

(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2005-535561

(P2005-535561A)

(43) 公表日 平成17年11月24日(2005.11.24)

(51) Int.Cl.⁷

C07K 14/575
A61K 38/00
A61K 38/28
A61P 1/04
A61P 1/16

F I

C O 7 K 14/575 Z N A
 A 6 1 P 1/04
 A 6 1 P 1/16
 A 6 1 P 1/18
 A 6 1 P 3/04

テーマコード (参考)

2 G O 4 5
 4 B O 2 4
 4 B O 6 3
 4 B O 6 5
 4 C O 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 177 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-562152 (P2003-562152)
 (86) (22) 出願日 平成15年1月17日 (2003.1.17)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年9月14日 (2004.9.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/NZ2003/000002
 (87) 国際公開番号 W02003/062275
 (87) 国際公開日 平成15年7月31日 (2003.7.31)
 (31) 優先権主張番号 516706
 (32) 優先日 平成14年1月18日 (2002.1.18)
 (33) 優先権主張国 ニュージーランド (NZ)
 (31) 優先権主張番号 60/349,885
 (32) 優先日 平成14年1月18日 (2002.1.18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 523411
 (32) 優先日 平成14年12月23日 (2002.12.23)
 (33) 優先権主張国 ニュージーランド (NZ)

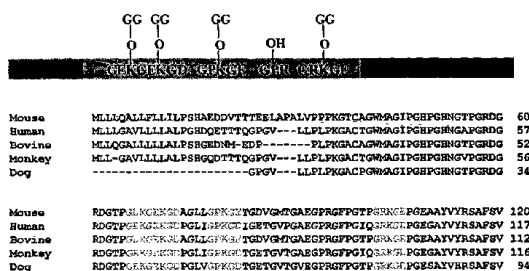
(71) 出願人 501487003
 プロテミックス コーポレイション リミ
 ティド
 ニュージーランド国, オークランド, クイ
 ーン ストリート 151, レベル 28
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次
 (74) 代理人 100117019
 弁理士 渡辺 陽一
 (74) 代理人 100082898
 弁理士 西山 雅也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アディポネクチンのグリコアイソフォームとその使用

(57) 【要約】

アディポネクチンポリペプチド (特にグリコシル化されているものであって、好ましくはリシン残基65、68、77及び101においてなされているものであり、且つヒトアディポネクチンに対応するもの、そして特にプロリン91でヒドロキシル化されているもの) が、広範の症状の処置に有効であることを示した。関連組成物、使用及び方法も開示する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

グリコシル化され、且つ組換え体であるか、単離され、精製され又は合成されているアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 2】

ヒトアディポネクチンである請求項1に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 3】

ヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するプロリル残基がヒドロキシル化されているか又はヒドロキシル化されていない請求項1又は請求項2に記載のアディポネクチンポリペプチド。

10

【請求項 4】

ヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するプロリル残基がヒドロキシル化されている請求項3に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 5】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上のリシン残基がグリコシル化されている請求項4に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 6】

グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による請求項5に記載のアディポネクチンポリペプチド。

20

【請求項 7】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する2以上のリシン残基がグリコシル化されている請求項4に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 8】

グリコシル化が、グルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による請求項7に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 9】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する3以上のリシン残基がグリコシル化されている請求項4に記載のアディポネクチンポリペプチド。

30

【請求項 10】

グリコシル化が、グルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による請求項9に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 11】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する4つすべてのリシン残基がグリコシル化されている請求項4に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 12】

グリコシル化が、グルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による請求項11に記載のアディポネクチンポリペプチド。

40

【請求項 13】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65に対応する位置に -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン残基を有する請求項5に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 14】

ヒトアディポネクチンのリシン残基68に対応する位置に -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン残基を有する請求項13に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 15】

ヒトアディポネクチンのリシン残基77に対応する位置に -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン残基を有する請求項13に記載のアディポネクチンポリペプチド。

50

【請求項 16】

ヒトアディポネクチンのリシン残基101に対応する位置に -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン残基を有する請求項13に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 17】

ヒトアディポネクチンのリシン残基77に対応する位置に -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン残基を有する請求項14に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 18】

ヒトアディポネクチンのリシン残基101に対応する位置に -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン残基を有する請求項17に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 19】

ヒトアディポネクチンのリシン残基101に対応する位置に -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン残基を有する請求項14に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 20】

ヒトアディポネクチンのリシン残基101に対応する位置に -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン残基を有する請求項15に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 21】

ヒトアディポネクチンのリシン残基68に対応する位置に -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン残基を有する請求項5に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 22】

ヒトアディポネクチンのリシン残基77に対応する位置に -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン残基を有する請求項21に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 23】

ヒトアディポネクチンのリシン残基101に対応する位置に -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン残基を有する請求項22に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 24】

ヒトアディポネクチンのリシン残基101に対応する位置に -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン残基を有する請求項21に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 25】

ヒトアディポネクチンのリシン残基77に対応する位置に -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン残基を有する請求項5に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 26】

ヒトアディポネクチンのリシン残基101に対応する位置に -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン残基を有する請求項25に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 27】

ヒトアディポネクチンのリシン残基101に対応する位置に -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン残基を有する請求項5に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 28】

ヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するプロリル残基がヒドロキシル化されていない請求項3に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 29】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上のリシン残基がグリコシル化されている請求項28に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 30】

グリコシル化が、グルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による請求項29に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 31】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する2以上のリシン残基がグリコシル化されている請求項28に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 32】

10

20

30

40

50

グリコシル化が、グルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による請求項31に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 3 3】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する3以上のリシン残基がグリコシル化されている請求項28に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 3 4】

グリコシル化が、グルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による請求項33に記載のアディポネクチンポリペプチド。

10

【請求項 3 5】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する4つすべてのリシン残基がグリコシル化されている請求項28に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 3 6】

グリコシル化が、グルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による請求項35に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 3 7】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65に対応する位置に -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン残基を有する請求項29に記載のアディポネクチンポリペプチド。

20

【請求項 3 8】

ヒトアディポネクチンのリシン残基68に対応する位置に -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン残基を有する請求項37に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 3 9】

ヒトアディポネクチンのリシン残基77に対応する位置に -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン残基を有する請求項37に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 4 0】

ヒトアディポネクチンのリシン残基101に対応する位置に -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン残基を有する請求項37に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 4 1】

30

ヒトアディポネクチンのリシン残基77に対応する位置に -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン残基を有する請求項38に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 4 2】

ヒトアディポネクチンのリシン残基101に対応する位置に -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン残基を有する請求項41に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 4 3】

ヒトアディポネクチンのリシン残基101に対応する位置に -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン残基を有する請求項38に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 4 4】

ヒトアディポネクチンのリシン残基101に対応する位置に -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン残基を有する請求項39に記載のアディポネクチンポリペプチド。

40

【請求項 4 5】

ヒトアディポネクチンのリシン残基68に対応する位置に -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン残基を有する請求項29に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 4 6】

ヒトアディポネクチンのリシン残基77に対応する位置に -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン残基を有する請求項45に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 4 7】

ヒトアディポネクチンのリシン残基101に対応する位置に -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン残基を有する請求項46に記載のアディポネクチンポリペプチド。

50

【請求項 48】

ヒトアディポネクチンのリシン残基101に対応する位置に -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン残基を有する請求項45に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 49】

ヒトアディポネクチンのリシン残基77に対応する位置に -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン残基を有する請求項29に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 50】

ヒトアディポネクチンのリシン残基101に対応する位置に -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン残基を有する請求項49に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 51】

ヒトアディポネクチンのリシン残基101に対応する位置に -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン残基を有する請求項29に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 52】

Lys-65、68、77及び101がどれもヒドロキシル化体である請求項2に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 53】

リシン残基65、68、77及び101のそれぞれに1以上の糖部分を有する請求項2に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 54】

グリコシル化が単一の糖部分による請求項52に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 55】

グリコシル化が複数の糖部分による請求項52に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 56】

リシン残基65、68、77及び101のそれぞれに1以上のグルコシルガラクトシル部分又はガラクトシルグルコシル部分を有する請求項2に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 57】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上のリシン残基X1構造を有し、且つ各X1がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルガラクトシル部分及びガラクトシルグルコシル部分のうち1つまたは複数より独立に選択される請求項1に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 58】

リシン残基65、68、77及び101のすべてに構造X1を有する請求項57に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 59】

アイソフォーム3である請求項1に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 60】

アイソフォーム4である請求項1に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 61】

アイソフォーム5である請求項1に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 62】

アイソフォーム6である請求項1に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 63】

医薬として許容される賦形剤、補助剤又は希釈剤からなる1つ又は複数の群と調合して哺乳動物患者への投与に適するようにした請求項1に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 64】

ヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する位置にヒドロキシプロリル残基を有し、且つ組換え体であるか、単離され、精製され又は合成されているアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 65】

10

20

30

40

50

医薬として許容される賦形剤、補助剤又は希釈剤からなる1つ又は複数の群と調合して哺乳動物患者への投与に適するようにした請求項64に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項66】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する各残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンである、医薬組成物としてのアディポネクチンポリペプチド。

【請求項67】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する各残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンではない、医薬投与単位としてのアディポネクチンポリペプチド。

【請求項68】

グリコシル化され、且つ組換え体であるか、単離され、精製され又は合成されているアディポネクチンポリペプチドを含む組成物。

【請求項69】

アディポネクチンポリペプチドはヒトアディポネクチンである請求項68に記載の組成物。

【請求項70】

哺乳動物患者への投与に適するように、他の医薬として許容される賦形剤、補助剤、希釈剤等と共に、又は単独で、調製した請求項68又は請求項69に記載の組成物。

【請求項71】

ヒトアディポネクチンの残基91に対応するアディポネクチンポリペプチドの残基がヒドロキシプロリンである請求項70に記載の組成物。

【請求項72】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上のリシン残基がグリコシル化されている請求項71に記載の組成物。

【請求項73】

グリコシル化が、グルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による請求項72に記載の組成物。

【請求項74】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する2以上のリシン残基がグリコシル化されている請求項71に記載の組成物。

【請求項75】

グリコシル化が、グルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による請求項74に記載の組成物。

【請求項76】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する3以上のリシン残基がグリコシル化されている請求項71に記載の組成物。

【請求項77】

グリコシル化が、グルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による請求項76に記載の組成物。

【請求項78】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する4つすべてのリシン残基がグリコシル化されている請求項71に記載の組成物。

【請求項79】

10

20

30

40

50

グリコシル化はグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による請求項78に記載の組成物。

【請求項80】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する各残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンである請求項71に記載の組成物。

【請求項81】

ヒトアディポネクチンの残基91に対応するアディポネクチンポリペプチドの残基がヒドロキシプロリンではない請求項70に記載の組成物。

【請求項82】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上のリシン残基がグリコシル化されている請求項81に記載の組成物。

【請求項83】

グリコシルが、グルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による請求項82に記載の組成物。

【請求項84】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する2以上のリシン残基がグリコシル化されている請求項81に記載の組成物。

【請求項85】

グリコシル化が、グルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による請求項84に記載の組成物。

【請求項86】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する3以上のリシン残基がグリコシル化されている請求項81に記載の組成物。

【請求項87】

グリコシル化はグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による請求項86に記載の組成物。

【請求項88】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する4つすべてのリシン残基がグリコシル化されている請求項81に記載の組成物。

【請求項89】

グリコシル化が、グルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による請求項88に記載の組成物。

【請求項90】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する各残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンである請求項81に記載の組成物。

【請求項91】

Lys-65、68、77及び101はどれもヒドロキシ化されている請求項68に記載の組成物。

【請求項92】

アディポネクチンポリペプチドはリシン残基65、68、77及び101のそれぞれに1以上の糖部分を含む請求項68に記載の組成物。

【請求項93】

グリコシル化が単一の糖部分による請求項91に記載の組成物。

【請求項94】

グリコシル化が複数の糖部分による請求項91に記載の組成物。

【請求項95】

10

20

30

40

50

アディポネクチンポリペプチドはリシン残基65、68、77及び101のそれぞれに1以上のグルコシルガラクトシル部分又はガラクトシルグルコシル部分を含む請求項68に記載の組成物。

【請求項96】

アディポネクチンポリペプチドがヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上のリシン残基に構造X1を有し、且つ各X1がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルガラクトシル部分及びガラクトシルグルコシル部分のうち1つまたは複数より独立に選択される請求項68に記載の組成物。

【請求項97】

アディポネクチンポリペプチドがリシン残基65、68、77及び101のすべてに構造X1を有する請求項96に記載の組成物。 10

【請求項98】

アディポネクチンポリペプチドが天然の哺乳動物アディポネクチンポリペプチドの配列を有する請求項68に記載の組成物。

【請求項99】

1以上の非グリコシル化アディポネクチンポリペプチドアイソフォームを実質的に欠くアディポネクチンポリペプチドを含む組成物。

【請求項100】

アイソフォーム1を実質的に欠く請求項99に記載の組成物。

【請求項101】

アイソフォーム2を実質的に欠く請求項99に記載の組成物。 20

【請求項102】

一切の非グリコシル化アディポネクチンポリペプチドアイソフォームを実質的に欠く請求項99に記載の組成物。

【請求項103】

支配的なアディポネクチンポリペプチド分子種が完全にグリコシル化されている、アディポネクチンポリペプチドを含む組成物。

【請求項104】

Lys-65、68、77及び101がすべてグリコシル化されている請求項103に記載の組成物。

【請求項105】

複数のアディポネクチンポリペプチドアイソフォームを含む請求項103に記載の組成物。 30

【請求項106】

アイソフォーム3が組成物において支配的なアディポネクチンポリペプチドである請求項103に記載の組成物。

【請求項107】

アイソフォーム4が組成物において支配的なアディポネクチンポリペプチドである請求項103に記載の組成物。

【請求項108】

アイソフォーム5が組成物において支配的なアディポネクチンポリペプチドである請求項103に記載の組成物。 40

【請求項109】

アイソフォーム6が組成物において支配的なアディポネクチンポリペプチドである請求項103に記載の組成物。

【請求項110】

哺乳動物に投与するとインスリンの効果を増強する請求項68に記載の組成物。

【請求項111】

生理的濃度範囲を下回る血中インスリン濃度をして正常な生理的血中インスリン濃度並みの生物学的効果を誘発することを可能ならしめる効力を有する請求項68に記載の組成物。 50

【請求項 1 1 2】

インスリンを追加的に含む請求項110又は請求項111に記載の組成物。

【請求項 1 1 3】

インスリンが約50pM～約400pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る量又は濃度で存在する請求項112に記載の組成物。

【請求項 1 1 4】

インスリンが約100pM～約300pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る量又は濃度で存在する請求項113に記載の組成物。

【請求項 1 1 5】

インスリンが約200pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る量又は濃度で存在する請求項114に記載の組成物。

【請求項 1 1 6】

個体に投与したときに糖新生を阻害するグリコシル化アディポネクチンポリペプチドの組成物。

【請求項 1 1 7】

1μg/mL～20μg/mLの血漿アディポネクチンポリペプチド濃度を誘発する効果をもつ請求項68に記載の組成物。

【請求項 1 1 8】

1.9μg/mL～17μg/mLの血漿アディポネクチンポリペプチド濃度を誘発する効果をもつ請求項117に記載の組成物。

【請求項 1 1 9】

純度が約50%以上である請求項1に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 1 2 0】

純度が約80%以上である請求項1に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 1 2 1】

純度が約90%以上である請求項1に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 1 2 2】

純度が約95%以上である請求項1に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 1 2 3】

純度が約99%以上である請求項1に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 1 2 4】

純度が約50%以上である請求項66に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 1 2 5】

純度が約80%以上である請求項66に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 1 2 6】

純度が約90%以上である請求項66に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 1 2 7】

純度が約95%以上である請求項66に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 1 2 8】

純度が約99%以上である請求項66に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 1 2 9】

純度が約50%以上である請求項67に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 1 3 0】

純度が約80%以上である請求項67に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 1 3 1】

純度が約90%以上である請求項67に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 1 3 2】

純度が約95%以上である請求項67に記載のアディポネクチンポリペプチド。

【請求項 1 3 3】

純度が約99%以上である請求項67に記載のアディポネクチンポリペプチド。

10

20

30

40

50

【請求項 1 3 4】

個体を対象に病状の存在又は病状を発現しやすい素因を診断する方法であって、該個体のある特定アディポネクチンポリペプチドアイソフォームのレベル又は2以上のグリコシル化アディポネクチンポリペプチドアイソフォームの発現プロファイルを決定するステップ及び該発現プロファイルを、該病状を患っていない個体に特有の発現プロファイルと比較し、発現プロファイルの差異から該病状の存在又は該病状を発現しやすい素因を読み取るステップを含む方法。

【請求項 1 3 5】

使用する任意の1つ又は複数のアディポネクチンポリペプチドアイソフォームが請求項1に記載のグリコシル化アディポネクチンポリペプチドである請求項134に記載の方法。

10

【請求項 1 3 6】

使用する任意の1つ又は複数のアディポネクチンポリペプチドアイソフォームがヒトアディポネクチンである請求項134に記載の方法。

【請求項 1 3 7】

個体がヒトである請求項135又は請求項136に記載の方法。

【請求項 1 3 8】

病状が高血糖症、インスリン抵抗性、インスリン抵抗性に関連する代謝症候群、II型糖尿病、又は肥満症、高血圧を含む代謝症候群、動脈硬化症、冠状動脈性心臓病、虚血性心疾患又は多嚢胞性卵巣症候群である請求項134に記載の方法。

【請求項 1 3 9】

アディポネクチンポリペプチドが生体試料から得られる請求項134に記載の方法。

20

【請求項 1 4 0】

レベル又は発現パターンがグリコシル化アディポネクチンポリペプチドアイソフォームの発現パターンを定量又は評価することによって得られる請求項134に記載の方法。

【請求項 1 4 1】

評価方法が電気泳動、HPLC又は質量分析を用いる請求項134に記載の方法。

【請求項 1 4 2】

レベル又は発現パターンがグリコシル化アディポネクチンポリペプチドアイソフォームに対して特異的な抗体を使用して定量又は評価される請求項140に記載の方法。

【請求項 1 4 3】

個体を対象に病状の存在又は病状を発現しやすい素因を診断する方法であって、該個体のある特定アディポネクチンポリペプチドアイソフォームのレベル又は2以上のグリコシル化アディポネクチンポリペプチドアイソフォームの発現プロファイルを決定するステップ及び該発現プロファイルを、該病状を患っている個体に特有の発現プロファイルと比較し、発現プロファイルの類似性から該病状の存在又は該病状を発現しやすい素因を読み取るステップを含む方法。

30

【請求項 1 4 4】

使用する任意の1つ又は複数のアディポネクチンポリペプチドアイソフォームが請求項1に記載のグリコシル化アディポネクチンポリペプチドである請求項143に記載の方法。

【請求項 1 4 5】

使用する任意の1つ又は複数のアディポネクチンポリペプチドアイソフォームがヒトアディポネクチンである請求項143に記載の方法。

40

【請求項 1 4 6】

個体がヒトである請求項144又は請求項145に記載の方法。

【請求項 1 4 7】

病状が高血糖症、インスリン抵抗性、インスリン抵抗性に関連する代謝症候群、II型糖尿病、又は肥満症、高血圧を含む代謝症候群、動脈硬化症、冠状動脈性心臓病、虚血性心疾患又は多嚢胞性卵巣症候群である請求項143に記載の方法。

【請求項 1 4 8】

アディポネクチンポリペプチドが生体試料から得られる請求項143に記載の方法。

50

【請求項 149】

レベル又は発現パターンがグリコシル化アディポネクチンポリペプチドアイソフォームの発現パターンを定量又は評価することによって得られる請求項143に記載の方法。

【請求項 150】

評価方法が電気泳動、HPLC又は質量分析を用いる請求項143に記載の方法。

【請求項 151】

レベル又は発現パターンがグリコシル化アディポネクチンポリペプチドアイソフォームに対して特異的な抗体を使用して定量又は評価される請求項149に記載の方法。

【請求項 152】

アディポネクチンポリペプチド調節又は異常インスリン感受性に関連する病状を処置する方法であって、有効量のグリコシル化アディポネクチンポリペプチドを、医薬として許容される賦形剤、補助剤、希釈剤等と共に、又は単独で、投与するステップを含む方法。

10

【請求項 153】

病状が高血糖症、インスリン抵抗性、インスリン抵抗性に関連する代謝症候群、II型糖尿病、又は肥満症、高血圧を含む代謝症候群、動脈硬化症、冠状動脈性心臓病、虚血性心疾患又は多嚢胞性卵巣症候群である請求項152に記載の方法。

【請求項 154】

グリコシル化アディポネクチンポリペプチドがヒトアディポネクチンである請求項152に記載の方法。

【請求項 155】

アディポネクチンポリペプチドが次のうちの1つ又は複数から選択される請求項152に記載の方法：

20

i) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

ii) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、i)に定義したアディポネクチンポリペプチド

iii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する2以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

iv) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、iii)に定義したアディポネクチンポリペプチド

30

v) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する3以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

vi) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、v)に定義したアディポネクチンポリペプチド

vii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する4つすべてのリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

viii) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、vii)に定義したアディポネクチンポリペプチド

40

ix) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンであるアディポネクチンポリペプチド、及び

x) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンではないアディポネクチンポリペプチド。

50

【請求項 156】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応するアディポネクチンポリペプチドの各残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンである請求項152に記載の方法。

【請求項 157】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応するアディポネクチンポリペプチドの各残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンでない請求項152に記載の方法。

10

【請求項 158】

アディポネクチンポリペプチド調節又は異常インスリン感受性に関連する病状を処置する方法であって、有効量の請求項68に記載の組成物を、医薬として許容される賦形剤、補助剤、希釈剤等と共に、又は単独で、投与するステップを含む方法。

【請求項 159】

病状が高血糖症、インスリン抵抗性、インスリン抵抗性に関連する代謝症候群、II型糖尿病、又は肥満症、高血圧を含む代謝症候群、動脈硬化症、冠状動脈性心臓病、虚血性心疾患又は多嚢胞性卵巣症候群である請求項158に記載の方法。

【請求項 160】

哺乳動物患者の

20

- i) アディポネクチンポリペプチド調節に関連する病状の処置、又は
- ii) インスリンの効果の増強、又は
- iii) 糖新生の阻害

に有効である医薬組成物又は薬物又は投与単位の調製への、グリコシル化アディポネクチンポリペプチドの(随意に医薬として許容される賦形剤、補助剤、希釈剤及び格納容器と一緒に)使用。

【請求項 161】

医薬組成物又は薬物又は投与単位がインスリンを追加的に含む請求項160に記載の使用。

【請求項 162】

インスリンが約50pM～約400pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る濃度である請求項161に記載の使用。

30

【請求項 163】

インスリンが約100pM～約300pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る濃度である請求項161に記載の使用。

【請求項 164】

インスリンが約200pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る濃度である請求項163に記載の使用。

【請求項 165】

グリコシル化アディポネクチンポリペプチドがヒトアディポネクチンである請求項160に記載の使用。

40

【請求項 166】

アディポネクチンポリペプチドが次のうちの1つ又は複数から選択される請求項160に記載の使用:

- i) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド
- ii) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、i)に定義したアディポネクチンポリペプチド
- iii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する2以上のリシン

50

残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

iv) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、iii)に定義したアディポネクチンポリペプチド

v) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する3以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

vi) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、v)に定義したアディポネクチンポリペプチド

vii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する4つすべてのリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

viii) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、vii)に定義したアディポネクチンポリペプチド

ix) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンであるアディポネクチンポリペプチド、及び

x) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンではないアディポネクチンポリペプチド。

10

20

【請求項167】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応するアディポネクチンポリペプチドの各残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンである請求項160に記載の使用。

【請求項168】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応するアディポネクチンポリペプチドの各残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンでない請求項160に記載の使用。

30

【請求項169】

少なくともグリコシル化アディポネクチンポリペプチドを入れた容器又は送達単位と、哺乳動物患者の

i) アディポネクチンポリペプチド調節に関連する病状の処置、又は

ii) インスリンの効果の増強、又は

iii) 糖新生の阻害

に有効である該グリコシル化アディポネクチンポリペプチドの使用説明書きとを含んで成る又は含む製造品。

40

【請求項170】

グリコシル化アディポネクチンポリペプチドがヒトアディポネクチンである請求項169に記載の物品。

【請求項171】

アディポネクチンポリペプチドが次のうちの1つ又は複数から選択される請求項169に記載の製造品：

i) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

ii) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数によ

50

る、i)に定義したアディポネクチンポリペプチド

iii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する2以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

iv) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、iii)に定義したアディポネクチンポリペプチド

v) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する3以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

vi) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、v)に定義したアディポネクチンポリペプチド

10

vii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する4つすべてのリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

viii) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、vii)に定義したアディポネクチンポリペプチド

ix) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンであるアディポネクチンポリペプチド、及び

20

x) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンではないアディポネクチンポリペプチド。

【請求項172】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応するアディポネクチンポリペプチドの各残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンである請求項169に記載の製造品。

【請求項173】

ヒト又は他の哺乳動物への投与又は自己投与時に、哺乳動物患者のアディポネクチンポリペプチド調節に関連する病状の処置への使用で効果をあげるに足る有効量のグリコシル化アディポネクチンポリペプチドを送達しうる製剤又は剤形。

30

【請求項174】

インスリンを追加的に含む請求項173に記載の製剤又は剤形。

【請求項175】

インスリンが約50pM～約400pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る濃度である請求項174に記載の製剤又は剤形。

【請求項176】

インスリンが約100pM～約300pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る濃度である請求項174に記載の製剤又は剤形。

40

【請求項177】

インスリンが約200pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る濃度である請求項176に記載の製剤又は剤形。

【請求項178】

グリコシル化アディポネクチンポリペプチドがヒトアディポネクチンである請求項173に記載の製剤又は剤形。

【請求項179】

アディポネクチンポリペプチドが次のうちの1つ又は複数から選択される請求項173に記載の製剤又は剤形：

50

i) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

ii) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、i)に定義したアディポネクチンポリペプチド

iii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する2以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

iv) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、iii)に定義したアディポネクチンポリペプチド

v) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する3以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

vi) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、v)に定義したアディポネクチンポリペプチド

vii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する4つすべてのリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

viii) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、vii)に定義したアディポネクチンポリペプチド

ix) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンであるアディポネクチンポリペプチド、及び

x) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンではないアディポネクチンポリペプチド。

【請求項180】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチンポリペプチドの各残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンである請求項173に記載の製剤又は剤形。

【請求項181】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチンポリペプチドの各残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンでない請求項173に記載の製剤又は剤形。

【請求項182】

ヒト又は他の哺乳動物への投与又は自己投与時にインスリンの効果を増強するに足る有効量のグリコシル化アディポネクチンポリペプチドを送達しうる製剤又は剤形。

【請求項183】

アディポネクチンポリペプチドはヒトアディポネクチンである請求項182に記載の製剤又は剤形。

【請求項184】

アディポネクチンポリペプチドが次のうちの1つ又は複数から選択される請求項183に記載の製剤又は剤形：

i) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

ii) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラ

10

20

30

40

50

クトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、i)に定義したアディポネクチンポリペプチド

iii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する2以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

iv) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、iii)に定義したアディポネクチンポリペプチド

v) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する3以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

vi) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、v)に定義したアディポネクチンポリペプチド

vii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する4つすべてのリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

viii) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、vii)に定義したアディポネクチンポリペプチド

ix) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が α -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンであるアディポネクチンポリペプチド、及び

x) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が α -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンではないアディポネクチンポリペプチド。

【請求項185】

ヒト又は他の哺乳動物への投与又は自己投与時にインスリンの効果を増強するに足る有効量のグリコシル化アディポネクチンポリペプチドを送達しうる製剤又は剤形であって、該アディポネクチンポリペプチドはグリコシル化されている製剤又は剤形。

【請求項186】

インスリンを追加的に含む請求項185に記載の製剤又は剤形。

【請求項187】

インスリンが約50pM～約400pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る濃度である請求項186に記載の製剤又は剤形。

【請求項188】

インスリンが約200pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る濃度である請求項187に記載の製剤又は剤形。

【請求項189】

ヒト又は他の哺乳動物への投与又は自己投与時に糖新生を阻害するに足る有効量のグリコシル化アディポネクチンポリペプチドを送達しうる製剤又は剤形。

【請求項190】

アディポネクチンポリペプチドが組換え体であるが、単離され、生成され又は合成されている請求項189に記載の製剤又は剤形。

【請求項191】

アディポネクチンポリペプチドがヒトアディポネクチンである請求項190に記載の製剤又は剤形。

【請求項192】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応するアディポネクチンポリペプチドの1以上のリシン残基がグリコシル化されている請求項191に記載の製剤又は剤形。

10

20

30

40

50

【請求項 193】

ヒト又は他の哺乳動物への投与又は自己投与時にインスリンの効果を増強するに足る有効量のグリコシル化アディポネクチンポリペプチドを送達しうる製剤又は剤形であって、該アディポネクチンポリペプチドがグリコシル化されている製剤又は剤形。

【請求項 194】

インスリンを追加的に含む請求項193に記載の製剤又は剤形。

【請求項 195】

インスリンが約50pM～約400pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る濃度である請求項194に記載の製剤又は剤形。

【請求項 196】

インスリンが約200pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る濃度である請求項195に記載の製剤又は剤形。

【請求項 197】

d. アディポネクチンポリペプチド調節に関連する症状

e. インスリンの増強を必要とする症状、又は

f. 糖新生の障害を必要とする症状、

に陥りやすい又は陥っている哺乳動物個体の処置をモニタリングする方法であって、

(A) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応するアディポネクチンポリペプチドの1以上のグリコシル化リシン残基

(B) ヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するヒドロキシ化プロリン残基、及び

(C) (A)と(B)の両方

のうちの1つを有するグリコシル化アディポネクチンポリペプチドの存在量を増加させるべく該個体方法をモニタリングするステップを含んで成る又は含む方法。

【請求項 198】

使用する任意の1つ又は複数のアディポネクチンポリペプチドアイソフォームが、(C)を有する[すなわち(A)と(B)の両方を有する]グリコシル化アディポネクチンポリペプチドである請求項197に記載の方法。

【請求項 199】

使用する任意の1つ又は複数のアディポネクチンポリペプチドアイソフォームがヒトアディポネクチンである請求項197に記載の方法。

【請求項 200】

個体はヒトである請求項199に記載の方法。

【請求項 201】

症状が高血糖症、インスリン抵抗性、インスリン抵抗性に関連する代謝症候群、II型糖尿病、又は肥満症、高血圧を含む代謝症候群、動脈硬化症、冠状動脈性心臓病、虚血性心疾患又は多嚢胞性卵巣症候群である請求項197に記載の方法。

【請求項 202】

アディポネクチンポリペプチドが生体試料から得られる請求項197に記載の方法。

【請求項 203】

レベル又は発現パターンがグリコシル化アディポネクチンポリペプチドアイソフォームの発現パターンを定量又は評価することによって得られる請求項197に記載の方法。

【請求項 204】

評価方法が電気泳動、HPLC又は質量分析を用いる請求項197に記載の方法。

【請求項 205】

レベル又は発現パターンがグリコシル化アディポネクチンポリペプチドアイソフォームに対して特異的な抗体を使用して定量又は評価される請求項203に記載の方法。

【請求項 206】

グリコシル化アディポネクチンポリペプチドを含んで成る組成物を調製する方法であって、

10

20

30

40

50

(a) グリコシル化の度合い又はタイプが異なる少なくとも2種類のアディポネクチンポリペプチドを含む第1組成物を獲得する、及び

(b) 該多種類のアディポネクチンポリペプチドを、少なくともある程度まではグリコシル化の度合い又はタイプに応じて分離し、もってアディポネクチンポリペプチドプロファイルが第1組成物とは異なる第2組成物を生成させる
ステップを含んで成る方法。

【請求項 2 0 7】

(A) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応するアディポネクチンポリペプチドの1以上のグリコシル化リシン残基

(B) ヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するヒドロキシル化プロリン残基、及び

(C) (A)と(B)の両方

を有するアディポネクチンポリペプチドを第2組成物中に濃縮するか又は少なくとも実質的に単離する請求項206に記載の方法。

【請求項 2 0 8】

アディポネクチンポリペプチドがアディポネクチンポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチドの哺乳動物細胞中での発現によって獲得される請求項206に記載の方法。

【請求項 2 0 9】

組換えポリヌクレオチドが図5に開示の配列をもつポリペプチド又はその生物活性断片又はその変異体をコードする請求項206に記載の方法。

【請求項 2 1 0】

アディポネクチンポリペプチドが動物組織から精製される請求項206に記載の方法。

【請求項 2 1 1】

動物がヒト、マウス、ラット、イヌ、ウシ、又はヒト以外の霊長類である請求項206に記載の方法。

【請求項 2 1 2】

組織が血清又は脂肪細胞である請求項206に記載の方法。

【請求項 2 1 3】

分離が電気泳動法を含む請求項206に記載の方法。

【請求項 2 1 4】

分離が電気泳動法を含まない請求項206に記載の方法。

【請求項 2 1 5】

分離がクロマトグラフィーを含む請求項206に記載の方法。

【請求項 2 1 6】

分離がクロマトグラフィーを含まない請求項206に記載の方法。

【請求項 2 1 7】

第2組成物が

(A) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチンポリペプチドの1以上のグリコシル化リシン残基

(B) ヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するヒドロキシル化プロリン残基、及び

(C) (A)と(B)の両方

のうち少なくとも1つを有するアディポネクチンポリペプチドの、または該アディポネクチンポリペプチドを含む、組成物である請求項206に記載の方法。

【請求項 2 1 8】

グリコシル化アディポネクチンポリペプチドを含む組成物を調製する方法によって調製される組成物であって、

(a) グリコシル化の度合い又はタイプが異なる少なくとも2種類のアディポネクチンポリペプチドを含む第1組成物を獲得する、及び

(b) 該多種類のアディポネクチンポリペプチドを、少なくともある程度まではグリコ

10

20

30

40

50

シル化の度合い又はタイプに応じて分離し、もってアディポネクチンポリペプチドプロファイルが第1組成物とは異なる第2組成物を生成させる
ステップを含む方法によって調製される組成物。

【請求項 2 1 9】

(A) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチンポリペプチドの1以上のグリコシル化リシン残基

(B) ヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するヒドロキシル化プロリル残基、及び

(C) (A)と(B)の両方

からなる群より選択されるグリコアイソフォームのアディポネクチンポリペプチドに対して特異的な抗体。 10

【請求項 2 2 0】

モノクローナル抗体である請求項219に記載の抗体。

【請求項 2 2 1】

2部位キャプチャーが可能である請求項219に記載の抗体。

【請求項 2 2 2】

(A) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチンポリペプチドの1以上のグリコシル化リシン残基

(B) ヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するヒドロキシル化プロリル残基、及び 20

(C) (A)と(B)の両方

からなる群より選択されるグリコアイソフォームのアディポネクチンポリペプチドに対して特異的な抗体を含む組成物。

【請求項 2 2 3】

(A) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチンポリペプチドの1以上のグリコシル化リシン残基

(B) ヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するヒドロキシル化プロリル残基、及び

(C) (A)と(B)の両方

からなる群より選択されるグリコアイソフォームのアディポネクチンポリペプチドに対して特異的な抗体の産生に対して特異的なハイブリドーマ。 30

【請求項 2 2 4】

(A) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチンポリペプチドの1以上のグリコシル化リシン残基

(B) ヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するヒドロキシル化プロリル残基、及び

(C) (A)と(B)の両方

のうち1つを有するグリコシル化アディポネクチンポリペプチドのレベルを哺乳動物において高めるために有用な物質をスクリーニングする方法であって、該哺乳動物又はその組織又は1つ又は複数の細胞に、又は不特定の哺乳動物に投与して、そうした哺乳動物又は哺乳動物組織又は1つ又は複数の細胞による該グリコシル化アディポネクチンポリペプチドの産生を増強させるステップを含む方法。 40

【請求項 2 2 5】

(A) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチンポリペプチドの1以上のグリコシル化リシン残基

(B) ヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するヒドロキシル化プロリル残基、及び

(C) (A)と(B)の両方

のうち1つを有するグリコシル化アディポネクチンポリペプチドのレベルを高めるための有用な物質であって、該哺乳動物又はその組織に、又は不特定の哺乳動物に投与して、そ 50

うした哺乳動物又は哺乳動物組織による該グリコシル化アディポネクチンポリペプチドの産生を増強させるステップを含むスクリーニング方法によって同定される物質。

【請求項 2 2 6】

アディポネクチンポリペプチドのアイソフォームの混合物であって、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上のリシン残基がグリコシル化され、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するプロリル残基がヒドロキシル化されているアイソフォームを、除去、変換又は合成により本質的構成要素とした、又は濃縮した混合物。

【請求項 2 2 7】

アディポネクチンポリペプチドのアイソフォームの混合物であって、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上のリシン残基がグリコシル化され、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するプロリル残基がヒドロキシル化されていないアイソフォームを、除去、変換又は合成により本質的構成要素とした、又は濃縮した混合物。

10

【請求項 2 2 8】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上のリシン残基がグリコシル化されているアイソフォームを、除去、変換又は合成により本質的構成要素とした、又は濃縮したアディポネクチンポリペプチドのアイソフォーム。

【請求項 2 2 9】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上のリシン残基がグリコシル化され、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する位置にヒドロキシプロリル残基をもつアイソフォームを(除去、変換又は合成により)本質的構成要素とした、又は濃縮したアディポネクチンポリペプチドのアイソフォーム。

20

【請求項 2 3 0】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上のリシン残基がグリコシル化され、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する位置にヒドロキシプロリル残基をもたないアイソフォームを(除去、変換又は合成により)本質的構成要素とした、又は濃縮したアディポネクチンポリペプチドのアイソフォーム。

【請求項 2 3 1】

グリコシル化アディポネクチンポリペプチドを発現することができる1つ又は複数の細胞をスクリーニングする方法であって、前記1又は複数の細胞によって発現される特定アディポネクチンポリペプチドアイソフォームのレベル又は2以上のグリコシル化アディポネクチンポリペプチド・アイソフォームの発現プロファイルを同定及び/又は決定するステップ及び前記1又は複数の細胞を同定及び/又は精製及び/又は単離するステップを含む方法。

30

【請求項 2 3 2】

グリコシル化アディポネクチンポリペプチドがヒトアディポネクチンである請求項231に記載の方法。

【請求項 2 3 3】

アディポネクチンポリペプチドが次のうちの1つ又は複数から選択される請求項231に記載の方法：

40

i) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

ii) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、i)に定義したアディポネクチンポリペプチド

iii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する2以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

iv) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数によ

50

る、iii)に定義したアディポネクチンポリペプチド

v) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する3以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

vi) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、v)に定義したアディポネクチンポリペプチド

vii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する4つすべてのリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

viii) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、vii)に定義したアディポネクチンポリペプチド

ix) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンであるアディポネクチンポリペプチド、及び

x) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンではないアディポネクチンポリペプチド。

10

【請求項234】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチンポリペプチドの各残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンである請求項231に記載の方法。

20

【請求項235】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチンポリペプチドの各残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンでない請求項231に記載の方法。

【請求項236】

任意の1アディポネクチンポリペプチドの同定及び/又は決定が

(A) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチンポリペプチドの1以上のグリコシル化リシン残基

(B) ヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するヒドロキシ化プロリン残基、及び

(C) (A)と(B)の両方

からなる群より選択されるアディポネクチンポリペプチドのグリコアイソフォームに対して特異的である抗体を使用する請求項231の方法。

30

【請求項237】

抗体がモノクローナル抗体である請求項236に記載の方法。

40

【請求項238】

抗体が、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する各残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンであるアディポネクチンポリペプチドに対して特異的である請求項236に記載の方法。

【請求項239】

抗体が、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する各残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンではないアディポネクチンポリペプチドに対して特異的である請求項236に記載の方法。

50

【請求項 2 4 0】

グリコシル化アディポネクチンポリペプチドを発現することができる1つ又は複数の細胞をスクリーニングする方法であって、前記1又は複数の細胞によって発現される特定アディポネクチンポリペプチドアイソフォームのレベル又は2以上のグリコシル化アディポネクチンポリペプチド・アイソフォームの発現プロファイルを同定及び/又は決定するステップ及び前記1又は複数の細胞を同定及び/又は精製及び/又は単離するステップを含む方法によって同定及び/又は単離及び/又は精製される任意の1つ又は複数の細胞。

【請求項 2 4 1】

肝疾患の素因がある及び/又は肝疾患の何らかの特徴を示す哺乳動物患者を処置する方法であって、該患者にアディポネクチン及び/又はそのアゴニストを投与するステップを含む方法。

10

【請求項 2 4 2】

哺乳動物がヒトであり、アディポネクチンがヒトアディポネクチンである請求項241に記載の方法。

【請求項 2 4 3】

アディポネクチンは完全長である請求項241又は242に記載の方法。

【請求項 2 4 4】

アディポネクチンはグリコシル化されている請求項241に記載の方法。

【請求項 2 4 5】

アディポネクチンはリシン残基65、68、77及び101に対応する1つ又は複数の残基でグリコシル化されたヒトアディポネクチンである請求項241に記載の方法。

20

【請求項 2 4 6】

アディポネクチン製剤を非経口投与に適した形に調製する請求項245に記載の方法。

【請求項 2 4 7】

アルコール性肝疾患の素因がある及び/又はアルコール性肝疾患の何らかの特徴を示す哺乳動物患者を処置する方法であって、該患者にアディポネクチン及び/又はそのアゴニストを投与するステップを含んで成る又は含む方法。

【請求項 2 4 8】

肝疾患及び/又は肝疾患の何らかの特徴を予防及び/又は逆転するための哺乳動物患者の処置方法であって、該患者にアディポネクチン及び/又はそのアゴニストを投与するステップを含む方法。

30

【請求項 2 4 9】

肝疾患の素因がある及び/又は肝疾患の何らかの特徴を示す哺乳動物患者を処置する方法であって、該患者に有効量のアディポネクチン及び/又はそのアゴニストを投与するステップを含む方法。

【請求項 2 5 0】

アルコール性肝疾患及び/又はアルコール性肝疾患の何らかの特徴を予防及び/又は逆転するための哺乳動物患者の処置方法であって、該患者にアディポネクチン及び/又はそのアゴニストを投与するステップを含んで成る又は含む方法。

【請求項 2 5 1】

アルコール性肝疾患の素因がある及び/又はアルコール性肝疾患の何らかの特徴を示す哺乳動物患者を処置する方法であって、該患者に有効量のアディポネクチン及び/又はそのアゴニストを投与するステップを含む方法。

40

【請求項 2 5 2】

肝脂肪症(脂肪浸潤)、肝炎、肝壊死、肝線維症、肝硬変症及び/又は肝機能障害のいずれ1つ又は複数の疾患の素因がある哺乳動物患者を処置する方法であって、該患者にアディポネクチン及び/又はそのアゴニストを投与するステップを含んで成る又は含む方法。

【請求項 2 5 3】

製造品であって、

アディポネクチン及び/又はアディポネクチンアゴニストを入れた容器；及び

50

肝疾患及び/又は肝疾患の任意の特徴を処置、予防又は逆転するためのアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストの(たとえば該容器に入れた状態での)使用に関する説明書き

を含んで成る又は含む製造品。

【請求項 2 5 4】

製造品であって、

アディポネクチン及び/又はアディポネクチンアゴニストを入れた容器；及び

アルコール性肝疾患及び/又はアルコール性肝疾患の任意の特徴を処置、予防又は逆転するためのアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストの(たとえば該容器に入れた状態での)使用に関する説明書き

を含んで成る又は含む製造品。

10

【請求項 2 5 5】

製造品であって、

アディポネクチン及び/又はアディポネクチンアゴニストを入れた包装資材；及び

肝疾患及び/又は肝疾患の任意の特徴を処置、予防又は逆転するためのアディポネクチン及び/又はアディポネクチンアゴニストの(たとえば該包装資材に入れた状態での)使用に関する説明書き

を含んで成る又は含む製造品。

【請求項 2 5 6】

製造品であって、

アディポネクチン及び/又はアディポネクチンアゴニストを入れた包装資材；及び

アルコール性肝疾患及び/又はアルコール性肝疾患の任意の特徴を処置、予防又は逆転するためのアディポネクチン及び/又はアディポネクチンアゴニストの(たとえば該包装資材に入れた状態での)使用に関する説明書き

を含んで成る又は含む製造品。

20

【請求項 2 5 7】

(ヒトであれヒト以外であれ)哺乳動物患者の肝疾患及び/又は肝疾患の任意の特徴の処置、予防及び/又は逆転への使用に有効な投与単位又は医薬組成物の製造への、アディポネクチン及び/又はアディポネクチンアゴニストの、(賦形剤、補助剤、希釈剤等であれ投与単位を規定する容器であれ)他の一又は複数の材料と一緒にの使用。

30

【請求項 2 5 8】

(ヒトであれヒト以外であれ)哺乳動物患者のアルコール性肝疾患及び/又はアルコール性肝疾患の任意の特徴の処置、予防及び/又は逆転への使用に有効な投与単位又は医薬組成物の製造への、アディポネクチン及び/又はアディポネクチンアゴニストの、(賦形剤、補助剤、希釈剤等であれ投与単位を規定する容器であれ)他の一又は複数の材料と一緒にの使用。

【請求項 2 5 9】

哺乳動物患者の(アルコール性肝疾患を含む)肝疾患及び/又は肝疾患の任意の特徴を処置、逆転又は予防するための処置方法であって、該哺乳動物患者のアディポネクチンをモニターするステップ及び/又は該哺乳動物にアディポネクチン及び/又はそのアゴニストを投与するステップを任意の順序で含む又は含んで成る方法。

40

【請求項 2 6 0】

哺乳動物患者はヒトである請求項259に記載の方法。

【請求項 2 6 1】

哺乳動物患者の(アルコール性肝疾患を含む)肝疾患及び/又は肝疾患の任意の特徴を処置、逆転又は予防するための処置方法であって、該哺乳動物患者のアディポネクチンmRNAをモニターするステップ及び/又は該哺乳動物にアディポネクチン及び/又はそのアゴニストを投与するステップを任意の順序で含む又は含んで成る方法。

【請求項 2 6 2】

哺乳動物患者はヒトである請求項261に記載の方法。

50

【請求項 2 6 3】

哺乳動物患者のアディポネクチンを測定する方法であって、血液又は組織中のアディポネクチン濃度をアッセイするステップを含んで成る又は含む方法。

【請求項 2 6 4】

濃度が放射線イムノアッセイ (RIA) 及び/又は ELISA などの免疫学的方法によって決定される請求項 263 に記載の方法。

【請求項 2 6 5】

組織が脂肪組織である請求項 263 に記載の方法。

【請求項 2 6 6】

哺乳動物患者のアディポネクチンを測定する方法であって、血液又は組織中のアディポネクチン mRNA 濃度をアッセイするステップを含んで成る又は含む方法。

【請求項 2 6 7】

アディポネクチン mRNA 濃度が RT-PCR、ノーザン法、in situ ハイブリダイゼーション及び/又は放射線イムノアッセイ (RIA) 法によって決定される、請求項 266 に記載の方法。

【請求項 2 6 8】

組織は脂肪組織である請求項 266 に記載の方法。

【請求項 2 6 9】

哺乳動物患者のアディポネクチンを測定することができるアッセイであって、該哺乳動物患者から血液又は組織試料を単離するステップ、試料を調製するステップ、血液又は組織中のアディポネクチン濃度をアッセイするステップを含んで成る又は含むアッセイ。

【請求項 2 7 0】

濃度が放射線イムノアッセイ (RIA) 及び/又は ELISA などの免疫学的方法によって決定される、請求項 269 に記載の方法。

【請求項 2 7 1】

急性肝疾患、慢性肝疾患、肝臓の炎症、肝臓の機能障害、脂肪肝 (肝脂肪症)、肝線維症、肝硬変症、肝臓の壊死、肝細胞壊死、アルコール性肝疾患、アルコール性肝脂肪症、アルコール性肝炎、アルコール性肝壊死、アルコール性肝硬変症、肝壊死、肝脂肪症、糖尿病に合併する肝脂肪症、高脂肪食に関連する肝脂肪症、脂質代謝異常に関連する肝脂肪症、任意の状態に起因する肝炎、任意の状態に起因する肝壊死、急性肝炎、慢性肝炎、慢性活動性肝炎、ウイルス感染症または肝臓の炎症に続発する肝炎、A 型肝炎、B 型肝炎、C 型肝炎、D 型肝炎、E 型肝炎、G 型肝炎、任意の薬物又は毒素の作用に関連する肝炎、胆汁うっ滞に関連する肝炎又は肝機能障害、原発性胆汁性肝硬変症、肝肉芽腫症、及び/又は高組織又は血中濃度の腫瘍壊死因子が病因となっているような状態より選択される任意の状態への素因をもつ哺乳動物患者を処置する方法であって、該患者にアディポネクチン及び/又はそのアゴニストを投与するステップを含んで成る又は含む方法。

【請求項 2 7 2】

患者がヒトであり、アディポネクチンがヒトアディポネクチンである請求項 271 に記載の方法。

【請求項 2 7 3】

アディポネクチンが完全長である請求項 271 に記載の方法。

【請求項 2 7 4】

アディポネクチンがグリコシル化されている請求項 271 に記載の方法。

【請求項 2 7 5】

アディポネクチンをなお自らコードすることができる哺乳動物患者を処置する方法であって、アディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを該患者に十分に投与して、TNF- α レベルをそのような投与なしに存在していたであろう又はおそらく存在していたであろうものよりも低く抑えるようにするステップを含む方法。

【請求項 2 7 6】

投与の目的が TNF- α 疾患又は障害及び/又は TNF- α 疾患又は障害の何らかの特徴を処置、緩和、予防及び/又は逆転することである請求項 275 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 277】

哺乳動物がヒトであり、またアディポネクチンがヒトアディポネクチンである請求項275に記載の方法。

【請求項 278】

アディポネクチンは完全長である請求項275に記載の方法。

【請求項 279】

アディポネクチンがグリコシル化されている請求項275に記載の方法。

【請求項 280】

アディポネクチンがリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたヒトアディポネクチンである請求項279に記載の方法。

10

【請求項 281】

アディポネクチンをなお自らコードすることができる哺乳動物患者を処置する方法であって、アディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを該患者に十分に投与して、TNF- α レベルをそのような投与なしに存在していたであろう又はおそらく存在していたであろうものよりも低く抑えるようにし、もって次のうちいずれか1つ又は複数の症状に関して有利な反応を誘発するステップを含む方法：炎症性疾患、循環器系疾患、門脈圧亢進症、肺高血圧症、アレルギー性疾患、クローン病、自己免疫性溶血性貧血、乾癬、肝疾患、脾疾患、神経変性病、中枢神経障害、毒素血症、更年期障害、妊娠中毒症、脂肪過多症、高脂質血症、高コレステロール血症、耐糖能異常、充実性腫瘍、がん腫と付随の悪液質、内分泌疾患、クロイツフェルト-ヤコブ病、ウイルス感染症、経皮術後冠動脈血管形成術、血管肥大又は閉塞、PTCA/ステント/バイパス手術後血管再閉塞/再狭窄、介入後血管肥大又は閉塞、移植誘発性血管障害及び拒絶反応の抑制、臓器又は組織移植及び自己免疫疾患に続く拒絶反応の発現、腫瘍の処置及び拒絶反応の処置予防に関連するショック関連症状を解消又は緩和するためのTNF生成に関連する副作用、透析性低血圧症、緑内障、高眼圧、重症筋無力症、慢性疲労、骨の病気、神経障害(個別神経、神経根、脊髄及び/又は脳への外傷、傷害、圧迫を含む)、TNF- α 誘発インスリン抵抗性、細胞死異常、糖尿病又はストレス高血糖症の合併症、慢性閉塞性肺疾患、慢性気管支炎及び気腫。

20

【請求項 282】

アディポネクチンをなお自らコードすることができる哺乳動物患者を処置する方法であって、アディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを該患者に十分に投与して、TNF- α mRNAレベルをそのような投与なしに存在していたであろう又はおそらく存在していたであろうものよりも低く抑えるようにするステップを含む方法。

30

【請求項 283】

投与の目的がTNF- α 疾患又は障害及び/又はTNF- α 疾患又は障害の何らかの特徴を処置、緩和、予防及び/又は逆転することである請求項282に記載の方法。

【請求項 284】

哺乳動物がヒトであり、且つアディポネクチンがヒトアディポネクチンである請求項282に記載の方法。

【請求項 285】

アディポネクチンが完全長である請求項282に記載の方法。

40

【請求項 286】

アディポネクチンがグリコシル化されている請求項282に記載の方法。

【請求項 287】

アディポネクチンがリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたヒトアディポネクチンである請求項286に記載の方法。

【請求項 288】

アディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアンタゴニストの製造における使用であって、TNF- α レベルを投与なしに存在していたであろう又はおそらく存在していたであろうものよりも低く抑えるための、他の1又は複数の材料と一緒に使用。

50

【請求項 289】

TNF- 疾患又は障害及び/又はTNF- 疾患又は障害の何らかの特徴の処置、緩和、予防及び/又は逆転への使用に有効な剤形又は医薬組成物の製造への、アディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストの、(賦形剤、補助剤、希釈剤等であれ、投与単位を規定する容器であれ)他の1又は複数の材料と一緒に、使用。

【請求項 290】

製造品であって、
アディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを入れた容器；
TNF- 濃度を投与前又は投与しなかった場合に想定される濃度よりも低く抑えるための使用に有効であるアディポネクチン又はアディポネクチン作用部位のアゴニストの(たとえば該容器に入れた状態での)使用に関する説明書きを含む製造品。 10

【請求項 291】

製造品であって、
アディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを入れた容器；
TNF- 疾患又は障害及び/又はTNF- 疾患又は障害の何らかの特徴の処置、緩和、予防及び/又は逆転への使用に有効であるアディポネクチン又はアディポネクチン作用部位のアゴニストの(たとえば該容器に入れた状態での)使用に関する説明書きを含む製造品。

【発明の詳細な説明】 20

【技術分野】

【0001】

本発明は一般に代謝(特に非限定的ながらグルコース代謝)及びアディポネクチン(特に非限定的ながらアディポネクチンのグリコアイソフォーム)によるその調節に関する。

【背景技術】

【0002】

本明細書中の参照番号付き出版物は明細書末尾の参考文献リストに対応する。

【0003】

アディポネクチン(別名: ACRP30、AdipoQ又はGBP28)はもっぱら脂肪細胞から分泌されるタンパク質であり、当初4研究グループが別個の方法でクローニングした。たとえばSch 30
erer, P.E. et al., Journal of Biological Chemistry 270(45): 26746-26749 (1995);
Nakano, Y. et al., Journal of Biochemistry 120(4): 803-12 (1996); Hu, E. et al.,
Journal of Biological Chemistry 271(18): 10697-10703 (1996); and Maeda, K. et al.,
Biochemical & Biophysical Research Communications, c221(2):286-9(1996)を参照。
アディポネクチン遺伝子は染色体3q27にある。これはII型糖尿病及び他代謝症候群に対する感受性遺伝子座である[12-14]。最近の何件かの研究報告が示唆するところでは、アディポネクチンは肥満症、インスリン抵抗性及びII型糖尿病を結び付ける決定的な、長年追及されてきたホルモンであるかもしれない[9-11]。

【0004】

本発明者は、ある種のグリコシル化体はそうした状態や他の様々な状態に対して有効であるとの仮説を立てた。 40

【0005】

本発明者は、2002年12月18日に、対応する米国仮特許出願と同時に提出した(未公開の)ニュージーランド特許出願第523410号及び523411号の中で、哺乳動物又はヒトのそれぞれ肝疾患及びTNF- 関連疾患の処置への様々な種類の(ヒトアディポネクチンを含む哺乳動物)アディポネクチンの使用について特許を請求した。

【0006】

アルコール性肝疾患(ALD)を非限定的に含む肝疾患は全世界で何百万人も目の患者があり、また先進諸国では主要な死因の1つとなっている¹。

【0007】 50

たとえばアルコール性肝疾患の進行は脂肪症(脂肪浸潤)、炎症、壊死、そして最後に線維症と肝硬変を特徴とし、重篤な肝炎は死に至るのが普通である²。

【0008】

現在のところ、アルコール性肝疾患を予防する又は元に戻す有効な薬は存在しない。

【0009】

アルコール性肝毒性の機序は複雑であり、多元的である³。

【0010】

最近の多数の研究報告は、活性化クッパー細胞によって産生される数種の炎症誘発性サイトカインがアルコール性肝疾患の発現に関与している可能性があることを示唆している^{4,5}。たとえばアルコール性肝障害のヒト患者及び動物モデルではTNF- α 、インターロイキン(IL)-1及びIL-6の循環濃度の上昇が観測される^{6,7}。これらサイトカインの発現レベルは疾患の経過とよく相関する。ALDの発現におけるこれらサイトカインの重要な役割は、クッパー細胞の破壊が胃内アルコール給餌モデルではアルコール性初期肝障害の防止になり⁸、また経口アルコール給餌モデルでもアルコール誘発小滴性及び大滴性脂肪症を抑える⁹という研究結果からもさらに裏付けられる。アルコール性肝障害はTNF- α 抗体の投与により有意に緩和される¹⁰、またTNF- α 受容体1ノックアウトマウスでは次第に弱まる¹¹。さらに、ラットのアルコール性肝障害はクッパー細胞内でのTNF- α 産生を阻害する化合物であるサリドマイドで処置すると完全に予防される¹²。

10

【0011】

炎症誘発性サイトカインとは対照的に、少数の抗炎症性サイトカインは肝保護作用を有することが判明している⁷。

20

【0012】

ヒトアディポネクチン(別名:ACRP30、AdipoQ又はGBP28)はもっぱら脂肪組織から分泌されるタンパク質である¹³。

【0013】

アディポネクチンは当初4研究グループが別個の方法でクローニングした。たとえばScherrer, P.E. et al., Journal of Biological Chemistry 270(45): 26746-26749 (1995); Nakano, Y. et al., Journal of Biochemistry 120(4): 803-12 (1996); Hu, E. et al., Journal of Biological Chemistry 271(18): 10697-10703 (1996); and Maeda, K. et al., Biochemical & Biophysical Research Communications, c221(2):286-9(1996)を参照

30

。アディポネクチン遺伝子は染色体3q27にある。

【0014】

ヒト及びマウスアディポネクチンは、特徴的なNH₂末端コラーゲン様領域及びCOOH末端補体因子C1q様球状ドメインのモジュール構造を示すタンパク質ファミリーと配列相同性をもつ。アディポネクチンの3次元構造はTNF- α のそれとよく似る¹⁴。

【0015】

Maeda et al.¹⁵は、内因性アディポネクチン産生能を欠くマウスでアディポネクチンmRNA産生能を回復させると、脂肪細胞中の異常に高いTNF- α mRNA濃度を低下させ、また血漿中の異常に高いTNF- α 濃度を低下させることができることを示した。

【0016】

しかし、選択的mRNAスプライシング、リボソーム内部進入(internal ribosome entry)、翻訳フレームシフト及び/又は再コード化、それにグリコシル化などのアミノ酸の翻訳後修飾といった遺伝子発現の転写後及び翻訳後調節機構の解明が進んできた今日、1遺伝子は1ポリペプチド産物だけをコードするという考え方は単純化しすぎであると言わざるを得ない。従って、特定のmRNA産生能の回復は必ずしも、該mRNAの可能なポリペプチド産物のどれ又はどの組み合わせが観測された任意の生物学的効果を誘発する原因であることを特定するとは限らない。

40

【0017】

マウスへのアディポネクチン投与は脂質代謝に有益な効果たとえば血漿からの脂質クリアランスの増強及び筋肉内脂肪酸酸化の増加をもたらすと判明している^{16,17}。アディ

50

ポネクチンは肝組織に直接作用してグルコース産生を阻害することができる^{18,19}。アディポネクチンにはまた直接的な抗炎症効果もある²⁰。

【0018】

アディポネクチンは最近、肥満関連代謝症候群の有力な処置薬候補であることが示された¹³。組換えアディポネクチンのマウスへの補充は高血糖の低下¹⁸、インスリン抵抗性の逆転¹⁶、及び食物摂取への悪影響を伴わない持続的な減量を可能にする¹⁷。

【0019】

本発明者はまた、アディポネクチンには肝保護作用があり、従ってアルコール性肝障害を含む肝疾患の処置へのアディポネクチン及びそのアゴニストの臨床応用もありうるとの仮説を立てた。

【0020】

そこで、マウスをモデルにしてアルコール性肝障害とマウスアディポネクチンによりこの仮説をアッセイした。

【0021】

結果として、(ヒトを含む)哺乳動物のアルコール性肝障害を含む肝疾患でのアディポネクチン及び/又はそのアゴニストの役割が、マウスでの活性から解明された。

【0022】

アルコール性肝障害、アルコール性肝脂肪症、アルコール性肝炎及びアルコール性肝壊死などのような多数の肝疾患、糖尿病、高脂肪食±肝脂肪症に続発するインスリン抵抗性などは血中及び脂肪中のアディポネクチンタンパク質及びアディポネクチンmRNA濃度の低下に付随することも立証された(アルコール摂取関連データについては、この明細書を参照)。

【0023】

マウスアディポネクチンのマウス体内循環濃度は高脂肪の含エタノール食の長期摂取後に著しく低下した。これらのマウスに組換えマウスアディポネクチンを投与すると肝腫脹及び脂肪症(脂肪肝)が劇的に緩和し、また炎症と高い血清アラニンアミノトランスフェラーゼ濃度も著しく減退した。マウスアディポネクチン処置は肝臓でのTNF- α 産生と脂肪酸シンターゼ及び脂肪酸輸送タンパク質CD36の発現とを低下させると判明した。

【0024】

TNF- α は多数の生物活性をもつ調節性サイトカインである。TNF- α は腫瘍の破壊、組織傷害に対する応答の媒介、及び種々の微生物による感染からの宿主の保護で不可欠の役割を果たす。たとえばTNF- α は、グラム陰性菌のリポ多糖(LPS)により活性化されたマクロファージから放出されるし、また細菌性敗血症に合併する内毒素性ショックの進行と発現に関与するきわめて重要な内因性媒介物質であるように見受けられる。

【0025】

しかし、その活性はリウマチ様関節炎、悪液質及び敗血症性ショックといったある種の病状及び炎症反応では過剰なようである。過剰TNF- α は、IL-6及び顆粒球/マクロファージ-コロニー刺激因子(GM-CSF)分泌の過剰刺激、多形核好中球の細胞傷害性の増強、及び細胞接着分子の発現延長といったいずれも有害な作用を及ぼしかねない誇大な免疫反応を招く。

【0026】

動物モデルでの炎症反応時のTNF- α 活性阻害の効果は、TNF- α に対する中和モノクローナル抗体を使用してすでに明らかにされてきた。

【0027】

TNF- α の生物活性は、リポタンパク質リパーゼ合成の阻害(「カケクチン」)、多形核白血球の活性化、細胞増殖の阻害又は刺激、ある種の形質転換細胞型に対する細胞傷害作用、抗ウイルス活性、骨再吸収の刺激、コラゲナーゼ及びプロスタグランジンE2産生の刺激、それにT細胞、B細胞、単球、胸腺細胞の活性化や主要組織適合複合体クラスI及びII分子の細胞表面発現の刺激を含む免疫調節活性などである。

【0028】

10

20

30

40

50

TNF- は組織障害を招く炎症誘発性作用たとえば血管内皮細胞に対する凝血促進作用の誘発、好中球及びリンパ球の接着性増強、それにマクロファージ、好中球及び血管内皮細胞からの血小板活性化因子の放出の刺激などで知られる。

【0029】

TNF- は多数の感染症、免疫障害、腫瘍病理の病状生理に、たとえばある種の悪性腫瘍を伴う悪液質、自己免疫病理及び移植片対宿主病理に関与するとされる。TNF- のがん及び感染症病理との関連はしばしば宿主の異化状態に関わる。がん患者の大問題は通常、無食欲に関連する体重減少である。その結果としての全身衰弱は「悪液質」と呼ばれる。悪液質は進行性の体重減少、無食欲、及び悪性腫瘍の増殖に対応した持続的な体力の衰えを含む。その根本的な生理的異常はエネルギー支出に対する食物摂取の相対的減少に関連しよう。従って悪液質状態は高い死亡率と結び付き、またがん死亡原因の大半を占めている。TNF- ががん、感染症病理及び他の異化状態における悪液質の重要な媒介物質であることを示唆する研究報告は数多い。

10

【0030】

TNF- は発熱、倦怠感、無食欲及び悪液質などを含むグラム陰性菌敗血症及び内毒素性ショックの病状生理学的な予後で中心的な役割を果たすと考えられる。内毒素はTNF- や他サイトカインの産生と分泌を刺激する強力な単球/マクロファージ活性化因子である。TNF- は内毒素の多数の生物学的効果に近いものをもたらすので、内毒素関連疾患の臨床的発現を引き起こす中心的な媒介物質であるとの結論に達した。

【0031】

TNF- と他の単球由来サイトカイン類は内毒素に対する代謝及び神経ホルモン反応を媒介する。志願者に内毒素を投与すると、発熱、頻脈、代謝率やストレスホルモン放出の上昇を含むインフルエンザ様症状を伴う急性疾患を引き起こす。グラム陰性菌敗血症の患者では循環TNF- 濃度の上昇もまた認められた。TNF- による(その腫瘍傷害作用に着目した)がん患者処置では、 $545 \mu\text{g}/\text{m}^2$ /24時間を超える用量は健常者への内毒素注射(4ng/kg)によって誘発される変化と類似する変化を引き起こすと判明したが、これは敗血症及び内毒素血症反応の主要な宿主媒介物質としてのTNF- の役割を裏付けるものであった。ヒト又はラットに対する長期的なTNF- 静注は無食欲、体液うっ滞、急性期反応、及びマイナスの窒素出納(すなわち古典的な異化効果)と関連付けられ、TNF- は重病期に認められる数多くの変化の原因であるかもしれないとの結論を招いた。

20

30

【0032】

本明細書で使用する用語「TNF- 関連疾患」又は「TNF- 疾患」又は「TNF- 障害」はTNF- の存在の結果として発症又は悪化するような、及び/又はTNF- に対する、又はTNF- の作用部位に対する阻害及び/又は拮抗効果により処置可能であるような、疾患又は障害である。そうした疾患又は障害の例は次のとおりである：炎症性疾患[糖尿病合併症たとえば網膜症、ネフロパシー、ニューロパシー、大血管及び微小血管障害、糖尿病性ネフロパシーなどの；関節炎たとえば慢性リウマチ様関節炎、変形性関節炎、リウマチ様骨髄炎及び骨膜炎など；術後/外傷後炎症；腫脹の改善；咽頭炎；膀胱炎；肺炎；心筋炎；心筋症；アトピー性皮膚炎；クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患；髄膜炎；炎症性眼疾患；炎症性肺疾患たとえば肺炎、珪粉肺核症、肺サルコイドーシス、炎症性骨疾患及び肺結核など]、循環器系疾患(不整脈、狭心症、心筋梗塞、心不全及びうっ血性心不全などを含む慢性心不全、アテローム性動脈硬化症を含む動脈硬化症、高血圧症、深部静脈血栓症、閉塞性末梢循環不全、虚血性脳循環不全、播種性血管内凝固症候群、レイノー病、バージャー病など)、門脈圧亢進症、肺高血圧症；喘息、アレルギー性鼻炎、結膜炎、消化管アレルギー、花粉症及び過敏症などのアレルギー性疾患；慢性閉塞性肺疾患、膠原病(紅斑性狼瘡、強皮症、多発性動脈炎)、クローン病、自己免疫性溶血性貧血、乾癬、慢性疾患や肝硬変を含む肝炎などの肝臓病、膵炎などの膵臓病、神経変性病(アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症など)、中枢神経障害(脳出血や脳梗塞及びその後遺症などの脳血管障害、頭蓋外傷、脊髄損傷、脳水腫、痴呆症、記憶障害、意識障害、多発性硬化症など)、毒素血症(敗血症、敗血症性ショック、内毒素性ショック、グラム

40

50

陰性菌敗血症、毒素ショック症候群など)、更年期障害、妊娠中毒症、脂肪過多症、高脂質血症、高コレステロール血症、耐糖能異常、充実性腫瘍、腫瘍(悪性黒色腫、悪性リンパ腫、胃腸などの消化器がん、がんと付随の悪液質など)、内分泌疾患(アジソン病、クッシング症候群、褐色細胞腫、原発性アルドステロン症など)、クロイツフェルト-ヤコブ病、ウイルス感染症(サイトメガロウィルス、インフルエンザウィルス、ヘルペスウィルスなどの感染症)、経皮術後冠動脈血管形成術、血管肥大又は閉塞、PTCA/ステント/バイパス手術後血管再閉塞/再狭窄、介入後血管肥大又は閉塞、移植誘発性血管障害及び拒絶反応の抑制、臓器又は組織移植及び自己免疫疾患(甲状腺炎などの器官特異疾患又はリウマチ様及び変形性関節炎などの非器官特異疾患)に続く拒絶反応の発現、腫瘍の処置及び拒絶反応の処置予防に関連するショック関連症状を解消又は緩和するためのTNF生成に関連する副作用、透析性低血圧症、緑内障、高眼圧、重症筋無力症、慢性疲労、骨の病気(骨折、再骨折、骨粗鬆症、骨軟化症、骨ペーチェット病、硬化性脊椎炎、慢性リウマチ様関節炎、変形性膝関節炎、それらの関連疾患に関連する関節組織破壊)、神経障害(個別神経、神経根、脊髄及び/又は脳への外傷、傷害、圧迫を含む)(急性脊髄及び脳損傷、脱髄疾患たとえば多発性硬化症、転移性がん起因する脊髄圧迫、原発性又は転移性脳腫瘍、転移性腫瘍起因する慢性痛症候群、炎症性CNS疾患たとえば亜急性硬化性全脳炎、ハンチントン病、ギラン-バレー症候群、顔面麻痺、糖尿病性ニューロパシー、視神経炎、黄斑変性症、網膜色素変性症、糖尿病性網膜症、筋ジストロフィー、及び多発性筋炎-皮膚筋炎など)、TNF-誘発インスリン抵抗性、細胞死異常(ウイルス性の細胞死阻害など)、糖尿病又はストレス高血糖症の合併症(心筋梗塞、うっ血性心不全及び心臓性ショックなど)、慢性閉塞性肺疾患、慢性気管支炎及び気腫。

10

20

【0033】

発明の要約

本発明は一態様で、グリコシル化された組換え、単離、精製又は合成アディポネクチンポリペプチドである。該アディポネクチンポリペプチドは、そうであるとは限らないがヒトアディポネクチンであるのが好ましい。

【0034】

グリコシル化アディポネクチンポリペプチドは純度が約50%以上であるのが好ましく、純度が約80%以上であればなお好ましく、約90%以上であればさらになお好ましく、約95%以上であればさらになおもっと好ましく、また約99%以上であるのが最も好ましい。

30

【0035】

ヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するプロリル残基はヒドロキシル化体又は非ヒドロキシル化体である。ヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するプロリル残基は一実施態様群ではヒドロキシル化体であり、別の実施態様群では非ヒドロキシル化体である。

【0036】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上のリシン残基はグリコシル化されているのが好ましい。

【0037】

該グリコシル化はグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数によるのが好ましい。

40

【0038】

実施態様によっては、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する2以上のリシン残基がグリコシル化されている。別の実施態様ではヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する3以上のリシン残基がグリコシル化されている。さらに別の実施態様ではヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する4つすべてのリシン残基がグリコシル化されている。

【0039】

グリコシル化リシン残基数のいかんを問わず、グリコシル化はグルコシルガラクトシル

50

部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数によるのが好ましい。アディポネクチンポリペプチドはヒトアディポネクチンのリシン残基65に対応する位置、ヒトアディポネクチンのリシン残基68に対応する位置、ヒトアディポネクチンのリシン残基77に対応する位置及び/又はヒトアディポネクチンのリシン残基101に対応する位置に、-1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン残基を1つ又は複数有するものであるのが好ましい(すなわち都合15通りの組み合わせがある)。

【0040】

本発明の態様によっては、アディポネクチンポリペプチドはリシン残基65、68、77及び101のそれぞれに1以上の糖鎖を有する。

10

【0041】

該グリコシル化は単一糖鎖によるのが好ましい。他の実施態様ではグリコシル化は複数糖鎖によるのが好ましい。

【0042】

本発明はまた、前記アディポネクチンポリペプチドを、医薬として許容される賦形剤、補助剤(co-actives)又は希釈剤からなる1つ又は複数の群と調合して哺乳動物患者への投与に適するようにしたものを含む。

【0043】

さらに別の態様では、本発明はヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する位置にヒドロキシプロリン残基を有する組換え、単離、精製又は合成アディポネクチンポリペプチドである。

20

【0044】

それは、医薬として許容される賦形剤、補助剤又は希釈剤からなる1つ又は複数の群と調合して哺乳動物患者への投与に適するようにしてもよい。

【0045】

さらに別の態様では、本発明はヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する各残基が-1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンであるアディポネクチンポリペプチドの医薬組成物である。

【0046】

別の態様では、本発明は単位用量製剤、すなわちヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する各残基が-1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンではないアディポネクチンポリペプチドの医薬投与単位。

30

【0047】

別の態様では、本発明はグリコシル化された組換え、単離、精製又は合成体の(好ましくはヒト)アディポネクチンポリペプチドを含む組成物である。

【0048】

該組成物は、他の医薬として許容される賦形剤、補助剤、希釈剤等と調合して哺乳動物患者への投与に適するようにするのが好ましい。

40

【0049】

ヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するアディポネクチンポリペプチドの残基はヒドロキシプロリンであるのが好ましい。

【0050】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基はグリコシル化されているのが好ましい。

【0051】

該グリコシル化はグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数によるのが好ましい。

50

【0052】

態様によっては、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する2以上のリシン残基がグリコシル化体であり、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する3以上のリシン残基がグリコシル化体であり、又はヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する4つすべてのリシン残基がグリコシル化されている。

該グリコシル化はグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数によるのが好ましい。

【0053】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチンポリペプチドの各残基は -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであるのが好ましい。ヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するアディポネクチンポリペプチドの残基は必ずしもヒドロキシプロリンである必要はないが、ヒドロキシ化体であるのが好ましい。

【0054】

該グリコシル化は単一の糖部分又は複数の糖部分によるものでもよい。

【0055】

該アディポネクチンポリペプチドはリシン残基65、68、77及び101の各々に1以上のグルコシルガラクトシル部分又はガラクトシルグルコシル部分を有するのが好ましい。

【0056】

該アディポネクチンポリペプチドは天然の哺乳動物アディポネクチンポリペプチドの配列を有するのが好ましい。

【0057】

該アディポネクチンポリペプチドは1以上の非グリコシル化体のアディポネクチンポリペプチドアイソフォームを実質的に欠くのが好ましい。

【0058】

該組成物はアイソフォーム1を実質的に欠くのが好ましい。

【0059】

該組成物はアイソフォーム2を実質的に欠くのが好ましい。

【0060】

該組成物は一切の非グリコシル化アディポネクチンポリペプチド・アイソフォームを実質的に欠くのが好ましい。

【0061】

支配的なアディポネクチンポリペプチド分子種は完全グリコシル化されているのが好ましい。

【0062】

Lys-65、68、77及び101はすべてグリコシル化されているのが好ましい。

【0063】

該組成物は複数のアディポネクチンポリペプチドアイソフォームを含んでもよい。

【0064】

好ましくは、アイソフォーム3は該組成物の支配的アディポネクチンポリペプチドであり、アイソフォーム4は該組成物の支配的アディポネクチンポリペプチドであり、アイソフォーム5は該組成物の支配的アディポネクチンポリペプチドであり、又はアイソフォーム6は該組成物の支配的アディポネクチンポリペプチドである。

【0065】

該組成物の哺乳動物への投与はインスリンの効果を強める。該組成物は、生理的濃度範囲を下回る血中インスリン濃度が正常な生理的血中インスリン濃度並みの生物学的効果を誘発することを可能にする効力を有する。

【0066】

10

20

30

40

50

別の態様では本発明はインスリンを追加的に含む組成物である。

【0067】

インスリンは約50pM～約400pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る量又は濃度で存在するのが好ましい。

【0068】

インスリンは約100pM～約300pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る量又は濃度で存在するのが好ましい。

【0069】

インスリンは約200pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る量又は濃度で存在するのが好ましい。

10

【0070】

該組成物は個体に投与すると糖新生を阻害するのが好ましい。

【0071】

該組成物は好ましくは1μg/mL～20μg/mLの血漿アディポネクチンポリペプチド濃度を誘発(より好ましくは1.9μg/mL～17μg/mLの血漿アディポネクチンポリペプチド濃度を誘発)する効果をもつ。

【0072】

別の態様では、本発明は個体を対象に病状の存在又は病状を発現しやすい素因を診断する方法であって、該個体のある特定アディポネクチンポリペプチドアイソフォームのレベル又は2以上のグリコシル化アディポネクチンポリペプチドアイソフォームの発現プロファイル

20

を決定するステップ及び該発現プロファイルを、該病状を患っていない個体に特有の発現プロファイルと比較し、発現プロファイルの差異から該病状の存在又は該病状を発現しやすい素因を読み取るステップを含む方法である。

【0073】

使用するアディポネクチンポリペプチドアイソフォームは先に定義したような、及び/又は図面の参照により後で定義するような、グリコシル化アディポネクチンポリペプチドであるのが好ましい。

【0074】

該個体はヒトであるのが好ましい。

【0075】

該病状は高血糖症、インスリン抵抗性、インスリン抵抗性に関連する代謝症候群、II型糖尿病、又は肥満症(体重増加、減量又は管理、又は体重増加の予防などを含む)、高血圧を含む代謝症候群、動脈硬化症、冠状動脈性心臓病、虚血性心疾患又は多嚢胞性卵巣症候群でもよい。

30

【0076】

また肝臓やTNF- 関連の病状を含めて、他のところで述べた任意の病状でもよい。

【0077】

アディポネクチンポリペプチドは生体試料から得たものでもよい。

【0078】

該レベル又は発現パターンは、グリコシル化アディポネクチンポリペプチドアイソフォームの発現パターンを定量又は評価することによって得る。評価方法は電気泳動、HPLC又は質量分析を用いるのが好ましい。あるいは該レベル又は発現パターンはグリコシル化アディポネクチンポリペプチドアイソフォームに対して特異的な抗体を使用して定量又は評価するのが好ましい。

40

【0079】

別の態様で、本発明は個体を対象に病状の存在又は病状を発現しやすい素因を診断する方法であって、該個体のある特定アディポネクチンポリペプチドアイソフォームのレベル又は2以上のグリコシル化アディポネクチンポリペプチドアイソフォームの発現プロファイル

50

しやすい素因を読み取るステップを含む方法である。

【0080】

使用するアディポネクチンポリペプチドアイソフォームは前述のようなグリコシル化アディポネクチンポリペプチドアイソフォームであるのが好ましい。

【0081】

使用する任意の1つ又は複数のアディポネクチンポリペプチドアイソフォームはヒトアディポネクチンであるのが好ましい。

【0082】

該個体はヒトであるのが好ましい。

【0083】

該病状は高血糖症、インスリン抵抗性、インスリン抵抗性に関連する代謝症候群、II型糖尿病、又は肥満症、高血圧を含む代謝症候群、動脈硬化症、冠状動脈性心臓病、虚血性心疾患又は多嚢胞性卵巣症候群でもよい。

【0084】

アディポネクチンポリペプチドは生体試料から得たものでもよい。

【0085】

該レベル又は発現パターンは、グリコシル化アディポネクチンポリペプチドアイソフォームの発現パターンを定量又は評価することによって得る。評価方法は電気泳動、HPLC又は質量分析を用いるのが好ましい。あるいはグリコシル化アディポネクチンポリペプチドアイソフォームに対して特異的な抗体を使用してレベル又は発現パターンを定量又は評価してもよい。

【0086】

さらに別の態様では、本発明はアディポネクチンポリペプチド調節又は異常インスリン感受性に関連する病状を処置する方法であって、有効量のグリコシル化アディポネクチンポリペプチドを、医薬として許容される賦形剤、補助剤、希釈剤等と共に、又は単独で、投与するステップを含む方法である。

【0087】

該病状は高血糖症、インスリン抵抗性、インスリン抵抗性に関連する代謝症候群、II型糖尿病、又は肥満症、高血圧を含む代謝症候群、動脈硬化症、冠状動脈性心臓病、虚血性心疾患又は多嚢胞性卵巣症候群でもよい。

【0088】

該グリコシル化アディポネクチンポリペプチドはヒトアディポネクチンであるのが好ましい。

該アディポネクチンポリペプチドは次のうちの1つ又は複数から選択するのが好ましい：

i) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

ii) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、i)に定義したアディポネクチンポリペプチド

iii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する2以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

iv) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、iii)に定義したアディポネクチンポリペプチド

v) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する3以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

vi) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、v)に定義したアディポネクチンポリペプチド

vii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する4つすべてのリ

10

20

30

40

50

シン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

viii) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、vii)に定義したアディポネクチンポリペプチド

ix) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンであるアディポネクチンポリペプチド、及び

x) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンではないアディポネクチンポリペプチド。

10

【0089】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチンポリペプチドの各残基は -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基はヒドロキシプロリンであるのが好ましい。

【0090】

あるいはヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチンポリペプチドの各残基は -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基はヒドロキシプロリンでないのが好ましい。

20

【0091】

別の態様では、本発明はアディポネクチンポリペプチド調節又は異常インスリン感受性に関連する病状を処置する方法であって、有効量の本発明組成物を、医薬として許容される賦形剤、補助剤、希釈剤等と共に、又は単独で、投与するステップを含む方法である。

【0092】

該病状は高血糖症、インスリン抵抗性、インスリン抵抗性に関連する代謝症候群、II型糖尿病、又は肥満症、高血圧を含む代謝症候群、動脈硬化症、冠状動脈性心臓病、虚血性心疾患又は多嚢胞性卵巣症候群でもよい。

30

【0093】

別の態様では、本発明はアディポネクチンポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を好適な発現ベクターに挿入するステップと、アディポネクチンをコードするポリヌクレオチド配列を組み込んだ該発現ベクターを、該アディポネクチンを発現し、及び/又はプロセッシングし、及び/又はグリコシル化することができるような好適な真核宿主細胞に導入し、もって生物活性生成物を産生させるようにするステップとを含む方法によって生産される生成物を提供する。

【0094】

一実施態様では、該ポリヌクレオチド配列は完全長アディポネクチンを、すなわちシグナル配列を含むプレプロ型アディポネクチンを、コードする。

40

【0095】

別の態様では、本発明は哺乳動物患者の体重を減らす方法であって、有効量のグリコシル化アディポネクチンポリペプチドを、医薬として許容される賦形剤、補助剤、希釈剤等と共に、又は単独で、投与するステップを含む方法を提供する。

【0096】

さらなる態様では、本発明は哺乳動物患者の体重増加を抑える方法であって、有効量のグリコシル化アディポネクチンポリペプチドを、医薬として許容される賦形剤、補助剤、希釈剤等と共に、又は単独で、投与するステップを含む方法を提供する。

【0097】

さらなる態様では、本発明は哺乳動物患者の肥満症を予防する方法であって、有効量の

50

グリコシル化アディポネクチンポリペプチドを、医薬として許容される賦形剤、補助剤、希釈剤等と共に、又は単独で、投与するステップを含む方法を提供する。

【0098】

さらなる態様では、本発明は哺乳動物患者の体重増加を予防する方法であって、有効量のグリコシル化アディポネクチンポリペプチドを、医薬として許容される賦形剤、補助剤、希釈剤等と共に、又は単独で、投与するステップを含む方法を提供する。

【0099】

別の態様では、本発明はアディポネクチンが欠乏している哺乳動物患者を処置する又はその他の点でそうした処置が有効である哺乳動物患者を処置する方法であって、有効量のグリコシル化アディポネクチンポリペプチドを、医薬として許容される賦形剤、補助剤、希釈剤等と共に、又は単独で、投与するステップを含む方法を提供する。

10

【0100】

別の態様では、本発明は哺乳動物患者の

- i) アディポネクチンポリペプチド調節に関連する病状の処置、又は
- ii) インスリンの効果の増強、又は
- iii) 糖新生の阻害

に有効である医薬組成物又は薬物又は投与単位の調製へのグリコシル化アディポネクチンポリペプチドの(随意に医薬として許容される賦形剤、補助剤、希釈剤及び格納容器と一緒に)使用である。

【0101】

該使用はインスリンを追加的に含む該医薬組成物又は薬物又は投与単位との併用でもよい。該インスリンは約50pM～約400pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る濃度でもよい。該インスリンは約100pM～約300pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る濃度でもよい。該インスリンは約200pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る濃度(すなわち圧力)でもよい。

20

【0102】

該グリコシル化アディポネクチンポリペプチドはヒトアディポネクチンであるのが好ましい。

【0103】

該アディポネクチンポリペプチドは次のうちの1つ又は複数から選択するのが好ましい:

30

i) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

ii) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、i)に定義したアディポネクチンポリペプチド

iii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する2以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

iv) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、iii)に定義したアディポネクチンポリペプチド

40

v) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する3以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

vi) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、v)に定義したアディポネクチンポリペプチド

vii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する4つすべてのリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

viii) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、vii)に定義したアディポネクチンポリペプチド

50

ix) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンであるアディポネクチンポリペプチド、及び

x) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンではないアディポネクチンポリペプチド。

【0104】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチンポリペプチドの各残基は -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基はヒドロキシプロリンであるのが好ましい。

【0105】

あるいはヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチンポリペプチドの各残基は -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基はヒドロキシプロリンでないのが好ましい。

【0106】

別の態様では、本発明は少なくともグリコシル化アディポネクチンポリペプチドを含む容器又は送達単位と哺乳動物患者の

i) アディポネクチンポリペプチド調節に関連する病状の処置、又は

ii) インスリンの効果の増強、又は

iii) 糖新生の阻害

に有効である該グリコシル化アディポネクチンポリペプチドの使用説明書とを含んで成る又は含む製造品である。

【0107】

該グリコシル化アディポネクチンポリペプチドはヒトアディポネクチンであるのが好ましい。

【0108】

該アディポネクチンポリペプチドは次のうちの1つ又は複数から選択するのが好ましい:

i) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

ii) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、i)に定義したアディポネクチンポリペプチド

iii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する2以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

iv) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、iii)に定義したアディポネクチンポリペプチド

v) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する3以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

vi) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、v)に定義したアディポネクチンポリペプチド

vii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する4つすべてのリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

viii) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数によ

10

20

30

40

50

る、vii)に定義したアディポネクチンポリペプチド

ix) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンであるアディポネクチンポリペプチド、及び

x) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンではないアディポネクチンポリペプチド。

【0109】

10

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチンポリペプチドの各残基は -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基はヒドロキシプロリンであるのが好ましい。

【0110】

あるいはヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチンポリペプチドの各残基は -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基はヒドロキシプロリンでないのが好ましい。

【0111】

20

別の態様では、本発明はヒト又は他の哺乳動物への投与又は自己投与時にアディポネクチンポリペプチド調節に関連する病状の処置への使用で効果をあげるに足る有効量のグリコシル化アディポネクチンポリペプチドを送達しうる製剤又は剤形である。

【0112】

該製剤又は剤形はインスリンを追加的に含むのが好ましい。該インスリンは約50pM～約400pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る濃度でもよい。該インスリンは約100pM～約300pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る濃度でもよい。

【0113】

該インスリンは約200pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る濃度(すなわち存在量)であるのが最も好ましい。

30

【0114】

該グリコシル化アディポネクチンポリペプチドはヒトアディポネクチンであるのが好ましい。

【0115】

該アディポネクチンポリペプチドは次のうちの1つ又は複数から選択するのが好ましい:

i) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

ii) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、i)に定義したアディポネクチンポリペプチド

40

iii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する2以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

iv) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、iii)に定義したアディポネクチンポリペプチド

v) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する3以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

vi) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、v)に定義したアディポネクチンポリペプチド

50

vii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する4つすべてのリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

viii) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、vii)に定義したアディポネクチンポリペプチド

ix) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンであるアディポネクチンポリペプチド、及び

x) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンではないアディポネクチンポリペプチド。

10

【0116】

本件のいくつかの形態においては、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチンポリペプチドの各残基は -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基はヒドロキシプロリンである。

本件の他の形態においては、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチンポリペプチドの各残基は -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基はヒドロキシプロリンでないのが好ましい。

20

【0117】

別の態様では、本発明はヒト又は他の哺乳動物への投与又は自己投与時にインスリンの効果を増強するに足る有効量のグリコシル化アディポネクチンポリペプチドを送達しうる製剤又は剤形である。

【0118】

該グリコシル化アディポネクチンポリペプチドはヒトアディポネクチンであるのが好ましい。

【0119】

前記製剤又は剤形において、該アディポネクチンポリペプチドは次のうちの1つ又は複数から選択するのが好ましい：

30

i) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

ii) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、i)に定義したアディポネクチンポリペプチド

iii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する2以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

iv) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、iii)に定義したアディポネクチンポリペプチド

40

v) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する3以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

vi) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、v)に定義したアディポネクチンポリペプチド

vii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する4つすべてのリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

viii) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラ

50

クトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、vii)に定義したアディポネクチンポリペプチド

ix) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンであるアディポネクチンポリペプチド、及び

x) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンではないアディポネクチンポリペプチド。

10

【0120】

別の態様で、本発明はヒト又は他の哺乳動物への投与又は自己投与時にインスリンの効果を増強するに足る有効量のグリコシル化アディポネクチンポリペプチドを送達しうる製剤又は剤形であって、該アディポネクチンポリペプチドは先に定義したとおりであるのが好ましい製剤又は剤形である。

【0121】

該製剤又は剤形はインスリンを追加的に(好ましくは先に定義した存在量で)含むのが好ましい。

【0122】

別の態様で、本発明はヒト又は他の哺乳動物への投与又は自己投与時に糖新生を阻害するに足る有効量のグリコシル化アディポネクチンポリペプチドを送達しうる製剤又は剤形である。

20

【0123】

該アディポネクチンポリペプチドは組換え、単離、生成又は合成体であるのが好ましい。

該アディポネクチンポリペプチドはヒトアディポネクチンであるのが好ましい。

【0124】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチンポリペプチドの1以上のリシン残基はグリコシル化されているのが好ましい。

【0125】

別の態様では、本発明はヒト又は他の哺乳動物への投与又は自己投与時にインスリンの効果を増強するに足る有効量のグリコシル化アディポネクチンポリペプチドを送達しうる製剤又は剤形であって、該アディポネクチンポリペプチドは上文で定義したとおりであるのが好ましい製剤又は剤形にある。

30

【0126】

該製剤又は剤形はインスリンを追加的に(たとえば先に開示した濃度まで)含むのが好ましい。

【0127】

さらに別の態様では、本発明は

- a. アディポネクチンポリペプチド調節に関連する
- b. インスリンの増強を必要とする、又は
- c. 糖新生の阻害を必要とする

40

症状に患いやすい又は患っている哺乳動物個体の処置を監視する方法であって、

(A) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチンポリペプチドの1以上のグリコシル化リシン残基

(B) ヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するヒドロキシ化プロリン残基、及び

(C) (A)と(B)の両方

のうちの1つを有するグリコシル化アディポネクチンポリペプチドの存在を増強させるべく該個体を監視するステップを含む方法にある。

50

【0128】

使用するアディポネクチンポリペプチドアイソフォームは先に開示したようなグリコシル化アディポネクチンポリペプチドであるのが好ましい。

【0129】

該症状は高血糖症、インスリン抵抗性、インスリン抵抗性に関連する代謝症候群、II型糖尿病、又は肥満症、高血圧を含む代謝症候群、動脈硬化症、冠状動脈性心臓病、虚血性心疾患又は多嚢胞性卵巣症候群のうちの1つ又は複数でもよい。

【0130】

さらに別の態様では、本発明はグリコシル化アディポネクチンポリペプチドを含む組成物を調製する方法であって、

(a) グリコシル化の程度又はタイプが異なる少なくとも2種類のアディポネクチンポリペプチドを含む第1組成物を獲得するステップ、及び

(b) 該多種類のアディポネクチンポリペプチドを、少なくともある程度まではグリコシル化の程度又はタイプに応じて分離し、もってアディポネクチンポリペプチドプロファイルが第1組成物とは異なる第2組成物を生成させるステップを含む方法にある。

【0131】

該方法は本明細書で開示した任意の種類のアディポネクチンポリペプチドを第2組成物中に濃縮するか、又は少なくとも実質的に単離するのが好ましい。

【0132】

該アディポネクチンポリペプチドはアディポネクチンポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチドの哺乳動物細胞中での発現によって獲得するのが好ましい。

【0133】

該組換えポリヌクレオチドは、図5に開示の配列をもつポリペプチド又はその生物活性断片又はその変異体をコードするのが好ましい。

【0134】

あるいは該アディポネクチンポリペプチドは動物組織たとえばヒト、マウス、ラット、犬、牛又はヒト以外の霊長類の組織から精製される。

【0135】

該組織は血清又は脂肪細胞であるのが好ましい。

【0136】

該分離は電気泳動法を伴っても伴わなくてもよい。

【0137】

該分離はクロマトグラフィーを伴っても伴わなくてもよい。

【0138】

該第2組成物は本発明の組成物又はポリペプチドであるのが好ましい。

【0139】

別の態様では、本発明は

(A) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチンポリペプチドの1以上のグリコシル化リシン残基

(B) ヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するヒドロキシ化プロリン残基、及び

(C) (A)と(B)の両方

からなる群より選択されるグリコアイソフォームのアディポネクチンポリペプチドに対して特異的な抗体にある。

【0140】

該抗体はモノクローナル抗体であるのが好ましい。

【0141】

該抗体は2部位キャプチャーが可能でもよい。

別の態様では、本発明はそうした任意の抗体の組成物にある。

【0142】

別の態様では、本発明は

(A) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチンポリペプチドの1以上のグリコシル化リシン残基

(B) ヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するヒドロキシル化プロリル残基、及び

(C) (A)と(B)の両方

からなる群より選択されるグリコアイソフォームのアディポネクチンポリペプチドに対して特異的な抗体の産生に対して特異的なハイブリドーマにある。

【0143】

別の態様では、本発明は

(A) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチンポリペプチドの1以上のグリコシル化リシン残基

(B) ヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するヒドロキシル化プロリル残基、及び

(C) (A)と(B)の両方

のうち1つを有するグリコシル化アディポネクチンポリペプチドの濃度を哺乳動物において高めるために有用な物質を又は物質についてスクリーニングする方法であって、該哺乳動物又はその組織に、又は哺乳動物に、そうした哺乳動物又は哺乳動物組織による該グリコシル化アディポネクチンポリペプチドの産生を増強させる任意のものを投与するステップを含む方法にある。

【0144】

別の態様では、本発明は

(A) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチンポリペプチドの1以上のグリコシル化リシン残基

(B) ヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するヒドロキシル化プロリル残基、及び

(C) (A)と(B)の両方

のうち1つを有するグリコシル化アディポネクチンポリペプチドの濃度を高めるための有用な物質であって、該哺乳動物又はその組織に、又は哺乳動物に、そうした哺乳動物又は哺乳動物組織による該グリコシル化アディポネクチンポリペプチドの産生を増強させる任意のものを投与するステップを含むスクリーニング方法によって同定される物質である。

【0145】

別の態様では、本発明はアディポネクチンポリペプチドのアイソフォームの混合物であって、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上のリシン残基をグリコシル化体としてもち、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するプロリル残基をヒドロキシル化体としてもつアイソフォームを、除去、変換又は合成により本質的構成要素とした、又は濃縮した混合物にある。

【0146】

別の態様では、本発明はアディポネクチンポリペプチドのアイソフォームの混合物であって、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上のリシン残基をグリコシル化体としてもち、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するプロリル残基を非ヒドロキシル化体としてもつアイソフォームを、除去、変換又は合成により本質的構成要素とした、又は濃縮した混合物にある。

【0147】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上のリシン残基をグリコシル化体としてもつアイソフォームを、除去、変換又は合成により本質的構成要素とした、又は濃縮したアディポネクチンポリペプチドのアイソフォーム。

【0148】

本発明はまた、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上

10

20

30

40

50

のリシン残基をグリコシル化体としてもち、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する位置にヒドロキシプロリン残基をもつアイソフォームを(除去、変換又は合成により)本質的構成要素とした、又は濃縮したアディポネクチンポリペプチドのアイソフォーム、又はヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上のリシン残基をグリコシル化体としてもち、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する位置にヒドロキシプロリン残基をもたないアイソフォームを(除去、変換又は合成により)本質的構成要素とした、又は濃縮したアディポネクチンポリペプチドのアイソフォームにある。

【0149】

別の態様では、本発明はグリコシル化アディポネクチンポリペプチドを発現することが
10
できる1つ又は複数の細胞をスクリーニングする方法であって、該細胞によって発現される特定アディポネクチンポリペプチドアイソフォームのレベル又は2以上のグリコシル化アディポネクチンポリペプチド・アイソフォームの発現プロファイルを同定及び/又は判定するステップ及び該細胞を同定及び/又は精製及び/又は単離するステップを含む方法である。

【0150】

該グリコシル化アディポネクチンポリペプチドはヒトアディポネクチンであるのが好ましい。

【0151】

該アディポネクチンポリペプチドは次のうちの1つ又は複数から選択するのが好ましい：
20

i) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

ii) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、i)に定義したアディポネクチンポリペプチド

iii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する2以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

iv) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、iii)に定義したアディポネクチンポリペプチド
30

v) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する3以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

vi) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、v)に定義したアディポネクチンポリペプチド

vii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する4つすべてのリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチド

viii) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、vii)に定義したアディポネクチンポリペプチド
40

ix) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンであるアディポネクチンポリペプチド、及び

x) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンではないアディポネクチンポリペプチド。
50

【0152】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチン

ポリペプチドの各残基は -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基はヒドロキシプロリンであるのが好ましい。

【0153】

あるいはヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチンポリペプチドの各残基は -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基はヒドロキシプロリンでないのが好ましい。

【0154】

任意の1アディポネクチンポリペプチドの同定及び/又は判定は

10

(A) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチンポリペプチドの1以上のグリコシル化リシン残基

(B) ヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するヒドロキシ化プロリン残基、及び

(C) (A)と(B)の両方

からなる群より選択されるアディポネクチンポリペプチドのグリコアイソフォームに対して特異的である抗体を使用するのが好ましい。

【0155】

該抗体はモノクローナル抗体であるのが好ましい。

【0156】

20

該抗体は、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する各残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンであるアディポネクチンポリペプチドに対して特異的であるのが好ましい。

【0157】

該抗体は、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する各残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンではないアディポネクチンポリペプチドに対して特異的であるのが好ましい。

【0158】

30

本発明はまた、請求項231に記載の方法によって同定及び/又は単離及び/又は精製される任意の1つ又は複数の細胞である。

【0159】

従って本発明は別の態様では、肝疾患の素因がある及び/又は肝疾患の何らかの特徴を示す哺乳動物患者を処置する方法であって、該患者にアディポネクチン及び/又はそのアゴニストを投与するステップを含む方法にある。

【0160】

該肝疾患は、急性肝疾患、慢性肝疾患、肝臓の炎症、肝臓の機能障害、脂肪肝(肝脂肪症)、肝線維症、肝硬変症、肝臓の壊死、肝細胞壊死、アルコール性肝疾患、アルコール性肝脂肪症、アルコール性肝炎、アルコール性肝壊死、アルコール性肝硬変症、肝壊死、肝脂肪症、糖尿病に合併する肝脂肪症、高脂肪食に関連する肝脂肪症、脂質代謝異常に関連する肝脂肪症、任意の状態に起因する肝炎、任意の状態に起因する肝壊死、急性肝炎、慢性肝炎、慢性活動性肝炎、ウイルス感染症または肝臓の炎症に続発する肝炎、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、D型肝炎、E型肝炎、G型肝炎、任意の薬物又は毒素の作用に関連する肝炎、胆汁うっ滞に関連する肝炎又は肝機能障害、原発性胆汁性肝硬変症、肝肉芽腫症、及び/又は高組織濃度又は高血中濃度の腫瘍壊死因子が病因となっているような状態のうち任意の1つ又は複数でもよい。

40

【0161】

該哺乳動物はヒトであり、また該アディポネクチンはヒトアディポネクチンであるのが好ましい。

50

【0162】

該アディポネクチンは完全長であるのが好ましい。

【0163】

該アディポネクチンはグリコシル化されているのが好ましい。

【0164】

該アディポネクチンはリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたヒトアディポネクチンであればなお好ましい。当然ながら、ヒト以外の種のアディポネクチン、アディポネクチン変異体又はヒトアディポネクチンとは異なる短縮型アディポネクチンに関して該アディポネクチンの残基を参照するには、最適アラインメントによって決定した対応するヒト配列残基の参照番号を使用することができる。

10

【0165】

該アディポネクチン製剤は、ヒトへの投与に適するように、好ましくは皮下(sc)、皮内(id)、静脈内(iv)、腹腔内(ip)又は経皮などの経路による非経口投与に適した形に、調製してもよい。該アディポネクチンを経口、経直腸、経膈、膀胱内、くも膜下、心室内、大脳内又は技術上周知の他経路で投与するような他製剤も見込まれる。

【0166】

好ましい投与経路は非経口である。非経口投与に適したアディポネクチンは安定化用の緩衝液を含む水溶液に調製し、好ましくはほぼ等張にし、また哺乳動物特にヒトへの投与に適したタンパク質製剤用として技術上周知の防腐、消泡、抗沈殿等の安定化剤、特に哺乳動物好ましくはヒトに投与するための処置用タンパク質溶液の安定化に適した安定化剤

20

【0167】

さらなる態様では、本発明はアルコール性肝疾患の素因がある及び/又はアルコール性肝疾患の何らかの特徴を示す哺乳動物患者を処置する方法であって、該患者にアディポネクチン及び/又はそのアゴニストを投与するステップを含む方法にある。

【0168】

さらなる態様では、本発明は肝疾患及び/又は肝疾患の何らかの特徴を予防及び/又は逆転するための哺乳動物患者の処置方法であって、該患者にアディポネクチン及び/又はそのアゴニストを投与するステップを含む方法にある。

【0169】

別のさらなる態様では、本発明は肝疾患の素因がある及び/又は肝疾患の何らかの特徴を示す哺乳動物患者を処置する方法であって、該患者に有効量のアディポネクチン及び/又はそのアゴニストを投与するステップを含む方法にある。

30

【0170】

さらなる態様では、本発明はアルコール性肝疾患及び/又はアルコール性肝疾患の何らかの特徴を予防及び/又は逆転するための哺乳動物患者の処置方法であって、該患者にアディポネクチン及び/又はそのアゴニストを投与するステップを含む方法にある。

【0171】

別のさらなる態様では、本発明はアルコール性肝疾患の素因がある及び/又はアルコール性肝疾患の何らかの特徴を示す哺乳動物患者を処置する方法であって、該患者に有効量のアディポネクチン及び/又はそのアゴニストを投与するステップを含む方法にある。

40

【0172】

別のさらなる態様では、本発明は肝脂肪症(脂肪浸潤)、肝炎、肝壊死、肝線維症、肝硬変症及び/又は肝機能障害のいずれ1つ又は複数の疾患の素因がある哺乳動物患者を処置する方法であって、該患者にアディポネクチン及び/又はそのアゴニストを投与するステップを含む方法にある。

【0173】

別のさらなる態様では、本発明は

アディポネクチン及び/又はアディポネクチンアゴニストを入れた容器；

肝疾患及び/又は肝疾患の任意の特徴を処置、予防又は逆転するためのアディポネクチ

50

ン又はアディポネクチンアゴニストの(たとえば該容器に入れた状態での)使用に関する説明書き

を含む製造品にある。

【0174】

別のさらなる態様では、本発明は

アディポネクチン及び/又はアディポネクチンアゴニストを入れた容器；

アルコール性肝疾患及び/又はアルコール性肝疾患の任意の特徴を処置、予防又は逆転するためのアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストの(たとえば該容器に入れた状態での)使用に関する説明書き

を含む製造品にある。

10

【0175】

別のさらなる態様では、本発明は

アディポネクチン及び/又はアディポネクチンアゴニストを入れた包装資材；

肝疾患及び/又は肝疾患の任意の特徴を処置、予防又は逆転するためのアディポネクチン及び/又はアディポネクチンアゴニストの(たとえば該包装資材に入れた状態での)使用に関する説明書き

を含む製造品にある。

【0176】

別のさらなる態様では、本発明は

アディポネクチン及び/又はアディポネクチンアゴニストを入れた包装資材；

アルコール性肝疾患及び/又はアルコール性肝疾患の任意の特徴を処置、予防又は逆転するためのアディポネクチン及び/又はアディポネクチンアゴニストの(たとえば該包装資材に入れた状態での)使用に関する説明書き

を含む製造品にある。

20

【0177】

別のさらなる態様では、本発明は(ヒトであれヒト以外であれ)哺乳動物患者の肝疾患及び/又は肝疾患の任意の特徴の処置、予防及び/又は逆転への使用に有効な剤形又は医薬組成物の製造への、(好ましくは有効量の)アディポネクチン及び/又はアディポネクチンアゴニストの、(賦形剤、補助剤、希釈剤等であれ、投与単位を規定する容器であれ)他の一又は複数の材料と一緒にの使用にある。

30

【0178】

別のさらなる態様では、本発明は(ヒトであれヒト以外であれ)哺乳動物患者のアルコール性肝疾患及び/又はアルコール性肝疾患の任意の特徴の処置、予防及び/又は逆転への使用に有効な剤形又は医薬組成物の製造への、(好ましくは有効量の)アディポネクチン及び/又はアディポネクチンアゴニストの、(賦形剤、補助剤、希釈剤等であれ投与単位を規定する容器であれ)他の一又は複数の材料と一緒にの使用にある。

【0179】

別の態様では、本発明は哺乳動物患者の(アルコール性肝疾患を含んでもよい)肝疾患及び/又は肝疾患の任意の特徴を処置、逆転又は予防するための処置方法であって、該哺乳動物患者のアディポネクチンをモニターするステップ及び/又は該哺乳動物にアディポネクチン及び/又はそのアゴニストを投与するステップを任意の順序で含む方法にある。該哺乳動物患者はヒトであるのが好ましい。

40

【0180】

別の態様では、本発明は哺乳動物患者の(アルコール性肝疾患を含んでもよい)肝疾患及び/又は肝疾患の任意の特徴を処置、逆転又は予防するための処置方法であって、該哺乳動物患者のアディポネクチンmRNAをモニターするステップ及び/又は該哺乳動物にアディポネクチン及び/又はそのアゴニストを投与するステップを任意の順序で含む方法にある。該哺乳動物患者はヒトであるのが好ましい。

【0181】

さらなる態様では、本発明は哺乳動物患者のアディポネクチンを測定する方法であって

50

、血液又は組織中のアディポネクチン濃度をアッセイするステップを含む方法にある。

【0182】

アディポネクチン濃度の測定には、活性型アディポネクチンとその組成物に関する先行の米国出願第60/349,885号明細書で開示したような放射線イムノアッセイ(RIA)、ELISAなどの免疫学的方法を非限定的に含む技術上周知の任意の方法を使用してもよい。

【0183】

該組織は脂肪組織であるのが好ましい。

【0184】

さらなる態様では、本発明は哺乳動物患者のアディポネクチンを測定する方法であって、血液又は組織中のアディポネクチンmRNA濃度をアッセイするステップを含む方法にある。

10

【0185】

アディポネクチンmRNA濃度の測定には、RT-PCR、ノーザン法、in situハイブリダイゼーション及び放射線イムノアッセイ(RIA)などを非限定的に含む技術上周知の任意の方法を使用してもよい。

【0186】

該組織は脂肪組織であるのが好ましい。

【0187】

さらなる態様では、本発明は哺乳動物患者のアディポネクチンを測定することができるアッセイであって、

20

該哺乳動物患者から血液又は組織試料を単離する；

試料を調製する；

放射線イムノアッセイ(RIA)、ELISAなどの免疫学的方法を非限定的に含む技術上周知の任意の方法により血液又は組織中のアディポネクチン濃度をアッセイするの各ステップを含むアッセイにある。アディポネクチン濃度の測定方法は活性型アディポネクチンとその組成物に関する前記米国出願第60/349,885号明細書で開示している。

【0188】

別のさらなる態様では、本発明は急性肝疾患、慢性肝疾患、肝臓の炎症、肝臓の機能障害、脂肪肝(肝脂肪症)、肝線維症、肝硬変症、肝臓の壊死、肝細胞壊死、アルコール性肝疾患、アルコール性肝脂肪症、アルコール性肝炎、アルコール性肝壊死、アルコール性肝硬変症、肝壊死、肝脂肪症、糖尿病に合併する肝脂肪症、高脂肪食に関連する肝脂肪症、脂質代謝異常に関連する肝脂肪症、任意の状態に起因する肝炎、任意の状態に起因する肝壊死、急性肝炎、慢性肝炎、慢性活動性肝炎、ウイルス感染症または肝臓の炎症に続発する肝炎、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、D型肝炎、E型肝炎、G型肝炎、任意の薬物又は毒素の作用に関連する肝炎、胆汁うっ滞に関連する肝炎又は肝機能障害、原発性胆汁性肝硬変症、肝肉芽腫症、及び/又は高組織又は血中濃度の腫瘍壊死因子が病因となっているような状態より選択される任意の状態への素因をもつ哺乳動物患者を処置する方法であって、該患者にアディポネクチン及び/又はそのアゴニストを投与するステップを含む方法にある。

30

【0189】

該患者はヒトであり、該アディポネクチンはヒトアディポネクチンであるのが好ましい。

40

【0190】

該アディポネクチンは完全長であるのが好ましい。

【0191】

該アディポネクチンはグリコシル化されているのが好ましい。

【0192】

アディポネクチンはヒトの処置との関連では、技術上周知の分子生物学(遺伝子組換え技術を含む)、微生物学、細胞生物学、生化学、核酸化学及び免疫学の常法によって得られるようなアディポネクチン、及び/又はヒトアディポネクチンに関連するそのアゴニス

50

トを含むのが好ましい。アディポネクチンは遺伝子組換え技術によって、該タンパク質をコードするポリヌクレオチド(通常はDNA)配列を発現ベクター中に挿入し、好適な宿主中で該ペプチドを発現させることにより、産生してもよい。目的のポリペプチドを(融合型又は成熟型としてであれ、また分泌を可能にするシグナル配列を含もうが含むまいが)コードするポリヌクレオチドは、任意の好都合な宿主にふさわしい発現ベクターに導入してもよい。技術上周知の任意多様な発現ベクターを使用してよいが、グリコシル化などの翻訳後修飾能を備える真核発現系が推奨される。発現は組換えペプチドをコードするDNA分子を収めた発現ベクターを導入してある任意好適な宿主細胞中で実現されよう。真核宿主細胞の例は技術上周知であり、酵母、鳥、昆虫、植物及び動物の細胞たとえばCOS7、HeLa、CHO及び他哺乳動物細胞などが含まれる。真核宿主細胞は発現タンパク質を独自の様式でグリコシル化するため、発現タンパク質がグリコシル化される様式を見極めることで好適な宿主細胞を特定し、もって目的のアディポネクチンポリペプチド・グリコアイソフォームを発現する宿主細胞を選定することができる。組換え体の産生技法はたとえば前掲Sambrookで開示されている。目的のアディポネクチンは、アディポネクチン又はその生物活性断片又はその変異体又はそのアイソフォームをコードする組換えポリヌクレオチドを哺乳動物細胞中で発現させることにより獲得することができる。

10

【0193】

別の実施態様では、アディポネクチンは(アイソフォーム及びグリコアイソフォームの混合物を含めて)血清又は脂肪細胞などを非限定的に含む動物組織から精製することもできる。脂肪細胞由来のアディポネクチンを精製する方法は技術上周知であり、また前記米国特許出願第60/349,885号明細書でもさらに開示している。グリコシル化アディポネクチンの組成物を獲得する源となりうる動物はヒト、マウス、ラット、犬、牛、及びヒトを除く霊長類である。

20

【0194】

本明細書でいう「有効量」は臨床結果を含めた有益な又は所望の結果をもたらすに足る任意の量を意味する。

【0195】

肝臓の様々な状態たとえばアルコール性肝疾患、アルコール性肝脂肪症、アルコール性肝炎及びアルコール性肝壊死、糖尿病性脂肪症及び糖尿病、高脂肪食±肝脂肪症に続発するインスリン抵抗性などがアディポネクチンタンパク質及びアディポネクチンmRNAの血中及び脂肪中濃度の低下を伴うことは、本発明者により立証済みである(アルコール摂取関連のデータについては、本明細書を参照)。

30

【0196】

従って、アディポネクチン欠乏症が存在するときには、理想的には十分な量の活性型アディポネクチンを処置対象の哺乳動物又はヒトに追加して、アディポネクチンの循環血液又は組織濃度を正常値に、又は正常値の±5%以内又は正常値の±10%以内又は正常値の±25%以内又は正常値の±50%以内に、回復させるのが好ましいというのが重要な処置原則である。しかし、アディポネクチン療法は一見正常な循環濃度のアディポネクチンが存在するときでも有効でありうる。従って正常アディポネクチン濃度の存在はアディポネクチン療法への禁忌ではない。

40

【0197】

そうした有効量は様々な投与経路により単回投与又は頻回投与で投与することができる。

【0198】

本明細書でいう「哺乳動物」はヒトとマウスの他に、家畜、スポーツ動物、ペット、霊長類に限らない任意好適な哺乳動物を含む。

【0199】

アルコール性肝疾患に特有の状況は脂肪症(脂肪浸潤)、炎症、壊死、線維症、硬変症及び/又は機能障害のうちいずれか1つ又は複数によって予知されよう。

【0200】

50

本発明に従うヒトへの使用に適した好ましい剤形は、アディポネクチンをヒトに投与することができてしかも貯蔵時の安定性喪失や体内での薬効誘発前の無用の不活性化を招くことのないような任意の形である。

【0201】

下文で開示するように、該アディポネクチンはその最も単純な形において、かつ(カプセルであれ何であれ)容器に何ら依存することなく、浸透圧ポンプなどのような外科的に埋め込んだ送達装置によって投与することができるし、また技術上周知のように、処置用タンパク質の投与に適した代替剤形を使用してもよい。

【0202】

従って本発明の別の態様では、アディポネクチンをなお自らコードすることができる哺乳動物患者を処置する方法であって、アディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを該患者に十分に投与して、TNF- α レベルをそのような投与なしに存在していたであろう又はおそらく存在していたであろうものよりも低く抑えるようにするステップを含む方法が提供される。

10

【0203】

そうした投与はTNF- α 疾患又は障害及び/又はTNF- α 疾患又は障害の何らかの特徴を処置、改善、予防及び/又は逆転するためであるのが好ましい。

【0204】

該哺乳動物はヒトであり、また該アディポネクチンはヒトアディポネクチンであるのが好ましい。

20

【0205】

該アディポネクチンは完全長であるのが好ましい。

【0206】

該アディポネクチンはグリコシル化されているのが好ましい。

【0207】

該アディポネクチンはリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたヒトアディポネクチンであればなお好ましい。

【0208】

該TNF- α 疾患又は障害は次のうちいずれか1つ又は複数であるのが好ましい：炎症性疾患、循環器系疾患、門脈圧亢進症、肺高血圧症、アレルギー性疾患、クローン病、自己免疫性溶血性貧血、乾癬、肝疾患、脾疾患、神経変性病、中枢神経障害、毒素血症、更年期障害、妊娠中毒症、脂肪過多症、高脂質血症、高コレステロール血症、耐糖能異常、充実性腫瘍、がん腫と付随の悪液質、内分泌疾患、クロイツフェルト-ヤコブ病、ウイルス感染症、経皮術後冠動脈血管形成術、血管肥大又は閉塞、PTCA/ステント/バイパス手術後血管再閉塞/再狭窄、介入後血管肥大又は閉塞、移植誘発性血管障害及び拒絶反応の抑制、臓器又は組織移植及び自己免疫疾患に続く拒絶反応の発現、腫瘍の処置及び拒絶反応の処置予防に関連するショック関連症状を解消又は緩和するためのTNF生成に関連する副作用、透析性低血圧症、緑内障、高眼圧、重症筋無力症、慢性疲労、骨の病気、神経障害、TNF- α 誘発インスリン抵抗性、細胞死異常、糖尿病又はストレス高血糖症の合併症、慢性閉塞性肺疾患、慢性気管支炎及び気腫。

30

40

【0209】

該炎症反応は次のうちいずれか1つであるのが好ましい：網膜症、ネフロパシー、ニューロパシー、大血管及び微小血管障害、糖尿病性ネフロパシーなどのような糖尿病合併症；慢性リウマチ様関節炎、変形性関節炎、リウマチ様骨髄炎及び骨膜炎などの関節炎；術後/外傷後炎症；腫脹の改善；咽頭炎；膀胱炎；肺炎；心筋炎；心筋症；アトピー性皮膚炎；クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患；髄膜炎；炎症性眼疾患；肺炎、珪肺肺核症、肺サルコイドーシス、炎症性骨疾患及び肺結核などの炎症性肺疾患。

【0210】

該循環器系疾患は、不整脈、狭心症、心筋梗塞、心不全及びうっ血性心不全などを含む慢性心不全、アテローム性動脈硬化症を含む動脈硬化症、高血圧症、深部静脈血栓症、閉

50

塞性末梢循環不全、虚血性脳循環不全、播種性血管内凝固症候群、レイノー病、バージャー病のうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0211】

該アレルギー性疾患は喘息、アレルギー性鼻炎、結膜炎、消化管アレルギー、花粉症及び過敏症、慢性閉塞性肺疾患、膠原病のうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0212】

該神経変性病はアルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、AIDS、脳症のうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0213】

該中枢神経障害は脳出血や脳梗塞及びその後遺症、頭蓋外傷、脊髄損傷、脳水腫、痴呆症、記憶障害、意識障害、多発性硬化症のうちいずれか1つを含むのが好ましい。 10

【0214】

該毒素血症は敗血症、敗血症性ショック、内毒素性ショック、グラム陰性菌敗血症、毒素ショック症候群のうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0215】

該がん性腫瘍は悪性黒色腫、悪性リンパ腫、消化器がんのうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0216】

該内分泌疾患はアジソン病、クッシング症候群、褐色細胞腫及び原発性アルドステロン症のうちいずれか1つを含むのが好ましい。 20

【0217】

該自己免疫疾患は甲状腺炎などの器官特異疾患又はリウマチ様及び変形性関節炎などの非器官特異疾患のうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0218】

該骨疾患は骨折、再骨折、骨粗鬆症、骨軟化症、骨ペーチェット病、硬化性脊椎炎、慢性リウマチ様関節炎、変形性膝関節炎、それに関連疾患に関連する関節組織破壊のうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0219】

該神経障害は個別神経、神経根、脊髄及び/又は脳への外傷、急性脊髄及び脳損傷、脱髄疾患たとえば多発性硬化症、転移性がん起因する脊髄圧迫、原発性又は転移性脳腫瘍、転移性腫瘍起因する慢性痛症候群、炎症性CNS疾患たとえば亜急性硬化性全脳炎、ハンチントン病、ギラン-バレー症候群、顔面麻痺、糖尿病性ニューロパシー、視神経炎、黄斑変性症、網膜色素変性症、糖尿病性網膜症、筋ジストロフィー及び多発性筋炎-皮膚筋炎を含むのが好ましい。 30

【0220】

該細胞死異常は任意のウイルス性細胞死阻害を含むのが好ましい。

【0221】

該糖尿病又はストレス高血糖症合併症は心筋梗塞、うっ血性心不全及び心臓性ショックのうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0222】

該アディポネクチンはヒトアディポネクチンであるのが好ましい。 40

【0223】

該アディポネクチンはグリコシル化されているのが好ましい。

【0224】

該アディポネクチンはリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたヒトアディポネクチンであればなお好ましい。当然ながら、ヒト以外の種のアディポネクチン、アディポネクチン変異体又はヒトアディポネクチンとは異なる短縮型アディポネクチンに関して該アディポネクチンの残基を参照するには、最適アラインメントによって決定した対応するヒト配列残基の参照番号を使用することができる。

【0225】

該アディポネクチン製剤は、ヒトへの投与に適するように、好ましくは皮下(sc)、皮内(id)、静脈内(iv)、腹腔内(ip)又は経皮などの経路による非経口投与に適した形に、調製してもよい。該アディポネクチンを経口、経腸、経膈、膀胱内、くも膜下、心室内、脳内又は技術上周知の他経路で投与するような他製剤も見込まれる。

【0226】

好ましい投与経路は非経口である。非経口投与に適したアディポネクチンは安定化用の緩衝液を含む水溶液に調製し、好ましくはほぼ等張にし、また哺乳動物特にヒトへの投与に適したタンパク質製剤用として技術上周知の防腐、消泡、抗沈殿等の安定化剤、特に哺乳動物好ましくはヒトに投与するための処置用タンパク質溶液の安定化に適した安定化剤を添加する。

10

【0227】

第2の態様では、本発明はアディポネクチンをなお自らコードすることができる哺乳動物患者を処置する方法であって、アディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを該患者に十分に投与して、TNF- α レベルをそのような投与なしに存在していたであろう又はおそらく存在していたであろうものよりも低く抑えるようにし、もって次のうちいずれか1つ又は複数の症状に関して有利な反応を誘発するステップを含む方法にある：炎症性疾患、循環器系疾患、門脈圧亢進症、肺高血圧症、アレルギー性疾患、クローン病、自己免疫性溶血性貧血、乾癬、肝疾患、脾疾患、神経変性病、中枢神経障害、毒素血症、更年期障害、妊娠中毒症、脂肪過多症、高脂質血症、高コレステロール血症、耐糖能異常、充実性腫瘍、がん腫と付随の悪液質、内分泌疾患、クロイツフェルト-ヤコブ病、ウイルス感染症、経皮術後冠動脈血管形成術、血管肥大又は閉塞、PTCA/ステント/バイパス手術後血管再閉塞/再狭窄、介入後血管肥大又は閉塞、移植誘発性血管障害及び拒絶反応の抑制、臓器又は組織移植及び自己免疫疾患に続く拒絶反応の発現、腫瘍の処置及び拒絶反応の処置予防に関連するショック関連症状を解消又は緩和するためのTNF生成に関連する副作用、透析性低血圧症、緑内障、高眼圧、重症筋無力症、慢性疲労、骨の病

気、神経障害(個別神経、神経根、脊髄及び/又は脳への外傷、傷害、圧迫を含む)、TNF- α 誘発インスリン抵抗性、細胞死異常、糖尿病又はストレス高血糖症の合併症、慢性閉塞性肺疾患、慢性気管支炎及び気腫。

20

【0228】

該炎症反応は次のうちいずれか1つであるのが好ましい：網膜症、ネフロパシー、ニューロパシー、大血管及び微小血管障害、糖尿病性ネフロパシーなどのような糖尿病合併症；慢性リウマチ様関節炎、変形性関節炎、リウマチ様骨髄炎及び骨膜炎などの関節炎；術後/外傷後炎症；腫脹の改善；咽頭炎；膀胱炎；肺炎；心筋炎；心筋症；アトピー性皮膚炎；クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患；髄膜炎；炎症性眼疾患；肺炎、珪肺核症、肺サルコイドーシス、炎症性骨疾患及び肺結核などの炎症性肺疾患。

30

該循環器系疾患は、不整脈、狭心症、心筋梗塞、心不全及びうっ血性心不全などを含む慢性心不全、アテローム性動脈硬化症を含む動脈硬化症、高血圧症、深部静脈血栓症、閉塞性末梢循環不全、虚血性脳循環不全、播種性血管内凝固症候群、レイノー病、バージャー病のうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0229】

該アレルギー性疾患は喘息、アレルギー性鼻炎、結膜炎、消化管アレルギー、花粉症及び過敏症、慢性閉塞性肺疾患、膠原病のうちいずれか1つを含むのが好ましい。

40

該神経変性病はアルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、AIDS、脳症のうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0230】

該中枢神経障害は脳出血や脳梗塞及びその後遺症、頭蓋外傷、脊髄損傷、脳水腫、痴呆症、記憶障害、意識障害、多発性硬化症のうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0231】

該毒素血症は敗血症、敗血症性ショック、内毒素性ショック、グラム陰性菌敗血症、毒素ショック症候群のうちいずれか1つを含むのが好ましい。

50

【0232】

該がん性腫瘍は悪性黒色腫、悪性リンパ腫、消化器がんのうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0233】

該内分泌疾患はアジソン病、クッシング症候群、褐色細胞腫及び原発性アルドステロン症のうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0234】

該自己免疫疾患は甲状腺炎などの器官特異疾患又はリウマチ様及び変形性関節炎などの非器官特異疾患のうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0235】

該骨疾患は骨折、再骨折、骨粗鬆症、骨軟化症、骨ペーチェット病、硬化性脊椎炎、慢性リウマチ様関節炎、変形性膝関節炎、それに関連疾患に関連する関節組織破壊のうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0236】

該神経障害は個別神経、神経根、脊髄及び/又は脳への外傷、急性脊髄及び脳損傷、脱髄疾患たとえば多発性硬化症、転移性がん起因する脊髄圧迫、原発性又は転移性脳腫瘍、転移性腫瘍起因する慢性痛症候群、炎症性CNS疾患たとえば亜急性硬化性全脳炎、ハンチントン病、ギラン-バレー症候群、顔面麻痺、糖尿病性ニューロパシー、視神経炎、黄斑変性症、網膜色素変性症、糖尿病性網膜症、筋ジストロフィー及び多発性筋炎-皮膚筋炎を含むのが好ましい。

【0237】

該細胞死異常は任意のウイルス性細胞死阻害を含むのが好ましい。

【0238】

該糖尿病又はストレス高血糖症合併症は心筋梗塞、うっ血性心不全及び心臓性ショックのうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0239】

該哺乳動物はヒトであり、また該アディポネクチンはヒトアディポネクチンであるのが好ましい。

【0240】

該アディポネクチンは完全長であるのが好ましい。

【0241】

該アディポネクチンはグリコシル化されているのが好ましい。

【0242】

該アディポネクチンはリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたヒトアディポネクチンであればなお好ましい。当然ながら、ヒト以外の種のアディポネクチン、アディポネクチン変異体又はヒトアディポネクチンとは異なる短縮型アディポネクチンに関して該アディポネクチンの残基を参照するには、最適アラインメントによって決定した対応するヒト配列残基の参照番号を使用することができる。

【0243】

該アディポネクチン製剤は、ヒトへの投与に適するように、好ましくは皮下(sc)、皮内(id)、静脈内(iv)、腹腔内(ip)又は経皮などの経路による非経口投与に適した形に、調製してもよい。該アディポネクチンを経口、経腸、経膈、膀胱内、くも膜下、心室内、脳内又は技術上周知の他経路で投与するような他製剤も見込まれる。

【0244】

好ましい投与経路は非経口である。非経口投与に適したアディポネクチンは安定化用の緩衝液を含む水溶液に調製し、好ましくはほぼ等張にし、また哺乳動物特にヒトへの投与に適したタンパク質製剤用として技術上周知の防腐、消泡、抗沈殿等の安定化剤、特に哺乳動物好ましくはヒトに投与するための処置用タンパク質溶液の安定化に適した安定化剤を添加する。

【0245】

10

20

30

40

50

本発明の別の態様では、アディポネクチンをなお自らコードすることができる哺乳動物患者を処置する方法であって、アディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを該患者に十分に投与して、TNF- mRNAレベルをそのような投与なしに存在していたであろう又はおそらく存在していたであろうものよりも低く抑えるようにするステップを含む方法が提供される。

【0246】

そうした投与はTNF- 疾患又は障害及び/又はTNF- 疾患又は障害の何らかの特徴を処置、改善、予防及び/又は逆転するためであるのが好ましい。

【0247】

該哺乳動物はヒトであり、また該アディポネクチンはヒトアディポネクチンであるのが好ましい。 10

【0248】

該アディポネクチンは完全長であるのが好ましい。

【0249】

該アディポネクチンはグリコシル化されているのが好ましい。

【0250】

該アディポネクチンはリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたヒトアディポネクチンであればなお好ましい。

【0251】

本発明の別の態様では、アディポネクチンをなお自らコードすることができる哺乳動物患者を処置する方法であって、アディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを該患者に十分に投与して、TNF- 疾患又は傷害及び/又はTNF- 疾患又は傷害の任意の特徴を処置、緩和、予防し及び/又は逆転するようにするステップを含む方法が提供される。 20

【0252】

本発明の別の態様では、哺乳動物患者に対するTNF- の悪影響を緩和する方法であって、そうした処置を必要とする患者に処置有効量のアディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを投与するステップを含む方法が提供される。

【0253】

該哺乳動物はヒトであり、また該アディポネクチンはヒトアディポネクチンであるのが好ましい。 30

【0254】

該アディポネクチンは完全長であるのが好ましい。

【0255】

該アディポネクチンはグリコシル化されているのが好ましい。

【0256】

該アディポネクチンはリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたヒトアディポネクチンであればなお好ましい。

【0257】

本発明のさらなる態様では、望ましくないほど高い濃度のTNF- に関連する疾患又は傷害に、又はその危険性に、見舞われている哺乳動物患者を処置する方法であって、該患者に有効量のアディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを投与するステップを含む方法が提供される。 40

【0258】

該哺乳動物はヒトであり、また該アディポネクチンはヒトアディポネクチンであるのが好ましい。

【0259】

該アディポネクチンは完全長であるのが好ましい。

【0260】

該アディポネクチンはグリコシル化されているのが好ましい。 50

【0261】

該アディポネクチンはリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたヒトアディポネクチンであればなお好ましい。

【0262】

本発明のさらなる態様では、哺乳動物患者のTNF- 関連疾患又は傷害を処置するためのTNF- の作用を阻害し及び/又は該作用に拮抗する方法であって、該患者に有効量のアディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを投与するステップを含む方法が提供される。

【0263】

該哺乳動物はヒトであり、また該アディポネクチンはヒトアディポネクチンであるのが好ましい。 10

【0264】

該アディポネクチンは完全長であるのが好ましい。

【0265】

該アディポネクチンはグリコシル化されているのが好ましい。

【0266】

該アディポネクチンはリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたヒトアディポネクチンであればなお好ましい。

【0267】

別の態様では、本発明は哺乳動物患者の処置方法であって、該哺乳動物患者のアディポネクチンを(直接又は間接に)モニターするステップ及び/又はアディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを該哺乳動物患者に投与しもってTNF- レベルをそのような投与なしに存在していたであろう又はおそらく存在していたであろうものよりも低く抑えるようにするステップを任意の順序で含む方法にある。 20

【0268】

そうした投与はTNF- 疾患又は障害及び/又はTNF- 疾患又は障害の何らかの特徴を処置、改善、予防及び/又は逆転するためであるのが好ましい。

【0269】

該哺乳動物はヒトであり、また該アディポネクチンはヒトアディポネクチンであるのが好ましい。 30

【0270】

該アディポネクチンは完全長であるのが好ましい。

【0271】

該アディポネクチンはグリコシル化されているのが好ましい。

【0272】

該アディポネクチンはリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたヒトアディポネクチンであればなお好ましい。

【0273】

別の態様では、本発明は哺乳動物患者の処置方法であって、該哺乳動物患者のアディポネクチンmRNAを(直接又は間接に)モニターするステップ及び/又はアディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを該哺乳動物患者に投与しもってTNF- レベルをそのような投与なしに存在していたであろう又はおそらく存在していたであろうものよりも低く抑えるようにするステップを任意の順序で含む方法にある。 40

【0274】

そうした投与はTNF- 疾患又は障害及び/又はTNF- 疾患又は障害の何らかの特徴を処置、改善、予防及び/又は逆転するためであるのが好ましい。

【0275】

該哺乳動物はヒトであり、また該アディポネクチンはヒトアディポネクチンであるのが好ましい。

【0276】

該アディポネクチンは完全長であるのが好ましい。

【0277】

該アディポネクチンはグリコシル化されているのが好ましい。

【0278】

該アディポネクチンはリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたヒトアディポネクチンであればなお好ましい。

【0279】

別の態様では、本発明は哺乳動物患者の処置方法であって、該哺乳動物患者のアディポネクチンを(直接又は間接に)モニターするステップ及び/又はアディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを該哺乳動物患者に投与しもってTNF- 疾患又は障害及び/又はTNF- 疾患又は障害の何らかの特徴を処置、改善、予防及び/又は逆転するようにするステップを任意の順序で含む方法にある。

10

【0280】

該哺乳動物はヒトであり、また該アディポネクチンはヒトアディポネクチンであるのが好ましい。

【0281】

該アディポネクチンは完全長であるのが好ましい。

【0282】

該アディポネクチンはグリコシル化されているのが好ましい。

【0283】

該アディポネクチンはリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたヒトアディポネクチンであればなお好ましい。

20

【0284】

別の態様では、本発明は哺乳動物患者の処置方法であって、該哺乳動物患者のアディポネクチンmRNAを(直接又は間接に)モニターするステップ及び/又はアディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを該哺乳動物患者に投与しもってTNF- 疾患又は障害及び/又はTNF- 疾患又は障害の何らかの特徴を処置、改善、予防及び/又は逆転するようにするステップを任意の順序で含む方法にある。

【0285】

該哺乳動物はヒトであり、また該アディポネクチンはヒトアディポネクチンであるのが好ましい。

30

【0286】

該アディポネクチンは完全長であるのが好ましい。

【0287】

該アディポネクチンはグリコシル化されているのが好ましい。

【0288】

該アディポネクチンはリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたヒトアディポネクチンであればなお好ましい。

【0289】

別のさらなる態様では、本発明はTNF- 濃度を投与前又は投与しなかった場合に想定される濃度よりも低く抑えるための使用に有効な剤形又は医薬組成物の製造への、(好ましくは有効量の)アディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストの、(賦形剤、補助剤、希釈剤等であれ、投与単位を規定する容器であれ)他の一又は複数の材料と一緒に、使用にある。

40

【0290】

そうした剤形又は医薬組成物はTNF- 疾患又は障害及び/又はTNF- 疾患又は障害の何らかの特徴を処置、改善、予防及び/又は逆転するためであるのが好ましい。

【0291】

該哺乳動物はヒトであり、また該アディポネクチンはヒトアディポネクチンであるのが好ましい。

50

【0292】

該アディポネクチンは完全長であるのが好ましい。

【0293】

該アディポネクチンはグリコシル化されているのが好ましい。

【0294】

該アディポネクチンはリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたヒトアディポネクチンであればなお好ましい。

【0295】

別のさらなる態様では、本発明はTNF- 疾患又は障害及び/又はTNF- 疾患又は障害の何らかの特徴の処置、改善、予防及び/又は逆転への使用に有効な剤形又は医薬組成物の製造への、(好ましくは有効量の)アディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストの、(賦形剤、補助剤、希釈剤等であれ、投与単位を規定する容器であれ)他の一又は複数の材料と一緒に、使用にある。

10

【0296】

該哺乳動物はヒトであり、また該アディポネクチンはヒトアディポネクチンであるのが好ましい。

【0297】

該アディポネクチンは完全長であるのが好ましい。

【0298】

該アディポネクチンはグリコシル化されているのが好ましい。

20

【0299】

該アディポネクチンはリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたヒトアディポネクチンであればなお好ましい。

【0300】

別のさらなる態様では、本発明は

アディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを入れた容器；

TNF- 濃度を投与前又は投与しなかった場合に想定される濃度よりも低く抑えるための使用に有効であるアディポネクチン又はアディポネクチン作用部位のアゴニストの(たとえば該容器に入れた状態での)使用に関する説明書きを含む製造品にある。

30

【0301】

別のさらなる態様では、本発明は

アディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを入れた容器；

TNF- 疾患又は障害及び/又はTNF- 疾患又は障害の何らかの特徴の処置、改善、予防及び/又は逆転への使用に有効であるアディポネクチン又はアディポネクチン作用部位のアゴニストの(たとえば該容器に入れた状態での)使用に関する説明書きを含む製造品にある。

【0302】

別のさらなる態様では、本発明は

アディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを入れた包装資材；

TNF- 濃度を投与前又は投与しなかった場合に想定される濃度よりも低く抑えるための使用に有効であるアディポネクチン又はアディポネクチン作用部位のアゴニストの(たとえば該包装資材に入れた状態での)使用に関する説明書きを含む製造品にある。

40

【0303】

別のさらなる態様では、本発明は

アディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを入れた包装資材；

TNF- 疾患又は障害及び/又はTNF- 疾患又は障害の何らかの特徴の処置、改善、予防及び/又は逆転への使用に有効であるアディポネクチン又はアディポネクチン作用部位のアゴニストの(たとえば該包装資材に入れた状態での)使用に関する説明書き

50

を含む製造品にある。

【0304】

別の態様では、本発明は肝疾患の素因がある及び/又は肝疾患の何らかの特徴を示す哺乳動物患者を処置する方法であって、アディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを該患者に投与するステップを含む方法にある。

【0305】

該肝疾患は、急性肝疾患、慢性肝疾患、肝臓の炎症、肝臓の機能障害、脂肪肝(肝脂肪症)、肝線維症、肝硬変症、肝臓の壊死、肝細胞壊死、アルコール性肝疾患、アルコール性肝脂肪症、アルコール性肝炎、アルコール性肝壊死、アルコール性肝硬変症、肝壊死、肝脂肪症、糖尿病に合併する肝脂肪症、高脂肪食に関連する肝脂肪症、脂質代謝異常に関連する肝脂肪症、任意の状態に起因する肝炎、任意の状態に起因する肝壊死、急性肝炎、慢性肝炎、慢性活動性肝炎、ウイルス感染症または肝臓の炎症に続発する肝炎、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、D型肝炎、E型肝炎、G型肝炎、任意の薬物又は毒素の作用に関連する肝炎、胆汁うっ滞に関連する肝炎又は肝機能障害、原発性胆汁性肝硬変症、肝肉芽腫症、及び/又は高組織又は血中濃度の腫瘍壊死因子が病因となっているような状態のうち任意の1つ又は複数でもよい。

10

【0306】

該哺乳動物はヒトであり、また該アディポネクチンはヒトアディポネクチンであるのが好ましい。

【0307】

該アディポネクチンは完全長であるのが好ましい。

20

【0308】

該アディポネクチンはグリコシル化されているのが好ましい。

【0309】

該アディポネクチンはリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたアディポネクチンであればなお好ましい。

【0310】

アディポネクチンはヒトの処置との関連では、技術上周知の分子生物学(遺伝子組換え技術を含む)、微生物学、細胞生物学、生化学、核酸化学及び免疫学の常法によって得られるようなアディポネクチン、及び/又はヒトアディポネクチンに関連するそのアゴニストを含むのが好ましい。アディポネクチンは遺伝子組換え技術によって、該タンパク質をコードするポリヌクレオチド(通常はDNA)配列を発現ベクター中に挿入し、好適な宿主中で該ペプチドを発現させることにより、産生してもよい。目的のポリペプチドを(融合型又は成熟型としてであれ、また分泌を可能にするシグナル配列を含もうが含むまいが)コードするポリヌクレオチドは、任意の好都合な宿主に好適な発現ベクターに導入してもよい。技術上周知の任意多様な発現ベクターを使用してよいが、グリコシル化などの翻訳後修飾能を備える真核発現系が推奨される。発現は組換えペプチドをコードするDNA分子を収めた発現ベクターを導入してある任意好適な宿主細胞中で実現されよう。真核宿主細胞の例は技術上周知であり、酵母、鳥、昆虫、植物及び動物の細胞たとえばCOS7、HeLa、CHO及び他哺乳動物細胞などが含まれる。真核宿主細胞は発現タンパク質を独自の様式でグリコシル化するため、発現タンパク質がグリコシル化される様式を見極めることで好適な宿主細胞を特定し、もって目的のアディポネクチンポリペプチド・グリコアイソフォームを発現する宿主細胞を選定することができる。組換え体の産生技法はたとえば前掲Sambrookで開示されている。目的のアディポネクチンは、アディポネクチン又はその生物活性断片又はその変異体又はそのアイソフォームをコードする組換えポリヌクレオチドを哺乳動物細胞中で発現させることにより獲得することができる。

30

40

【0311】

別の実施態様では、アディポネクチンは(アイソフォーム及びグリコアイソフォームの混合物を含めて)血清又は脂肪細胞などを非限定的に含む動物組織から精製することもできる。脂肪細胞由来のアディポネクチンを精製する方法は技術上周知であり、また前記米

50

国特許出願第60/349,885号明細書でもさらに開示している。グリコシル化アディポネクチン組成物を獲得する源となりうる動物はヒト、マウス、ラット、犬、牛、及びヒトを除く霊長類である。

【0312】

本明細書でいう「有効量」は臨床結果を含めた有益な又は所望の結果をもたらすに足る任意の量を意味する。

【0313】

肝臓の様々な状態たとえばアルコール性肝疾患、アルコール性肝脂肪症、アルコール性肝炎及びアルコール性肝壊死、糖尿病性脂肪症及び糖尿病、高脂肪食±肝脂肪症に続発するインスリン抵抗性などは、アディポネクチンタンパク質及びアディポネクチンmRNAの血液及び脂肪中濃度の低下を伴うことは、本発明者により立証済みである(アルコール摂取関連のデータについては、本明細書を参照)。

10

【0314】

従って、アディポネクチン欠乏症が存在するときには、理想的には十分な量の活性型アディポネクチンを処置対象の哺乳動物又はヒトに追加して、アディポネクチンの循環血液又は組織濃度を正常値に、又は正常値の±5%以内又は正常値の±10%以内又は正常値の±25%以内又は正常値の±50%以内に、回復させるのが好ましいというのが重要な処置原則である。しかし、アディポネクチン療法は一見正常な循環アディポネクチン濃度が存在するときでも有効でありうる。従って正常アディポネクチン濃度の存在はアディポネクチン療法への禁忌ではない。

20

【0315】

そうした有効量は様々な投与経路により単回投与又は頻回投与で投与することができる。

【0316】

本明細書でいう「哺乳動物」はヒトとマウスの他に、家畜、スポーツ動物、ペット、霊長類に限らない任意好適な哺乳動物を含む。

【0317】

アルコール性肝疾患に特有の状況は脂肪症(脂肪浸潤)、炎症、壊死、線維症、硬変症及び/又は機能障害のうちいずれか1つ又は複数によって予知されよう。

【0318】

本発明に従うヒトへの使用に適した好ましい剤形は、アディポネクチンをヒトに投与することができてしかも貯蔵時の安定性喪失や体内での薬効誘発前の無用の不活性化を招くことのないような任意の形である。

30

【0319】

下文で開示するように、該アディポネクチンはその最も単純な形において、かつ(カプセルであれ何であれ)容器に何ら依存することなく、浸透圧ポンプなどのような外科的に埋め込んだ送達装置によって投与することができるし、また技術上周知のように、処置用タンパク質の投与に適した代替剤形を使用してもよい。

【0320】

本発明はグリコシル化アディポネクチンとグリコシル化アディポネクチン組成物とを提供する。そうしたアディポネクチンは(たとえば本明細書で開示する任意の効果をもたらすための)処置用又は医薬用であるのが好ましい。一態様では、本発明はグリコシル化された組換え、単離、精製又は合成アディポネクチンポリペプチドを提供する。該アディポネクチンポリペプチドはヒトアディポネクチンであるのが好ましい。ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101(残基番号はヒトアディポネクチンに従った)に対応する1以上のリシン残基はグリコシル化されているのが好ましい。一実施態様では、該アディポネクチンは完全グリコシル化されている。別の態様では、リシン残基に付加される糖部分はグルコシルガラクトシル部分又はガラクトシルグルコシル部分である。別の態様では、該アディポネクチンポリペプチドはリシン残基68、71、80及び104(マウス)又はリシン残基65、68、77及び101(ヒト)の各々に1以上のグルコシルガラクトシル部分又はガラク

40

50

トシルグルコシル部分を有する。別の実施態様では、該アディポネクチンポリペプチドは Lys-68、71、80及び104(マウス)又はLys-65、68、77及び101(ヒト)の1以上に、又はLys-68、71、80及び104(マウス)又はLys-65、68、77及び101(ヒト)のすべてに、X1構造を有する。ただしX1はグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルガラクトシル部分及びガラクトシルグルコシル部分のうち1つまたは複数より独立に選択される。一実施態様では、アディポネクチンポリペプチド中のすべてのリシンが完全グリコシル化されている。

【0321】

別の態様では、本発明はグリコシル化体のアディポネクチンポリペプチドを含む組成物を提供する。一実施態様では、該組成物のアディポネクチンポリペプチドは組換え、単離、精製又は合成体である。別の実施態様では、該組成物のアディポネクチンポリペプチドはヒトアディポネクチンである。アディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101(残基番号はヒトアディポネクチンに従った)に対応する1以上のリシン残基はグリコシル化されているのが好ましい。別の実施態様では、該組成物はヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101(又は他生物種又はアディポネクチン変異体の対応する残基)に対応する1以上のリシン残基がグリコシル化されている組換え、単離、精製又は合成アディポネクチンポリペプチドを含む。一実施態様では、該組成物はすべてのリシン残基(Lys-65、68、77及び101)がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチドを含む。別の実施態様では、該組成物はリシン残基65、68、77及び101の各々に1以上の糖部分を有するアディポネクチンポリペプチドを含む。別の実施態様では、該組成物は単一の糖部分でグリコシル化されたアディポネクチンを含む。単一の糖部分はたとえばシアル酸、グルコシル、ガラクトシル、N-アセチルガラクトシル、N-アセチルグルコシル、シアリルLewis X及びフコシルとすることができる。別の実施態様では、該組成物は複数の糖部分でグリコシル化されたアディポネクチンを含む。別の実施態様では、該組成物はリシン残基65、68、77及び101の各々に1以上のグルコシルガラクトシル部分又はガラクトシルグルコシル部分を有するアディポネクチンポリペプチドを含む。別の実施態様では、該アディポネクチンポリペプチドはLys-68、71、80及び104(マウス)又はLys-65、68、77及び101(ヒト)の1以上に、又はLys-68、71、80及び104(マウス)又はLys-65、68、77及び101(ヒト)のすべてに、X1構造を有する。ただしX1はグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルガラクトシル部分及びガラクトシルグルコシル部分のうち1つまたは複数より独立に選択される。別の実施態様では、該組成物はリシン残基65、68、77及び101のすべてにX1構造を有するアディポネクチンポリペプチドを含む。別の実施態様では、該組成物は天然の哺乳動物アディポネクチンの配列を有するアディポネクチンポリペプチドを含む。

【0322】

別の態様では、本発明は1以上の非グリコシル化アディポネクチンアイソフォームを実質的に含まないアディポネクチンポリペプチドを含む組成物を提供する。一実施態様では、該組成物はアイソフォーム1を実質的に含まない。別の実施態様では、該組成物はアイソフォーム2を実質的に含まない。別の実施態様では、該組成物はいかなる非グリコシル化アディポネクチンアイソフォームも実質的に含まない。

【0323】

別の態様では、本発明は支配的なアディポネクチン分子種が完全グリコシル化されているアディポネクチンポリペプチドを含む組成物を提供する。一実施態様では、該組成物はいずれもグリコシル化されているLys-68、71、80及び104を有するアディポネクチンを含む。別の実施態様では、該組成物は複数のアディポネクチンアイソフォームを含む。別の実施態様では、アイソフォーム3が該組成物中の支配的なアディポネクチンである。アイソフォーム4が該組成物中の支配的なアディポネクチンである。アイソフォーム5が該組成物中の支配的なアディポネクチンである。アイソフォーム6が該組成物中の支配的なアディポネクチンである。

【0324】

別の態様では、本発明は哺乳動物に投与するとインスリンの効果を増強するような組成物を提供する。一実施態様では、インスリンは約50pM～約400pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る量又は濃度で存在する。別の実施態様では、インスリンは約100pM～約300pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る量又は濃度で存在する。別の実施態様では、インスリンは約200pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る量又は濃度で存在する。

【0325】

別の態様では、本発明はグリコシル化アディポネクチンの組成物であって、個体に投与したときに糖新生を阻害する働きをもつ組成物を提供する。

【0326】

別の態様では、本発明はグリコシル化アディポネクチンを含む組成物を調製する方法であって、グリコシル化の度合い又はタイプが異なる少なくとも2種類のアディポネクチンポリペプチドを含む第1組成物を獲得するステップ、次いでアディポネクチンポリペプチドをグリコシル化の度合い又はタイプに応じて分離し、もってアディポネクチンポリペプチドプロファイルが第1組成物とは異なる第2組成物を生成させるステップを含む方法を提供する。一実施態様では、該アディポネクチンはアディポネクチンをコードする組換えポリヌクレオチドを哺乳動物細胞中で発現させて獲得する。別の実施態様では、該組換えポリヌクレオチドは図5に記載の配列を有するポリペプチド又はその生物活性断片又はその変異体をコードする。別の実施態様では、該アディポネクチンは動物組織から精製する。別の実施態様では、該動物はヒト、マウス、ラット、犬、牛、又はヒト以外の霊長類である。別の実施態様では、該組織は血清又は脂肪細胞である。別の実施態様では、分離は電気泳動法を伴う。別の実施態様では、分離は電気泳動法を伴わない。別の実施態様では、分離はクロマトグラフィー法を伴う。別の実施態様では、分離はクロマトグラフィー法を伴わない。別の実施態様では、第2組成物は以上掲げた特許請求組成物のうちいずれかである。

【0327】

別の態様では、本発明は以上の方法のうちいずれかで調製される組成物を提供する。

【0328】

別の態様では、本発明は個体を対象にアディポネクチン調節に関連する病状の存在又は素因を診断する方法であって、特定アディポネクチンアイソフォームのレベル又は2以上のグリコシル化アディポネクチンアイソフォームの発現プロファイルをモニターするステップを含む方法を提供する。一実施態様では、該病状は高血糖症、インスリン抵抗性、インスリン抵抗性に関連する代謝症候群、II型糖尿病、本態性高血圧症を含む代謝症候群、動脈硬化症、冠状動脈性心臓病、虚血性心疾患、多嚢胞性卵巣症候群又はアディポネクチン欠乏症又は肥満症に関連する他の病状である。別の実施態様では、該アディポネクチンは生物試料から獲得する。別の実施態様では、1以上のアイソフォームは完全グリコシル化されている。別の実施態様では、該レベル又は発現パターンはグリコシル化アディポネクチンアイソフォームのレベル又は発現パターンから決定する。別の実施態様では、該評価方法は電気泳動法、HPLC法又は質量分析法である。

【0329】

別の態様では、本発明は個体を対象に病状の存在又は病状を発現しやすい素因を診断する方法であって、該個体のある特定アディポネクチンポリペプチドアイソフォームのレベル又は2以上のグリコシル化アディポネクチンポリペプチドアイソフォームの発現プロファイルを決定するステップ及び該発現プロファイルを、該病状を患っていない個体に特有の発現プロファイルと比較し、発現プロファイルの差異から該病状の存在又は該病状を発現しやすい素因を読み取るステップを含む方法である。

【0330】

別の態様では、本発明は個体を対象に病状の存在又は病状を発現しやすい素因を診断する方法であって、該個体のある特定アディポネクチンポリペプチドアイソフォームのレベル又は2以上のグリコシル化アディポネクチンポリペプチドアイソフォームの発現プロファイルを決定するステップ及び該発現プロファイルを、該病状を患っている個体に特有の

発現プロファイルと比較し、発現プロファイルの類似性から該病状の存在又は該病状を発現しやすい素因を読み取るステップを含む方法である。

【0331】

別の態様では、本発明は個体のアディポネクチン調節に関連する病状を処置する方法であって、有効量の任意の前記組成物を該個体に投与するステップを含む方法を提供する。一実施態様では、該病状は高血糖症、インスリン抵抗性、インスリン抵抗性に関連する代謝症候群、II型糖尿病、高血圧症を含む代謝症候群、動脈硬化症、冠状動脈性心臓病、虚血性心疾患、多嚢胞性卵巣症候群又はアディポネクチン欠乏症又は肥満症に関連する他の病状である。

【0332】

別の態様では、本発明は哺乳動物患者のi)アディポネクチンポリペプチド調節に関連する病状の処置;又はii)インスリンの効果の増強;又はiii)糖新生の阻害に有効である剤形又は医薬組成物又は医薬の調製へのグリコシル化アディポネクチンポリペプチドの使用を提供する。該アディポネクチンポリペプチドは組換え、単離、精製又は合成体であるのが好ましい。該アディポネクチンはヒトアディポネクチンであるのが好ましい。該剤形又は医薬組成物又は医薬はインスリンを追加的に含むのが好ましい。該インスリンは約50pM~約400pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る濃度であるのが好ましい。該インスリンは約100pM~約300pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る濃度であるのが好ましい。該インスリンは約200pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る濃度であるのが好ましい。

【0333】

I. 一般技法

本発明の実施には技術上周知の通常の、分子生物学、微生物学、細胞生物学、生化学、核酸化学及び免疫学的な(遺伝子組換え技法を含めた)技法が使用されよう。そうした技法はたとえば次の文献で余すところなく説明されている: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al., 1989)及びMolecular Cloning: A Laboratory Manual, third edition (Sambrook and Russell, 2001)(本明細書では一括してSambrookと呼ぶ); Current Protocols in Molecular Biology (F.M Ausubel et al., eds., 1987, 2001年までの補遺を含む); PCR: The Polymerase Chain Reaction (Mullis et al., eds., 1994); Harlow and Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York及びHarlow and Lane (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (本明細書では一括してHarlow and Laneと呼ぶ); Beaucage et al., eds., Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2000).

【0334】

II. 用語の意味

「抗体」(Ab)及び「免疫グロブリン」(Ig)は同じ構造的特徴をもつ糖タンパク質である。抗体は特定の抗原に対して結合特異性を示すが、免疫グロブリンは抗体だけでなく抗原特異性を欠く他の抗体様分子をも含む。後者の種類のポリペプチドはたとえばリンパ系で低レベルに、また骨髄腫で高レベルに、産生される。用語「抗体」は最広義で使用され、特にインタクトなモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、2以上のインタクト抗体から形成される多重特異性抗体(たとえば二重特異性抗体)、及び所望の生物活性を示す限りでの抗体断片などを非限定的に含む。

【0335】

「抗体断片」はインタクト抗体の一部、好ましくはインタクト抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例はFab、Fab'、F(ab')₂及びFv断片; ダイアボディ; 線状抗体(Zapata et al., Protein Eng., 8 10: 1057-1062 [1995]); 単鎖抗体分子; 及び抗体断片から形成された多重特異性抗体などである。

【0336】

本明細書で使用する用語「モノクローナル抗体」は実質的に同種の抗体の集団(少量存在する可能性がある天然突然変異を別にすればまったく同じ個体からなる集団)から得ら

10

20

30

40

50

れる抗体をいう。モノクローナル抗体は特異性が高く、単一の抗原決定基を認識する。さらに種々の決定基(エピトープ)を認識する種々の抗体を含むのが普通である通常の(ポリクローナル)抗体調製品とは異なり、各モノクローナル抗体は抗原上の単一決定基を認識する。モノクローナル抗体はその特異性に加えて、ハイブリドーマ培養によって、他免疫グロブリンの汚染を受けずに合成されるという利点もある。「モノクローナル」という修飾語は、実質的に同種の抗体集団から得られるという該抗体の特性を表わし、該抗体の生産に特定の方法が必要になるという意味ではない。たとえば本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature, 256:495 [1975]が最初に開示したハイブリドーマ法で生産してもよいし、組換えDNA法(たとえば米国特許第4,816,567号明細書を参照)で生産してもよい。「モノクローナル抗体」はまた、Clackson et al., Nature, 352:624-628 [1991]及びMarks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)で開示の技法を使用してファージ抗体ライブラリーから単離してもよい。

【0337】

本明細書ではモノクローナル抗体は特に、H鎖及び/又はL鎖の一部分が特定生物種に由来する又は特定抗体クラス又はサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一又は相同である一方で、該H鎖及び/又はL鎖の残りの部分は別の生物種に由来する又は別の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一又は相同であるような「キメラ」抗体(免疫グロブリン)を、また所望の生物活性を示す限りでそうした抗体の断片を、含む。

【0338】

本明細書で開示するような各アディポネクチンアイソフォームに対するモノクローナル特異抗体は本明細書で開示するようなアディポネクチン疾患又は障害の診断又は処置に使用することができるものと見込まれる。

【0339】

「ポリクローナル抗体」

ポリクローナル抗体の作製方法は技術上周知である。ポリクローナル抗体は哺乳動物に、たとえば免疫剤及び必要ならアジュバントの1回又は複数回注射により産生させることができる。

【0340】

一般に、該免疫剤及び/又はアジュバントは複数回、皮下又は腹腔内注射する。該免疫剤は本発明のアディポネクチンポリペプチド又はその融合タンパク質を含む。

【0341】

該免疫剤は場合によって、免疫処理しようとする哺乳動物で免疫原性を有すると判明しているタンパク質へと結合させるのが有効である。そうした免疫原性タンパク質の非限定的な例は、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシ・サイログロブリン及びダイズ・トリプシン阻害因子などである。使用可能なアジュバントの例はフロインド完全アジュバント及びMPL-TDMアジュバント(モノホスホリルリピドA、合成トレハロースジコリノミコラート)などである。当業者は免疫法プロトコールを過度の実験にまつことなく選択することができよう。

【0342】

「モノクローナル抗体」

アディポネクチンポリペプチド抗体はまた、モノクローナル抗体でもよい。モノクローナル抗体はKohler and Milstein, Nature, 256:495 [1975]が開示しているようなハイブリドーマ法で生産してもよい。ハイブリドーマ法では一般に、マウス、ハムスター又は他の好適な宿主動物を免疫剤で免疫処理し、該免疫剤に特異的に結合する抗体を産生する又はそうした抗体の産生能を有するリンパ球を活性化させる。

【0343】

あるいはリンパ球をin vitroで免疫にしてもよい。

【0344】

免疫剤の例は一般にアディポネクチンポリペプチド及びその断片、そうしたタンパク質

の融合タンパク質又はその断片などである。一般に、ヒト由来細胞が望ましいなら末梢血リンパ球(PBL)を使用し、またヒト以外の哺乳動物に由来する細胞が望ましいなら脾臓細胞又はリンパ節細胞を使用する。次いで好適な融合剤たとえばポリエチレングリコールを使用してリンパ球を不死化細胞系と融合してハイブリドーマ細胞を形成する[Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press (1996) pp. 59-103]。

【0345】

不死化細胞系は通常、哺乳動物の形質転換細胞特にげっ歯類、ウシ又はヒト由来の骨髄腫細胞である。通常、ラット又はマウスの骨髄腫細胞系を使用する。ハイブリドーマ細胞は、非融合不死化細胞の増殖又は生存を阻害するような1つ又は複数の物質を含むのが好ましい好適な細胞培地で培養することができる。

10

【0346】

好ましい不死化細胞系は、効率的に融合し、特定の抗体産生細胞による安定した高レベルの抗体発現を支え、またHAT培地などの培地に対し感受性を有するような細胞系である。より好ましい不死化細胞系はマウス骨髄腫細胞系であり、それはたとえばSalk Institute Cell Distribution Center (San Diego, California)及びAmerican Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, Virginia)から入手することができる。ヒト骨髄腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髄腫細胞系もまたヒトモノクローナル抗体産生用として開示されている[Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York (1987) pp. 5163]

20

【0347】

次いでハイブリドーマ細胞の培地をアッセイしモノクローナル抗体の有無を調べる。ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は免疫沈降法又はin vitro結合アッセイたとえば放射線イムノアッセイ(RIA)又は酵素免疫測定法(ELISA)などで決定する。そうした技法やアッセイは技術上周知である。モノクローナル抗体の結合アフィニティーはたとえばMunson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)のスキッチャード法で決定することができる。

【0348】

目的のハイブリドーマ細胞が確認されたら、そのクローンを限界希釈培養法でサブクローニングし、標準方法で増殖させることができる。この目的のための好適な培地にはダルベッコの改良イーグル培地やRPMI-1640培地などがある。あるいはハイブリドーマ細胞を哺乳動物中で腹水としてin vivo増殖させてもよい。

30

【0349】

サブクローンが分泌するモノクローナル抗体は通常の免疫グロブリン精製法たとえばプロテインAセファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又はアフィニティークロマトグラフィーなどにより培地又は腹水から単離又は精製することができる。

【0350】

モノクローナル抗体はまた組換えDNA法で作製してもよい。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは通常の方法を使用して(たとえばマウス抗体のH鎖及びL鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用して)容易に単離し配列を決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞はそうしたDNAの好ましい供給源として役立つ。該DNAはひとたび単離したら発現ベクターに挿入し、次いでベクターごと宿主細胞に導入して、その組換え宿主細胞にモノクローナル抗体を合成させる。該DNAは修飾体でもよい。

40

【0351】

該抗体は一価抗体でもよい。一価抗体の作製方法は技術上周知である。

【0352】

一価抗体の作製にはin vitro法も適する。抗体の消化によるその断片特にFab断片の作製は技術上周知の通常の技法を用いて行うことができる。

50

【0353】

「ヒト及びヒト化抗体」

非ヒト(たとえばマウス)抗体のヒト化型は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含むキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖又はその断片[抗体のFv、Fab、Fab'、F(ab')₂又は他の抗原結合部分配列など]である。ヒト化抗体は、受容者の相補性決定領域(CDR)に由来する残基が所望の特異性、アフィニティー及び能力をもつマウス、ラット、ウサギなどヒト以外の生物種のCDR(供与者抗体)に由来する残基に置き換わっているヒト免疫グロブリン(受容者抗体)を含む。

【0354】

場合によっては、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基が対応する非ヒト残基に置き換わる。ヒト化抗体はまた、受容者抗体にも外来CDR又はフレームワーク配列にも見られない残基を含んでもよい。一般にヒト化抗体は少なくとも1つの(一般的には2つの)可変ドメインを実質的に全部含むであろうが、そこではCDRの全部又は実質的に全部が非ヒト免疫グロブリンのそれに対応しFR領域の全部又は実質的に全部がヒト免疫グロブリンのコンセンサス配列のそれに対応している。ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部分を、特にヒトのそれを含むのが最適であろう。

【0355】

非ヒト抗体をヒト化する方法は技術上周知である。一般に、ヒト化抗体には非ヒト由来の1つ又は複数のアミノ酸残基が導入されている。これらの非ヒト由来アミノ酸残基はしばしば「外来」残基というが、大体が「外来」可変領域に由来する。ヒト化は基本的にWinterらの方法[Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536 (1988)]に従い、げっ歯類CDR又はCDR配列をヒト抗体の対応配列に置換することで行うことができる。

【0356】

従って、そうした「ヒト化」抗体はキメラ抗体であり、インタクトなヒト可変領域に実質的に満たない部分がヒト以外の生物種に由来する対応配列によって置き換わっている。実際には、ヒト化抗体は大体がヒト抗体であり、若干のCDR残基及び場合によっては若干のFR残基をげっ歯類抗体の類似部位に由来する残基で置換してある。

【0357】

ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリー[Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]を含む技術上周知の種々の技法を用いて作製してもよい。

【0358】

ヒトモノクローナル抗体の作製にはCole et al.及びBerner et al.の技法も使用可能である[Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)及びBerner et al., J. Immunol., 147 (1): 86-95 (1991)]。同様に、ヒト免疫グロブリン遺伝子座をトランスジェニック動物(たとえば内在免疫グロブリン遺伝子を部分的又は完全に不活性化したマウス)に導入してヒト抗体を作製することもできる。抗原暴露後、遺伝子再編成、組立、抗体レパートリーなどを含むすべての点でヒトに見られるものに類似したヒト抗体の産生が観測される。

【0359】

「二重特異性抗体」

二重特異性抗体は少なくとも2種類の抗原に対応した結合特異性をもつモノクローナル(好ましくはヒト又はヒト化)抗体である。

【0360】

二重特異性抗体の作製方法は技術上周知である。二重特異性抗体の遺伝子組換え技術による産生は伝統的に2つの免疫グロブリンH鎖/L鎖ペアの同時発現を利用するものであり、その場合、2つのH鎖は異なる特異性を有している[Milstein and Cuello, Nature, 305: 537-539 (1983)]。免疫グロブリンH鎖及びL鎖の組合せはランダムなので、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は10種類の潜在的な抗体分子混合物を産み出すが、そのうち正し

い二重特異性構造を有するのは1種類だけである。正しい分子は通常、アフィニティークロマトグラフィーで精製する。

【0361】

所望の結合特異性(抗体-抗原結合部位)をもつ抗体可変ドメインは免疫グロブリン定常ドメイン配列へと融合することができる。二重特異性抗体作製の詳細についてはたとえば Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)を参照。

【0362】

PCT公開WO 96/27011号明細書に開示の別の方法では、抗体分子ペアの間の境界面を工夫することにより、組換え細胞培養から回収されるヘテロ二量体の割合を極大化することができる。好ましい境界面は抗体定常ドメインのCH3領域の一部を少なくとも含む。

10

【0363】

この方法では、第1抗体分子の境界面に由来する1つ又は複数の小アミノ酸側鎖をもっと大きなアミノ酸側鎖(チロシン又はトリプトファンなど)に置き換える。

【0364】

この大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相殺的な「空洞」を第2抗体分子の界面に、大きなアミノ酸側鎖をもっと小さなアミノ酸側鎖(アラニン又はトレオニンなど)に置き換えることにより、設ける。これは、ホモ二量体などのような無用の最終生成物に対してヘテロ二量体の収量を高めるためのメカニズムを提供する。

【0365】

二重特異性抗体は完全長抗体又は抗体断片[たとえばF(ab')₂二重特異性抗体]として作製することができる。抗体断片から二重特異性抗体を作製する技法は文献で開示されている。たとえば二重特異性抗体は化学結合法で作製することができる。Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)はインタクト抗体をタンパク質分解によりF(ab')₂断片へと切断する方法を開示している。これらの断片はジチオール錯化剤である亜ヒ酸ナトリウムの存在下に還元して、近隣ジチオールを安定させ分子間ジスルフィド形成を防止する。生成したFab'断片は次にチオニトロ安息香酸(TNB)誘導体へと変換する。Fab'-TNB誘導体の一方を次にメルカプトエチルアミンによる還元でFab'-チオールへと再変換し、等モル量の他Fab'-TNB誘導体と混合して二重特異性抗体とする。作製された二重特異性抗体は選択的酵素固定化剤として使用することができる。

20

【0366】

Fab'断片はE. coliから直接回収し、化学結合により二重特異性抗体へと形成してもよい。Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992)は完全ヒト化二重特異性抗体F(ab')₂分子の作製を開示している。E. coliから別個に分泌された各Fab'断片をin vitro直接化学結合により二重特異性抗体へと作製する方法である。

30

【0367】

組換え細胞培養から二重特異性抗体の断片を直接生成し単離する種々の技法もまた開示されている。たとえば二重特異性抗体の作製にロイシンジッパーを使用する方法がある[Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148 (5): 1547-1553 (1992)]。Fos及びJunタンパク質に由来するロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により2種類の抗体のFab'部分へと結合させ、抗体ホモ二量体をヒンジ領域で還元して単量体を形成させ、次いで再酸化して抗体ヘテロ二量体を形成させた。この方法は抗体二量体の作製にも利用することができる。

40

Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993)が開示した「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作製する代替手段を提供してきた。該断片はH鎖可変ドメイン(VH)とL鎖可変ドメイン(VL)を、これら2ドメインを同じ分子鎖上で対合させるには短すぎるリンカーで連結して含む。

【0368】

従って、ある断片のVH及びVLドメインを他断片の相補的なVL及びVHドメインと強制的にペアにし、それによって2つの抗原結合部位をむりやり設ける。単鎖Fv(scFv)二量体を使用して二重特異性抗体を作製するという別の方法も報告されている。Gruber et al., *J. Immunol.* 152: 5368 (1994)を参照。

50

【0369】

2価超の抗体も見込まれる。たとえば三重特異性抗体の作製が可能である[Tutt et al., J. Immunol., 147:60 (1991)]。

【0370】

例示的な二重特異性抗体は本明細書中の任意のポリペプチド上の2種類のエピトープに結合しよう。

【0371】

あるいは抗ポリペプチド・アームをT細胞受容体分子(たとえばCD2、CD3、CD28又はB7)又はIgGのFc受容体(FcγR)[たとえばFcγRI(CD64)、FcγRII(CD32)及びFcγRIII(CD16)]などのような白血球上のトリガー分子に結合するアームと結び付けて、細胞防御機構を、該特定ポリペプチドを発現する細胞へと集中させるようにすることができよう。二重特異性抗体はまた、特定ポリペプチドを発現する細胞に細胞毒を局在化させるために使用することもできよう。これらの抗体はポリペプチド結合アームと細胞毒又は放射性核種キレート化剤たとえばEUTOBE、DPTA、DOTA又はTETAなどを結合するアームとをもつ。興味深い別の二重特異性抗体は該ポリペプチドを結合し、また組織因子(TF)をさらに結合する。

10

【0372】

「ヘテロ複合抗体」

ヘテロ複合抗体は2つの共有結合抗体からなる。該抗体は架橋剤の使用を伴う方法を含めた合成タンパク質化学の周知の方法によりin vitroで作製されるものと見込まれる。たとえば抗毒素はジスルフィド交換反応を使用して、又はチオエーテル結合の形成によって作製されよう。この目的のための好適な試薬はイミノチオラート、メチル-4-メルカプトブチルイミダート、及びたとえば米国特許第4,676,980号明細書で開示の試薬などである。

20

【0373】

「スクリーニングアッセイ」は天然PRO又はPRO受容体の生物活性によく似た活性を示すリード化合物を見つけ出すためにある。そうしたスクリーニングアッセイは、化学ライブラリーの高スループットスクリーニングになじみ低分子の薬物候補の特定に特に適するようなアッセイを含もう。見込まれる低分子は合成有機又は無機化合物などである。アッセイはタンパク質-タンパク質結合アッセイ、生化学スクリーニングアッセイ、イムノアッセイ及び細胞ベースアッセイなど、解明が十分に進んでいる多様な様式で行うことができる。

30

【0374】

「イムノアッセイ」はELISA、放射線イムノアッセイ、ウェスタンブロット法などを含む。好適な抗体アッセイ標識は技術上周知であり、酵素標識のグルコースオキシダーゼ、及び放射性同位体のヨウ素(^{125}I 、 ^{121}I)、炭素(^{14}C)、硫黄(^{35}S)、三重水素(^3H)、インジウム(^{112}In)及びテクネチウム($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、蛍光標識のフルオレセインやローダミン、ピオチン、それに蛍光性の放射性同位体、蛍光プロキシミティ標識及び技術上周知の他の諸々の標識などがある。

【0375】

「実質的に相同(の)」又は「実質的に同一(の)」は、最大限の一致を求めて比較し、アラインメントし、次のうちいずれかの配列比較アルゴリズムを使用して、又は目視検査で、測定したときに、50%以上の配列が同一であるような配列相同性、好ましくは60%以上、好ましくは70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上のヌクレオチド又はアミノ酸残基の同一性をいう。2つの(アミノ酸又はヌクレオチド)配列は全長にわたって(たとえば両配列の長さが実質的に異なる場合には、短いほうの配列の全長にわたって)比較することができる。配列比較では、一般に一方の配列が基準用配列として試験用配列の比較対象となる。配列比較アルゴリズムを使用するときは、試験用及び基準用配列をコンピュータに入力し、必要ならば部分配列座標を指定し、また配列比較アルゴリズムのプログラムパラメーターを指定する。後は配列比較アルゴリズムが指定のプログラムパラメーターを基に基準用配列に対する試験用配列の配列一致率を計算する。比較のための最適配列

40

50

アライメントは、たとえばSmith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482(1981)のローカルホモロジーアルゴリズムによって、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)のホモロジーアライメントアルゴリズムによって、Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)の類似性検索法によって、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実行(Wisconsin Genetics Software Packageに収められたGAP、BESTFIT、FASTA及びTFASTA; Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)によって、又は目視検査によって、行うことができる(一般にAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, supraを参照)。前記いずれかのアルゴリズムを使用するとき、Window長、ギャップペナルティ等についてはデフォルトパラメーターを使用する。2つの核酸配列又はポリペプチドが実質的に同一であることのさらなる表れとして、第1ポリペプチド(たとえば第1核酸によってコードされるポリペプチド)は第2ポリペプチド(たとえば第2核酸によってコードされるポリペプチド)と免疫学的に交差反応性である。従って、たとえば2つのポリペプチドは一般に、同類置換が異なるだけという場合には、実質的に同一である。

10

20

30

40

50

【0376】

用語「実質的に純粋な」又は「単離(された)」は、タンパク質又はポリペプチドについていう場合には、それらのポリペプチドが天然には一体化しているタンパク質又は他不純物から分離されていることを意味する。タンパク質又はポリペプチドが実質的に純粋であるとみなされるのは、該タンパク質が該タンパク質を含む組成物の全タンパク質分の約50%超を占める場合、一般には全タンパク質分の約60%超を占める場合である。もっと一般的には、実質的に純粋な又は単離されたタンパク質又はポリペプチドは全タンパク質分の75%以上より好ましくは90%以上を占めよう。好ましくは、該タンパク質は組成物中の全タンパク質分の約90%超、より好ましくは約95%超を占めよう。

【0377】

「有効量」は臨床的結果を含む有益な又は望ましい結果をもたらすに足る量である。有益な結果は個体のインスリン感受性の改善、インスリン抵抗性の低下、高血糖の低下、及び個体の肥満の改善などを非限定的に含む。有効量は種々の投与経路により1回又は複数回投与で投与することができる。

【0378】

「処置」は本明細書では、臨床的結果を含むのが好ましい有益な又は望ましい結果をもたらすためのやり方である。有益な又は臨床的結果は個体のインスリン感受性の改善、インスリン抵抗性の低下、高血糖の低下、及び個体の肥満の改善などを非限定的に含む。処置計画は一定期間にわたる場合があり、複数投与量、複数回投与及び/又は種々の投与経路を伴う場合もある。一般に、処置目的のためにはグリコシル化アディポネクチンを含む組成物を有効量投与する。アディポネクチン療法は一見正常な循環アディポネクチン濃度が存在するときでも有効な場合がある。従って正常アディポネクチン濃度の存在はアディポネクチン療法への禁忌ではない。

【0379】

「生物試料」は個体から獲得される種々の試料タイプを包含し、また診断又はモニタリングアッセイに使用することができる。この定義は生物起源の血液又は他の体液試料、生検標本又は組織培養又はそれらに由来する細胞などのような固形組織試料、及びその子孫を包含する。この定義はまた、獲得後に何らかの操作たとえば試薬による処理、可溶化、又はタンパク質やヌクレオチドなど特定成分の濃縮などを経た試料を含む。用語「生物試料」は臨床的試料を包含し、また培養細胞、細胞上清、細胞溶解物、血清、血漿、体液、及び組織試料を含む。

【0380】

用語「統計的に有意の」、「統計的に有意の差」などは本明細書では通常の技術的な意味を有し、また観測差が偶然に生じる確率(又は「統計的に類似の」測量的場合には観測差が存在しない確率)(p値)はある既定値すなわち <0.05 好ましくは <0.01 最も好ましくは <0.001 であるp値を下回ることを意味する。統計的有意性の測定には技術上周知の好適な統

計的手法が種々利用可能である[たとえば2標本を比較するためのステューデントのtアッセイ、分散分析のANOVA、信頼区間分析; SASシステムVersion 8(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)など]。

【0381】

「個体」は脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトである。哺乳動物は家畜、スポーツ動物、ペット、霊長類、マウス及びラットを非限定的に含む。

【0382】

「剤形」は本明細書では、哺乳動物特にヒトへの投与に適したタンパク質製剤に好適な技術上周知の任意適切な剤形、特に(非限定的ながら)哺乳動物好ましくはヒトに投与するための処置用タンパク質の溶液の安定化に好適な剤形を含む。これはアディポネクチンを含む組成物の形のいかなを問わない。

10

【0383】

一例は経口投与型の錠剤、カプセル剤、トローチ剤など、又は液剤のシロップ剤、水剤、乳剤などであり、たとえば経口型ならば消化管内にあって処置用タンパク質を、効果の誘発に先立つ分解から保護することができる。

【0384】

経皮投与型の例は経皮貼付、経皮包帯などである。

【0385】

局所投与型の例はローション、スティック、スプレー、軟膏、ペースト、クリーム、ジェルなどであり、皮膚に直接適用するか又はパッド、パッチなどを媒介にして適用する。

20

【0386】

座剤の例は開口に挿入可能な固形等の剤形である(特に肛門直腸、膣、尿道に挿入する座剤)。

【0387】

経粘膜投与型の例はデポジットリー、浣腸剤、ペッサリー、タンポン、クリーム、ジェル、ペースト、フォーム、噴霧液、散剤及び類似の製剤であり、活性成分の他に技術上周知の適切な担体などを含む。

【0388】

デポ投与型の例は活性成分のペレット又は小シリンダー、又は活性成分を生物分解性高分子のマトリックス、マイクロエマルジョン、リポソーム又はマイクロカプセルに閉じ込めた固形剤である。

30

【0389】

埋め込み型注入装置の例は、活性成分を生物分解性高分子又は合成高分子(シリコーン、シリコーンゴム、SILASTIC又は類似高分子など)の内部に封入し又は分散させた任意の固形剤である。

【0390】

あるいは注入装置はリポソームデリバリーシステムを使用するような剤形でもよい。

【0391】

ボラス投与型の例は、静脈内、皮下、皮内、筋内又は経口の各投与経路による単回又は頻回投与剤を含む。

40

【0392】

吸入投与型の例は、医薬として許容される水性又は有機溶媒を使用した溶液及び/又は懸濁液を含む組成物、又はそれらの混合物及び/又は粉末である。

【0393】

タンパク質の同類置換はあるアミノ酸の、類似の大きさと電荷をもつアミノ酸による置換である。等価であると一般に判明しているアミノ酸群は次のとおりである: (a) Ala, Ser, Thr, Pro及びGly; (b) Asn, Asp, Glu及びGln; (c) His, Arg及びLys; (d) Met, Glu, Ile及びVal; (e) Phe, Tyr及びTrp.

【0394】

III. アディポネクチンとアディポネクチン組成物

50

本発明は一般に、アディポネクチンとアディポネクチン組成物に関する。多数のアディポネクチンアイソフォームが存在し、異なる生物活性を有することを思いがけず発見した。本発明のアディポネクチンとアディポネクチン組成物はとりわけ処置、診断及び他の用途に有用である。本発明は一態様では、グリコシル化された組換え、単離、精製又は合成アディポネクチンポリペプチドを提供する。該アディポネクチンポリペプチドはヒトアディポネクチンであるのが好ましい。ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101(ヒトペプチドに基づく残基番号)に対応する1以上のリシン残基はグリコシル化されているのが好ましい。

【0395】

別の態様では、本発明はグリコシル化体のアディポネクチンポリペプチドを含む組成物を提供する。該組成物のアディポネクチンは組換え、単離、生成又は合成体であるのが好ましい。該組成物のアディポネクチンはヒトアディポネクチンであるのがなお好ましい。ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101(ヒトペプチドに基づく残基番号)に対応する1以上のリシン残基はグリコシル化されているのが好ましい。

【0396】

別の態様では、本発明はヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101(ヒトペプチドに基づく残基番号)に対応する1以上のリシン残基がグリコシル化されている組換え、単離、精製又は合成アディポネクチンポリペプチドを含む組成物を提供する。

【0397】

リシン残基65、68、77及び101のグリコシル化(又はその欠如)を互いの相違点とするアディポネクチンポリペプチドは本明細書ではときに「グリコアイソフォーム」という。

【0398】

A. アディポネクチンポリペプチド

「アディポネクチンポリペプチド」は本明細書では組換え、単離、生成又は合成体とすることができる。一実施態様では、アディポネクチンは天然に存在する動物(たとえばヒト、ヒト以外の霊長類、マウス、ラット、犬又は牛)由来アディポネクチンの配列を有する。たとえば図5を参照。別の実施態様では、アディポネクチンポリペプチドはプレプロ型のシグナル配列を欠く成熟型のグリコシル化されている。別の実施態様では、アディポネクチンポリペプチドと天然に存在するアディポネクチンとの相違点は天然アディポネクチンタンパク質の(天然又は組換え)短縮及び/又は同類置換である。一実施態様では、アディポネクチンは天然に存在するアディポネクチンの配列たとえば図5の配列と実質的に類似する(すなわち実質的に同一の)配列を有する。一実施態様では、これらの短縮アディポネクチンポリペプチド及び同類置換は天然アディポネクチンと実質的に相同であり、その生物活性を本明細書で開示するようになお維持する。本発明の組成物に有用であるアディポネクチンポリペプチドは、多様な実施態様において、図5のアディポネクチンの変異体、特異的スプライシング変異体、可変スプライシング変異体、及び図5のアディポネクチンと実質的な同一性を有する他の天然アディポネクチン変異体を含む。他の有用なアディポネクチン変異体は、完全長アディポネクチンの1つ又は複数のアミノ酸残基の欠失又は完全長アディポネクチンの短縮によって得られるような、完全長アディポネクチンの断片である。アディポネクチンの活性断片又はその一部分はアディポネクチンペプチドのN末端又はC末端からの、又は内部からの、アミノ酸残基の段階的削除によって確かめることができる。あるアミノ酸を削除してもアディポネクチンの生物活性に実質的な低下が見られなければ、該アミノ酸は活性断片の一部を含まないことになる。

【0399】

アディポネクチンのそうした活性断片又はその一部分は技術上周知の方法によって他ポリペプチドと融合し、キメラポリペプチドを形成させてもよい。天然アディポネクチンの生物活性を保持するそうしたキメラポリペプチドもまた、本発明のアディポネクチンポリペプチドであるとみなされる。

【0400】

アディポネクチンの機能的変異体はその生物学的機能によって、アディポネクチンと同

じ生物学的応答を誘発することができるアディポネクチン作用部位のアゴニストであると特徴付けることができる。そうした機能的変異体は本明細書で定義するアディポネクチンポリペプチドであるとみなされる。

【0401】

本明細書では特に糖又は糖混合物によるグリコシル化に、又はさらに具体的にはグルコシルガラクトシル部分などのような種々の化学種に言及するが、該用語はその範囲に、そのもっと厳密な非限定部分に類似の生物活性を誘発するような該グリコシル化部分の任意の拡張又は変異を含む。

【0402】

本明細書ではヒドロキシル化について特に言及するが、該用語はその範囲に、そのもっと厳密な非限定部分に類似の生物活性を誘発するような該ヒドロキシル化部分の任意の拡張又は変異を、他の修飾と共に含む。

【0403】

本明細書ではヒドロキプロリンについて特に言及するが、該用語はその範囲に、そのもっと厳密な非限定部分に類似の生物活性を誘発するような任意のアミノ酸及び修飾アミノ酸を含む。

【0404】

アディポネクチン製剤はヒトへの投与に適するやり方で、好ましくは皮下(s.c.)、皮内(i.d.)、静脈内(i.v.)、腹腔内(i.p.)又は経皮などの経路による非経口投与用の剤形に調製することができる。該アディポネクチンを経口、経直腸、経膈、膀胱内、くも膜下、脳室内、大脳内等技術上周知の経路で投与するような他の製剤も見込まれる。

【0405】

好ましい投与経路は非経口である。非経口投与に適したアディポネクチンは安定化用の緩衝液を含む水溶液に調製し、好ましくは等張又はほぼ等張にし、また哺乳動物特にヒトへの投与に適したタンパク質製剤用として技術上周知の防腐、消泡、抗沈殿等の安定化剤、特に哺乳動物好ましくはヒトに投与するための処置用タンパク質溶液の安定化に適した安定化剤を添加する。

【0406】

本発明の一実施態様では該組成物は、実施例で示すように、たとえば肝細胞の対インスリン応答能を測定するin vitroアッセイで検出可能な生物活性を有するアディポネクチンポリペプチドを含む。別の実施態様では、アディポネクチンポリペプチドは少なくともインスリンの効果の増強、個体のインスリン抵抗性の減少、糖新生の阻害、高血糖の低下、又は肥満になりやすい個人の健康増強といった生物活性をもつ。種々の実施態様では、本発明の組成物のアディポネクチンポリペプチドの生物活性は、図5に示す配列をもつアディポネクチンポリペプチドたとえば図5のヒトアディポネクチンポリペプチドの約50%以上であり、またしばしば約95%以上である。

【0407】

B. アディポネクチンアイソフォーム

一態様では、本発明はアディポネクチンのアイソフォームを1つ又は複数含む組成物に関する。アディポネクチン「アイソフォームは」本明細書ではpI及び見掛け分子量から区別されるアディポネクチンポリペプチドの種類である。種々のアイソフォームは電気泳動などの標準方法で識別することができる。図1に示すように、脂肪細胞から単離されるアディポネクチンには少なくとも8種類のアイソフォームがあるが、それらは図1及び2に示すように等電点(pI)と電気泳動度(見掛け分子量)に応じて区別することができる。アイソフォームにはグリコシル化体(例：アイソフォーム3、4、5及び6)と非グリコシル化体(例：アイソフォーム1及び2)がある。

【0408】

C. アディポネクチンのグリコアイソフォーム

後述のように、哺乳動物細胞中で産生されるアディポネクチンはグリコシル化などのような翻訳後修飾を受ける場合がある。発明者はマウスアディポネクチンのリシン残基68、

10

20

30

40

50

71、80及び104、及び対応するヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101はグリコシル化の標的であることを発見した。一態様では、本発明はヒトアディポネクチン、ヒト以外の生物種に由来するアディポネクチン及びヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化を受けたアディポネクチンを含む組成物を提供する。ヒト以外の生物種のアディポネクチン、アディポネクチン変異体又は図5に示すヒトアディポネクチンとは異なる短縮アディポネクチンに言及するとき、該アディポネクチンの残基は当然、対応するヒト配列残基の番号を(両配列の最適アラインメントを通じて割り出し)使用して呼ぶことができる。図5は種々の動物に関するアディポネクチンの配列アラインメントを示す。たとえば天然に存在するマウスアディポネクチンでは、対応するリシン残基は68、71、80及び104である。ある生物種(たとえばヒト又はマウス)の残基番号を明示する場合は、その明示には他生物種の相当する番号をも示す狙いがあるものとする。

10

【0409】

一態様では、本発明はグリコシル化された組換え、単離、精製又は合成アディポネクチンポリペプチドを提供する。別の実施態様では、該アディポネクチンポリペプチドはヒトアディポネクチンである。別の実施態様では、リシン残基68、71、80及び104(マウス)又はリシン残基65、68、77及び101(ヒト)に対応する1以上のリシン残基がグリコシル化されている。一実施態様ではアディポネクチンは完全グリコシル化されている。「完全グリコシル化体」はアディポネクチンポリペプチド内部のすべてのリシン残基が1以上の糖部分によってグリコシル化されている[たとえばリシン残基68、71、80及び104(マウス)又はリシン残基65、68、77及び101(ヒト)に対応する4リシン残基がみなグリコシル化されている]というアディポネクチンポリペプチド上のグリコシル化の状態をいう。

20

【0410】

リシン残基のグリコシル化は0結合型であり、各リシン残基に1つ又は複数の糖部分が付加される結果となる。本発明の一態様では、リシン残基に付加される糖部分はグリコシルガラクトシル部分又はガラクトシルグリコシル部分である。別の態様では、アディポネクチンポリペプチドはリシン残基68、71、80及び104(マウス)又はリシン残基65、68、77及び101(ヒト)の各々に1以上のグリコシルガラクトシル部分又はガラクトシルグリコシル部分をもつ。別の実施態様では、アディポネクチンポリペプチドはリシン残基68、71、80及び104(マウス)又はリシン残基65、68、77及び101(ヒト)のうち1以上の又はすべての残基に構造X1を有する。ただし各X1はグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルガラクトシル部分及びガラクトシルグルコシル部分のうち1つ又は複数より独立に選択される。一実施態様では、アディポネクチンのすべてのリシン残基が完全にグリコシルされている。

30

【0411】

グリコシル化アディポネクチンポリペプチドはまた、その生物学的効果によって特徴付けることができる。一実施態様では、グリコシル化アディポネクチンポリペプチドの哺乳動物への投与は、本明細書でいうアディポネクチン調節に関連する病状の処置に有効である。別の実施態様では、グリコシル化アディポネクチンポリペプチドの哺乳動物への投与は実施例で説明するようにインスリンの効果を増強する。別の実施態様では、グリコシル化アディポネクチンポリペプチドは動物に投与すると糖新生を阻害する。

40

【0412】

別の態様では、本発明はグリコシル化体のアディポネクチンポリペプチドを含む組成物を提供する。一実施態様では、アディポネクチンポリペプチドは組換え、単離、生成又は合成体である。別の実施態様ではアディポネクチンポリペプチドはヒトアディポネクチンである。別の実施態様では、該組成物は哺乳動物患者への投与に適するように、他の医薬として許容される賦形剤、補助剤、希釈剤等と共に、又は単独で、調製する。別の実施態様では該組成物はインスリンを追加的に含む。該インスリンは約50pM～400pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る量又は濃度であるのが好ましい。インスリンは約100pM～300pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る量又は濃度であるのがなお好ましい。インスリ

50

ンは約200pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る量又は濃度であるのが最も好ましい。

【0413】

別の態様では、本発明はリシン残基68、71、80及び104(マウス)又はリシン残基65、68、77及び101(ヒト)に対応する1以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチンポリペプチドの組成物を提供する。一実施態様ではアディポネクチンは完全グリコシル化されている。「完全グリコシル化体」はアディポネクチンポリペプチド内部のすべてのリシン残基が1以上の糖部分によってグリコシル化されているというアディポネクチンポリペプチド上のグリコシル化の状態をいう。

【0414】

リシン残基のグリコシル化は0結合型であり、各リシン残基に1つ又は複数の糖部分が付加される結果となる。本発明の一態様では、リシン残基に付加される糖部分はグリコシルガラクトシル部分又はガラクトシルグリコシル部分である。別の態様では、アディポネクチンポリペプチドはリシン残基68、71、80及び104(マウス)又はリシン残基65、68、77及び101(ヒト)の各々に1以上のグリコシルガラクトシル部分又はガラクトシルグリコシル部分をもつ。別の実施態様では、アディポネクチンポリペプチドはリシン残基68、71、80及び104(マウス)又はリシン残基65、68、77及び101(ヒト)のうち1以上の又はすべての残基に構造X1を有する。ただし各X1はグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルガラクトシル部分及びガラクトシルグルコシル部分のうち1つ又は複数より独立に選択される。一実施態様では、アディポネクチンのすべてのリシン残基が完全

10

20

【0415】

グリコシル化アディポネクチンポリペプチドの組成物はまた、その生物学的効果によって特徴付けることができる。一実施態様では、該組成物の哺乳動物への投与は実施例で説明するようにインスリンの効果を増強する。別の実施態様では、グリコシル化アディポネクチンポリペプチドの組成物は動物に投与すると糖新生を阻害する。

【0416】

一態様では、本発明は1以上の非グリコシル化アディポネクチンアイソフォームを実質的に含まないアディポネクチンポリペプチドを含む組成物を提供する。一態様では、該組成物はアイソフォーム1及び/又はアイソフォーム2を実質的に含まない。別の態様では、該組成物はいかなる非グリコシル化アディポネクチンアイソフォームも実質的に含まない。本明細書では、組成物がアイソフォームを「実質的に含まない」のは、該アイソフォームが該組成物のアディポネクチンタンパク質の約20(重量)%未満、好ましくは10%未満、好ましくは5%未満、最も好ましくは1%又は0.1%未満のときである。そうした組成物を得る方法は実施例で開示の方法及びタンパク質精製及びクロマトグラフィー技術の分野で周知の方法などである。

30

【0417】

さらに別の態様では、本発明は唯一の又は支配的なアディポネクチン分子種が完全グリコシル化されているアディポネクチンポリペプチドを含む組成物を提供する。一実施態様では、複数のアディポネクチンアイソフォーム及び/又は複数のグリコシル化状態のアディポネクチンを含む。該組成物はアイソフォーム3、4、5又は6のいずれか1つが該組成物中の支配的なアディポネクチンであるようにすることができる。この場合の「支配的」は組成物中のアディポネクチンポリペプチドの約50%以上が、好ましくは約60%以上、約70%以上、約80%以上、約90%以上、約95%以上、及び約98%以上が規定のグリコシル化状態にあるか又は規定のアイソフォームであることをいう。

40

【0418】

グリコシル化アディポネクチンポリペプチドの組成物はまた、その生物学的効果によって特徴付けることができる。一実施態様では、該組成物の哺乳動物への投与は実施例で説明するようにインスリンの効果を増強する。別の実施態様では、グリコシル化アディポネ

50

クチンポリペプチドの組成物は動物に投与すると糖新生を阻害する。

【0419】

D. グリコシル化アディポネクチンを得る方法

本発明の組成物を得るにはいくつかの方法がある。アディポネクチンポリペプチドは組換え又は合成手段によって生産し又は天然供給源から単離又は精製することが可能であることは理解されよう。

【0420】

一実施態様では、1つ又は複数のアディポネクチンアイソフォーム又はグリコアイソフォームを組換え方法で調製する。アディポネクチンは組換え手法を用い、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド(通常はDNA)配列を発現ベクターに挿入し適当な宿主中で該ペプチドを発現させることによって生産してもよい。目的のポリペプチドを(融合又は成熟型として、また分泌を可能にするシグナル配列の有無を問わず)コードするポリヌクレオチドは、任意の好都合な宿主に適した発現ベクターに挿入してよい。技術上周知の多様な発現ベクターのうち任意のものを使用してよいが、真核細胞はグリコシル化などの翻訳後修飾を行うことができるので真核発現系が推奨される。発現は、組換えペプチドをコードするDNA分子を収めた発現ベクターを予め導入してある任意好適な宿主細胞で起こさせる。真核宿主細胞の例は技術上周知であり、酵母、鳥、昆虫、植物及び動物の細胞、たとえばCOS7、HeLa、CHO及び他の哺乳動物細胞などがある。標準組換え生産技法はたとえば前掲Sambrookで開示されている。アディポネクチンは、アディポネクチン又は図5に記載の任意の動物(ヒト、マウスなど)の配列を有するポリペプチド又はその生物活性断片又はその変異体をコードする組換えポリヌクレオチドの哺乳動物細胞中での発現によって得ることができる。

10

20

【0421】

別の実施態様では、アディポネクチン(アイソフォーム及びグリコアイソフォームの混合物を含む)は血清又は脂肪細胞などを非限定的に含む動物組織から精製する。脂肪細胞からアディポネクチンを精製する方法は技術上周知であり、また実施例でもさらに開示する。グリコシル化アディポネクチンの組成物を獲得する源としての動物の非限定的な例はヒト、マウス、ラット、犬、牛及びヒト以外の霊長類などである。

【0422】

組換え手法により又は動物組織から得たアディポネクチンは、分子量、pI及び/又はアディポネクチンポリペプチド中のグリコシル化の度合いに応じて、通常の方法たとえば実施例で開示の電気泳動又はクロマトグラフィーによって分離することができる。本発明の一態様では、前記のように、規定のアディポネクチンアイソフォーム又はグリコアイソフォームを含むアディポネクチン組成物をディファレンシャル精製法で調製する。たとえば本発明の方法によれば、これはグリコシル化の度合い又はタイプが異なる2種類以上のアディポネクチンを含む第1組成物を得るステップ、次いでグリコシル化の度合い又はタイプに応じてアディポネクチンを種類分けするステップを伴う。この方法により、アディポネクチンプロファイルが第1組成物とは異なる第2組成物が得られる。

30

【0423】

グリコシル化アディポネクチンポリペプチドはタンパク質精製の分野では周知のいくつかの方法により他ポリペプチドから分離することができる。一実施態様では、該分離は2次元電気泳動法とそれに続くゲルからのタンパク質の切り出しと溶出によって行う。別の実施態様では、電荷に基づく選択法であるアフィニティークラム法で分離する。別の実施態様では、レクチン添加アフィニティークラム法で分離する。他の実施態様では代替タンパク質精製法たとえばイムノアフィニティークラム、サイズ排除カラム、レクチンアフィニティー、疎水性相互作用、逆相、陰イオン及び陽イオン交換クロマトグラフィー等を使用する[一般にR. Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y. (1982)及びD. M. Schmechel, Methods in Enzymology, Vol. 182: Guide to Protein Purification, Academic Press, Inc. N.Y. (1990)を参照]。

40

【0424】

50

一実施態様では、レクチンカラムたとえばコンカナバリンA又は小麦胚凝集素カラムを使用してグリコシル化アディポネクチンポリペプチドを結合することにより、支配的グリコシル化アディポネクチンポリペプチドを含む組成物が得られる。非グリコシル化アディポネクチンはカラムに結合しないので、カラムを通過することになる。次いでグリコシル化アディポネクチンポリペプチドをカラムから溶出すれば、支配的グリコシル化アディポネクチンポリペプチドを含む組成物が得られる。

【0425】

別の実施態様では、組換え手法により又は動物組織から得たアディポネクチンを2次元ゲル電気泳動にかけ、グリコシル化分子種を(実施例の要領で)抗体によって識別し、グリコシル化アディポネクチンアイソフォームのスポット又はバンドを切り出し、該バンドからグリコシル化アディポネクチンアイソフォームを溶出して1つのグリコシル化アディポネクチンアイソフォームからなる実質的に純粋な組成物を得るという方法で、種々のアイソフォーム及び/又はグリコアイソフォームを得る。当然、本発明の組成物は前記技法など、特定のアイソフォーム及び/又はグリコアイソフォーム分離し再結合して所望の実施態様を調製する方法を含めた通常の技法により、調製することができる。

10

【0426】

IV. 方法

A. 発現のモニタリング

アディポネクチンのアイソフォーム及びグリコアイソフォームの発現はモニターすることができる。本発明の一態様では、該発現をモニター又は判定して、アディポネクチン調節に関連する病状又は病状を発現しやすい素因をもつ個体の診断に役立てる。種々の実施態様では該病状は高血糖症、インスリン抵抗性、インスリン抵抗性に関連する代謝症候群、II型糖尿病、高血圧を含む代謝症候群、動脈硬化症、冠状動脈性心臓病、虚血性心疾患又は多嚢胞性卵巣症候群、又はアディポネクチン又は肥満に関連する他病状である。アディポネクチンは血清又は血液などのような体液から採取し、電気泳動法、HPLC又は質量分析法で分析することができる。発現プロファイルは本明細書で開示する又は技術上周知の任意の方法(たとえば2次元電気泳動法)でモニターすることができる。

20

【0427】

モニタリングは、特定アディポネクチンアイソフォームのレベル、2以上のアディポネクチンアイソフォームく他はグリコアイソフォームの発現プロファイルを対象に行う。一実施態様では、個体の該レベル又は発現プロファイルを基準プロファイルと比較し、基準プロファイルと比較した場合の統計的に有意の相関を状態の診断に用いる。該基準プロファイルは高血糖症、インスリン抵抗性、インスリン抵抗性に関連する代謝症候群、II型糖尿病又は肥満症の家族歴がある別の個体に由来しても、本人が高血糖症、インスリン抵抗性、インスリン抵抗性に関連する代謝症候群、II型糖尿病又は肥満症二価かっている個体に由来してもよい。基準プロファイルはまた、病歴たとえば高血糖症、インスリン抵抗性、インスリン抵抗性に関連する代謝症候群、II型糖尿病又は肥満症の病歴に応じてグループ分けされた個体群に由来してもよい。

30

【0428】

特定グリコシル化アディポネクチンアイソフォームの発現レベル又は発現パターンを統計分析すれば、本明細書に記載の任意のアディポネクチン関連病状に対応するある範囲のレベル又は発現パターンを決定することができる。次いで統計的に有意の相関を使用して、良好な(又は芳しくない)予後に相関するようなグリコシル化アディポネクチンアイソフォームのレベル又はパターンを決定することができる。次いで、生体試料(たとえば患者試料)に由来するグリコシル化アディポネクチンアイソフォームの発現レベル又は発現パターンを決定し、基準のレベル又はパターンと比較して臨床的な結果を予測することができる。

40

【0429】

好ましい実施態様では、モニタリング方法に使用するいずれか1つ又は複数のアディポネクチンアイソフォームはヒトアディポネクチンである。別の好ましい実施態様では該個

50

体はヒトである。

【0430】

B. 処置及び薬剤調製の方法

本発明はまた、個体のアディポネクチン調節に関連する病状の処置を提供する。該病状の非限定的な例は高血糖症、インスリン抵抗性、インスリン抵抗性に関連する代謝症候群、II型糖尿病、高血圧を含む代謝症候群、動脈硬化症、冠状動脈性心臓病、虚血性心疾患又は多嚢胞性卵巣症候群、又はアディポネクチン又は肥満に関連する他病状である。

【0431】

処置計画は一般に、有効量のグリコシル化アディポネクチン組成物の、処置対象個体への投与を含む。有効量は、実施例で開示するように、たとえばインスリン増感のための生物活性の評価によって決定することができる。当業者はグリコシル化組成物の有効量を、投与量の段階的増加と各段階での生物学的機能の評価によって決定してもよい。

【0432】

グリコシル化アディポネクチン組成物は医薬として許容される賦形剤に混ぜて投与してもよい。医薬として許容される賦形剤は技術上周知であり、また薬効物質の投与を容易にするような比較的不活性の物質である。実施態様によっては、本発明のアディポネクチン組成物は(たとえば腹腔内、静脈内、皮下、筋内などの)注射投与用に調製する。

【0433】

従って、グリコシル化アディポネクチン組成物は医薬として許容される担体たとえば生理食塩水、リンガー液、デキストロース液などと混合してもよい。具体的な投薬計画すなわち用量、タイミング及び頻度は特定個体又は該個体の病歴に依存しよう。処置は一定期間にわたる多数回の投与を含んでもよい。処置は、血糖値、空腹時血糖値試験及びin vitroインスリン増感試験などを非限定的に含む通常の臨床検査により生物学的機能について評価することができる。

【0434】

静菌的又は静真菌的な濃度の抗菌剤もまた、米国薬局方(USP)の規定に従う限りで添加してもよい。これらの抗菌剤は複数回投与用容器入りの製剤に添加しなければならない。使用時には、たとえば皮下注射針で内容物を部分的に吸い上げる際に製剤中に不用意に導入された微生物の増殖を防止するに足る濃度で存在しなければならない。

【0435】

特に等張又はほぼ等張でなければ投与部位に相当の炎症や痛みが起こるような非経口製剤では、組成物の張度を調整するために塩化ナトリウム等の塩を加えてもよい。

【0436】

本発明は当然、本明細書で開示するアディポネクチン組成物の、医薬組成物の調製への使用をも提供する。

【0437】

さらに別の態様では本発明は、アディポネクチン調節に関連する病状の処置に有効な、インスリンの効果の増強に有効な、又は糖新生の阻害に有効な、哺乳動物患者用の剤形又は医薬組成物又は薬剤の調製へのグリコシル化アディポネクチンポリペプチドの使用にある。一実施態様では、アディポネクチンポリペプチドは組換え、単離、精製又は合成体である。別の実施態様では、アディポネクチンポリペプチドはヒトアディポネクチンである。別の実施態様ではリシン残基68、71、80及び104(マウス)又はリシン残基65、68、77及び101(ヒト)に対応する1以上のリシン残基はグリコシル化されている。別の実施態様では該剤形又は医薬組成物又は薬剤はインスリンを追加的に含む。該インスリンは約50pM~約400pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る量存在するのが好ましい。該インスリンは約100pM~約300pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る量又は濃度である。該インスリンは約200pMの血中インスリン濃度を誘発するに足る量存在するのが好ましい。

【0438】

本発明の非経口製剤の好適な投与経路は筋内、静脈内、皮下、皮内、関節内、くも膜下などである。皮下経路が好ましい。経粘膜投与もまた許容される。

【0439】

本発明は組成物又は製剤としてのインスリンとの同時投与又は順次投与及び/又は混合が可能であるものと見込まれる。これは事情と患者に依存しよう。好適な処置計画は患者ごとに医師又は開業医が決定するのが最善であろう。種々のインスリン製剤がEli Lilly & CompanyやNovo Nordiskなど多数の会社から出ている。使用可能なインスリン製剤のタイプは速効型、中間型及び持続型である。これらの区分内にもさまざまなタイプがある。インスリンと本明細書で規定するアディポネクチンポリペプチドの比は特定患者の個別のニーズに依存しよう。好適な処置計画は患者ごとに医師又は開業医が決定するのが最善であろう。

【0440】

本発明に有用な組成物は一般に受け入れられている方法で成分を混合して調製する。たとえば特定成分を混合機又は他の標準装置で混合して濃縮混合物とした後、水又は増粘剤を加え、また場合によってはpH調整用の緩衝液又は張度調整用の追加溶質を加えて、最終濃度及び粘度へと調整する。

【0441】

C. スクリーニング

本発明の組成物は、アディポネクチンの調節及びもっと一般的には代謝に関連する化合物のスクリーニングに使用することができる。一実施態様では、アディポネクチンを発現する哺乳動物の細胞たとえば培養細胞を試験化合物と接触させ、次いでアディポネクチンアイソフォームのレベル又は発現パターンの変化をモニターする。一実施態様ではアディポネクチンは自然に発現させる。別の実施態様ではアディポネクチンは組換え的に発現させる。別の実施態様では、アディポネクチンアイソフォームのレベルの変化を、試験化合物との接触前のアディポネクチンアイソフォーム量を定量しその量を細胞に試験化合物を接触させた後の量と比較することによって、検出する。タンパク質の定量は技術上周知であり、たとえばウェスタンブロット法で行うことができる。別の実施態様では、アディポネクチンアイソフォームを定量する。定量にはタンパク質スポット又はバンドの相対レベルを検出するデンスitomーターを使用する。そうした計測器の例はMolecular Dynamics社のLaser Densitometer又はBio-Rad社のGS-700である。別の実施態様では発現パターンの変化を2次元電気泳動法で検出する。

【0442】

試験化合物は一般的な種類が多様であり、ポリペプチド；オリゴ糖や多糖などの糖質；ポリヌクレオチド；脂質又はリン脂質；脂肪酸；ステロイド；又はアミノ酸類似体などを非限定的に含む。試験化合物はまた化学的な種類が多様であり、複素環式化合物、炭素環式化合物、ラクタム、ポリカーバメート、オリゴマー-N-置換グリシン、ベンゾジアゼピン、チアゾリジノン及びイミダゾリジノンなどを非限定的に含む。ある種の試験化合物は合成有機化合物を含む低分子である。試験化合物は天然物ライブラリー又はコンビナトリアルライブラリーなどのようなライブラリーから入手することができる。多数の異なるタイプのコンビナトリアルライブラリー及びそうしたライブラリーの作製方法が、たとえばPCT公開WO 93/06121号、WO 95/12608号、WO 95/35503号、WO 94/08051号及びWO 95/30642号の各明細書ですでに開示されている。

【0443】

一実施態様では、ある生物学的機能はインスリンの効果に対し肝細胞を増感させるアディポネクチンの能力であり、肝細胞に対するインスリンの効果の増強は実施例で説明するようにアディポネクチンポリペプチドが誘発する。アディポネクチンポリペプチドが誘発する肝細胞に対するインスリンの効果の増強は技術上周知のインスリン活性試験によって確定されよう。ひとたびそうした周知の試験で細胞のグルコース生産又は糖新生に対するインスリンの効果が確定されたら、この試験はインスリンの効果を激化、増強又は減衰させるような作用物質の能力の判定に使用することができる。化合物類を段階的に分析して、どの化合物がアディポネクチンの活性を阻害又は増強するかを判定することができる。

【0444】

以下の実施例は本発明の例示であり、本発明をいかなる点でも限定しない。

【実施例】

【0445】

実施例1: 実験方法

資材 - デキサメタゾン、3-イソブチル-1-メチルキサンチン (IBMX)、 α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸 (CHC)、コラゲナーゼ、ラット尾コラーゲンI型、アミノ酸標品、FLAGペプチド、抗FLAG M2アフィニティーゲル及びグルコースTrinderアッセイキットはSigmaから購入した。ヒトインスリン (Actrapid)はNovo Nordiskから得た。全細胞RNA抽出試薬 (TRIzol)、TEVプロテアーゼ、哺乳動物発現ベクターPCDNA3.1(+)及び原核生物発現ベクターpPROEX HTbはInvitrogenから得た。QuikChange部位指定突然変異誘発キットはStratageneから得た。BCAタンパク質アッセイ試薬はPierceから得た。糖タンパク質検出用のImmu-BlotキットはBio-Rad Laboratoriesから得た。FuGENE 6トランスフェクション試薬、トリプシン及びASP-Nエンドプロテイナーゼ、それに改良ケミルミネセンス (ECL)検出システムはRoche Molecular Biochemicalsから得た。Ni-NTAアガロースカラムはQIAGENから得た。2次元ゲル電気泳動用の諸々の消耗品、3H-1ガラクトース及び3H-1グルコースはAmersham Pharmacia商品であった。諸々のアミノ酸分析試薬及び質量分析計用Cal Mix 2検量標品はApplied Biosystemsから得た。

10

【0446】

3T3-L1細胞の分化と細胞培地由来タンパク質の濃縮 - 3T3-L1細胞を10%ウシ胎仔血清添加DMEM中にサブコンフルエント培養物として維持した。分化のために、細胞を150mmプレートにまき、100%コンフルエントに到達させ、コンフルエント1日後に0.25 μ Mデキサメタゾン、0.5mM IBMX及び10 μ g/mlインスリンを含む前記培地で分化を2日間誘発した。これに続いて10 μ g/mlインスリンと2日間インキュベートする。次いで細胞を10%ウシ胎仔血清添加DMEM中にさらに4日間維持した。

20

【0447】

脂肪細胞から分泌されたタンパク質を回収するために、分化8日後の細胞をPBSで3回洗浄し、次いで無血清培地でさらに4時間インキュベートした。培地を回収し、3000 \times gで10分間遠心にかけ、0.20 μ mフィルターでろ過し、次いでMWC0(分画分子量)が5000 Daの濃縮フィルター (Vivascience Ltd, Gloucestershire, UK)を使用して濃縮、脱塩した。次いでBCA試薬を使用してタンパク質を定量し、マイナス80 $^{\circ}$ Cで用時まで貯蔵した。

30

【0448】

2次元ゲル電気泳動 (2-DE)、免疫プロット法及び糖鎖検出 - 脂肪細胞又は3T3-L1前脂肪細胞から分泌されたタンパク質は2-DEにより既述の要領で[24]分離した。分離したタンパク質は銀又はCoomassie Brilliant Blue R250 (CBB)で染色した。免疫プロット法では、2-DEで分離したタンパク質を、Multiphor II Novablot電気泳動トランスファーユニット (Pharmacia)により、ニトロセルロース膜にプロットした。膜をブロッキングし、次いでウサギ抗アディポネクチンポリクローナル抗体 (1:1000)と4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。さらに1時間、室温で、西洋ワサビペルオキシダーゼを結合させた二次抗体とインキュベートした後、結合抗体をECLキットで検出した。糖タンパク質は市販のImmun-Blotキットを使用してメーカーの説明書に従って検出した。

40

【0449】

ゲル内トリプシン消化及び逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) - SDS-PAGE又は2-DEで分離した目的のタンパク質を切り出し、ゲル片を記述の要領で[25]ゲル内トリプシン消化した。抽出されたトリプシン消化ペプチド混合物をJupiter 5 μ C18カラム (250 \times 2.00mm, Phenomenex)によるRP-HPLCで分画した。予暖 (37 $^{\circ}$ C)カラムを0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸で7分間洗浄し、次いで50分間のリニアグラジエント (8% \rightarrow 36%アセトニトリル)により200 μ l/分の送液量で溶出した。各画分を手動で回収し、後述の要領でさらに分析した。 3 H標識糖タンパク質を液体シンチレーションカウンターで検出した。

【0450】

アミノ酸配列決定とアミノ酸分析 - 2-DEで分離したタンパク質スポットをPVDF膜にプロ

50

ットし、CBBで染色し、切り出し、Perkin-Elmerタンパク質配列解析機(Procise, Model 492)を使用してエドマン分解法でアミノ酸配列を決定した。内部アミノ酸配列はRP-HPLC分画後のトリプシン消化ペプチドの配列解析によって求めた。

【0451】

アミノ酸分析では、トリプシン消化ペプチド5 μ gを減圧乾燥し6N HCl、1%フェノールの気相中、110 $^{\circ}$ で24時間加水分解した。この処理によって糖残基は分解されたが、ヒドロキシリシン及びヒドロキシプロリンの検出と定量はなお可能であった[26]。遊離アミノ酸残基を40 μ lの0.025% K3EDTAに溶解し、フェニルイソチオシアネート(PITC)で誘導体化し、Sepheri-5 PTC 5 μ カラム(220 \times 2.1mm)で分離し、421アミノ酸分析機(Applied Biosystems)で分析した。

10

【0452】

マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF MS)による分析 - トリプシン消化ペプチド混合物又はRP-HPLC分離ペプチド0.5 μ lを等量の CHCマトリックス(10mg/ml, 60%アセトニトリル/0.3%TFAに溶解)と混合し、サンプルプレートに滴下し、風乾させた。パルスレーザービーム(窒素レーザー、 $\lambda=337$ nm)使用のVoyager DE PR Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems)でリフレクトロン質量分析を行った。イオンスペクトルはすべてポジティブモードで、加速電圧20.0kVを使用して記録した。分析計はCal Mix 2標準混合物を使用して外部校正した。

【0453】

マウスアディポネクチンのクローニング - 全RNAを3T3-L1脂肪細胞から、TRIZOL試薬を使用してメーカーの説明書に従って精製した。全RNA由来のオリゴ-dTプライムドcDNAを、マウスアディポネクチンヌクレオチド配列(登録番号: U37222)に基づくPCRクローニングの鋳型として使用した。次いでアディポネクチンの完全長cDNAをpGEMT-easyベクターに挿入し、その配列をDNA配列解析で確認した。タンパク質配列はメチオニン残基から勘定した。

20

【0454】

アディポネクチン及びその変異体の組換え発現及び精製 - マウスアディポネクチンに対応する原核生物用発現プラスミドを調製するために5' ATCGGGATCCGAAGATGACGTTACTACAAC3' をセンスプライマーとし、また5' TACGAATTCTCAGTTGGTATCATGGTAGAG3' をアンチセンスプライマーとして使用してDNA配列を増幅した。増幅DNA生成物のBamHI/SalI断片をpPRO EX HTbプラスミド中にサブクローニングして、N末端に6 x His標識を付けた完全長アディポネクチンをコードする発現ベクターpPRO-His-Adを得た。5' ATCGGGATCCGCCGCTTATATGATCGCTC3' がセンスプライマーである以外は同様の方法で、アディポネクチンのHis標識球状領域(アミノ酸残基110~247)を発現する原核生物用発現ベクターpPRO-His-gAdを構築した。His標識完全長アディポネクチン又はその球状領域のBL21細胞中での発現を、増殖培地への1mMイソプロピル β -D-チオガラクトピラノシドの添加によって誘発した。完全長アディポネクチン又はその球状領域は細菌溶解物からNi-NTAアガロースカラムを使用してメーカー説明書に従って精製した。精製後、N末端標識を組換えTEVプロテアーゼによる切断で除去した。タンパク質の純度はSDS-PAGEとHPLCで確認した。

30

【0455】

哺乳動物でアディポネクチンを発現させるためのベクターは、5' GCC CGC GGA TCC ATG CTA CTG TTG CAA GCT CT3' をセンスプライマーとして、また5' GGC CGC GAA TTC TCA CTT GTC ATC GTC GTC CTT GTA GTC GTT GGT ATC ATG GTA GAG3' をアンチセンスプライマーとして使用してcDNA増幅で生成させた。BamHI/EcoRIで消化後の断片を、C末端にFLAGエピトープを標識として付けた完全長アディポネクチンをコードするpcDNA-Ad-Fを産生させるためにpcDNA3.1ベクターに挿入した。次いでこの発現ベクターを鋳型として使用して、QuikChange部位指定突然変異誘発キットを使用して4リシン(残基68、71、80及び104)をアルギニンに置き換えたアディポネクチン変異体をコードするベクターを構築した。変異原性オリゴヌクレオチドプライマーはメーカー推奨基準に従って、AAGからGCGへのコドン変更(残基68及び80に対応)又はAAAからCGAへのコドン変更(残基71及び104に対応)を盛り込

40

50

むよう設計した。4リシンすべてをアルギニンに置き換えたFLAG標識アディポネクチン変異体をコードするプラスミド[pcDNA-Ad(K R)-Fと命名]は各部位の逐次突然変異によって獲得し、またすべての突然変異をDNA配列解析で確認した。

【0456】

これらの哺乳動物用発現ベクターはFuGENE 6トランスフェクション試薬を使用してCOS-7細胞又はHEK-293細胞に導入し、該細胞にアディポネクチンを無血清培地中に48時間分泌させた。次いで培地を回収し、3000×gでの10分間の遠心分離とそれに続く0.2μmフィルターによるろ過で細胞残屑を除去した。40%硫酸アンモニウムを添加し4で一晩攪拌してタンパク質を沈殿させた。8000×gでの1時間の遠心分離の後、ペレットをTBS中に再懸濁させ、MWC0 7000DaのSnakeSkinチューブを使用して同じ緩衝液に対して透析した。FLAG標識アディポネクチンは抗FLAG M2アフィニティーゲルを使用して精製し、また150μg/mlのFLAGペプチドで溶出した。

10

【0457】

抗体の産生 - E. coliから産生されたHisタグ組換えアディポネクチンをフロインド完全アジュバントと混合し、Wistar雌ラットに腹腔内注射(50μg/頭)するか又はNew Zealand雌ウサギに皮下注射(100μg/頭)した。これらの動物にはフロインド不完全アジュバントと混合した同量のタンパク質を2回ブースター注射し、最後のブースター注射の1週間後に採血した。

【0458】

初代培養ラット肝細胞の単離と肝グルコース産生の測定 - 初代培養肝細胞をWistar雄ラット(200g)から、既述の要領で[27]、2段階コラゲナーゼ溶液灌流法により調製した。単離後の細胞は、10%ウシ胎仔血清、10mM Hepes (pH 7.4)、2mM L-グルタチオン、100nMデキサメタゾン及び1mMインスリンを添加したDMEMで3回洗浄した。各洗浄間に細胞を200gで2分間遠心分離した。この手順後のトリパンブルー分染法で推定した細胞生存率は通常80%超であった。細胞はI型コラーゲン塗布(12穴)プレート上の前記培地中に50万個細胞/穴をプレーティングした。細胞を24時間かけて培養ディッシュ上に接着させ、次いで5.5mMグルコース添加、インスリン又はデキサメタゾン無添加のDMEM中で一晩インキュベートした。その後、細胞を種々の濃度のインスリン及び/又はアディポネクチンでさらに24時間刺激した。次いで培地を、各5mMのアラニン、バリン、グリシン、ピルビン酸塩及び乳酸塩を添加したフェノールレッド抜き、無グルコースDMEM 0.5mlに取り換えた。6時間のインキュベーション後、グルコースTrinderアッセイキットを使用して培地のグルコース濃度を測定した。

20

30

【0459】

動物と食餌 - 実験動物の愛護に関する施設指針に従って体重25~30gのFVB/N雄マウスを明/暗周期12時間のステンレス鋼金網底ケージに収容した。マウスには脂肪44%、タンパク質16%、糖分5.5%、及びエタノール34%又は対照としての等カロリーのマルトースデキストリンを含む改良高脂肪/低糖分流動食を与えた²¹。エタノール濃度は給餌第1週に17%から34%へと逡増させ、さらに5週間同じ濃度に保った。

【0460】

血清アディポネクチン、TNF- α 及びALT濃度の測定 - 血清アディポネクチン濃度はインハウスRIAにより、アディポネクチンに対するウサギポリクローナル抗体を使用して測定した¹⁹。循環TNF- α は市販ELISAキット(Chemico)を使用して定量した。血清ALT活性は市販試薬(Sigma)を使用して測定した。

40

【0461】

RNA抽出とノーザンブロット法 - Trizol試薬(Invitrogen)を使用して肝組織から全RNAを抽出した。各試料に由来する全RNA 20μgを変性アガロースゲルによって分離し、ナイロン膜上にブロットし、マウスTNF- α 、FAS又はCD36をそれぞれコードする³²P標識cDNA断片でプローブした。これらのcDNA断片はそれらの特異的プライマーを使用してマウス肝組織由来cDNAのPCR増幅によって得た。各遺伝子の相対的存在量をリン光画像法で定量した。

【0462】

50

組織分析 - 肝標本を緩衝ホルムアルデヒド(10%)で一晩固定し、パラフィンに包埋した。ヘマトキシリン-エオシン染色切片について脂肪変化、炎症及び壊死の度合いを盲式でランク付けした。肝臓あたり10低倍率視野を調べた。脂肪浸潤の度合いは0~4でランク付けしたが、0は無脂肪を、4は細胞の75%超が脂肪を含むことを、それぞれ示す。

統計分析 - 実験は群あたり5~6頭のマウスを対象に規定どおり実施し、値を平均 \pm SEとして表わした。分析は表示の代表的データを用いて反復した。統計的有意性は一元配置ANOVAによって決定した。諸々の統計的比較では、0.05>のP値を使用して有意差を示した。

【0463】

実施例2: 多数のアイソフォームとして存在する脂肪細胞分泌アディポネクチン

2-DE分析では未分化3T3-L1前脂肪細胞ではなく脂肪細胞から優先的に発現、分泌される8つのタンパク質スポットが識別された(図1、パネルA及びB)。これらのタンパク質の性質を解明するために、脂肪細胞から回収した分泌タンパク質500 μ gを分離用2-DEで分離し、PVDF膜にプロットし、CBBで染色した。N末端アミノ酸配列解析により、これらのタンパク質(スポット1~8)はどれも同じN末端配列(EDDVTTE)を共有することが判明したが、その配列はもっぱら脂肪細胞から発現する分泌タンパク質であるマウスアディポネクチンのアミノ酸残基18~25に紛れもなく対応する[5,7]。この配列決定した断片(EDDVTTE)は推定シグナルペプチド切断部位の直後に位置しており、異種アディポネクチンアイソフォームが分泌時の異なる酵素による切断には起因しないことを示唆する。これらのタンパク質のアディポネクチンとしての独自性は、8種類のタンパク質がどれもマウスアディポネクチンに対する抗体に対して免疫反応性であることを示したウェスタンブロット法でもさらに確認された(図1、パネルC)。E. coliから産生された組換えアディポネクチンの2-DEによる分離では単一スポットだけが検出された(データ不掲載)が、これは脂肪細胞から産生される複数のアディポネクチンアイソフォームの存在が分泌時の翻訳後修飾に起因することを示唆する。COS-7及びHEK-293細胞から一過性に発現、分泌される組換えアディポネクチンの2-DE分析でもまた、このタンパク質の複数アイソフォームが脂肪細胞由来のアディポネクチンと類似するパターンで観測された(データ不掲載)。

【0464】

2-DEで分離したタンパク質の糖鎖検出では、脂肪細胞に由来する6つのアディポネクチンアイソフォーム(スポット3~8)がグリコシル化されていると判明し(図6)、またE. coli産生アディポネクチンでは糖鎖が検出されなかった(データ不掲載)。これはグリコシル化がアディポネクチンの異種性に少なくとも部分的には寄与していることを示唆する。2つのコンセンサスN結合型グリコシル化部位(Asn 53及び233)が存在するものの、N結合型グリコシル化の阻害剤である[28]ツニカマイシンで処理してもグリコシル化パターンには影響がなかった(データ不掲載)ので、アディポネクチンではN結合型グリコシル化の可能性が排除されることになる。エンドグリコシダーゼH処理(endo H treatment)を使用した過去の研究でもアディポネクチンではNグリコシル化は起きないことが確認されている[5]。哺乳動物タンパク質のムチン型Oグリコシル化部位に関するニューラルネットワーク予測を産み出すNetOGlyc 2.0予測サーバー[29]を使用する限りでは、Oグリコシル化することが予測される潜在セリン及びトレオニン残基は存在しなかった。

【0465】

実施例3: コラーゲン様ドメインのいくつかの保存リシン残基上で起こるアディポネクチンのグリコシル化

アディポネクチンについてグリコシル化の特性をさらに解明し、またグリコシル化部位を解析するために、脂肪細胞又は一過性トランスフェクトCOS-7細胞に由来するか又はE. coli細胞に由来する各アディポネクチンアイソフォームからのトリプシン消化ペプチド混合物をMALDI-TOF MSで分析した。これらの試料の質量スペクトルの比較から、6つのグリコシル化アイソフォームだけに存在しE. coli由来の2つの非グリコシル化アディポネクチンアイソフォームには存在しない3つの際立ったペプチド断片(その質量はそれぞれ1679 Da、4260 Da及び4276 Daである)を検出した(図3)。そのうえ、これら3つのトリプシン消化ペプチド断片の質量は非修飾トリプシン消化アディポネクチン断片のいずれにも対応させ

ることができなかった。これはアディポネクチンのグリコシル化がこれら3つの断片内で起こる可能性のあることを示唆する。

【0466】

これら3つのペプチド断片を単離するため、諸々のグリコシル化アイソフォームからのトリプシン消化ペプチド混合物をプールし、RP-HPLCで分離し、各画分をMALDI-TOF MSで分析した(図4)。この分析により、16.4%のアセトニトリルで溶出した画分Aは質量1679 Daのペプチドを含むことが判明した。質量4276 Da及び4260 Daのペプチドは、それぞれ18%、18.4%のアセトニトリルで溶出された画分B及びC中に検出された。質量1679 Daのペプチドはアミノ酸配列解析によりKGEPGEAAYVYRと確認された。これはマウスアディポネクチンのアミノ酸残基104~115に対応する断片である。質量4260 Da及び4276 Daのペプチドは同じ断片(DGTPGEGKEKGDAGLLGPKGETGDVGMTGAEGPR)に由来し、アディポネクチンのアミノ酸残基62~95に対応する。特に、アミノ酸配列解析ではこれら3つのペプチド断片の全アミノ酸残基が、4リシン残基(質量1679 Daペプチドのリシン104、質量がそれぞれ4260 Da及び4276 Daのペプチドのリシン68、71及び80)を除いて、容易に検出された。この結果は、これらのリシン残基が糖鎖などの親水基によって修飾される可能性があること、また通常の液相配列決定法による親水性アミノ酸誘導体の効率的な無極性溶媒抽出は不可能であることを示唆する。これらの4リシン残基が修飾されているとの結論は、これら4リシン残基がアルギニン又はリシンのC末端を特異的に切断するプロテイナーゼであるトリプシンによる消化を受けにくいという所見からも裏付けられた。興味深いことに、これら4リシン残基(Lys 68、71、80及び104)はどれもアディポネクチンのコラーゲン様ドメイン内にあり、周辺モチーフGXKGE(D)を従えている。配列アラインメントから、これら4リシンとその周辺モチーフは諸々のアディポネクチン分子種を通じて保存性がきわめて強いと判明した(図5)。

10

20

【0467】

これらの4リシンが修飾されていることを確認するために、前記の3精製ペプチドを6N HClによる110℃、24時間の加水分解後、さらにアミノ酸分析にかけた。その結果、リシン残基以外のアミノ酸残基はすべて期待モル比で検出されるにもかかわらず、リシン残基は予測位置に存在しないことが判明した(図6)。これらのスペクトルのさらなる分析はこれら3ペプチドのリシン残基がすべてヒドロキシル化体であることを示した。ペプチドBではヒドロキシル化プロリン残基もまた検出された。このヒドロキシプロリンは結局Pro 94(後述)に帰属させた。

30

【0468】

ヒドロキシル化とそれに続くヒドロキシリシンのグリコシル化による-1,2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン(GG-Hyl)の形成がコラーゲン様ドメインを有するいくつかの分泌タンパク質で以前に開示されているので[30, 31]、同じタイプの修飾は前記の3単離ペプチド内の4リシン(Lys 68、71、80及び104)でも起こるのではないかと推測した。この推測はこれら3ペプチドのMALDI-TOF MSデータの分析によって裏付けられた(図4)。ペプチドAでは、実験的に計測された質量(1679)とその理論質量(1339)との差は340 Daであり、これはグルコシルガラクトシル-ヒドロキシル(GG-Hyl)基の質量とまったく同じである。ペプチドCでは実験的に計測された質量と理論質量の差は1020 Daであり、これはペプチドC内の3つのリシン残基(Lys 68、71及び80)に結合する可能性のある3つのGG-Hyl基に対応する期待質量に相当する。ペプチドBでは実験的に計測された質量(4276 Da)と理論質量の差は1036 Daであり、これは3つのGG-Hyl基に図6で検出されたもう1つのヒドロキシル基をプラスした場合の期待値に相当する。

40

【0469】

ペプチドB及びCの各リシンは340 Daの結合グリコシド基をもつというこの想定は、アスパラギンのN末端を特異的に切断するエンドプロテイナーゼAsp-Nによるこれら2ペプチドの消化によってさらに裏付けられた。MALDI-TOF分析により、Lys 80を含む断片の実験的に測定された質量はその理論質量よりも340 Daだけ大きかったのに対して、Lys 68及び71を含む断片の実測質量とその理論質量との差は680 Daであった(図7)。この結果もまた、

50

ペプチドB内の追加のヒドロキシル化がプロリン94で起きていることを示差した。プロリン94のヒドロキシル化もまたアミノ酸分析及びアミノ酸配列決定によって確認された。

【0470】

4リシン残基に結合したグリコシドがグルコシルガラクトシル基であることをさらに確認するために、FLAG標識アディポネクチンを一過性に発現するCOS-7細胞を³H-ガラクトース又は³H-グルコースで放射性標識した。これらの細胞培地から精製した放射性標識アディポネクチンのトリプシン消化混合物をRP-HPLCで分画し、ペプチドA、B及びCを図4のように単離した。液体シンチレーションカウンティングにより、³H-ガラクトースと³H-グルコースの両方がこれらの3ペプチドに取り込まれていることが判明した(図8)。

【0471】

実施例5: アディポネクチンのコラーゲン様ドメインでの4リシン(Lys 68、71、80及び104)の置換はそのインスリン増感活性を弱める

4ヒドロキシル化リシンのグリコシル化がアディポネクチンの生物活性に影響するかどうかを調べるために、4リシンをアルギニンに置き換えたアディポネクチン変異体をコードするコンストラクト[pcDNA-Ad(K R)-F]を生成させた。トランスフェクト細胞の³⁵Sメチオニンによるパルスチェイス標識により、アディポネクチン変異体(K R)は野生型アディポネクチンの場合(データ不掲載)とほぼ同じ速度で細胞培地中に分泌されること、従ってその分泌にはコラーゲン様ドメインの4リシンに対する修飾が必要とはされないらしいことが判明した。SDS-PAGE分析では、COS-7から分泌される野生型アディポネクチンは分子質量がやや異なる3つのバンドとして移動することが判明した(図9)。上方の2バンドは全アディポネクチンの~85%を占めるが、グリコシル化されていた。その一方、アディポネクチン変異体(K R)は主に、野生型アディポネクチンの2大グリコシル化バンドよりやや速く移動する単一の非グリコシル化バンドからなった。この結果はアディポネクチンのグリコシル化が主にコラーゲン様ドメインの4リシン残基で起こることをさらに確認する。

【0472】

最近の研究で、アディポネクチンは初代培養ラット肝細胞でグルコース産生を阻害するインスリンの作用を増強しうることが証明された[9]。この報告とも整合するが、本発明者の研究結果は濃度50pMのインスリンが初代培養ラット肝細胞でのグルコース産生に有意の影響を及ぼさないことを示した(図10)。半値抑制は濃度200pMで観測された。生理的濃度を下回るインスリン濃度のこうした肝グルコース産生抑制能は、哺乳動物細胞から産生されるアディポネクチンにより有意に増強された。20 µg/mlのアディポネクチンの存在下では50pMのインスリンでもグルコース産生を~40%激減させた。ある濃度依存研究によれば、アディポネクチンのEC50は~4 µg/mlのレベル、すなわち生理的アディポネクチン濃度範囲内の濃度であった[15,16]。アディポネクチン変異体(K R)の肝糖新生に対するインスリン増感能は野生型アディポネクチンに比して有意に低下していた。4 µg/mlのアディポネクチン変異体の存在下では、50pMのインスリンはグルコース産生に有意の作用を及ぼさなかったし、また20 µg/mlのアディポネクチン変異体の存在下でも~13%の減少を招いたにすぎない。細菌由来の完全長アディポネクチン(図10)及び球状領域は糖新生抑制というインスリンの肝性作用を増強するような生物学的効果をもたない。

【0473】

実施例5: アディポネクチンのin vivoでの生物学的効果

マウスのアルコール性肝障害モデルを使用して、本明細書で開示の要領で単離したアディポネクチンを哺乳動物に投与したときの効果を評価した。

【0474】

マウスでは常習的なエタノール摂取が循環アディポネクチン濃度の有意の低下を招くことを観察した。

【0475】

改良高脂肪-対照流動食(HF/LC)及び高脂肪-エタノール流動食(HF/LE)を与えられたマウス³²は6週間の処置期間中ずっと体重が増え続けた。体重増加はHF/LCマウスのほう(7.2 ±

10

20

30

40

50

0.6g)がやや大きいものの、HF/LEマウスのそれ($6.8 \pm 0.5\text{g}$)と大差なかった。LE食マウスのエタノール摂取量は約17~19 g/kg-体重/日であった。検死ではLE食マウスの肝/体重比($8.3 \pm 0.6\%$)はLC食マウスのそれ($6.2 \pm 0.4\%$)を有意に上回った($P < 0.05$)。

【0476】

常習的なエタノール摂取は循環アディポネクチン濃度の有意の低下を招いた。血漿アディポネクチンはHF/LE食給餌の3週間後に $32.1 \pm 2.9\%$ 低下し、また4週間後には $40.3 \pm 4.6\%$ 低下した(図11A)。アディポネクチン濃度の低下は肝障害の発現と密接な相関関係があることは、血清のアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)活性レベルから判定される(図11B)。常習的なHF/LE食の摂取の後では循環アディポネクチン濃度とTNF- α レベルの間に反比例関係が見られた(図11C)。特にアディポネクチンとTNF- α とのインキュベーションは3 T3-L1脂肪細胞でのアディポネクチンの発現の著減を招くことが示された³³。従って、アルコール性肝障害の初期段階でのTNF- α 産生はアルコール性肝障害の発現時におけるアディポネクチン産生の低下の少なくとも一因であると考えられる。

【0477】

アルコール性肝障害に対するアディポネクチンの働きを調べるために、他で開示した要領により³⁴、FLAGエピトープ標識マウスアディポネクチンをコードするベクターを一過性にトランスフェクトしたHEK293細胞から完全長の組換えアディポネクチンを発現させ、精製した。HF/LE食を与えて3週間後に、組換えアディポネクチン又は生理食塩水(対照)を30 μg /日投与するための浸透圧ポンプ(Alzet, Newark, DE)をマウスに埋め込んだ。この用量のアディポネクチン投与は循環アディポネクチン濃度を非処置LEマウスに比して 2.7 ± 0.3 倍上昇させた。アディポネクチン処置は食物摂取量、脂肪組織質量又は体重増加に有意の影響を及ぼさなかったが、2週間にわたる連続アディポネクチン投与は肝/体重比を有意に低下させた(図12A)。それはまた、血清ALT活性のエタノール誘発性の上昇を顕著に緩和した(図12B)。

【0478】

肝標本の組織評価により、HF/LE給餌マウスに限って大きな汎小葉性小滴性及び大滴性脂肪症、並びにまばらな炎症部位の存在が明白になった(図13)。アディポネクチンの投与は脂肪の蓄積を背景レベルへと劇的に低下させ、また炎症をほぼ解消した(顕微鏡下に炎症部位の不存在によって判定)。この結果から、マウスのアルコール性肝障害に対するアディポネクチンの防護的な役割が立証された。

【0479】

アディポネクチンの投与は肝臓でのTNF- α 産生と脂肪酸シンターゼ及び脂肪酸運搬体タンパク質CD36の発現を阻害した。

【0480】

仮説に縛られるつもりはないが、肝組織内のクッパー細胞からのTNF- α 産生の増加は初期アルコール性肝障害の重要な媒介因子であると考えられるはずである³⁵。アッセイを終えたばかりの本発明者の仮説は、アディポネクチンはアルコールに誘発されたTNF- α 産生の増加を抑制することによりアルコール性肝障害を緩和するのではないかというものである。この仮説のアッセイに際して、HF/LEマウスを組換えアディポネクチンで処置すると、アルコールに誘発された循環TNF- α の上昇だけでなく肝中でのこのサイトカインのmRNA産生もまた鈍った(図14)。

【0481】

仮説に縛られるつもりはないが、アディポネクチンはTNF- α 産生を抑制する他に、肝組織内でのTNF- α の傷害作用に直接拮抗する可能性もあると考えられる。アディポネクチンとTNF- α は多数の相互に反対の作用を誘発する。TNF- α はインスリン抵抗性の原因物質であるのに対しアディポネクチンはインスリン感受性を増強させる³⁶。アディポネクチンは抗アテローム発生活性を有するの^{37, 38}、TNF- α はアテローム性動脈硬化症の発現に寄与する³⁹。これら両ホルモンの拮抗関係は最近、筋細胞で明らかになったが、そこでは両者がグルコース/脂質代謝の調節で互いに相手の作用を妨げる⁴⁰。肝組織では、TNF- α がインスリン感受性を低下させ、また糖新生を増強する一方で、アディポネクチンはまった

く正反対の機能を有することが判明した⁹。

【0482】

アルコールはミトコンドリア脂肪酸 酸化の阻害によって、又は肝脂質生成経路の活性化によって、肝臓の脂肪浸潤を誘発する。エタノールの酸化はNADH/NAD⁺比を高め、以ってミトコンドリア 酸化の要NAD⁺ステップを阻害する⁴¹。さらに、ヒト及びげっ歯類では常習的なエタノール摂取は脂質生成経路で主要酵素の発現を誘発することにより脂肪酸合成を増加させる可能性がある^{42, 43}。次に、アディポネクチンがこれらの過程のいずれかを妨げることにより肝臓の脂肪蓄積を抑制するかどうかを調べた。過去の報告とも整合するが⁴¹、HF/LE食の常習的な摂取は肝NADH/NAD⁺比を有意に上昇させ、また脂肪酸シンターゼ(FAS)mRNAの存在量を有意に増加させた(図14)。アディポネクチン処置は上昇後のNADH/NAD⁺比には何の効果もなかったが、FAS mRNAの発現を著しく減少させた(図14)。さらに脂肪酸運搬体タンパク質CD36の発現はアディポネクチン処置後に著しく阻害された。

アディポネクチンの他の代謝効果もまたアルコール性肝脂肪蓄積の抑制に寄与する可能性があることに注目するのも重要である。たとえばアディポネクチンの短縮型C00H末端球状領域断片のin vivo投与は循環遊離脂肪酸及びトリグリセリドのクリアランスを高めると判明しているが⁴、それは肝臓への脂肪酸流入源を縮小することになる。アルコール性障害後のNADH/NAD⁺比の上昇は影響を受けないが、アディポネクチンが他の機序によって肝臓のミトコンドリア 酸化を直接促進するという可能性はなお残る。実際、もっと最近の研究では、完全長アディポネクチンがラット肝細胞の5'-AMP活性化キナーゼを活性化する可能性があることと判明しており、それはアセチル-CoAカルボキシラーゼ(ACC)をリン酸化し、またこの酵素の活性を弱めることになる³⁰。肝細胞中のACCの不活性化はその生成物すなわちマロニル-CoAの濃度の低下を招き、以って肝組織中の脂肪酸 酸化を誘発するであろう³¹。これらの結果は全体として、アディポネクチンが多数の協調的な代謝経路を調節することによってアルコール性脂肪肝をなくすることを明示する(図15)。

【0483】

過剰な肝脂肪蓄積の減少に対するアディポネクチンのこうした著しい効果は、インスリン抵抗性の患者におけるアディポネクチン不足と肝脂肪蓄積との密接な相関とも整合する⁴⁴。特に四塩化炭素で処置したマウスに由来する肝臓では、大量のアディポネクチンが蓄積し肝細胞に近接する細胞外マトリックスに結合していることが判明したが⁴⁵、これは該ホルモンがCCl₄誘発肝障害の修復過程に関係する抗炎症因子として作用する可能性をも秘めていることを示唆する。

【0484】

従って、アディポネクチン又はそのアゴニストは抗糖尿病及び抗アテローム発生薬としての可能性だけでなく¹、新規な肝疾患処置薬としての可能性をも秘めている。

【0485】

実施例7: 検討

アディポネクチンの抗糖尿病作用は最近の何件かの報告で別個に示されてはいるが、どの種類のアディポネクチンが機能的に活性なのかはなお議論の的になっている。LodishらとKadowakiらの研究報告では、アディポネクチンの球状ドメインに対応する短縮型断片が高血糖の低下とインスリン抵抗性の解消に有効であるが、細菌由来の完全長アディポネクチンは無活性であると分かった[10, 11]。これらの研究成果は薬理学的には確かに重要であるが、生理学的な関連性はなお不確かである。大多数の血清アディポネクチンは見掛けMWが30 kDaの完全長タンパク質として存在する[5, 6]。2-DE分離タンパク質を免疫沈降法、ウェスタンブロット法どちらで分析しても(データ不掲載)、ヒト及びマウス血清中にアディポネクチンのいかなるタンパク質分解断片も検出することができなかった。さらにアミノ末端配列分析により、脂質細胞から分泌される主要アディポネクチンアイソフォームはいずれも同じN末端を共有すると判明したが(図1)、それはこのタンパク質が分泌時に細胞内で切断されていないことを示唆する。Lodishらは25 kDaの弱いバンドを示したが、この実験は免疫沈降法、ウェスタンブロット法のどちらにも同じ抗体を使用しているため、MWが~25 kDaの抗体L鎖をも視覚化してしまったという可能性がある。LodishらとKadowaki

iらの両方の研究で使用された機能的アッセイ用のアディポネクチンは細菌由来であるため、種々の分泌タンパク質の生物学的機能に必要とされる適正な翻訳後修飾をしばしば欠いている。

【0486】

これらの報告とは対照的に、Schererらは哺乳動物細胞に由来する完全長アディポネクチンがいくつかの糖尿病動物モデルで高血糖を実際に低下させることができたのに対し、*E. coli*由来の完全長アディポネクチンはその球状ドメインも含めてそうした活性をもたないことを示した[9]。この研究はまた、肝細胞がアディポネクチンの潜在的な生理学的標的の1つであることを示唆する証拠を示した。発明者はこの報告に沿って、初代培養肝細胞で生理的濃度を下回る濃度のインスリンのグルコース産生抑制能を増強する作用は哺乳動物細胞に由来する完全長アディポネクチンのほうが細菌由来アディポネクチンよりもずっと強いことを示した(図10)。これらの研究結果は、アディポネクチンの翻訳後修飾が少なくとも肝作用にかかわるインスリン増感剤としての役割にとって機能的に重要であることを示唆する。

10

【0487】

2-DE分析では脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンは広範囲に修飾を受けてpIやMWの異なる多数のアイソフォームになることが判明したが、この異質性はグリコシル化によって少なくとも部分的には説明がつく(図1及び図2)。非グリコシル化体及びグリコシル化体アイソフォームの質量スペクトルを比較すると、コラーゲン様ドメイン内の4リシン(Lys 68、71、80及び104)を潜在グリコシル化部位として識別することができる(図3)。これら4リシンがグリコシル化されているという結論は次のような証拠からもさらに裏付けられた：第1に、これら4リシンは配列を決定することができず、またトリプシン切断にも強かったが、それは4リシンが修飾されている可能性のあることを示唆する。第2に、アミノ酸分析によりこれら4リシンがどれもヒドロキシ化されていることが判明した(図6)。第3に、アディポネクチンのグリコシル化はこれら4リシンのアルギニンへの置換後に大幅に鈍る(図9)か、又はヒドロキシラーゼ阻害物質である、 α -ジピリジルによる処理後に大幅に鈍った(未公開の研究結果)。特に、これら4部位でのヒドロキシリシルグリコシル化は脂肪細胞分泌アディポネクチン全体の85%超を占める6大グリコシル化アイソフォームのいずれでも検出されたが、それはこのグリコシル化がアディポネクチンに見られる主要な翻訳後修飾の1つであることを示唆する。興味深いことに、これら4リシン残基はどれも、これまでに同定された諸々のアディポネクチン分子種を通じて保存性がきわめて強いコンセンサス配列のGXKGE(D)内に位置する(図5)。

20

30

【0488】

リシンのヒドロキシ化とそれに続くガラクトース及びグルコースによるグリコシル化
グルコシルガラクトシルヒドロキシリシン(GlcGalHyl-Lys)の形成は過去に、コラーゲン様ドメインをもつ多数の分泌タンパク質たとえば補体成分C1q及び肺表面活性タンパク質などで観測されてきた[30]。この修飾の機能的な関連性は目下不明である。4リシンに結合したグリコシドがたぶんグリコシルガラクトシル基であることを示唆するような証拠は挙がっている。質量分析ではリシン80及び104上のグリコシド基の質量は340 Daであったが、これはGlcGalHyl残基の期待サイズである(図7)。放射性標識実験で、グリコシドが ^3H -ガラクトースと ^3H -グルコースの両方を含むことも判明した(図8)。

40

【0489】

4ヒドロキシ化リシンのグリコシル化がもつ生理学的な重要性は、アディポネクチン変異体(K R)使用の機能分析によって示唆された。そこでは、これらの残基のアルギニンによる置換は生理的濃度を下回る濃度のアディポネクチンの、グルコース産生を抑制するインスリンの対肝作用を増強する機能を著しく弱めることが示された。この結果はまた、コラーゲン様ドメインもアディポネクチンのインスリン増感機能に関与することを際立たせた。コラーゲン様ドメインでこれら4リシンに結合したグリコシドがアディポネクチンのインスリン増感効果を増強する機序はなお不明である。4リシン残基のうち1残基だけをアルギニンに置換したアディポネクチン変異体のインスリン増感能は、野生型アディポネ

50

クチンのそれをずっと下回ったが、4つの部位すべてで変異を起こした変異体のそれ(データ不掲載)を有意に上回った。これは各リシンに結合したグリコシドが協調的に機能する可能性のあることを示唆する。これらのグリコシドはリガンド-受容体相互作用に直接関わっているかもしれない。あるいはそれは適正なフォールディングと生物学的機能に必要とされる3次元構造の安定化にとって重要なかもしれない。これらの可能性は発明者の研究施設で目下研究中である。

【0490】

要するに、発明者は哺乳動物細胞に由来する完全長アディポネクチンがインスリン増感剤として機能的に活性であること、またこの活性には4リシン(Lys 68、71、80及び104)のヒドロキシル化とそれに続くグリコシル化が寄与していること明らかにした。また、マウスアディポネクチンのマウス体内の循環濃度は高脂肪の含エタノール食の常習的な摂取後に著しく低下することも明らかにすることができた。組換えマウスアディポネクチンをこれらマウスに投与すると肝腫脹と及び脂肪症(脂肪肝)の劇的な緩和、及び炎症と高レベルの血清アラニンアミノトランスフェラーゼの著しい後退が見られた。マウスアディポネクチン処置はTNF- α の肝産生を、また脂肪酸シンターゼと脂肪酸運搬体タンパク質CD36の発現を、低下させることが判明した。

10

【0491】

これらの結果はまた、アディポネクチンのインスリン増感作用にはコラーゲン様ドメインが機能的に重要であることを示す。脂肪細胞から分泌される多数のアディポネクチンアイソフォームには翻訳後修飾もまた機能的に関連する可能性がある。

20

【0492】

【表 1】

引用文献リスト：

1. Molina, P.E. et al. *Molecular pathology and clinical aspects of alcohol-induced tissue injury*. Alcoholism: Clin. Exp. Res. 26, 120-128 (2002).
2. Stewart, S., Jones, D. & Day, C.P. Alcoholic liver disease: new insights into mechanisms and preventative strategies. Trends Mol. Med. 7, 408-413 (2001). 10
3. Tsukamoto, H. & Lu, S.C. Current concepts in the pathogenesis of alcoholic liver injury. FASEB J. 15, 1335-1349 (2001).
4. Diehl, A.M. Cytokine regulation of liver injury and repair. Immunol. Rev. 174, 160-171 (2000).
5. Tilg, H. & Diehl, A.M. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. New Eng. J. Med. 343, 1467-1476 (2000).
6. Thurman, R.G. et al. Mechanisms of alcohol-induced hepatotoxicity: studies in rats. Front. Biosci. 4, e42-46 (1999). 20
7. McClain, C.J., Barve, S., Deaciue, J., Kugelmas, M. & Hill, D. Cytokines in alcoholic liver disease. Semin. Liver Disease 19, 205-219 (1999).
8. Adachi, Y., Bradford, B.U., Gao, W., Bojes, H.K. & Thurman, R.G. Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury. Hepatology 20, 453-460 (1994).
9. Jarvelainen, H.A. et al, Kupffer cell inactivation alleviates ethanol-induced steatosis and CYP2E1 induction but not inflammatory responses in rat liver. J. Hepatol. 32, 900-910 (2000). 30
10. Iimuro, Y., Gallucci, R.M., Luster, M.I., Kono, H. & Thurman, R.G. Antibodies to tumor necrosis factor alpha attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. Hepatology 26, 1530-1537 (1997).
11. Yin, M. et al. Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice. Gastroenterology 117, 942-952 (1999).
12. Enomoto, N. et al. Thalidomide prevents alcoholic liver injury in rats through suppression of Kupffer cell sensitization and TNF-alpha production. Gastroenterology 123, 291-300 (2002). 40

【表 2】

13. Berg, A.H., Combs, T.P. & Scherer, P.E. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 13, 84-89 (2002).
14. Shaprio, L. & Scherer, P.E. The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Curr. Biol.* 8, 335-338 (1998). 10
15. Maeda, N. et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat. Med.* 8, 731-737 (2002).
16. Yamauchi, T. et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat. Med.* 7, 941-946 (2001).
17. Fruebis, J. et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 2005-2010 (2001). 20
18. Berg, A.H., Combs, T.P., Du, X., Brownlee, M. & Scherer, P.E. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat. Med.* 7, 947-953 (2001).
19. Wang, Y., Xu, A., Knight, C., Xu, L.Y. & Cooper, G.J. Hydroxylation and glycosylation of the four conserved lysine residues in the collagenous domain of adiponectin. Potential role in the modulation of its insulin-sensitizing activity. *J. Biol. Chem.* 277, 19521-19529 (2002). 30
20. Yokota, T. et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood* 96, 1723-1732 (2000).
22. Hotta, K., et al., *Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys.* *Diabetes*, 2001. **50**(5): p. 1126-1133. 40
23. Lindros, K.O. & Jarvelainen, H.A. A new oral low-carbohydrate alcohol liquid diet producing liver lesions: a preliminary account. *Alcohol Alcoholism* 33, 347-353 (1998).

【表 3】

24. Fasshauer, M., Klein, J., Neumann, S., Esslinger, M. & Paschke, R. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 1084-1089 (2002).
25. Steppan, C.M. & Lazar, M.A. Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Trends Endocrinol. Metab.* 13, 18-23 (2002).
26. Ouchi, N. et al. A novel adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 100, 3967 (1999). 10
27. Ouchi, N. et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 100, 2473-2476 (1999).
28. Ross, R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *New Eng. J. Med.* 340, 115-126 (1999).
29. Eaton, S., Record, C.O. & Bartlett, K. Multiple biochemical effects in the pathogenesis of alcoholic fatty liver. *Eur. J. Clin. Invest.* 27, 719-722 (1997). 20
30. You, M., Fischer, M., Deeg, M.A. & Crabb, D.W. Ethanol induces fatty acid synthesis pathways by activation of sterol regulatory element-binding protein (SREBP). *J. Biol. Chem.* 277, 29342-29347 (2002).
31. Siler, S.Q., Neese, R.A. & Hellerstein, M.K. De novo lipogenesis, lipid kinetics, and whole-body lipid balances in humans after acute alcohol consumption. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 928-936 (1999). 30
32. Funabiki, A., Maeda, K., Ishihara, K., Okada, Y. & Kasuga, M. Adiponectin is associated with insulin resistance in liver. *Diabetes* 51 (suppl 2), A32 (2002).
33. Yoda-Murakami, M. et al, Change in expression of GBP28/adiponectin in carbon tetrachloride-administrated mouse liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 372-377 (2001).

他の引用文献：

- Bradley, R.L., K.A. Cleveland, and B. Cheatham, *The adipocyte as a secretory organ: mechanisms of vesicle transport and secretory pathways*. Recent Progress in Hormone Research, 2001. 56: p. 329-58.

【表 4】

- Fruhbeck, G., et al., *The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation*. American Journal of Physiology - Endocrinology & Metabolism, 2001. **280**(6): p. E827-47.
- Kim, S. and N. Moustaid-Moussa, *Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte*. Journal of Nutrition, 2000. **130**(12): p. 3110S-3115S.
- Steppan, C.M. and M.A. Lazar, *Resistin and obesity-associated insulin resistance*. TRENDS in endocrinology & metabolism, 2002. **13**(1): p. 18-23. 10
- Scherer, P.E., et al., *A Novel Serum-Protein Similar to C1q, Produced Exclusively in Adipocytes*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(45): p. 26746-26749.
- Nakano, Y., et al., *Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma*. Journal of Biochemistry, 1996. **120**(4): p. 803-12.
- Hu, E., P. Liang, and B.M. Spiegelman, *AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(18): p. 10697-10703. 20
- Maeda, K., et al., *cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1)*. Biochemical & Biophysical Research Communications, 1996. **221**(2): p. 286-9.
- Berg, A.H., et al., *The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action*. Nature Medicine, 2001. **7**(8): p. 947-53. 30
- Fruebis, J., et al., *Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(4): p. 2005-10.
- Yamauchi, T., et al., *The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity*. Nature Medicine, 2001. **7**(8): p. 941-6. 40
- Saito, K., et al., *Organization of the gene for gelatin-binding protein (GBP28)*. Gene, 1999. **229**(1-2): p. 67-73.

【表 5】

- Das, K., et al., *Chromosomal localization, expression pattern, and promoter analysis of the mouse gene encoding adipocyte-specific secretory protein Acrp30*. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2001. **280**(4): p. 1120-9.
- Takahashi, M., et al., *Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin*. International Journal of Obesity, 2000. **24**(7): p. 861-868. 10
- Arita, Y., et al., *Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999. **257**(1): p. 79-83.
- Hotta, K., et al., *Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients*. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2000. **20**(6): p. 1595-1599.
- Weyer, C., et al., *Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: Close association with insulin resistance and hyperinsulinemia*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2001. **86**(5): p. 1930-1935. 20
- Statnick, M.A., et al., *Decreased expression of apM1 in omental and subcutaneous adipose tissue of humans with type 2 diabetes*. International Journal of Experimental Diabetes Research, 2000. **1**(2): p. 81-8.
- Hotta, K., et al., *Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys*. Diabetes, 2001. **50**(5): p. 1126-1133. 30
- Yang, W.S., et al., *Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2001. **86**(8): p. 3815-3819.
- Combatsiaris, T.P., et al., *Induction of Acrp30 levels by PPAR gamma agonists: A potential mechanism of insulin sensitization*. Diabetes, 2001. **50**: p. A271-A272.
- Maeda, N., et al., *PPAR gamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein*. Diabetes, 2001. **50**(9): p. 2094-2099. 40

【表 6】

- Shapiro, L. and P.E. Scherer, *The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor*. Current Biology, 1998. **8**(6): p. 335-338.
- Wang, Y., et al., *Alteration in phosphorylation of P20 is associated with insulin resistance*. Diabetes, 2001. **50**(8): p. 1821-7. 10
- Wang, Y., et al., *Insulin and insulin antagonists evoke phosphorylation of P20 at serine 157 and serine 16 respectively in rat skeletal muscle*. FEBS Letters, 1999. **462**(1-2): p. 25-30.
- Johnson, R.G., et al., *Biochemical analysis of rabbit articular cartilage using an amino acid analyzer*. Clinical Orthopaedics & Related Research, 1980(146): p. 282-8.
- Leffert, H.L., et al., *Liver cells*. Methods Enzymol, 1979. **58**: p. 536-544. 20
- Wu, G.C., et al., *N-glycosylation and residues Asn805 and Asn890 are involved in the functional properties of type VI adenylyl cyclase*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(38): p. 35450-7.
- Hansen, J.E., et al., *NetOglyc: prediction of mucin type O-glycosylation sites based on sequence context and surface accessibility*. Glycoconjugate Journal, 1998. **15**(2): p. 115-30.
- Colley, K.J. and J.U. Baenziger, *Identification of the post-translational modifications of the core-specific lectin. The core-specific lectin contains hydroxyproline, hydroxylysine, and glucosylgalactosylhydroxylysine residues*. Journal of Biological Chemistry, 1987. **262**(21): p. 10290-5. 30
- Shinkai, H. and K. Yonemasu, *Hydroxylysine-linked glycosides of human complement subcomponent C1q and various collagens*. Biochemical Journal, 1979. **177**(3): p. 847-52.
- Lindros, K.O. & Jarvelainen, H.A. *A new oral low-carbohydrate alcohol liquid diet producing liver lesions: a preliminary account*. Alcohol Alcoholism **33**, 347-353 (1998). 40

【表 7】

- Fasshauer, M., Klein, J., Neumann, S., Esslinger, M. & Paschke, R. *Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes.* Biochem. Biophys. Res. Commun. **290**, 1084-1089 (2002).
- Wang, Y., Xu, A., Knight, C., Xu, L.Y. & Cooper, G.J. *Hydroxylation and glycosylation of the four conserved lysine residues in the collagenous domain of adiponectin. Potential role in the modulation of its insulin-sensitizing activity.* J. Biol. Chem. **277**, 19521-19529 (2002). 10
- Tilg, H. & Diehl, A.M. *Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis.* New Eng. J. Med. **343**, 1467-1476 (2000).
- Stepan, C.M. & Lazar, M.A. *Resistin and obesity-associated insulin resistance.* Trends Endocrinol. Metab. **13**, 18-23 (2002).
- Ouchi, N. et al. *A novel adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages.* Circulation **100**, 3967 (1999). 20
- Ouchi, N. et al. *Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin.* Circulation **100**, 2473-2476 (1999).
- Ross, R. *Atherosclerosis: an inflammatory disease.* New Eng. J. Med. **340**, 115-126 (1999).
- Maeda, N. et al. *Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30.* Nat. Med. **8**, 731-737 (2002). 30
- Eaton, S., Record, C.O. & Bartlett, K. *Multiple biochemical effects in the pathogenesis of alcoholic fatty liver.* Eur. J. Clin. Invest. **27**, 719-722 (1997).
- You, M., Fischer, M., Deeg, M.A. & Crabb, D.W. *Ethanol induces fatty acid synthesis pathways by activation of sterol regulatory element-binding protein (SREBP).* J. Biol. Chem. **277**, 29342-29347 (2002).
- Siler, S.Q., Neese, R.A. & Hellerstein, M.K. *De novo lipogenesis, lipid kinetics, and whole-body lipid balances in humans after acute alcohol consumption.* Am. J. Clin. Nutr. **70**, 928-936 (1999). 40
- Funabiki, A., Maeda, K., Ishihara, K., Okada, Y. & Kasuga, M. *Adiponectin is associated with insulin resistance in liver.* Diabetes **51** (suppl 2), A32 (2002).

【表 8】

- Yoda-Murakami, M. *et al*, Change in expression of GBP28/adiponectin in carbon tetrachloride-administrated mouse liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**, 372-377 (2001).
- Yamauchi, T. *et al*. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* **7**, 1-8 (2002).
- Winder, W.W. & Hardie, D.G. AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am. J. Physiol.* **277**, E1-10 (1999).

10

【0493】

当然ながら、本明細書に収めた実施例及び実施態様はもっぱら例証が目的であり、それらに照らした種々の変更態様又は修正が当業者には思い浮かぶであろうが、それらもまた本明細書の精神と範囲並びに添付請求項の範囲に包含される。本明細書で引用した諸々の出版物、特許及び特許出願は参照により本明細書にその全体が組み込まれるが、それはあたかも各個別出版物、特許及び特許出願が参照により組み込まれる旨を個別的具体的に指示されているのと同様である。

20

【図面の簡単な説明】

【0494】

【図1】図1は2次元電気泳動法(2-DE)による脂肪細胞分泌タンパク質の分離で明らかになった複数のアディポネクチンアイソフォームである。サブコンフルエントな3T3-L1前脂肪細胞(A)又は分化誘導8日後の脂肪細胞(B)をPBSで3回すすぎ洗いし、次いで無血清DMEMで4時間インキュベートした。培地を回収、濃縮し、各試料から50 μ gのタンパク質を2-DEで分離し、実験的方法(実施例1)で開示するように銀染色法で視覚化した。脂肪細胞で選択的に分泌されたタンパク質を番号付きの矢印で示した。(C)では脂肪細胞からの分泌タンパク質を前述の2-DEで分離し、ニトロセルロース膜にプロットし、ウサギ抗アディポネクチン抗体により1:1000希釈で検出した。矢印で示した8つのタンパク質はすべて抗アディポネクチン抗体に対して免疫反応性である点に注意。

30

【図2】図2は2-DE分離後の脂肪細胞分泌生成物の糖タンパク質の検出を示す。脂肪細胞の培地から回収したタンパク質200 μ gを図1の要領で2-DEにより分離し、ニトロセルロース膜にプロットし、糖タンパク質検出用の免疫プロット法キットを使用して検出した。図1と同様に番号付きの矢印で8種類のアディポネクチンアイソフォームを示した。

【図3】図3は種々のアディポネクチンアイソフォームに由来するトリプシン消化ペプチド混合物のMALDI-TOF質量スペクトルを示す。細菌産生アディポネクチン(A)、脂肪細胞分泌アディポネクチンのアイソフォーム1(B)及びアイソフォーム3(C)、それにCOS-7細胞中で発現したアディポネクチンのアイソフォーム3(D)をトリプシンによりゲル内消化し、トリプシン消化物をMALDI-TOF MSで分析した。矢印で示した3つのペプチド(質量1679、4260及び4276 Da)は2つの非グリコシル化アイソフォーム(1及び2)又は細菌産生アディポネクチンではなく、脂肪細胞とCOS-7細胞の両方で産生されたすべてのグリコシル化アイソフォーム(3~8)で、再現可能に観測されたことに注意。

40

【図4】図4はアディポネクチン由来のトリプシン消化ペプチドのRP-HPLC、MALDI-TOF MS及びアミノ酸配列解析による分画及び解析を示す。2-DEで分離したすべてのグリコシル化アディポネクチンアイソフォームをゲルから切り出し、プールし、トリプシンで消化した。トリプシン消化ペプチド混合物をRP-HPLCで分離した。各画分を回収してMALDI-TOF MS

50

で分析した。質量1679、4260及び4276 Daのペプチドを含む3つの画分をそれぞれA、B及びCで示した。下部の表はこれら3ペプチドのアミノ酸配列、実測質量、理論質量及び質量差を示す。

【図5】図5は、アディポネクチンのコラーゲン様ドメインの4つの修飾リシン(マウス付番方式で残基番号68、71、80及び104)がどの種でも観察されることを示す。マウス、ヒト、ウシ、サル及びイヌの各アディポネクチンの配列はそれぞれ登録番号BAB22597、NP_004788、AAK58902、AAK92202及びAAL09702で参照する。4つの修飾リシンとそれらの周辺モチーフは強調表示してある。

【図6】図6は図4で分離した3つのトリプシン消化ペプチドのアミノ酸分析を示す。ペプチドA(質量1679 Da)、ペプチドB(質量4260 Da)及びペプチドC(質量4276Da)を6N HClにより110 で24時間消化し(この処理で糖残基は分解されたが、ヒドロキシリシン及びヒドロキシプロリンの検出と定量はなお可能であった[26])、遊離アミノ酸残基をPITCで誘導体化し、421アミノ酸分析機で分析した。a:アミノ酸標品スペクトル、b: ヒドロキシプロリン標品スペクトル、c: ヒドロキシリシン標品スペクトル、d: ペプチドAスペクトル、e: ペプチドCスペクトル、f. ペプチドBスペクトル。

【図7】図7はAsp-N消化ペプチドB及びC由来のペプチド混合物のMALDI-TOF MSスペクトルを示す。図4で分離したペプチドC(I)及びB(II)をAsp-Nでさらに消化してから、MALDI-TOF MSにより図3の場合と同様に分析した。各ピークの上にペプチド配列と各質量に帰属させられる潜在的な修飾を示した。Pro94のヒドロキシル化プロリンとしての帰属もまたアミノ酸分析によって確認されたことに注意。

【図8】図8は4つのヒドロキシリシン上のグリコシドがグルコシル及びガラクトシル基を含むことを示す。COS-7細胞にpcDNA-Ad-Fを導入し、次いで100 μ Ci/ml 3H-1-ガラクトース/DMEM+2mMグルコースで48時間又は100 μ Ci/ml 3H-1-グルコース/DMEM+2mMガラクトースで48時間、放射性標識した。FLAG標識アディポネクチンを細胞培地から精製し、未標識又は放射性標識アディポネクチンに由来するトリプシン消化ペプチド混合物を図4の要領でRP-HPLCにより分離しペプチドA、B及びCを得た。放射能を比較するため各ペプチドを分取し液体シンチレーションカウンターにかけた。

【図9】図9はFLAG標識アディポネクチン変異体(K R)の発現と糖鎖検出を示す。COS-7細胞にpcDNA-Ad-F又はpcDNA-Ad(K R)-Fを導入した。(注: pcDNA-Ad-FはFLAG標識野生型マウスアディポネクチンを発現するpcDNAベクターであり、またpcDNA-Ad(K R)-Fは野生型分子ではヒドロキシル化及びグリコシル化されているのが普通である4リシン残基をアルギニン残基に変化させたマウスアディポネクチン変異体を発現させる同等ベクターである。) 48時間後にFLAG標識アディポネクチン又はアディポネクチン変異体(K R)を細胞培地から精製した。各試料からタンパク質500ngを、15% SDS-PAGEで分離し、Coomassie Brilliant Blue (CBB)で染色する(パネルA)か又は糖タンパク質検出用免疫プロットキットで検出した(パネルB)。アディポネクチン変異体(K R)では大半のグリコシル化が解消されていることに注意。

【図10】図10は初代培養ラット肝細胞でのインスリン誘発型のグルコース産生阻害に対するアディポネクチン及びアディポネクチン変異体の効果を示す。上パネル(パネルA)は、COS-7細胞産生アディポネクチン又はアディポネクチン変異体(K R) 20 μ g/ml又は細菌産生アディポネクチン20 μ g/mlの存在又は不存在下に逓増量のインスリンで処理した後の肝細胞グルコース産生の阻害を示す。下パネル(パネルB)は50pMのインスリンと逓増量のCOS-7細胞産生アディポネクチン又はアディポネクチン変異体(K R)で処理した後の肝細胞グルコース産生の阻害を示す。結果は、非処理細胞のグルコース産生に対するグルコース産生減少率として、また平均値 \pm 標準偏差(n=4)として表わしている。Ad: COS-7細胞由来のアディポネクチン; Ad variant: COS-7細胞由来のアディポネクチン変異体(K R); pAd: E.coli由来のアディポネクチン。

【図11】図11は常習的なアルコール摂取が血清アディポネクチンを減少させ、TNF- α を増加させ、また肝障害を誘発することを示す。マウスに高脂肪(HF)の対照流動食を与えた後(破線)又は高脂肪の含エタノール食を与えた後(実線)に血漿試料を採取し、次いでテキ

10

20

30

40

50

スト中の説明のようにアディポネクチン(A)、ALT (B)及びTNF- (C)の各濃度を定量した。
* $P<0.05$ エタノール食対対照食 (n=6)。

【図 1 2】図12はアディポネクチンによる処理がマウスのアルコール誘発性の肝:体重比(A)及び血漿ALT濃度(B)の上昇を無効にすることを示す。5週間にわたる対照流動食(LC)、エタノール流動食(LE)又はエタノール流動食+最後2週間のアディポネクチン処理(LE+Ad)の後、血漿試料を採取し検死で肝:体重比(A)と血清ALT濃度(B)を求めた(n=5)。* $P<0.05$ LE食だけを与えたマウスとの比較。

【図 1 3】図13はアルコール性の脂肪症及び炎症に対するアディポネクチンの効果を示す。5週間にわたる対照流動食(LC)、エタノール流動食(LE)又はエタノール流動食+最後2週間のアディポネクチン処理(LE+Ad)の後、マウス肝標本を採取してオイルレッドO(上パネル)又はヘマトキシリン+エオシン(下パネル)で染色した。結果は6回の独立実験に由来する代表的な顕微鏡写真である。

【図 1 4】図14はアディポネクチンが脂肪酸シンターゼ(FAS)及びCD36のmRNA発現を減らし肝臓中のTNF- 産生を抑える(A)ことを示す。対照流動食、アルコール流動食又はアディポネクチン処理アルコール流動食を与えたマウスの肝臓に由来する全RNAを抽出し、 ^{33}P 標識したTNF- 、FAS又はCD36をそれぞれ使用しノーザンブロット法で分析した(B)。パネルAの結果をリン光画像法で定量した(n=5)。すべてのRNA濃度は16S RNAの存在度を基にした標準化の後に、非処理HF/LCペア対照食に対する相対値として表わしている(C)。血漿中TNF- 濃度はChemicoのELISAキットを使用して定量した(n=5)。** $P<0.01$ HF/LE食対HF/LE食+アディポネクチン処理、FAS=脂肪酸シンターゼ、TNF- =腫瘍壊死因子アルファ。

【図 1 5】図15はアディポネクチンの肝保護作用の根底にある潜在的機序の略図である。FA=遊離脂肪酸、ACC=アセチルCoAカルボキシラーゼ、AMPK=5'-AMP活性化キナーゼ、FAS=脂肪酸シンターゼ、TNF- =腫瘍壊死因子アルファ。

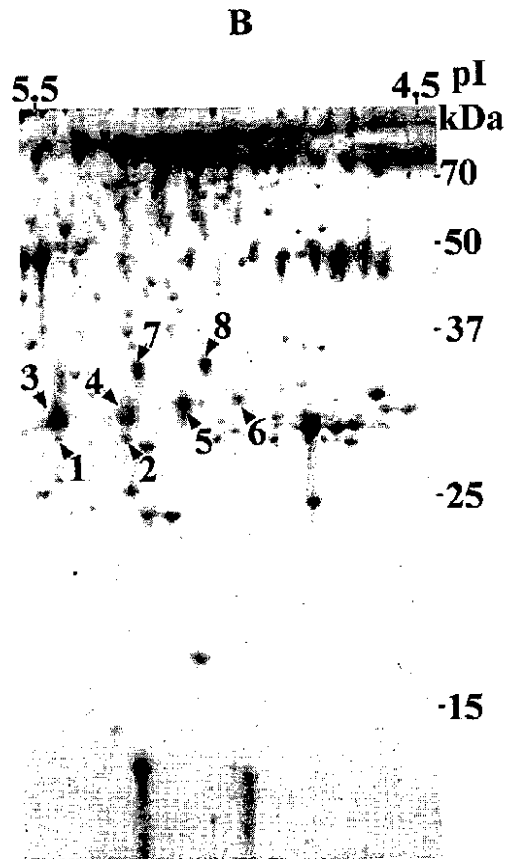
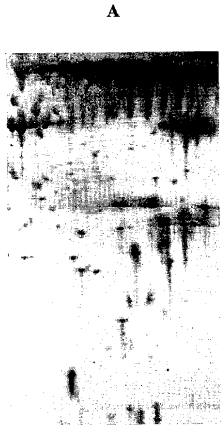
【図 1 6】図16は、アディポネクチンのコラーゲン様ドメイン内の数個の保存リシン残基(マウスアディポネクチンのLys 68、71、80及び104又は他生物種やアディポネクチン変異体の対応する残基)のグリコシル化及びヒドロキシル化、それに周辺モチーフのGXKGE(D)を示す。

10

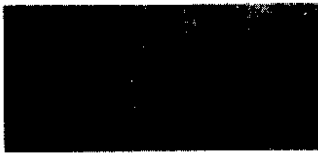
20

【 図 1 】

Figure 1

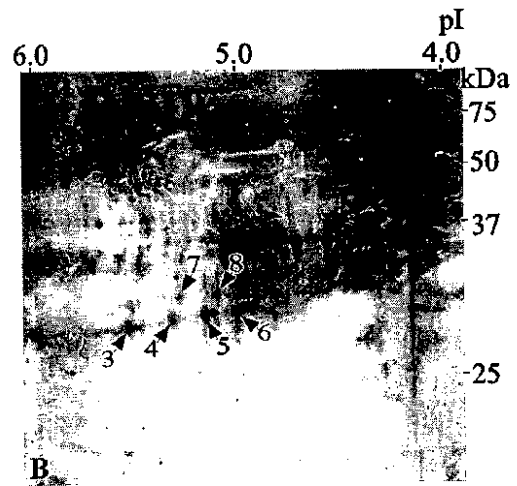


C



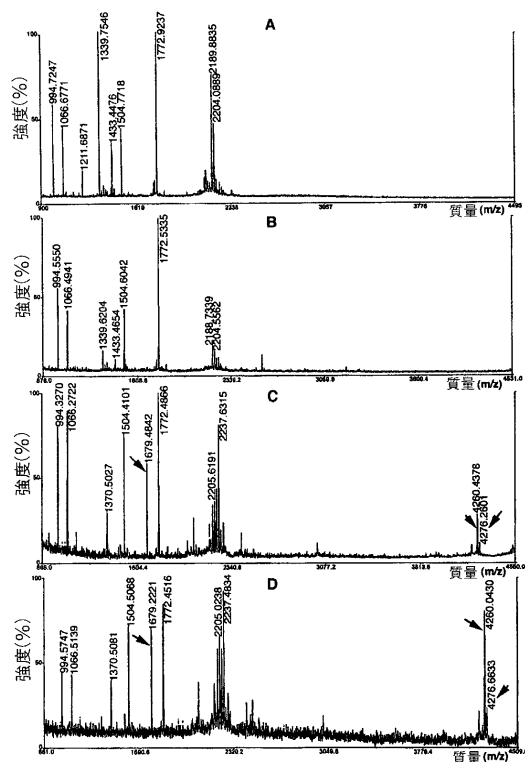
【 図 2 】

Figure 2



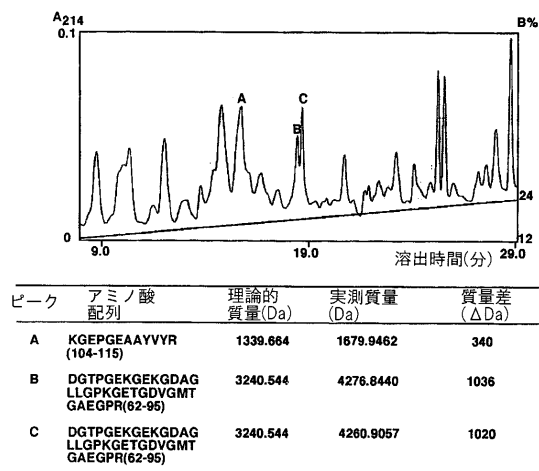
【 図 3 】

Figure 3



【 図 4 】

Figure 4



【 図 5 】

Figure 5

```

マウス      MLLGALLFLFLPLFSHAEDDTTTEALAPVPPPGCTGACGWMAGICPGHCGHNGTFRGD
ヒト          MLLGALLLALLLALSGHGDQTTTQGPV-----LLPLFGKACGWMAGICPGHCGHNGTFRGD
マウス      MLLGALLLALLLFSHGDENN-EDP-----PLFGKACGWMAGICPGHCGHNGTFRGD
ヒト          MLLGALLLALLLFSHGQTTTQGPV-----LLPLFGKACGWMAGICPGHCGHNGTFRGD
-----GPGV-----LLPLFGKACGWMAGICPGHCGHNGTFRGD

マウス      RDPTTTPVNNVPIFTIKFYNNQHHYDGSSTOKFCINIPGLYFSYHIVTMKDVYSLEK
ヒト          RDPTTTPVNNVPIFTIKFYNNQHHYDGSSTOKFCINIPGLYFSYHIVTMKDVYSLEK
マウス      RDPTTTPVNNVPIFTIKFYNNQHHYDGSSTOKFCINIPGLYFSYHIVTMKDVYSLEK
ヒト          RDPTTTPVNNVPIFTIKFYNNQHHYDGSSTOKFCINIPGLYFSYHIVTMKDVYSLEK
マウス      RDPTTTPVNNVPIFTIKFYNNQHHYDGSSTOKFCINIPGLYFSYHIVTMKDVYSLEK
ヒト          RDPTTTPVNNVPIFTIKFYNNQHHYDGSSTOKFCINIPGLYFSYHIVTMKDVYSLEK

マウス      GLETRTVTVNNVPIFTIKFYNNQHHYDGSSTOKFCINIPGLYFSYHIVTMKDVYSLEK
ヒト          GLETRTVTVNNVPIFTIKFYNNQHHYDGSSTOKFCINIPGLYFSYHIVTMKDVYSLEK
マウス      GLETRTVTVNNVPIFTIKFYNNQHHYDGSSTOKFCINIPGLYFSYHIVTMKDVYSLEK
ヒト          GLETRTVTVNNVPIFTIKFYNNQHHYDGSSTOKFCINIPGLYFSYHIVTMKDVYSLEK
マウス      GLETRTVTVNNVPIFTIKFYNNQHHYDGSSTOKFCINIPGLYFSYHIVTMKDVYSLEK
ヒト          GLETRTVTVNNVPIFTIKFYNNQHHYDGSSTOKFCINIPGLYFSYHIVTMKDVYSLEK

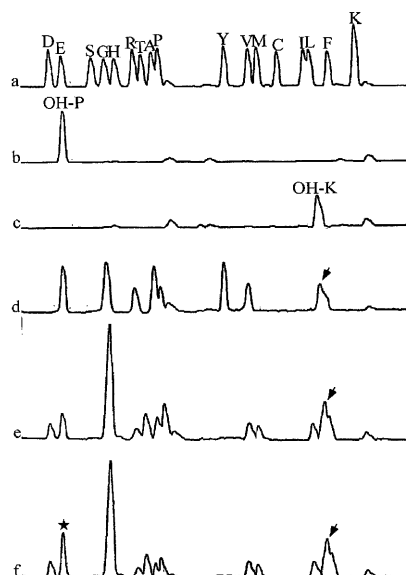
マウス      KOKAMLFTFDQYQENNDVAGSSVLLLEVDGQWQLVQYGE-NGNGVANDNDSTFTG
ヒト          KOKAMLFTFDQYQENNDVAGSSVLLLEVDGQWQLVQYGE-NGNGVANDNDSTFTG
マウス      KOKAMLFTFDQYQENNDVAGSSVLLLEVDGQWQLVQYGE-NGNGVANDNDSTFTG
ヒト          KOKAMLFTFDQYQENNDVAGSSVLLLEVDGQWQLVQYGE-NGNGVANDNDSTFTG
マウス      KOKAMLFTFDQYQENNDVAGSSVLLLEVDGQWQLVQYGE-NGNGVANDNDSTFTG
ヒト          KOKAMLFTFDQYQENNDVAGSSVLLLEVDGQWQLVQYGE-NGNGVANDNDSTFTG

マウス      FLLYHD-TN
ヒト          FLLYHD-TN
マウス      FLLYVNIH
ヒト          FLLYHD-TN

```

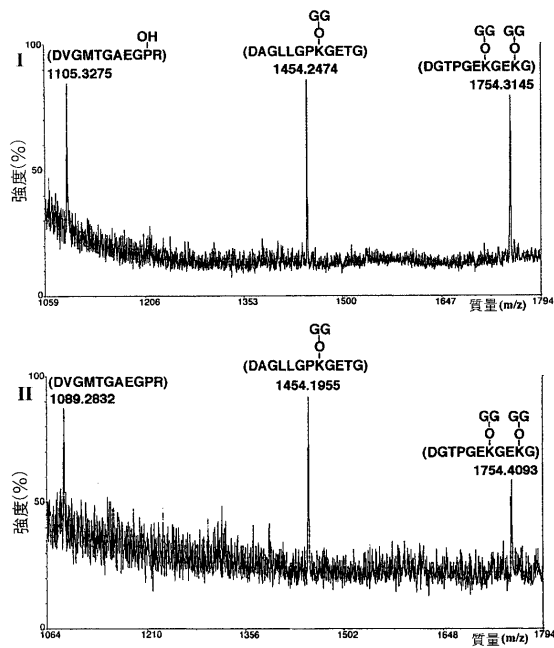
【 図 6 】

Figure 6



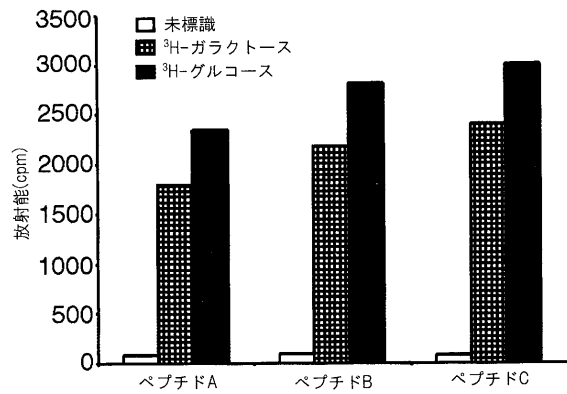
【 図 7 】

Figure 7



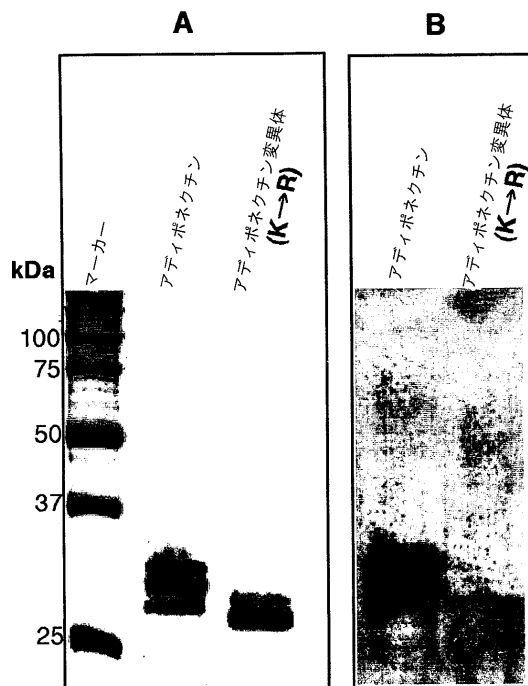
【 図 8 】

Figure 8



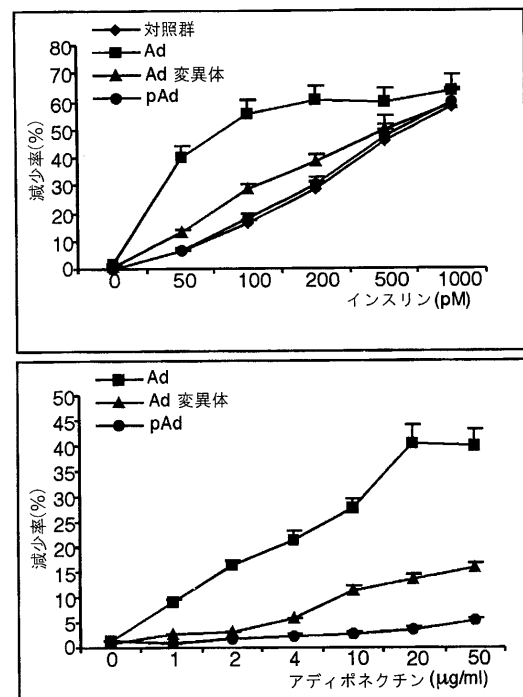
【 図 9 】

Figure 9



【 図 10 】

Figure 10



【手続補正書】

【提出日】平成15年2月26日(2003.2.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は広く、アディポネクチン及びアディポネクチンアゴニスト、限定しないが、アディポネクチンの分野におけるものである。

【背景技術】

【0002】

本発明の背景

本明細書において番号で引用されている文書は、本明細書の巻末にあるリストに対応している。本明細書で引用する全ての文書は、引用によってその全てが本明細書に組み入れられる。

【0003】

アディポネクチン(別名: ACRP30、AdipoQ又はGBP28)は、脂肪細胞から分泌されるタンパク質である。そのヌクレオチド配列は、最初に4つの研究グループにより、別個の方法で同定された。たとえばScherer, P.E. et al., *Journal of Biological Chemistry* 270(45): 26746-26749 (1995); Nakano, Y. et al., *Journal of Biochemistry* 120(4): 803-12 (1996); Hu, E. et al., *Journal of Biological Chemistry* 271(18): 10697-10703 (1996); and Maeda, K. et al., *Biochemical & Biophysical Research Communications*, c221(2):286-9(1996)を参照のこと。アディポネクチン遺伝子は染色体3q27にある。これはII型糖尿病及び他代謝症候群に対する感受性遺伝子座である[12-14]。最近の何件かの研究報告は、アディポネクチンが肥満症、インスリン抵抗性及びII型糖尿病に関連するホルモンでありうるという考えを支持すると言われている[9-11]。

【0004】

本発明者は、他の分子のみならず、アディポネクチンのあるグリコシル化型にも種々の病状及び症状の処置において有効であることを発見した。対応する米国仮特許出願と同時に提出した、2002年12月18日出願のニュージーランド特許出願第523410号及び523411号は、哺乳動物又は人間のそれぞれ肝疾患及びTNF- 関連疾患の処置への様々な種類の(ヒトアディポネクチンを含む哺乳動物)アディポネクチンの使用を説明している。

【0005】

アルコール性肝疾患(ALD)を非限定的に含む肝疾患は全世界で何百万人も目の患者があり、また先進諸国では主要な死因の1つとなっている¹。たとえばアルコール性肝疾患の進行は脂肪症(脂肪浸潤)、炎症、壊死、そして最後に線維症と肝硬変を特徴とし、重篤な肝炎は死に至るのが普通である²。現在のところ、アルコール性肝疾患を予防する又は元に戻す有効な薬は存在しない。

【0006】

アルコール性肝毒性の機序は複雑であり、多元的である³。最近の多数の研究報告は、活性化クッパー細胞によって産生される数種の炎症誘発性サイトカインがアルコール性肝疾患の発現に関与している可能性があることを示唆している^{4,5}。たとえばアルコール性肝障害の人間患者及び動物モデルではTNF- 、インターロイキン(IL)-1 及びIL-6の循環濃度の上昇が観測される^{6,7}。これらサイトカインの発現レベルは疾患の経過とよく相関する。ALDの発現におけるこれらサイトカインの重要な役割は、クッパー細胞の破壊が胃内アルコール給餌モデルではアルコール性初期肝障害の防止になり⁸、また経口アルコール給餌モデルでもアルコール誘発小滴性及び大滴性脂肪症を抑える⁹という研究結果から

もさらに裏付けられる。アルコール性肝障害はTNF- α 抗体の投与により有意に緩和される¹⁰、またTNF- α 受容体1ノックアウトマウスでは次第に弱まる¹¹。さらに、ラットのアルコール性肝障害はクッパー細胞内でのTNF- α 産生を阻害する化合物であるサリドマイドで処置すると完全に予防される¹²。炎症誘発性サイトカインとは対照的に、少数の抗炎症誘発性サイトカインは肝保護作用を有することが判明している⁷。

【0007】

ヒトアディポネクチン(別名: ACRP30、AdipoQ又はGBP28)はもっぱら脂肪組織から分泌されるタンパク質である¹³。アディポネクチンは当初4研究グループが別個の方法でクローニングした。たとえばScherer, P.E. et al., *Journal of Biological Chemistry* 270(45): 26746-26749 (1995); Nakano, Y. et al., *Journal of Biochemistry* 120(4): 803-12 (1996); Hu, E. et al., *Journal of Biological Chemistry* 271(18): 10697-10703 (1996); and Maeda, K. et al., *Biochemical & Biophysical Research Communications*, c221(2):286-9(1996)を参照。アディポネクチン遺伝子は染色体3q27にある。

【0008】

ヒト及びマウスアディポネクチンは、モジュール構造、特徴的なNH₂末端コラーゲン様領域及びCOOH末端補体因子C1q様球状ドメインを示すタンパク質ファミリーと配列相同性をもつ。アディポネクチンの3次元構造はTNF- α のそれとよく似る¹⁴。

【0009】

Maeda et al.¹⁵は、内因性アディポネクチン産生能を欠くマウスでアディポネクチンmRNA産生能を回復させると、脂肪細胞中の異常に高いTNF- α mRNA濃度を低下させ、また血漿中の異常に高いTNF- α 濃度を低下させることができることを示した。しかし、選択的mRNAスプライシング、リボソーム内部進入(internal ribosome entry)、翻訳フレームシフト及び/又は再コード化、それにグリコシル化などのアミノ酸の翻訳後修飾といった遺伝子発現の転写後及び翻訳後調節機構の解明が進んできた今日、1遺伝子は1ポリペプチド産物だけをコードするという考え方は単純化しすぎであると言わざるを得ない。従って、特異的mRNA産生能の回復は必ずしも、該mRNAの可能なポリペプチド産物のどれ又はどの組み合わせが観測された任意の生物学的効果を誘発する原因であるかを特定するとは限らない。

【0010】

マウスへのアディポネクチン投与は脂質代謝に有益な効果たとえば血漿からの脂質クリアランスの増強及び筋肉内脂肪酸酸化の増加をもたらすと判明している^{16,17}。アディポネクチンは肝組織に直接作用してグルコース産生を阻害することができる^{18,19}。アディポネクチンにはまた直接的な抗炎症効果もある²⁰。

【0011】

アディポネクチンは最近、肥満関連代謝症候群の有力な治療薬候補であることが示された¹³。組換えアディポネクチンのマウスへの補充は高血糖の低下¹⁸、インスリン抵抗性の逆転¹⁶、及び食物摂取への悪影響を伴わない持続的な減量を可能にする¹⁷。

【0012】

本発明者はまた、アディポネクチンには肝保護作用があり、従ってアルコール性肝障害を含む肝疾患の処置へのアディポネクチン及びそのアゴニストの臨床応用もありうることを発見した。このことは、マウスをモデルにしてアルコール性肝障害とマウスアディポネクチンにより証明され、その結果、(人間を含む)哺乳動物のアルコール性肝障害を含む肝疾患でのアディポネクチン及び/又はそのアゴニストの使用が支持された。

【0013】

アルコール性肝障害、アルコール性肝脂肪症、アルコール性肝炎及びアルコール性肝壊死などのような多数の肝疾患、糖尿病、高脂肪食 \pm 肝脂肪症に続発するインスリン抵抗性などは血中及び脂肪中のアディポネクチンタンパク質及びアディポネクチンmRNA濃度の低下に付随することも立証された(アルコール摂取関連データについては、この明細書を参照)。マウスアディポネクチンのマウス体内循環濃度は高脂肪の含エタノール食の長期摂取後に著しく低下した。これらのマウスに組換えマウスアディポネクチンを投与すると肝

腫脹及び脂肪症(脂肪肝)が劇的に緩和し、また炎症と高い血清アラニンアミノトランスフェラーゼ濃度も著しく減退した。マウスアディポネクチン処置は肝臓でのTNF- α 産生と脂肪酸シンターゼ及び脂肪酸輸送タンパク質CD36の発現とを低下させると判明した。

【0014】

TNF- α は多数の生物活性をもつ調節性サイトカインである。TNF- α は腫瘍の破壊、組織傷害に対する応答の媒介、及び種々の微生物による感染からの宿主の保護で不可欠の役割を果たす。たとえばTNF- α は、グラム陰性菌のリポ多糖(LPS)により活性化されたマクロファージから放出されるし、また細菌性敗血症に合併する内毒素性ショックの進行と発現に関与するきわめて重要な内因性媒介物質であるように見受けられる。

【0015】

しかし、その活性はリウマチ様関節炎、悪液質及び敗血症性ショックといったある種の病態及び炎症反応では過剰であるか見える。過剰TNF- α は、IL-6及び顆粒球/マクロファージ-コロニー刺激因子(GM-CSF)分泌の過剰刺激、多形核好中球の細胞傷害性の増強、及び細胞接着分子の発現延長といったいずれも有害な作用を及ぼしかねない誇大な免疫反応を招く。動物モデルでの炎症反応時のTNF- α 活性阻害の効果は、TNF- α に対する中和モノクローナル抗体を使用してすでに明らかにされてきた。

【0016】

TNF- α は組織障害を招く炎症誘発性作用たとえば血管内皮細胞に対する凝血促進作用の誘発、好中球及びリンパ球の接着性増強、それにマクロファージ、好中球及び血管内皮細胞からの血小板活性化因子の放出の刺激などで知られる。TNF- α は多数の感染症、免疫障害、腫瘍病理の病態生理に、たとえばある種の悪性腫瘍を伴う悪液質、自己免疫病理及び移植片対宿主病理に関与するとされる。TNF- α のがん及び感染症病理との関連はしばしば宿主の異化状態に関わる。がん患者の大問題は通常、無食欲に関連する体重減少である。その結果としての全身衰弱は「悪液質」と呼ばれる。悪液質は進行性の体重減少、無食欲、及び悪性腫瘍の増殖に対応した持続的な体力の衰えを含む。その根本的な生理的異常はエネルギー支出に対する食物摂取の相対的減少に関連しよう。従って悪液質状態は高い死亡率と結び付き、またがん死亡原因の大半を占めている。TNF- α ががん、感染症病理及び他の異化状態における悪液質の重要な媒介物質であることを示唆する研究報告は数多い。

【0017】

TNF- α はまた、発熱、倦怠感、無食欲及び悪液質などを含むグラム陰性菌敗血症及び内毒素性ショックの病態生理学的な予後で中心的な役割を果たすと考えられる。内毒素はTNF- α や他サイトカインの産生と分泌を刺激する強力な単球/マクロファージ活性化因子である。TNF- α は内毒素の多数の生物学的効果に近いものをもたらしまうるので、内毒素関連疾患の臨床的発現を引き起こす中心的な媒介物質であるとの結論に達した。

【0018】

TNF- α と他の単球由来サイトカイン類は内毒素に対する代謝及び神経ホルモン反応を媒介する。志願者に内毒素を投与すると、発熱、頻脈、代謝率やストレスホルモン放出の上昇を含むインフルエンザ様症状を伴う急性疾患を引き起こす。グラム陰性菌敗血症の患者では循環TNF- α 濃度の上昇もまた認められた。TNF- α による(その腫瘍傷害作用に着目した)がん患者治療では、 $545\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 時間を超える用量は健常者への内毒素注射($4\text{ng}/\text{kg}$)によって誘発される変化と類似する変化を引き起こすと判明したが、これは敗血症及び内毒素血症反応の主要な宿主媒介物質としてのTNF- α の役割を裏付けるものであった。人間又はラットに対する長期的なTNF- α 静注は無食欲、体液うっ滞、急性期反応、及びマイナスの窒素出納(すなわち古典的な異化効果)と関連付けられ、TNF- α は重病期に認められる数多くの変化の原因であるかもしれないとの結論を招いた。

【0019】

本明細書で使用する用語「TNF- α 関連疾患」又は「TNF- α 疾患」又は「TNF- α 障害」はTNF- α の存在の結果として発症又は悪化するような、及び/又はTNF- α に対する、又はTNF- α の作用部位に対する阻害及び/又は拮抗効果により処置可能であるような、疾患又は障害である。そうした疾患又は障害の例は次のとおりである：炎症性疾患[糖尿病合併症た

例えば網膜症、ネフロパシー、ニューロパシー、大血管及び微小血管障害、糖尿病性ネフロパシーなどの；関節炎たとえば慢性リウマチ様関節炎、変形性関節炎、リウマチ様骨髄炎及び骨膜炎など；術後/外傷後炎症；腫脹の改善；咽頭炎；膀胱炎；肺炎；心筋炎；心筋症；アトピー性皮膚炎；クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患；髄膜炎；炎症性眼疾患；炎症性肺疾患たとえば肺炎、珪肺肺核症、肺サルコイドーシス、炎症性骨疾患及び肺結核など]、循環器系疾患(不整脈、狭心症、心筋梗塞、心不全及びうっ血性心不全などを含む慢性心不全、アテローム性動脈硬化症を含む動脈硬化症、高血圧症、深部静脈血栓症、閉塞性末梢循環不全、虚血性脳循環不全、播種性血管内凝固症候群、レイノー病、バージャー病など)、門脈圧亢進症、肺高血圧症；喘息、アレルギー性鼻炎、結膜炎、消化管アレルギー、花粉症及び過敏症などのアレルギー性疾患；慢性閉塞性肺疾患、膠原病(紅斑性狼瘡、強皮症、多発性動脈炎)、クローン病、自己免疫性溶血性貧血、乾癬、慢性疾患や肝硬変を含む肝炎などの肝臓病、脾炎などの脾臓病、神経変性病(アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症など)、中枢神経障害(脳出血や脳梗塞及びその後遺症などの脳血管障害、頭蓋外傷、脊髄損傷、脳水腫、痴呆症、記憶障害、意識障害、多発性硬化症など)、毒素血症(敗血症、敗血症性ショック、内毒素性ショック、グラム陰性菌敗血症、毒素ショック症候群など)、更年期障害、妊娠中毒症、脂肪過多症、高脂質血症、高コレステロール血症、耐糖能異常、充実性腫瘍、腫瘍(悪性黒色腫、悪性リンパ腫、胃腸などの消化器がん、がん付随の悪液質など)、内分泌疾患(アジソン病、クッシング症候群、褐色細胞腫、原発性アルドステロン症など)、クロイツフェルト-ヤコブ病、ウイルス感染症(サイトメガロウィルス、インフルエンザウィルス、ヘルペスウィルスなどの感染症)、経皮術後冠動脈血管形成術、血管肥大又は閉塞、PTCA/ステント/バイパス手術後血管再閉塞/再狭窄、介入後血管肥大又は閉塞、移植誘発性血管障害及び拒絶反応の抑制、臓器又は組織移植及び自己免疫疾患(甲状腺炎などの器官特異疾患又はリウマチ様及び変形性関節炎などの非器官特異疾患)に続く拒絶反応の発現、腫瘍の治療及び拒絶反応の治療予防に関連するショック関連症状を解消又は緩和するためのTNF生成に関連する副作用、透析性低血圧症、緑内障、高眼圧、重症筋無力症、慢性疲労、骨の病気(骨折、再骨折、骨粗鬆症、骨軟化症、骨ペーチェット病、硬化性脊椎炎、慢性リウマチ様関節炎、変形性膝関節炎、それらの関連疾患に関連する関節組織破壊)、神経障害(個別神経、神経根、脊髄及び/又は脳への外傷、傷害、圧迫を含む)(急性脊髄及び脳損傷、脱髄疾患たとえば多発性硬化症、転移性がん起因する脊髄圧迫、原発性又は転移性脳腫瘍、転移性腫瘍起因する慢性痛症候群、炎症性CNS疾患たとえば亜急性硬化性全脳炎、ハンチントン病、ギラン-バレー症候群、顔面麻痺、糖尿病性ニューロパシー、視神経炎、黄斑変性症、網膜色素変性症、糖尿病性網膜症、筋ジストロフィー、及び多発性筋炎-皮膚筋炎など)、TNF-誘発インスリン抵抗性、細胞死異常(ウイルス性の細胞死阻害など)、糖尿病又はストレス高血糖症の合併症(心筋梗塞、うっ血性心不全及び心臓性ショックなど)、慢性閉塞性肺疾患、慢性気管支炎及び気腫。

【0020】

本発明の要約

1つの観点において、本発明は、グリコシル化され、且つ組換え体であるか、単離され、精製され又は合成されたアディポネクチンポリペプチドである。必ずしもではないが、該アディポネクチンポリペプチドはヒトアディポネクチンであるのが好ましい。

【0021】

必ずしもではないが、グリコシル化アディポネクチンポリペプチドは純度が約50%以上であるのが好ましく、純度が約80%以上であればなお好ましく、約90%以上であればさらになお好ましく、約95%以上であればさらになおもっと好ましく、また約99%以上であるのが最も好ましい。

【0022】

ヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するプロリル残基はヒドロキシル化されているか又はヒドロキシル化されていない。ヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するプロリル残基は一実施態様群ではヒドロキシル化されており、別の実施態様群では

ヒドロキシ化されていない。他の残基が、アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニスト中のアミノ酸位91にあるヒドロキシプロリンを置換することもあり、ここで、当該置換は、アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストの活性に対して不所望な作用をもたらさない。

【0023】

アディポネクチン（限定しないが、ヒトアディポネクチンを含む）又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上のリシン残基はグリコシル化されているのが好ましい。

【0024】

必ずしもではないが、分子内の1又は複数のグリコシル化部位でのアディポネクチン又はアディポネクチン又はポリペプチドアディポネクチンアゴニストのグリコシル化は、グルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による。

【0025】

実施態様によっては、アディポネクチン（限定しないが、ヒトアディポネクチンを含む）又はポリペプチドアディポネクチンアゴニストのリシン残基65、68、77及び101又は他のグリコシル化部位に対応する2以上のリシン残基はグリコシル化されている。別の態様において、アディポネクチン（限定しないが、ヒトアディポネクチンを含む）又はポリペプチドアディポネクチンアゴニストのリシン残基65、68、77及び101又は他のグリコシル化部位に対応する3以上のリシン残基がグリコシル化されている。さらに別の態様において、アディポネクチン（限定しないが、ヒトアディポネクチンを含む）又はポリペプチドアディポネクチンアゴニストのリシン残基65、68、77及び101又は他のグリコシル化部位に対応する4つすべてのリシン残基がグリコシル化されている。

【0026】

リシン又は他の残基がグリコシル化されたかに関係なく、必ずしもではないが、グリコシル化はグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数によるのが好ましい。アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドは、ヒトアディポネクチンのリシン残基65に対応する位置、ヒトアディポネクチンのリシン残基68に対応する位置、ヒトアディポネクチンのリシン残基77に対応する位置及び/又はヒトアディポネクチンのリシン残基101に対応する位置に、
-1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン残基を1つ又は複数有するものであるのが好ましい(すなわち都合15通りの組み合わせがある)。

【0027】

本発明の態様によっては、アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドはリシン残基65、68、77及び101のそれぞれに1以上の糖部分を有する。

【0028】

該グリコシル化は単一糖部分によるのが好ましい。他の態様においてグリコシル化は複数の糖部分によるのが好ましい。

【0029】

本発明はまた、前記アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドを、医薬として許容される賦形剤、補助剤(co-actives)又は希釈剤からなる1又は複数の群と調合して哺乳動物患者への投与に適するようにしたものを含む。

【0030】

さらに別の側面において、本発明はヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する位置にヒドロキシプロリン残基を有し、且つ組換え体であるか、単離され、精製され又は合成されたアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドである。

【0031】

さらに別の側面において、本発明は、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101、及び/又は他の天然若しくは合成のグリコシル化部位に対応する各残基が
-1-2-

グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンであるアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの医薬組成物である。

【0032】

別の側面において、本発明は、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101、及び/又は他の天然若しくは合成のグリコシル化部位に対応する各残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンではないアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの、医薬投与単位である。

【0033】

別の側面において、本発明は、アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドがグリコシル化され、且つアディポネクチンポリペプチド（好ましくはヒト）が、組換え体であるか、単離され、精製され又は合成されている、アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドを含んで成る組成物である。

【0034】

該組成物は、他の医薬として許容される賦形剤、補助剤、希釈剤等と調合して哺乳動物患者への投与に適するようにするのが好ましい。

【0035】

ヒトアディポネクチンの残基91に対応するアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの残基はヒドロキシプロリンであるのが好ましい。ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上のリシン残基はグリコシル化されているのが好ましい。該グリコシル化はグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1又は複数によるのが好ましい。

【0036】

態様によっては、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する2以上のリシン残基がグリコシル化されており、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する3以上のリシン残基がグリコシル化されており、又はヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する4つすべてのリシン残基がグリコシル化されている。

【0037】

該グリコシル化はグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1又は複数によるのが好ましい。

【0038】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する各残基は -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであるのが好ましい。ヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの残基は必ずしもヒドロキシプロリンである必要はないが、ヒドロキシ化されているのが好ましい。

【0039】

該グリコシル化は単一の糖部分又は複数の糖部分によるものでもよい。

【0040】

該アディポネクチンポリペプチドはリシン残基65、68、77及び101の各々に1以上のグルコシルガラクトシル部分又はガラクトシルグルコシル部分を有するのが好ましい。

【0041】

該アディポネクチンポリペプチドは天然の哺乳動物アディポネクチンポリペプチドの配列を有するか、あるいはアディポネクチンアゴニストとして、所望の活性レベルを維持するように変化させられている。

【0042】

該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドは、1以上の非グリコシル化アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドアイソフォームを実質的に欠くのが好ましい。

【0043】

該組成物はアイソフォーム1を実質的に欠くのが好ましい。

【0044】

該組成物はアイソフォーム2を実質的に欠くのが好ましい。

【0045】

該組成物は一切の非グリコシル化アディポネクチンポリペプチド・アイソフォームを実質的に欠くのが好ましい。

【0046】

支配的なアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド分子種は完全にグリコシル化されているのが好ましい。

【0047】

Lys-65、68、77及び101はすべてグリコシル化されているのが好ましい。

【0048】

該組成物は複数のアディポネクチンポリペプチドアイソフォームを含んでもよい。

【0049】

例えば、アイソフォーム3は該組成物の支配的アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドであってもよく、アイソフォーム4は該組成物の支配的アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドであってもよく、アイソフォーム5は該組成物の支配的アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドであってもよく、又はアイソフォーム6は該組成物の支配的アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドであってもよい。

【0050】

該組成物の哺乳動物への投与は、インスリンの効果を強めるために使用されうる。該組成物はまた、生理的濃度範囲を下回る血中インスリン濃度が正常な生理的血中インスリン濃度並みの生物学的効果を誘発させるために使用されうる。

【0051】

別の側面において、本発明はインスリン又はインスリン類似体を追加的に含む組成物である。

【0052】

インスリン又はインスリン類似体は、約50pM～約400pMの血中インスリン又はインスリン類似体濃度を誘発するに足る量又は濃度で存在する。

【0053】

好ましくは、インスリン又はインスリン類似体は、約100pM～約300pMの血中インスリン又はインスリン類似体濃度を誘発するのに十分な量又は濃度で存在する。

【0054】

好ましくは、インスリン又はインスリン類似体は、約200pMの血中インスリン又はインスリン類似体濃度を誘発するのに十分な量又は濃度で存在する。

【0055】

該組成物は、個体に投与した場合に糖新生を阻害するために使用されうる。

【0056】

該組成物は、例えば約1 μ g/mL～約20 μ g/mLの血漿アディポネクチンポリペプチド濃度を誘発(より好ましくは、例えば約1.9 μ g/mL～約17 μ g/mLの血漿アディポネクチンポリペプチド濃度を誘発)するために使用されうる。

【0057】

別の側面において、本発明は個体を対象に病状の存在又は病状を発現しやすい素因を診断する方法であって、該個体のある特定アディポネクチンポリペプチドアイソフォームのレベル又は2以上のグリコシル化アディポネクチンポリペプチドアイソフォームの発現ブ

ロファイルを決定するステップ及び該発現プロファイルを、該病状（又は該病状の範囲にあるもの）に罹っていない個体に特有の発現プロファイルと比較することを含む方法であり、ここで、発現プロファイルの差異は、該病状の存在又は該病状を発現しやすい素因を示唆する。

【0058】

使用するアディポネクチンポリペプチドアイソフォームは、例えば先に定義したような、及び/又は図面の参照により後で定義するような、グリコシル化アディポネクチンポリペプチドであってもよい。

【0059】

必ずしもではないが、該個体はヒトであるのが好ましい。

【0060】

該病状は、例えば高血糖症、インスリン抵抗性、インスリン抵抗性に関連する代謝症候群、II型糖尿病、又は肥満症(体重増加、減量又は管理、又は体重増加の予防などを含む)、高血圧を含む代謝症候群、動脈硬化症、冠状動脈性心臓病、虚血性心疾患又は多嚢胞性卵巣症候群でもよい。

【0061】

また肝臓やTNF- 関連の病状を含めて、他のところで述べた任意の病状でもよい。

【0062】

アディポネクチンポリペプチドは生体試料から得たものでもよい。

【0063】

該レベル又は発現パターンは、グリコシル化アディポネクチンポリペプチドアイソフォームの発現パターンを定量的又は定性的に評価することによって得ることができる。評価方法は電気泳動、HPLC又は質量分析を用いるのが好ましい。あるいは、又は好ましくは、該レベル又は発現パターンは、グリコシル化アディポネクチンポリペプチドアイソフォームに対して特異的な抗体を使用して定量又は評価される。

【0064】

別の側面において、本発明は個体を対象に病状の存在又は病状を発現しやすい素因を診断する方法であって、該個体のある特定アディポネクチンポリペプチドアイソフォームのレベル又は2以上のグリコシル化アディポネクチンポリペプチドアイソフォームの発現プロファイルを決定し、そして該発現プロファイルを、該病状に罹っている個体に特有の発現プロファイルと比較することを含んで成る方法であり、ここで、発現プロファイルの類似性は、該病状の存在又は該病状を発現しやすい素因を示唆する。

【0065】

使用するアディポネクチンポリペプチドアイソフォームは前述のようなグリコシル化アディポネクチンポリペプチドアイソフォームであるのが好ましい。

【0066】

使用する任意の1又は複数のアディポネクチンポリペプチドアイソフォームはヒトアディポネクチンアイソフォームであるのが好ましい。

【0067】

該個体はヒトであるのが好ましい。

【0068】

該病状は、例えば高血糖症、インスリン抵抗性、インスリン抵抗性に関連する代謝症候群、II型糖尿病、又は肥満症、高血圧を含む代謝症候群、動脈硬化症、冠状動脈性心臓病、虚血性心疾患又は多嚢胞性卵巣症候群でもよい。

【0069】

アディポネクチンポリペプチドは生体試料から得たものでもよい。

【0070】

該レベル又は発現パターンは、グリコシル化アディポネクチンポリペプチドアイソフォームの発現パターンを定量的又は定性的に評価することによって得る。評価方法は電気泳動、HPLC又は質量分析を用いるのが好ましい。あるいはグリコシル化アディポネクチンポ

リペプチドアイソフォームに対して特異的な抗体を使用してレベル又は発現パターンを定量又は評価してもよい。

【0071】

さらに別の側面において、本発明は、例えばアディポネクチンポリペプチド調節又は異常インスリン感受性に関連する病状を処置する方法であって、有効量のグリコシル化アディポネクチンポリペプチド又はポリペプチドアゴニストを、医薬として許容される賦形剤、補助剤、希釈剤等と共に、又は単独で、投与するステップを含む方法である。

【0072】

該病状は、例えば高血糖症、インスリン抵抗性、インスリン抵抗性に関連する代謝症候群、II型糖尿病、又は肥満症、高血圧を含む代謝症候群、動脈硬化症、冠状動脈性心臓病、虚血性心疾患又は多嚢胞性卵巣症候群でもよい。

【0073】

該グリコシル化アディポネクチンポリペプチドはヒトアディポネクチンであるのが好ましい。

【0074】

該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドは、例えば次のうちの1つ又は複数から選択してもよい：

i) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

ii) グリコシル化が、例えばグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、i)に定義したアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

iii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する2以上の残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

iv) グリコシル化が、例えばグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、iii)に定義したアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

v) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する3以上の残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

vi) グリコシル化が、例えばグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、v)に定義したアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

vii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する4つすべての残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

viii) グリコシル化が、例えばグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、vii)に定義したアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

ix) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が、例えば-1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンであるアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

x) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が、例えば-1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンではないアディポネクチン又はア

ディポネクチンアゴニストポリペプチド、及び

xi) 天然のアディポネクチンと比較して所望のアディポネクチン活性レベルを有するグリコシル化アディポネクチンポリペプチドアゴニスト。

【0075】

例えば、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの各残基は -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基はヒドロキシプロリンであるのが好ましい。

【0076】

あるいは、例えばヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチンポリペプチドの各残基は -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基はヒドロキシプロリンでないのが好ましい。

【0077】

別の側面において、本発明はアディポネクチンポリペプチド調節又は異常インスリン感受性に関連する病状を処置する方法であって、有効量の本発明の1又は複数の組成物を、医薬として許容される賦形剤、補助剤、希釈剤等と共に、又は単独で、投与するステップを含む方法である。

【0078】

該病状は、例えば高血糖症、インスリン抵抗性、インスリン抵抗性に関連する代謝症候群、II型糖尿病、又は肥満症、高血圧を含む代謝症候群、動脈硬化症、冠状動脈性心臓病、虚血性心疾患又は多嚢胞性卵巣症候群でもよい。

【0079】

別の側面において、本発明はアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を好適な発現ベクターに挿入するステップと、該ポリヌクレオチド配列を組み込んだ該発現ベクターを、該アディポネクチンを発現し、及び/又はプロセッシングし、及び/又はグリコシル化することができるような好適な真核宿主細胞に導入し、もって所望の生物活性生成物を産生させるようにするステップとを含む方法によって生産される生成物を提供する。

【0080】

一態様において、該ポリヌクレオチド配列は、完全長アディポネクチン、すなわちアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストのプロ型又はプレプロ型、あるいはシグナル配列又はグリコシル化分子を精製するのに十分な他の配列を含む、アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストをコードするヌクレオチド配列、をコードする。

【0081】

別の側面において、本発明は哺乳動物患者の体重を減らす方法であって、有効量のグリコシル化アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドを、医薬として許容される賦形剤、補助剤、希釈剤等と共に、又は単独で、投与するステップを含む方法を提供する。

【0082】

さらなる側面において、本発明は哺乳動物患者の体重増加を抑える方法であって、有効量のグリコシル化アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドを、医薬として許容される賦形剤、補助剤、希釈剤等と共に、又は単独で、投与するステップを含む方法を提供する。

【0083】

さらなる側面において、本発明は哺乳動物患者の肥満症を予防又は処置する方法であって、有効量のグリコシル化アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドを、医薬として許容される賦形剤、補助剤、希釈剤等と共に、又は単独で、投与するステップを含む方法を提供する。

【0084】

さらなる側面において、本発明は哺乳動物患者の体重増加を予防する方法であって、有効量のグリコシル化アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドを、医薬として許容される賦形剤、補助剤、希釈剤等と共に、又は単独で、投与するステップを含む方法を提供する。

【0085】

別の側面において、本発明はアディポネクチンが欠乏している哺乳動物患者を処置する又はその他の点でそうした処置が有益である哺乳動物患者を処置する方法であって、有効量のグリコシル化アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドを、医薬として許容される賦形剤、補助剤、希釈剤等と共に、又は単独で、投与するステップを含む方法を提供する。

【0086】

別の側面において、本発明は哺乳動物患者の

i) アディポネクチンポリペプチド調節に関連する、又はグリコシル化アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの投与が望まれる患者の病状又は症状の処置、あるいは

ii) インスリンの効果の増強、又は

iii) 糖新生の阻害

に有用である医薬組成物又は薬物又は投与単位の調製へのグリコシル化アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの(随意に医薬として許容される賦形剤、補助剤、希釈剤及び格納容器と一緒に)使用である。

【0087】

該使用はインスリン又はインスリン類似体を追加的に含む該医薬組成物又は薬物又は投与単位との併用でもよい。該インスリン又はインスリン類似体は約50pM～約400pMの血中インスリン又はインスリン類似体濃度を誘発するに足る濃度でもよい。該インスリン又はインスリン類似体は約100pM～約300pMの血中インスリン又はインスリン類似体濃度を誘発するに足る濃度でもよい。該インスリン又はインスリン類似体は約200pMの血中インスリン又はインスリン類似体濃度を誘発するに足る濃度(すなわち、もしくはは圧力)でもよい。

【0088】

該グリコシル化アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドは、例えばヒトアディポネクチンであるのが好ましい。

【0089】

該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドは次のうちの1つ又は複数から選択するのが好ましい:

i) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

ii) グリコシル化が、例えばグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、i)に定義したアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

iii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する2以上の残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

iv) グリコシル化が、例えばグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、iii)に定義したアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

v) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する3以上の残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

vi) グリコシル化が、例えばグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は

複数による、v)に定義したアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

vii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する4つすべての残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

viii) グリコシル化が、例えばグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、vii)に定義したアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

ix) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が、例えば -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンであるアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

x) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が、例えば -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンではないアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、及び

xi) 天然のアディポネクチンと比較して所望のアディポネクチン活性レベルを有するグリコシル化アディポネクチンポリペプチドアゴニスト。

【0090】

例えば、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの各残基は -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基はヒドロキシプロリンであるのが好ましい。

【0091】

あるいはヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの各残基は、例えば -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基はヒドロキシプロリンでないのが好ましい。

【0092】

別の側面において、本発明は、少なくともグリコシル化アディポネクチン又はアゴニストポリペプチドを含む容器又は送達単位と、哺乳動物患者の、例えば

i) アディポネクチンポリペプチド調節に関連する、又はグリコシル化アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの投与が望まれる患者の病状の処置、又は

ii) インスリンの効果の増強、又は

iii) 糖新生の阻害

に有効である該グリコシル化アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの使用説明書とを含んで成る又は含む製造品である。

【0093】

該グリコシル化アディポネクチンポリペプチドはヒトアディポネクチン又はそのアゴニストであるのが好ましい。

【0094】

該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドは次のうちの1つ又は複数から選択するのが好ましい：

i) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

ii) グリコシル化が、例えばグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、i)に定義したアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド

ド、

iii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する2以上の残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

iv) グリコシル化が、例えばグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、iii)に定義したアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

v) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する3以上の残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

vi) グリコシル化が、例えばグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、v)に定義したアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

vii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する4つすべての残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

viii) グリコシル化が、例えばグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、vii)に定義したアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

ix) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が、例えば -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンであるアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

x) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が、例えば -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンではないアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、及び

xi) 天然のアディポネクチンと比較して所望のアディポネクチン活性レベルを有するグリコシル化アディポネクチンポリペプチドアゴニスト。

【0095】

ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの各残基は、例えば -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基はヒドロキシプロリンであるのが好ましい。

【0096】

あるいはヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの各残基は、例えば -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基はヒドロキシプロリンでないのが好ましい。

【0097】

別の側面において、本発明はヒト又は他の哺乳動物への投与又は自己投与時に、アディポネクチンポリペプチド調節に関連する、又はアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの投与が望まれる患者の病状又は症状の処置における使用に有効であるほど十分な、有効量のグリコシル化アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドを送達することができる製剤又は剤形である。

【0098】

該製剤又は剤形はインスリン又はインスリン類似体を追加的に含むのが好ましい。該インスリン又はインスリン類似体は約50pM～約400pMの血中インスリン又はインスリン類似

体濃度を誘発するに足る濃度でもよい。該インスリン又はインスリン類似体は約100pM～約300pMの血中インスリン又はインスリン類似体濃度を誘発するに足る濃度でもよい。

【0099】

該インスリン又はインスリン類似体は約200pMの血中インスリン又は類似体濃度を誘発するに足る濃度(すなわち存在量)であるのが最も好ましい。

【0100】

該グリコシル化アディポネクチンポリペプチドはヒトアディポネクチン又はそのアゴニストであるのが好ましい。

【0101】

該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドは次のうちの1つ又は複数から選択するのが好ましい：

i) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

ii) グリコシル化が、例えばグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、i)に定義したアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

iii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する2以上の残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

iv) グリコシル化が、例えばグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、iii)に定義したアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

v) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する3以上の残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

vi) グリコシル化が、例えばグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、v)に定義したアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

vii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する4つすべての残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

viii) グリコシル化が、例えばグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、vii)に定義したアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

ix) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が、例えば-1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンであるアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

x) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が、例えば-1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンではないアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、及び

xi) 天然のアディポネクチンと比較して所望のアディポネクチン活性レベルを有するグリコシル化アディポネクチンポリペプチドアゴニスト。

【0102】

幾つかの態様において、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの各残基は、例え

ば -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基はヒドロキシプロリンである。

【0103】

他の態様において、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの各残基は、例えば -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基はヒドロキシプロリンでない。

【0104】

別の側面において、本発明はヒト又は他の哺乳動物への投与又は自己投与時にインスリンの効果を増強するに足る有効量のグリコシル化アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドを送達しうる製剤又は剤形である。

【0105】

該グリコシル化アディポネクチンポリペプチドは、ヒトアディポネクチン又はそのアゴニストであるのが好ましい。

【0106】

製剤又は剤形において、該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドは次のうちの1つ又は複数から選択するのが好ましい：

i) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

ii) グリコシル化が、例えばグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、i)に定義したアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

iii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する2以上の残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

iv) グリコシル化が、例えばグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、iii)に定義したアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

v) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する3以上の残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

vi) グリコシル化が、例えばグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、v)に定義したアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

vii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する4つすべての残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

viii) グリコシル化が、例えばグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、vii)に定義したアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

ix) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が、例えば -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンであるアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

x) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が、例えば -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンではないアディポネクチン又はア

ディボネクチンアゴニストポリペプチド、及び

xi) 天然のアディボネクチンと比較して所望のアディボネクチン活性レベルを有するグリコシル化アディボネクチンポリペプチドアゴニスト。

【0107】

別の側面において、本発明はヒト又は他の哺乳動物への投与又は自己投与時にインスリンの効果を増強するに足る有効量のグリコシル化アディボネクチン又はアディボネクチンアゴニストポリペプチドを送達しうる製剤又は剤形であって、該アディボネクチン又はアディボネクチンアゴニストポリペプチドは、好ましくは本明細書で定義したものである。

【0108】

該製剤又は剤形はインスリン又はインスリン類似体を追加的に(好ましくは先に定義した存在量で)含むのが好ましい。

【0109】

別の側面において、本発明はヒト又は他の哺乳動物への投与又は自己投与時に糖新生を阻害するに足る有効量のグリコシル化アディボネクチン又はアディボネクチンアゴニストポリペプチドを送達しうる製剤又は剤形である。

【0110】

該アディボネクチン又はアディボネクチンアゴニストポリペプチドは組換え、単離、生成又は合成体であるのが好ましい。

【0111】

該アディボネクチンポリペプチドはヒトアディボネクチン又はそのアゴニストであるのが好ましい。

【0112】

ヒトアディボネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディボネクチン又はアディボネクチンアゴニストポリペプチドの1以上の残基が、グリコシル化されているのが好ましい。

【0113】

別の側面において、本発明はヒト又は他の哺乳動物への投与又は自己投与時にインスリンの効果を増強するに足る有効量のグリコシル化アディボネクチン又はアディボネクチンアゴニストポリペプチドを送達しうる製剤又は剤形であり、ここで、該アディボネクチン又はアディボネクチンアゴニストポリペプチドは本明細書で定義した通りである。

【0114】

該製剤又は剤形はインスリン又はインスリン類似体を追加的に(たとえば先に開示した濃度まで)含むのが好ましい。

【0115】

さらに別の側面において、本発明は

a. アディボネクチンポリペプチド調節に関連する症状；又はアディボネクチン若しくはアディボネクチンアゴニストの投与が望まれる者の症状；

b. インスリンの増強を必要とする又はそれから恩恵を受ける症状、あるいは

c. 糖新生の阻害を必要とする又はそれから恩恵を受ける症状、
に罹りやすい又は罹っている哺乳動物個体の処置をモニタリングする方法であって、

(A) ヒトアディボネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディボネクチン又はアディボネクチンアゴニストポリペプチドの1以上のグリコシル化残基

(B) ヒトアディボネクチンのプロリン残基91に対応するヒドロキシ化プロリル残基、及び

(C) (A)と(B)の両方

のうちの1つを有するグリコシル化アディボネクチン又はアディボネクチンアゴニストポリペプチドの存在量を増加させるべく該個体をモニタリングするステップを含んで成る又は含む方法にある。

【0116】

使用する任意のアディボネクチンアイソフォームは、例えば本明細書に開示したような

グリコシル化アディポネクチンポリペプチドであるのが好ましい。

【0117】

該病状は、例えば高血糖症、インスリン抵抗性、インスリン抵抗性に関連する代謝症候群、II型糖尿病、又は肥満症、高血圧を含む代謝症候群、動脈硬化症、冠状動脈性心臓病、虚血性心疾患又は多嚢胞性卵巣症候群のうちの1つ又は複数でもよい。

【0118】

さらに別の側面において、本発明はグリコシル化アディポネクチンポリペプチドを含む組成物を調製する方法であって、

(a) グリコシル化の程度又はタイプが異なる少なくとも2つの形態のアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドを含む第1組成物を獲得するステップ、及び

(b) アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの形態を、少なくともある程度まではグリコシル化の程度又はタイプに応じて分離し、もってアディポネクチン及び/又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドプロファイルが第1組成物とは異なる第2組成物を生成させるステップ、
を含んで成る方法にある。

【0119】

例えば、該方法は本明細書で開示した任意の種類のアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドを第2組成物中に濃縮するか、又は少なくとも実質的に単離するのが好ましい。

【0120】

例えば、該アディポネクチンポリペプチドはアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチドの哺乳動物細胞又はポリペプチドをグリコシル化することができる他の細胞中での発現によって獲得するのが好ましい。

【0121】

該組換えポリヌクレオチドは、例えば図5に記載のような配列をもつポリペプチド又はその生物活性断片又はその変異体又は誘導体をコードしてもよい。

【0122】

あるいは、例えば該アディポネクチンポリペプチドは動物組織、たとえばヒト、マウス、ラット、イヌ、ウシ又は別のヒト以外の霊長類の組織から精製される。

【0123】

該組織は血清又は脂肪細胞であるのが好ましい。

【0124】

該分離は電気泳動のステップを伴っても伴わなくてもよい。

【0125】

該分離はクロマトグラフィーのステップを伴っても伴わなくてもよい。

【0126】

該第2組成物は本発明の組成物又はポリペプチドであるのが好ましい。

【0127】

別の側面において、本発明は、

(A) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの1以上の残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニスト、

(B) ヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するプロリル残基がヒドロキシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニスト、及び

(C) (A)と(B)の両方

からなる群より選択されるアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドのグリコアイソフォームに対して特異的な抗体にある。

【0128】

該抗体はモノクローナル抗体であるのが好ましい。

【0129】

該抗体は2部位キャプチャーが可能でもよい。

【0130】

別の側面において、本発明はそうした任意の抗体の組成物にある。

【0131】

別の側面において、本発明は

(A) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの1以上の残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニスト、

(B) ヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するプロリル残基がヒドロキシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニスト、及び

(C) (A)と(B)の両方

からなる群より選択されるアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドのグリコアイソフォームに対して特異的な抗体の産生に対して特異的なハイブリドーマにある。

【0132】

別の側面において、本発明は

(A) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの1以上の残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニスト、

(B) ヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するプロリル残基がヒドロキシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニスト、及び

(C) (A)と(B)の両方

のうち1つを有するグリコシル化アディポネクチンポリペプチド活性のレベルを増強する物質又は哺乳動物において増強するために有用な物質をスクリーニングする方法であって、該哺乳動物又はその組織に、又は不特定の哺乳動物に投与し、そうした哺乳動物又は哺乳動物組織による該グリコシル化アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの産生を増強させるステップを含んで成る方法にある。

【0133】

別の側面において、本発明は

(A) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの1以上の残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニスト、

(B) ヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するプロリル残基がヒドロキシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニスト、及び

(C) (A)と(B)の両方

のうち1つを有する物質の使用により対象者のグリコシル化アディポネクチンポリペプチドの活性レベルを増強するのに有用な物質であって、該哺乳動物又はその組織に、又は不特定の哺乳動物に、任意のそのような分子を投与し、そしてそうした哺乳動物又は哺乳動物組織による該グリコシル化アディポネクチン又はポリペプチドの活性又は産生を同定することを含んで成るスクリーニング方法によって同定される物質である。

【0134】

別の側面において、本発明は、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基がグリコシル化され、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するプロリル残基がヒドロキシル化されているアイソフォームの濃縮又は除去、変換又は合成による、アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドのアイソフォーム混合物を含む。

【0135】

別の側面において、本発明は、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101

に対応する1以上の残基がグリコシル化され、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するプロリル残基がヒドロキシ化されていないアイソフォームの濃縮又は除去、変換又は合成による、アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドのアイソフォーム混合物を含む。

【0136】

別の側面において、本発明は、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドのアイソフォームを含む。

【0137】

本発明はまた、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基がグリコシル化されており、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する位置にヒドロキシプロリル残基をもつアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドのアイソフォーム、あるいはヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基がグリコシル化されており、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する位置にヒドロキシプロリル残基をもたないアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドのアイソフォームを含む。

【0138】

別の側面において、本発明はグリコシル化アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドを発現することができる1又は複数の細胞をスクリーニングする方法であって、前記1又は複数の細胞によって発現される、特定のアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドアイソフォームのレベル又は2以上のグリコシル化アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドアイソフォームの発現プロファイルを同定及び/又は決定するステップと、前記1又は複数の細胞を同定及び/又は精製及び/又は単離するステップを含む方法である。

【0139】

例えば、該グリコシル化アディポネクチンポリペプチドはヒトアディポネクチン又はそのアゴニストであるのが好ましい。

【0140】

該アディポネクチンポリペプチドは次のうちの1つ又は複数から選択するのが好ましい：

- i) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、
- ii) グリコシル化が、例えばグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、i)に定義したアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、
- iii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する2以上の残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、
- iv) グリコシル化が、例えばグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、iii)に定義したアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、
- v) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する3以上の残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド
- vi) グリコシル化が、例えばグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、v)に定義したアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、
- vii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する4つすべての残

基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

viii) グリコシル化が、例えばグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1つ又は複数による、vii)に定義したアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

ix) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が、例えば -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンであるアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、

x) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が、例えば -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンではないアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、及び

xi) 天然のアディポネクチンと比較して所望のアディポネクチン活性レベルを有するグリコシル化アディポネクチンポリペプチドアゴニスト。

【0141】

例えば、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの各残基は -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基はヒドロキシプロリンであるのが好ましい。

【0142】

更に、例えばヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの各残基は -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであってもよく、またヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基はヒドロキシプロリンでないのが好ましい。

【0143】

任意の1アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの同定及び/又は決定は、

(A) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの1以上の残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニスト、

(B) ヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応するプロリン残基がヒドロキシ化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニスト、及び

(C) (A)と(B)の両方、

からなる群より選択されるアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの1又は複数のグリコアイソフォームに関して所望の結合特性を有する抗体を利用するのが好ましい。

【0144】

該抗体はモノクローナル抗体であるのが好ましい。

【0145】

該抗体は、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する各残基が、例えば -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンであるアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドに対して特異的であっても、それに関して所望の結合特性を有してもよい。

【0146】

該抗体は、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する各残基が、例えば -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンではないアディポネクチン

ン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドに対して特異的であっても、それに関して所望の結合特性を有してもよい。

【0147】

本発明はまた、特許請求の範囲の対象の全てを含み、これは、グリコシル化アディポネクチンポリペプチドを発現することができる1又は複数の細胞をスクリーニングする方法であって、前記1又は複数の細胞によって発現した、特定のアディポネクチンポリペプチドアイソフォームのレベル又は少なくとも2つのグリコシル化アディポネクチンアイソフォームの発現プロファイルを同定及び/又は決定し、そして前記1又は複数の細胞を同定及び/又は精製及び/又は単離することを含んで成る方法によって同定及び/又は単離及び/又は精製される任意の1又は複数の細胞を含む。

【0148】

別の側面によると、本発明は、例えば肝疾患に罹りやすい又は肝疾患の哺乳動物の患者、及び/又は肝疾患の何らかの特徴を示す哺乳動物患者を処置する方法であって、該患者に有効量のアディポネクチン及び/又はそのアゴニストを投与することを含んで成る又は含む方法、を含む。

【0149】

該肝疾患は、例えば急性肝疾患、慢性肝疾患、肝臓の炎症、肝臓の機能障害、脂肪肝(肝脂肪症)、肝線維症、肝硬変症、肝臓の壊死、肝細胞壊死、アルコール性肝疾患、アルコール性肝脂肪症、アルコール性肝炎、アルコール性肝壊死、アルコール性肝硬変症、肝壊死、肝脂肪症、糖尿病に合併する肝脂肪症、高脂肪食に関連する肝脂肪症、脂質代謝異常に関連する肝脂肪症、任意の状態に起因する肝炎、任意の状態に起因する肝壊死、急性肝炎、慢性肝炎、慢性活動性肝炎、ウイルス感染症または肝臓の炎症に続発する肝炎、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、D型肝炎、E型肝炎、G型肝炎、任意の薬物又は毒素の作用に関連する肝炎、胆汁うっ滞に関連する肝炎又は肝機能障害、原発性胆汁性肝硬変症、肝肉芽腫症、及び/又は高組織濃度又は高血中濃度の腫瘍壊死因子が病因となっているような状態のうち任意の1つ又は複数でもよい。

【0150】

該哺乳動物はヒトであり、且つ該アディポネクチンはヒトアディポネクチンであるのが好ましい。

【0151】

該アディポネクチンは完全長であるのが好ましい。

【0152】

例えば、該アディポネクチンは、1又は複数の部位でグリコシル化されているのが好ましい。

【0153】

例えば、該アディポネクチンはリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたヒトアディポネクチンであればなお好ましい。当然ながら、ヒト以外の種のアディポネクチン、アディポネクチン変異体、アディポネクチンアゴニストポリペプチド、又はヒトアディポネクチンとは異なる短縮型アディポネクチンを参照する際、該アディポネクチンの残基は、その2つの配列の最適アラインメントを作成することによって決定した、対応するヒト配列残基の番号付けを用いて参照することができる。

【0154】

該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストの調製品は、ヒトへの投与に適するように、好ましくは例えば皮下(sc)、皮内(id)、静脈内(iv)、腹腔内(ip)又は経皮などの経路による非経口投与に適した形に、調製してもよい。他の調製品も、該アディポネクチンを経口、頬側、経直腸、経膈、膀胱内、くも膜下、心室内、大脳内又は当業者に知られているか若しくは望まれている他経路で投与されることも見込まれる。

【0155】

好ましい投与経路は非経口である。非経口投与に適したアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストは、例えば安定化用の緩衝液を含む水溶液に調製し、好ましくはほぼ

等張にし、また哺乳動物特にヒトへの投与に適したタンパク質製剤用として当業者に知られている防腐、消泡、抗沈殿等の安定化剤、例えば、特にヒトを含む哺乳動物に投与するための治療用タンパク質溶液の安定化に適した安定化剤を添加する。

【0156】

さらなる側面において、本発明はアルコール性肝疾患の素因がある若しくはアルコール性肝疾患の及び/又はアルコール性肝疾患の何らかの特徴を示す哺乳動物患者を処置する方法であって、該患者にアディポネクチン及び/又はそのアゴニストを投与するステップを含む方法にある。

【0157】

さらなる側面において、本発明は肝疾患及び/又は肝疾患の何らかの特徴を予防及び/又は逆転するための哺乳動物患者の処置方法であって、該患者にアディポネクチン及び/又はそのアゴニストを投与するステップを含んで成る又は含む方法にある。

【0158】

別のさらなる側面において、本発明は肝疾患の素因がある及び/又は肝疾患の何らかの特徴を示す哺乳動物患者を処置する方法であって、該患者に有効量のアディポネクチン及び/又はそのアゴニストを投与するステップを含んで成る方法にある。

【0159】

さらなる側面において、本発明はアルコール性肝疾患及び/又はアルコール性肝疾患の何らかの特徴を予防及び/又は逆転するための哺乳動物患者の処置方法であって、該患者にアディポネクチン及び/又はそのアゴニストを投与するステップを含んで成る又は含む方法にある。

【0160】

別のさらなる側面において、本発明はアルコール性肝疾患の素因がある及び/又はアルコール性肝疾患の何らかの特徴を示す哺乳動物患者を処置する方法であって、該患者に有効量のアディポネクチン及び/又はそのアゴニストを投与するステップを含んで成る方法にある。

【0161】

別のさらなる側面において、本発明は肝脂肪症(脂肪浸潤)、肝炎、肝壊死、肝線維症、肝硬変症及び/又は肝機能障害のいずれ1又は複数の疾患の素因がある哺乳動物患者を処置する方法であって、該患者にアディポネクチン及び/又はそのアゴニストを投与するステップを含んで成る又は含む方法にある。

【0162】

別のさらなる側面において、本発明はアディポネクチン及び/又はアディポネクチンアゴニストを含む容器；肝疾患及び/又は肝疾患の任意の特徴を処置、予防又は逆転するためのアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストの(たとえば該容器に入れた状態での)使用に関する説明書、を含んで成る又は含む製造品にある。

【0163】

別のさらなる側面において、本発明はアディポネクチン及び/又はアディポネクチンアゴニストを含む容器；アルコール性肝疾患及び/又はアルコール性肝疾患の任意の特徴を処置、予防又は逆転するためのアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストの(たとえば該容器に入れた状態での)使用に関する説明書、を含んで成る又は含む製造品にある。

【0164】

別のさらなる側面において、本発明はアディポネクチン及び/又はアディポネクチンアゴニストを入れた包装資材；肝疾患及び/又は肝疾患の任意の特徴を処置、予防又は逆転するためのアディポネクチン及び/又はアディポネクチンアゴニストの(たとえば該包装資材に入れた状態での)使用に

関する説明書

を含んで成る又は含む製造品にある。

【0165】

別のさらなる側面において、本発明は

アディポネクチン及び/又はアディポネクチンアゴニストを入れた包装資材；

アルコール性肝疾患及び/又はアルコール性肝疾患の任意の特徴を処置、予防又は逆転するためのアディポネクチン及び/又はアディポネクチンアゴニストの(たとえば該包装資材に入れた状態での)使用に関する説明書

を含んで成る又は含む製造品にある。

【0166】

別のさらなる側面において、本発明は(ヒトであれヒト以外であれ)哺乳動物患者の肝疾患及び/又は肝疾患の任意の特徴の処置、予防及び/又は逆転への使用に有効な投与単位又は医薬組成物の製造への、(好ましくは有効量の)アディポネクチン及び/又はアディポネクチンアゴニストの、(賦形剤、補助剤、希釈剤等であれ、投与単位を規定する容器であれ)他の1又は複数の材料と一緒にの使用にある。

【0167】

別のさらなる側面において、本発明は(ヒトであれヒト以外であれ)哺乳動物患者のアルコール性肝疾患及び/又はアルコール性肝疾患の任意の特徴の処置、予防及び/又は逆転への使用に有効な投与単位又は医薬組成物の製造への、(好ましくは有効量の)アディポネクチン及び/又はアディポネクチンアゴニストの、(賦形剤、補助剤、希釈剤等であれ投与単位を規定する容器であれ)他の1又は複数の材料と一緒にの使用にある。

【0168】

別の側面において、本発明は、該哺乳動物患者におけるアディポネクチンのモニタリング並びに/あるいは該哺乳動物へのアディポネクチン及び/又はそのアゴニストの投与、を任意の順序で含む又は含んで成る哺乳動物患者の処置方法であって、哺乳動物患者の(アルコール性肝疾患を含んでもよい)肝疾患及び/又は肝疾患の任意の特徴を処置、逆転又は予防するための処置方法に存する。該哺乳動物患者はヒトであるのが好ましい。

【0169】

別の側面において、本発明は哺乳動物患者の(アルコール性肝疾患を含む)肝疾患及び/又は肝疾患の任意の特徴を処置、逆転又は予防するための処置方法であって、該哺乳動物患者のアディポネクチンmRNAのモニタリング並びに/あるいは該哺乳動物へのアディポネクチン及び/又はそのアゴニストの投与を任意の順序で含む又は含んで成る方法にある。該哺乳動物患者はヒトであるのが好ましい。

【0170】

さらなる側面において、本発明は哺乳動物患者の活性アディポネクチンを測定する方法であって、例えば血液又は組織中の1又は複数の活性型アディポネクチンの濃度又は量をアッセイ又は評価することを含んで成る又は含む方法にある。

【0171】

アディポネクチン濃度の測定には、活性型アディポネクチンとその組成物に関する先行の米国出願第60/349,885号明細書で開示したような放射線イムノアッセイ(RIA)、ELISAなどの免疫学的方法を非限定的に含む当業者に知られている任意の方法を使用してもよい。

【0172】

例えば、該組織は脂肪組織であるのが好ましい。

【0173】

さらなる側面において、本発明は、哺乳動物患者のアディポネクチンを測定する方法であって、血液又は組織中のアディポネクチンmRNAの濃度又は量をアッセイし、又は評価することを含んで成る又は含む方法にある。

【0174】

アディポネクチンmRNAの濃度は、限定しないが、RT-PCR、ノーザン法、in situハイブリダイゼーション及び放射線イムノアッセイ(RIA)などを含む当業者に周知な任意の方法

で決定してもよい。

【0175】

該組織は脂肪組織であるのが好ましい。

【0176】

さらなる側面において、本発明は、哺乳動物患者のアディポネクチンを測定することができるアッセイであって、

該哺乳動物患者から血液又は組織試料を単離し；

試料を調製し；

限定しないが、放射線イムノアッセイ(RIA)、ELISAなどの免疫学的方法を含む当業者に知られている任意の方法により血液又は組織中のアディポネクチン濃度をアッセイすること、

を含んで成る又は含むアッセイにある。アディポネクチンの測定方法は活性型アディポネクチンとその組成物を説明している米国出願第60/349,885号明細書に記載されている。

【0177】

別のさらなる側面において、本発明は、例えば急性肝疾患、慢性肝疾患、肝臓の炎症、肝臓の機能障害、脂肪肝(肝脂肪症)、肝線維症、肝硬変症、肝臓の壊死、肝細胞壊死、アルコール性肝疾患、アルコール性肝脂肪症、アルコール性肝炎、アルコール性肝壊死、アルコール性肝硬変症、肝壊死、肝脂肪症、糖尿病に合併する肝脂肪症、高脂肪食に関連する肝脂肪症、脂質代謝異常に関連する肝脂肪症、任意の状態に起因する肝炎、任意の状態に起因する肝壊死、急性肝炎、慢性肝炎、慢性活動性肝炎、ウイルス感染症または肝臓の炎症に続発する肝炎、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、D型肝炎、E型肝炎、G型肝炎、任意の薬物又は毒素の作用に関連する肝炎、胆汁うっ滞に関連する肝炎又は肝機能障害、原発性胆汁性肝硬変症、肝肉芽腫症、及び/又は高組織又は血中濃度の腫瘍壊死因子が病因となっているような症状より選択される任意の症状に罹りやすい又は罹っている哺乳動物患者を処置する方法であって、該患者にアディポネクチン及び/又はそのアゴニストを投与することを含んで成る又含む方法にある。

【0178】

該患者はヒトであり、該アディポネクチンはヒトアディポネクチン又はそのアゴニストであるのが好ましい。

【0179】

該アディポネクチン又はそのアゴニストは完全長であるのが好ましい。

【0180】

該アディポネクチン又はそのアゴニストは、1又は複数の部位でグリコシル化されているのが好ましい。

【0181】

アディポネクチンは、ヒトの処置との関連では、当業界の技術範囲にある、分子生物学技術(遺伝子組換え技術を含む)、並びに微生物学、細胞生物学、生化学、核酸化学及び免疫学技術によって導かれるようなアディポネクチン、及び/又はヒトアディポネクチンに関連するそのアゴニストを含むのが好ましい。アディポネクチン及びアディポネクチンアゴニストポリペプチドは、遺伝子組換え技術によって、該タンパク質をコードするポリヌクレオチド(通常はDNA)配列を発現ベクター中に挿入し、好適な宿主中で該ペプチドを発現させることにより、産生してもよい。目的のポリペプチドを(融合型又は成熟型としてであれ、また分泌を可能にするシグナル配列を含もうが含むまいが)コードするポリヌクレオチドは、任意の好都合な宿主にふさわしい発現ベクターに導入してもよい。当業者に知られている任意多様な発現ベクターを使用してよいが、グリコシル化などの翻訳後修飾能を備える真核発現系が推奨される。発現は組換えペプチドをコードするDNA分子を収めた発現ベクターを導入してある任意の好適な宿主細胞中で実現されよう。真核宿主細胞の例は技術上周知であり、酵母、鳥、昆虫、植物及び動物の細胞たとえばCOS7、HeLa、CHO及び他哺乳動物細胞などが含まれる。脂肪細胞由来の細胞が、本明細書で定義するアディポネクチンポリペプチドの発現に特に適していることがある。真核宿主細胞は発現タンパ

ク質を独自の様式でグリコシル化するため、発現タンパク質がグリコシル化される様式を見極めることで好適な宿主細胞を特定し、もって目的のアディポネクチンポリペプチド・グリコアイソフォームを発現する宿主細胞を選定することができる。組換え体の産生技法はたとえば前掲Sambrookで開示されている。アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドは、アディポネクチン又はその生物学的に活性な断片又はその変異体又はそのアイソフォーム又はポリペプチドアゴニストをコードする組換えポリヌクレオチドを哺乳動物細胞中で発現させることにより獲得することができる。

【0182】

別の態様において、アディポネクチン(アイソフォーム及びグリコアイソフォームの混合物を含む)は、限定しないが、例えば血清又は脂肪細胞を含む動物組織又は他の供給源から精製することもできる。脂肪細胞からアディポネクチンを精製する方法は、更に米国特許出願第60/349,885号に記載されている。グリコシル化アディポネクチンを獲得する源となりうる動物は、限定しないが、ヒト、マウス、ラット、イヌ、ウシ、及びヒトを除く霊長類である。

【0183】

本明細書でいう「有効量」は、有益な又は所望の臨床的な結果を含む有益な又は所望な結果を達成するのに十分な任意の量を意味する。

【0184】

肝臓の様々な状態たとえばアルコール性肝疾患、アルコール性肝脂肪症、アルコール性肝炎及びアルコール性肝壊死、糖尿病性脂肪症及び糖尿病、高脂肪食±肝脂肪症に続発するインスリン抵抗性などがアディポネクチンタンパク質及びアディポネクチンmRNAの血中及び脂肪中濃度の低下を伴うことを我々は証明した。

【0185】

アディポネクチン欠乏症が存在するときには、理想的には十分な量の活性型アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストが、ヒト又は他の哺乳動物に投与して、循環しているアディポネクチン活性の血液又は組織レベルを正常値に、又は正常値の±5%以内又は正常値の±10%以内又は正常値の±25%以内又は正常値の±50%以内に回復させるのが好ましい。アディポネクチン療法は一見正常な循環濃度のアディポネクチンが存在するときでも有効でありうるが、正常アディポネクチン濃度の存在は、必ずしもアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニスト療法への禁忌ではない。

【0186】

そうした有効量は様々な投与経路により単回投与又は頻回投与で投与することができる。

【0187】

本明細書でいう「哺乳動物」はヒトとマウスの他に、家畜、スポーツ動物、ペット、霊長類に限らない任意の好適な哺乳動物を含む。

【0188】

アルコール性肝疾患の状況及び特徴は、例えば脂肪症(脂肪浸潤)、炎症、壊死、線維症、硬変症及び/又は機能障害のうちいずれか1つ又は複数によって予知されよう。

【0189】

本発明に従うヒトへの使用に適した好ましい投与単位は、ヒトの中で所望のアディポネクチン活性を提供することができ、且つ貯蔵時の安定性喪失や体内での薬効誘発前の無用な又は不所望の不活性化を招くことのないような任意の形態である。

【0190】

下文で開示するように、該アディポネクチン及び/又はアディポネクチンアゴニストはまた、その最も単純な形において、かつ(カプセルであれ何であれ)容器に何ら依存することなく、浸透圧ポンプなどのような外科的に埋め込んだ送達装置によって投与することができるし、また当業者に知られているように、治療用タンパク質の投与に適した代替剤形を使用してもよい。

【0191】

従って、本発明の別の側面において、アディポネクチンをなお自らコードすることができる哺乳動物患者を処置する方法であって、アディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを該患者に十分に投与して、TNF- α レベルをそのような投与なしに存在していたであろう又はおそらく存在していたであろうものよりも低く抑えるようにするステップを含む方法が提供される。

【0192】

例えば、そうした投与はTNF- α 疾患又は障害及び/又はTNF- α 疾患又は障害の何らかの特徴を処置、緩和、予防及び/又は逆転するためであるのが好ましい。

【0193】

該哺乳動物はヒトであり、且つ該アディポネクチンはヒトアディポネクチン又はそのアゴニストであるのが好ましい。

【0194】

該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストは、完全長であるのが好ましい。

【0195】

該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストは、グリコシル化されているのが好ましい。

【0196】

該アディポネクチンはリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたヒトアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストであればなお好ましい。

【0197】

該TNF- α 疾患又は障害は、例えば次のうちいずれか1つ又は複数であるのが好ましい：炎症性疾患、循環器系疾患、門脈圧亢進症、肺高血圧症、アレルギー性疾患、クローン病、自己免疫性溶血性貧血、乾癬、肝疾患、脾疾患、神経変性病、中枢神経障害、毒素血症、更年期障害、妊娠中毒症、脂肪過多症、高脂質血症、高コレステロール血症、耐糖能異常、充実性腫瘍、がん腫と付随の悪液質、内分泌疾患、クロイツフェルト-ヤコブ病、ウイルス感染症、経皮術後冠動脈血管形成術、血管肥大又は閉塞、PTCA/ステント/バイパス手術後血管再閉塞/再狭窄、介入後血管肥大又は閉塞、移植誘発性血管障害及び拒絶反応の抑制、臓器又は組織移植及び自己免疫疾患に続く拒絶反応の発現、腫瘍の処置及び拒絶反応の処置予防に関連するショック関連症状を解消又は緩和するためのTNF生成に関連する副作用、透析性低血圧症、緑内障、高眼圧、重症筋無力症、慢性疲労、骨の病気、神経障害、TNF- α 誘発インスリン抵抗性、異常なアポトーシス、糖尿病又はストレス高血糖症の合併症、慢性閉塞性肺疾患、慢性気管支炎及び気腫。

【0198】

該炎症反応は、例えば次のうちいずれか1つであるのが好ましい：網膜症、ネフロパシー、ニューロパシー、大血管及び微小血管障害、糖尿病性ネフロパシーなどのような糖尿病合併症；慢性リウマチ様関節炎、変形性関節炎、リウマチ様骨髄炎及び骨膜炎などの関節炎；術後/外傷後炎症；腫脹の改善；咽頭炎；膀胱炎；肺炎；心筋炎；心筋症；アトピー性皮膚炎；クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患；髄膜炎；炎症性眼疾患；肺炎、珪肺、肺核症、肺サルコイドーシス、炎症性骨疾患及び肺結核などの炎症性肺疾患。

【0199】

該循環器系疾患は、例えば不整脈、狭心症、心筋梗塞、心不全及びうっ血性心不全などを含む慢性心不全、アテローム性動脈硬化症を含む動脈硬化症、高血圧症、深部静脈血栓症、閉塞性末梢循環不全、虚血性脳循環不全、播種性血管内凝固症候群、レイノー病、バージャー病のうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0200】

該アレルギー性疾患は、例えば喘息、アレルギー性鼻炎、結膜炎、消化管アレルギー、花粉症及び過敏症、慢性閉塞性肺疾患、膠原病のうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0201】

該神経変性病はアルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、AIDS、脳症

のうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0202】

該中枢神経障害は、例えば脳出血や脳梗塞及びその後遺症、頭蓋外傷、脊髄損傷、脳水腫、痴呆症、記憶障害、意識障害、多発性硬化症のうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0203】

該毒素血症は、例えば敗血症、敗血症性ショック、内毒素性ショック、グラム陰性菌敗血症、毒素ショック症候群のうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0204】

該がん性腫瘍は悪性黒色腫、悪性リンパ腫、消化器がんのうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0205】

該内分泌疾患は、例えばアジソン病、クッシング症候群、褐色細胞腫及び原発性アルドステロン症のうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0206】

該自己免疫疾患は、例えば甲状腺炎などの器官特異疾患又はリウマチ様及び変形性関節炎などの非器官特異疾患のうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0207】

該骨疾患は、例えば骨折、再骨折、骨粗鬆症、骨軟化症、骨ペーチェット病、硬化性脊椎炎、慢性リウマチ様関節炎、変形性膝関節炎、それに関連疾患に関連する関節組織破壊のうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0208】

該神経障害は、例えば個別神経、神経根、脊髄及び/又は脳への外傷、急性脊髄及び脳損傷、脱髄疾患たとえば多発性硬化症、転移性がん起因する脊髄圧迫、原発性又は転移性脳腫瘍、転移性腫瘍起因する慢性痛症候群、炎症性CNS疾患たとえば亜急性硬化性全脳炎、ハンチントン病、ギラン-バレー症候群、顔面麻痺、糖尿病性ニューロパシー、視神経炎、黄斑変性症、網膜色素変性症、糖尿病性網膜症、筋ジストロフィー及び多発性筋炎-皮膚筋炎を含むのが好ましい。

【0209】

該異常なアポトーシスは、例えば任意のウイルス性アポトーシス阻害を含むのが好ましい。

【0210】

該糖尿病又はストレス高血糖症合併症は、例えば心筋梗塞、うっ血性心不全及び心臓性ショックのうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0211】

該アディポネクチンはヒトアディポネクチン又はそのアゴニストであるのが好ましい。

【0212】

該アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストは、グリコシル化されているのが好ましい。

【0213】

該アディポネクチンはリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたヒトアディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストであればなお好ましい。当然ながら、ヒト以外の種のアディポネクチン、アディポネクチン変異体又はヒトアディポネクチンとは異なる短縮型アディポネクチン又は他のアディポネクチンポリペプチドアゴニストに関して該アディポネクチンの残基を参照するには、2つの配列の最適アラインメントを作成することによって決定した対応するヒト配列残基の参照番号を使用することができる。

【0214】

該アディポネクチン調製物は、ヒトへの投与に適するように、好ましくは皮下(sc)、皮内(id)、静脈内(iv)、腹腔内(ip)又は経皮などの経路による非経口投与に適した形に、調

製してもよい。該アディポネクチンを経口、頬側、経腸、経膈、膀胱内、くも膜下、心室内、脳内又は当業者に知られている他経路で投与するような他製剤も見込まれる。

【0215】

好ましい投与経路は非経口である。非経口投与に適したアディポネクチンは安定化用の緩衝液を含む水溶液に調製し、好ましくはほぼ等張にし、また哺乳動物特にヒトへの投与に適したタンパク質製剤用として当業者に知られている防腐、消泡、抗沈殿等の安定化剤、特に哺乳動物好ましくはヒトに投与するための治療用タンパク質溶液の安定化に適した安定化剤を添加する。

【0216】

第2の側面において、本発明は、アディポネクチンをなお自らコードすることができる哺乳動物患者を処置する方法であって、アディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを該患者に十分に投与して、TNF- α レベルをそのような投与なしに存在していたであろう又はおそらく存在していたであろうものよりも低く抑えるようにし、もって次のうちいずれか1又は複数の症状に関して有利な反応を誘発するステップを含む方法にある：炎症性疾患、循環器系疾患、門脈圧亢進症、肺高血圧症、アレルギー性疾患、クローン病、自己免疫性溶血性貧血、乾癬、肝疾患、脾疾患、神経変性病、中枢神経障害、毒素血症、更年期障害、妊娠中毒症、脂肪過多症、高脂質血症、高コレステロール血症、耐糖能異常、充実性腫瘍、がん腫と付随の悪液質、内分泌疾患、クロイツフェルト-ヤコブ病、ウイルス感染症、経皮術後冠動脈血管形成術、血管肥大又は閉塞、PTCA/ステント/バイパス手術後血管再閉塞/再狭窄、介入後血管肥大又は閉塞、移植誘発性血管障害及び拒絶反応の抑制、臓器又は組織移植及び自己免疫疾患に続く拒絶反応の発現、腫瘍の処置及び拒絶反応の処置予防に関連するショック関連症状を解消又は緩和するためのTNF生成に関連する副作用、透析性低血圧症、緑内障、高眼圧、重症筋無力症、慢性疲労、骨の病気、神経障害(個別神経、神経根、脊髄及び/又は脳への外傷、傷害、圧迫を含む)、TNF- α 誘発インスリン抵抗性、異常なアポトーシス、糖尿病又はストレス高血糖症の合併症、慢性閉塞性肺疾患、慢性気管支炎及び気腫。

【0217】

該炎症反応は次のうちいずれか1つであるのが好ましい：網膜症、ネフロパシー、ニューロパシー、大血管及び微小血管障害、糖尿病性ネフロパシーなどのような糖尿病合併症；慢性リウマチ様関節炎、変形性関節炎、リウマチ様骨髄炎及び骨膜炎などの関節炎；術後/外傷後炎症；腫脹の改善；咽頭炎；膀胱炎；肺炎；心筋炎；心筋症；アトピー性皮膚炎；クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患；髄膜炎；炎症性眼疾患；肺炎、珪肺、肺核症、肺サルコイドーシス、炎症性骨疾患及び肺結核などの炎症性肺疾患。

【0218】

該循環器系疾患は、例えば不整脈、狭心症、心筋梗塞、心不全及びうっ血性心不全などを含む慢性心不全、アテローム性動脈硬化症を含む動脈硬化症、高血圧症、深部静脈血栓症、閉塞性末梢循環不全、虚血性脳循環不全、播種性血管内凝固症候群、レイノー病、バージャー病のうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0219】

該アレルギー性疾患は、例えば喘息、アレルギー性鼻炎、結膜炎、消化管アレルギー、花粉症及び過敏症、慢性閉塞性肺疾患、膠原病のうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0220】

該神経変性病は、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、ALS、脳症のうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0221】

該中枢神経障害は、例えば脳出血や脳梗塞及びその後遺症、頭蓋外傷、脊髄損傷、脳水腫、痴呆症、記憶障害、意識障害、多発性硬化症のうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0222】

該毒素血症は、例えば敗血症、敗血症性ショック、内毒素性ショック、グラム陰性菌敗

血症、毒素ショック症候群のうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0223】

該がん性腫瘍は、例えば悪性黒色腫、悪性リンパ腫、消化器がんのうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0224】

該内分泌疾患は、例えばアジソン病、クッシング症候群、褐色細胞腫及び原発性アルドステロン症のうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0225】

該自己免疫疾患は、甲状腺炎などの器官特異疾患又はリウマチ様及び変形性関節炎などの非器官特異疾患のうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0226】

該骨疾患は、例えば骨折、再骨折、骨粗鬆症、骨軟化症、骨ペーチェット病、硬化性脊椎炎、慢性リウマチ様関節炎、変形性膝関節炎、それに関連疾患に関連する関節組織破壊のうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0227】

該神経障害は、例えば個別神経、神経根、脊髄及び/又は脳への外傷、急性脊髄及び脳損傷、脱髄疾患たとえば多発性硬化症、転移性がん起因する脊髄圧迫、原発性又は転移性脳腫瘍、転移性腫瘍起因する慢性痛症候群、炎症性CNS疾患たとえば亜急性硬化性全脳炎、ハンチントン病、ギラン-バレー症候群、顔面麻痺、糖尿病性ニューロパシー、視神経炎、黄斑変性症、網膜色素変性症、糖尿病性網膜症、筋ジストロフィー及び多発性筋炎-皮膚筋炎を含むのが好ましい。

【0228】

該異常なアポトーシスは、例えば任意のウイルス性アポトーシス阻害を含むのが好ましい。

【0229】

該糖尿病又はストレス高血糖症合併症は、例えば心筋梗塞、うっ血性心不全及び心臓性ショックのうちいずれか1つを含むのが好ましい。

【0230】

該哺乳動物はヒトであり、そして該アディポネクチンはヒトアディポネクチン又はそのアゴニストであるのが好ましい。

【0231】

該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストは完全長であるのが好ましい。

【0232】

該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストは、1又は複数の部位でグリコシル化されているのが好ましい。

【0233】

該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストは、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたヒトアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストであればなお好ましい。当然ながら、ヒト以外の種のアディポネクチン、アディポネクチン変異体、アディポネクチン誘導体又はヒトアディポネクチンとは異なる短縮型アディポネクチン又はポリペプチドアディポネクチンアゴニストに関して該アディポネクチンの残基を参照するには、2つの配列の最適アラインメントを作成することによって決定した対応するヒト配列残基の参照番号を使用することができる。

【0234】

該アディポネクチン調製物は、例えば、ヒトへの投与に適するように、好ましくは皮下(sc)、皮内(id)、静脈内(iv)、腹腔内(ip)又は経皮などの経路による非経口投与に適した形に、調製してもよい。該アディポネクチンを経口、頬側、経腸、経膈、膀胱内、くも膜下、心室内、脳内又は当業者に知られている他経路で投与するような他製剤も見込まれる。

【0235】

好ましい投与経路は非経口である。非経口投与に適したアディポネクチンは安定化用の緩衝液を含む水溶液に調製し、好ましくはほぼ等張にし、また哺乳動物特にヒトへの投与に適したタンパク質製剤用として当業者に知られている防腐、消泡、抗沈殿等の安定化剤、特に哺乳動物好ましくはヒトに投与するための治療用タンパク質溶液の安定化に適した安定化剤を添加する。

【0236】

本発明の別の側面において、アディポネクチンをなお自らコードすることができる哺乳動物患者を処置する方法であって、アディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを該患者に十分に投与して、TNF- α mRNAレベルをそのような投与なしに存在していたであろう又はおそらく存在していたであろうものよりも低く抑えるようにするステップを含む方法が提供される。

【0237】

そうした投与はTNF- α 疾患又は障害及び/又はTNF- α 疾患又は障害の何らかの特徴を処置、緩和、予防及び/又は逆転するためであるのが好ましい。

【0238】

該哺乳動物はヒトであり、且つ該アディポネクチンはヒトアディポネクチン又はそのアゴニストであるのが好ましい。

【0239】

該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストは、完全長であるのが好ましい。

【0240】

該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストは1又は複数の部位でグリコシル化されているのが好ましい。

【0241】

該アディポネクチンは、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたヒトアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストであればなお好ましい。

【0242】

本発明の別の側面において、アディポネクチンをなお自らコードすることができる哺乳動物患者を処置する方法であって、アディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを該患者に十分に投与して、TNF- α 疾患又は傷害及び/又はTNF- α 疾患又は傷害の任意の特徴を処置、緩和、予防し及び/又は逆転するようにすることを含む方法が提供される。

【0243】

本発明の別の側面において、哺乳動物患者に対するTNF- α の悪影響を緩和する方法であって、そうした処置を必要とする患者に処置有効量のアディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを投与することを含む方法が提供される。

【0244】

該哺乳動物はヒトであり、且つ該アディポネクチンはヒトアディポネクチン又はそのアゴニストであるのが好ましい。

【0245】

該アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストは、完全長であるのが好ましい。

【0246】

該アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストは、1又は複数の部位でグリコシル化されているのが好ましい。

【0247】

該アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストは、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたヒトアディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストであればなお好ましい。

【0248】

本発明のさらなる側面において、不所望に高レベルのTNF- に関連する疾患又は障害に罹っている、又はその危険性のある哺乳動物患者を処置する方法であって、該患者に有効量のアディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを投与することを含んで成る方法が提供される。

【0249】

該哺乳動物はヒトであり、且つ該アディポネクチンはヒトアディポネクチン又はそのアゴニストであるのが好ましい。

【0250】

該アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストは、完全長であるのが好ましい。

【0251】

該アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストは、1又は複数の部位でグリコシル化されているのが好ましい。

【0252】

該アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストは、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたヒトアディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストであればなお好ましい。

【0253】

本発明のさらなる側面において、哺乳動物患者のTNF- 関連疾患又は障害を処置するためのTNF- の作用を阻害し及び/又はアンタゴナイズする方法であって、該患者に有効量のアディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを投与するステップを含む方法が提供される。

【0254】

該哺乳動物はヒトであり、且つ該アディポネクチンはヒトアディポネクチン又はそのアゴニストであるのが好ましい。

【0255】

該アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストは、完全長であるのが好ましい。

【0256】

該アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストは、1又は複数の部位でグリコシル化されているのが好ましい。

【0257】

該アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストは、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたヒトアディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストであればなお好ましい。

【0258】

別の側面において、本発明は哺乳動物患者の処置方法であって、該哺乳動物患者のアディポネクチンを(直接又は間接に)モニタリングし、そして/あるいはアディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを該哺乳動物患者に投与することを、TNF- レベルをそのような投与なしに存在していたであろう又はおそらく存在していたであろうものよりも低く抑えるようにするために、任意の順序で含む又は含んで成る方法にある。

【0259】

そうした投与はTNF- 疾患又は障害及び/又はTNF- 疾患又は障害の何らかの特徴を処置、緩和、予防及び/又は逆転するためであるのが好ましい。

【0260】

該哺乳動物はヒトであり、且つ該アディポネクチンはヒトアディポネクチン又はそのアゴニストであるのが好ましい。

【0261】

該アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストは、完全長であるのが好ましい。

【0262】

該アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストは、1又は複数の部位でグリコシル化されているのが好ましい。

【0263】

該アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストは、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたヒトアディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストであればなお好ましい。

【0264】

別の側面において、本発明は哺乳動物患者の処置方法であって、該哺乳動物患者のアディポネクチンmRNAを(直接又は間接に)モニタリングし、そして/あるいはアディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを該哺乳動物患者に投与することを、TNF- α レベル又は活性を、投与せずに存在していた、又はおそらく存在していたものよりも低く抑えるために、任意の順序で含む又は含んで成る方法にある。

【0265】

そうした投与はTNF- α 疾患又は障害及び/又はTNF- α 疾患又は障害の何らかの特徴を処置、緩和、予防及び/又は逆転するためであるのが好ましい。

【0266】

該哺乳動物はヒトであり、且つ該アディポネクチンはヒトアディポネクチン又はそのアゴニストであるのが好ましい。

【0267】

該アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストは、完全長であるのが好ましい。

【0268】

該アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストは、1又は複数の部位でグリコシル化されているのが好ましい。

【0269】

該アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストは、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたヒトアディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストであればなお好ましい。

【0270】

別の側面において、本発明は哺乳動物患者の処置方法であって、該哺乳動物患者のアディポネクチンを(直接又は間接に)モニタリングし、そして/あるいはアディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを該哺乳動物患者に投与することを、TNF- α 疾患若しくは障害及び/又はTNF- α 疾患若しくは障害の特徴を有するものの処置、緩和、予防及び/又は逆転するために、任意の順序で含む又は含んで成る方法を含む。

【0271】

該哺乳動物はヒトであり、且つ該アディポネクチンはヒトアディポネクチン又はそのアゴニストであるのが好ましい。

【0272】

該アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストは完全長であるのが好ましい。

【0273】

該アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストは、1又は複数の部位でグリコシル化されているのが好ましい。

【0274】

該アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストは、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたヒトアディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストであればなお好ましい。

【0275】

別の側面において、本発明は哺乳動物患者の処置方法であって、該哺乳動物患者のアディポネクチンmRNAを(直接又は間接に)モニタリングし、そして/あるいはアディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを該哺乳動物患者に投与することを、TNF- 疾患若しくは障害及び/又はTNF- 疾患若しくは障害の特徴を処置、緩和、予防及び/又は逆転するために、任意の順序で含む又は含んで成る方法にある。

【0276】

該哺乳動物はヒトであり、且つ該アディポネクチンはヒトアディポネクチン又はそのアゴニストであるのが好ましい。

【0277】

該アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストは完全長であるのが好ましい。

【0278】

該アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストは、1又は複数の部位でグリコシル化されているのが好ましい。

【0279】

該アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストは、リシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたヒトアディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストであればなお好ましい。

【0280】

別のさらなる側面において、本発明は、投与しない場合に存在する又はおそらく存在するもの以下にTNF- レベル又は活性を抑えるための使用に有効な投与単位又は医薬組成物の製造における、(好ましくは有効量の)アディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストの、(賦形剤、補助剤、希釈剤等であれ、投与単位を規定する容器であれ)他の1又は複数の材料と一緒に、使用にある。

【0281】

そうした投与単位又は医薬組成物は、TNF- 疾患又は障害及び/又はTNF- 疾患又は障害の何らかの特徴を処置、緩和、予防及び/又は逆転するためであるのが好ましい。

【0282】

該哺乳動物はヒトであり、且つ該アディポネクチンはヒトアディポネクチン又はそのアゴニストであるのが好ましい。

【0283】

該アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストは、完全長であるのが好ましい。

【0284】

該アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストはグリコシル化されているのが好ましい。

【0285】

該アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストは、リシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたヒトアディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストであればなお好ましい。

【0286】

別のさらなる側面において、本発明はTNF- 疾患又は障害及び/又はTNF- 疾患又は障害の何らかの特徴の処置、緩和、予防及び/又は逆転への使用に有効な投与単位又は医薬組成物の製造への、(好ましくは有効量の)アディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストの、(賦形剤、補助剤、希釈剤等であれ、投与単位を規定する容器であれ)他の1又は複数の材料と一緒に、使用を含む。

【0287】

該哺乳動物はヒトであり、且つ該アディポネクチンはヒトアディポネクチン又はそのアゴニストであるのが好ましい。

【0288】

該アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストは、完全長であるのが好ましい。

【0289】

該アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストはグリコシル化されているのが好ましい。

【0290】

該アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストは、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたヒトアディポネクチンであればなお好ましい。

【0291】

別のさらなる側面において、本発明は、アディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを含む容器；投与しないで存在する又はおそらく存在するものよりもTNF- α レベルを低く抑えるための使用に有効であるアディポネクチン又はアディポネクチン作用部位のアゴニスト(たとえば該容器に含められる)の使用に関する説明書、を含んで成る又は含む製造品にある。

【0292】

別のさらなる側面において、本発明はアディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを含む容器；TNF- α 疾患若しくは障害及び/又はTNF- α 疾患若しくは障害の何らかの特徴の処置、緩和、予防及び/又は逆転への使用に有効であるアディポネクチン又はアディポネクチン作用部位のアゴニストの(たとえば該容器に入れた状態での)使用に関する説明書を含んで成る又は含む製造品にある。

【0293】

別のさらなる側面において、本発明はアディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを入れた包装資材；投与しないで存在する又はおそらく存在するものよりTNF- α レベルを低く抑えるための使用に有効であるアディポネクチン又はアディポネクチン作用部位のアゴニストの(たとえば該包装資材に入れた状態での)使用に関する説明書を含んで成る又は含む製造品にある。

【0294】

別のさらなる側面において、本発明はアディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを入れた包装資材；TNF- α 疾患又は障害及び/又はTNF- α 疾患又は障害の何らかの特徴の処置、緩和、予防及び/又は逆転への使用に有効であるアディポネクチン又はアディポネクチン作用部位のアゴニストの(たとえば該包装資材に入れた状態での)使用に関する説明書を含んで成る又は含む製造品にある。

【0295】

別の側面において、本発明は肝疾患の素因がある若しくは肝疾患の及び/又は肝疾患の何らかの特徴を示す哺乳動物患者を処置する方法であって、アディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを該患者に投与するステップを含む方法にある。

【0296】

該肝疾患は、急性肝疾患、慢性肝疾患、肝臓の炎症、肝臓の機能障害、脂肪肝(肝脂肪症)、肝線維症、肝硬変症、肝臓の壊死、肝細胞壊死、アルコール性肝疾患、アルコール性肝脂肪症、アルコール性肝炎、アルコール性肝壊死、アルコール性肝硬変症、肝壊死、肝脂肪症、糖尿病に合併する肝脂肪症、高脂肪食に関連する肝脂肪症、脂質代謝異常に関連する肝脂肪症、任意の状態に起因する肝炎、任意の状態に起因する肝壊死、急性肝炎、慢性肝炎、慢性活動性肝炎、ウイルス感染症または肝臓の炎症に続発する肝炎、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、D型肝炎、E型肝炎、G型肝炎、任意の薬物又は毒素の作用に関連す

る肝炎、胆汁うっ滞に関連する肝炎又は肝機能障害、原発性胆汁性肝硬変症、肝肉芽腫症、及び/又は高組織又は血中濃度の腫瘍壊死因子が病因となっているような状態のうち任意の1つ又は複数でもよい。

【0297】

該哺乳動物はヒトであり、且つ該アディポネクチンはヒトアディポネクチン又はそのアゴニストであるのが好ましい。

【0298】

該アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストは完全長であるのが好ましい。

【0299】

該アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストはグリコシル化されているのが好ましい。

【0300】

該アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストは、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたアディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストであればなお好ましい。

【0301】

アディポネクチンは、ヒトの処置との関連では、アディポネクチン又はそのアゴニストを含む。アゴニストは、分子生物学(遺伝子組換え技術を含む)、微生物学、細胞生物学、生化学、核酸化学及び免疫学技術によって導かれるようなアディポネクチン、及び/又はヒトアディポネクチンに関連するそのアゴニストを含むのが好ましい。アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストは、遺伝子組換え技術によって、該タンパク質をコードするポリヌクレオチド(通常はDNA)配列を発現ベクター中に挿入し、好適な宿主中で該ペプチドを発現させることにより、産生してもよい。目的のポリペプチドを(融合型又は成熟型としてであれ、また分泌を可能にするシグナル配列を含もうが含むまいが)コードするポリヌクレオチドは、任意の好都合な宿主に好適な発現ベクターに導入してもよい。当業者に知られている任意多様な発現ベクターを使用してよいが、グリコシル化などの翻訳後修飾能を備える真核発現系が推奨される。発現は組換えペプチドをコードするDNA分子を収めた発現ベクターを導入してある任意の好適な宿主細胞中で実現されよう。真核宿主細胞の例は技術上周知であり、酵母、鳥、昆虫、植物及び動物の細胞たとえばCOS7、HeLa、CHO及び他哺乳動物細胞などが含まれる。組換え体の産生技法はたとえば前掲Sambrookで開示されている。該アディポネクチン又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストは、例えば、アディポネクチン又はその生物活性断片又はその変異体又はそのアイソフォーム又は他の又はアディポネクチンポリペプチドアゴニストをコードする組換えポリヌクレオチドを哺乳動物細胞中で発現させることにより獲得することができる。

【0302】

別の態様において、アディポネクチン(アイソフォーム及びグリコアイソフォームの混合物を含む)は、血清又は脂肪細胞などを非限定的に含む動物組織から精製することもできる。脂肪細胞由来のアディポネクチンを精製する方法は、米国特許出願第60/349,885号明細書でもさらに開示している。グリコシル化アディポネクチン組成物を獲得する源となりうる動物はヒト、マウス、ラット、イヌ、ウシ、及びヒトを除く霊長類である。

【0303】

本明細書でいう「有効量」は、所望の又は有益な臨床結果を含めた有益な又は所望の結果をもたらすに足る任意の量を意味する。

【0304】

肝臓の様々な状態たとえばアルコール性肝疾患、アルコール性肝脂肪症、アルコール性肝炎及びアルコール性肝壊死、糖尿病性脂肪症及び糖尿病、高脂肪食±肝脂肪症に続発するインスリン抵抗性などは、アディポネクチンタンパク質及びアディポネクチンmRNAの血液及び脂肪中濃度の低下を伴うことが証明された。

【0305】

従って、アディポネクチン欠乏症又はアディポネクチン活性欠乏症が存在するときには、理想的には十分な量の1又は複数の活性型アディポネクチン又はそのアゴニストを処置対象の哺乳動物又はヒトに投与して、循環しているアディポネクチンの血液、組織及び/又は活性レベルを正常値に、又は正常値の $\pm 5\%$ 以内又は正常値の $\pm 10\%$ 以内又は正常値の $\pm 25\%$ 以内又は正常値の $\pm 50\%$ 以内に、あるいは任意な他の所望なレベルに回復させるのが好ましい。しかし、アディポネクチン療法は一見正常な循環アディポネクチン濃度が存在するときでも有効でありうる。従って正常アディポネクチン又はアディポネクチン活性レベルの存在はアディポネクチン療法への禁忌ではない。

【0306】

そうした有効量は様々な投与経路により単回投与又は頻回投与で投与することができる。

【0307】

本明細書でいう「哺乳動物」はヒトとマウスの他に、家畜、スポーツ動物、ペット、霊長類に限らない任意の好適な哺乳動物を含む。

【0308】

アルコール性肝疾患に特有の状況は脂肪症(脂肪浸潤)、炎症、壊死、線維症、硬変症及び/又は機能障害のうちいずれか1つ又は複数によって予知されよう。

【0309】

本発明に従うヒトへの使用に適した好ましい投与単位は、所望量のアディポネクチン又はアディポネクチン活性を提供することができてしかも貯蔵時の安定性喪失や体内での薬効誘発前の無用の不活性化を招くことのないような任意の形である。

【0310】

説明した通り、該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストは、浸透圧ポンプなどのような外科的に埋め込んだ送達装置によって投与することができる。当業者に周知なように、治療用タンパク質の投与に適した代替剤形を使用してもよい。

【0311】

本発明は、グリコシル化アディポネクチン及びそのグリコシル化ポリペプチドアゴニスト、並びにグリコシル化アディポネクチン及びそのグリコシル化ポリペプチドアゴニストの組成物を提供する。そうしたアディポネクチン及びアゴニストは、(たとえば本明細書で開示する任意の効果のための)治療目的又は医薬目的にとって有用である。一側面において、本発明はグリコシル化され、且つ組換え体であるか、単離され、精製され又は合成されたアディポネクチンポリペプチド又はポリペプチドアゴニストを提供する。該アディポネクチンポリペプチド又はアゴニストは、ヒトアディポネクチン又はそのアゴニストであるのが好ましい。例えば、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101(残基番号はヒトアディポネクチンに従った)に対応する1以上の残基はグリコシル化されているのが好ましい。一態様において、該アディポネクチン又はアゴニストは完全にグリコシル化されている。別の側面において、例えばリシン残基に結合しうる糖部分は、グルコシルガラクトシル部分又はガラクトシルグルコシル部分である。別の側面において、該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドは、例えばリシン残基68、71、80及び104(マウス)又はリシン残基65、68、77及び101(ヒト)の各々に1以上のグルコシルガラクトシル部分又はガラクトシルグルコシル部分を有する。別の態様において、該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドは、例えばLys-68、71、80及び104(マウス)又はLys-65、68、77及び101(ヒト)に対応する1以上の残基に、又はLys-68、71、80及び104(マウス)又はLys-65、68、77及び101(ヒト)のすべてに、X1構造を有する。ただしX1はグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルガラクトシル部分及びガラクトシルグルコシル部分のうち1つまたは複数より独立に選択される。一態様において、アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド中のすべてのリシンが完全にグリコシル化されている。

【0312】

別の側面において、本発明はグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネ

クチンアゴニストポリペプチドを含む組成物を提供する。一態様において、該組成物のアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドは、組換え体であるか、単離され、精製され又は合成されている。別の態様において、該組成物のアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドはヒトアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストである。例えば、アディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101(残基番号はヒトアディポネクチンに従った)に対応する1以上のリシン残基はグリコシル化されているのが好ましい。別の側面において、該組成物は、例えばヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101(又は他生物種又はアディポネクチン変異体の対応する残基)に対応する1以上の残基がグリコシル化され、且つ組換え体であるか、単離され、精製され又は合成されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドを含む。更に別の側面において、該組成物はすべてのリシン残基(Lys-65、68、77及び101)がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドを含む。別の側面において、該組成物は、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応するリジン残基の各々に1以上の糖部分を有するアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドを含む。別の態様において、該組成物は単一の糖部分でグリコシル化されたアディポネクチンを含む。単一の糖部分はたとえばシアル酸、グルコシル、ガラクトシル、N-アセチルガラクトシル、N-アセチルグルコシル、シアリル Lewis X及びフコシルとすることができる。別の側面において、該組成物は複数の糖部分でグリコシル化されたアディポネクチンを含む。別の態様において、該組成物はリシン残基65、68、77及び101の各々に1以上のグルコシルガラクトシル部分又はガラクトシルグルコシル部分を有するアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドを含む。別の態様において、該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドはLys-68、71、80及び104(マウス)又はLys-65、68、77及び101(ヒト)に対応する1以上の残基に、又はLys-68、71、80及び104(マウス)又はLys-65、68、77及び101(ヒト)に対応する残基のすべてに、X1構造を有する。ただしX1はグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルガラクトシル部分及びガラクトシルグルコシル部分のうち1つまたは複数より独立に選択される。別の観点において、例えば、該組成物は、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基のすべてにX1構造を有するアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドを含む。別の態様において、該組成物は天然の哺乳動物アディポネクチンの配列を有するアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドを含む。

【0313】

別の側面において、本発明は、1以上の非グリコシル化アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストアイソフォームを実質的に含まないアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドを含む組成物を提供する。一態様において、該組成物はアディポネクチンアイソフォーム1を実質的に含まない。別の態様において、該組成物はアディポネクチンアイソフォーム2を実質的に含まない。別の態様において、該組成物はいかなる非グリコシル化アディポネクチンアイソフォームも実質的に含まない。

【0314】

別の側面において、本発明は支配的なアディポネクチン分子種が完全にグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドを含む組成物を提供する。一態様において、例えば、該組成物は、いずれもグリコシル化されているマウスアディポネクチンの残基Lys-68、71、80及び104に対応する残基を有するアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストを含む。別の態様において、例えば、該組成物は複数のアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドのアイソフォームを含む。別の態様において、例えば、アディポネクチンアイソフォーム3が、該組成物中で支配的な分子である。別の態様において、アディポネクチンアイソフォーム4が該組成物中で支配的な分子である。別の態様において、例えばアディポネクチンアイソフォーム5が該組成物中で支配的な分子である。別の態様において、例えばアディポネクチンアイソフォーム6が該組成物中で支配的な分子である。

【0315】

別の側面において、例えば、本発明は哺乳動物に投与するとインスリンの効果を増強するような組成物を提供する。一態様において、例えば、インスリン及び／又はインスリン類似体は該組成物中に含まれ、そして該インスリン及び／又はインスリン類似体は、約50pM～約400pMの血中インスリン及び／又はインスリン類似体濃度を誘発するに足る量又は濃度で存在する。別の態様において、該インスリン又はインスリン類似体は、約100pM～約300pMの血中インスリン又はインスリン類似体濃度を誘発するに足る量又は濃度で存在する。別の態様において、インスリン及び／又はインスリン類似体は、少なくとも約200pMの血中インスリン及び／又はインスリン類似体濃度を誘発するに足る量又は濃度で存在する。

【0316】

別の側面において、本発明はグリコシル化アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストの組成物であって、個体に投与したときに糖新生を阻害する働きをもつ組成物を提供する。

【0317】

別の側面において、本発明はグリコシル化アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストを含んで成る組成物を調製する方法であって、グリコシル化の程度又はタイプが異なる少なくとも2つの形態のアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストを含む第1組成物を獲得し、それらをグリコシル化の程度又はタイプに応じて分離し、もってアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストプロファイルが第1組成物とは異なる第2組成物を生成させることによる方法を提供する。一態様において、該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストは、アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストをコードする組換えポリヌクレオチドを哺乳動物細胞中で発現させて獲得する。別の態様において、例えば該組換えポリヌクレオチドは図5に記載の配列を有するポリペプチド又はその生物活性断片又はその変異体をコードする。別の態様において、該アディポネクチンは動物組織から精製する。別の態様において、該動物はヒト、マウス、ラット、イヌ、ウシ、又はヒト以外の霊長類である。別の態様において、該組織は血清又は脂肪細胞である。別の態様において、分離は電気泳動法を伴う。別の態様において、分離は電気泳動法を伴わない。別の態様において、分離はクロマトグラフィー法を伴う。別の態様において、分離はクロマトグラフィー法を伴わない。別の態様において、第2組成物は以上掲げた特許請求組成物のうちいずれかである。

【0318】

別の側面において、本発明は以上の方法のうちいずれかで調製される組成物を提供する。

【0319】

別の側面において、本発明は個体を対象にアディポネクチン調節に関連する病状の存在又は素因を診断する方法であって、特定アディポネクチンアイソフォームのレベル又は2以上のグリコシル化アディポネクチンアイソフォームの発現プロファイルをモニタリングするステップを含む方法を提供する。一態様において、該病状は、例えば高血糖症、インスリン抵抗性、インスリン抵抗性に関連する代謝症候群、II型糖尿病、本態性高血圧症を含む代謝症候群、動脈硬化症、冠状動脈性心臓病、虚血性心疾患、多嚢胞性卵巣症候群又はアディポネクチン欠乏症又は肥満症に関連する他の病状である。別の態様において、該アディポネクチンは生物試料から獲得する。別の態様において、1以上のアイソフォームは完全にグリコシル化されている。別の態様において、該レベル又は発現パターンはグリコシル化アディポネクチンアイソフォームのレベル又は発現パターンから決定する。別の態様において、該評価方法は電気泳動法、HPLC法又は質量分析法である。

【0320】

別の側面において、本発明は個体を対象に病状の存在又は病状を発現しやすい素因を診断する方法であって、該個体のある特定アディポネクチンアイソフォームのレベル又は2以上のグリコシル化アディポネクチンアイソフォームの発現プロファイルを決定するステ

ップ及び該発現プロファイルを、例えば該病状に罹っていない個体に特有の発現プロファイルと比較し、発現プロファイルの差異から該病状の存在又は該病状を発現しやすい素因を読み取るステップを含む方法である。

【0321】

別の側面において、本発明は個体を対象に病状の存在又は病状を発現しやすい素因を診断する方法であって、該個体のある特定アディポネクチンアイソフォームのレベル又は2以上のグリコシル化アディポネクチンアイソフォームの発現プロファイルを決定するステップ及び該発現プロファイルを、該病状に罹っている個体に特有の発現プロファイルと比較し、発現プロファイルの類似性から該病状の存在又は該病状を発現しやすい素因を読み取るステップを含む方法である。

【0322】

別の側面において、本発明は個体のアディポネクチン又はアディポネクチン調節に関連する病状を処置する方法であって、有効量の、本明細書及び特許請求の範囲に記載のアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストのいずれかを該個体に投与するステップを含む方法を提供する。一態様において、該病状は、例えば高血糖症、インスリン抵抗性、インスリン抵抗性に関連する代謝症候群、II型糖尿病、高血圧症を含む代謝症候群、動脈硬化症、冠状動脈性心臓病、虚血性心疾患、多嚢胞性卵巣症候群又はアディポネクチン欠乏症又は肥満症に関連する他の病状である。

【0323】

別の側面において、本発明は哺乳動物患者の、例えばi)アディポネクチン調節に関連する病状の処置;又はii)インスリンの効果の増強;又はiii)糖新生の阻害に有効である剤形又は医薬組成物又は医薬の調製へのグリコシル化アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの使用を提供する。該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドは、組換え体であるか、単離され、精製され又は合成されているのが好ましい。該アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストは、ヒトアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストであるのが好ましい。該投与単位又は医薬組成物又は薬物はインスリン又はインスリン類似体を追加的に含むのが好ましい。該インスリン又はインスリン類似体は、約50pM～約400pMの血中インスリン又はインスリン類似体濃度を誘発するに足る濃度であるのが好ましい。該インスリン又はインスリン類似体は、約100pM～約300pMの血中インスリン又はインスリン類似体濃度を誘発するに足る濃度であるのが好ましい。該インスリン又はインスリン類似体は、約200pMの血中インスリン又はインスリン類似体濃度を誘発するに足る濃度であるのが好ましい。

【0324】

本発明の詳細な説明

I. 一般技法

本発明の実施には当業者に知られている通常の、分子生物学、微生物学、細胞生物学、生化学、核酸化学及び免疫学的な(遺伝子組換え技法を含めた)技法が使用されよう。そうした技法はたとえば次の文献で余すところなく説明されている: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al., 1989)及びMolecular Cloning: A Laboratory Manual, third edition (Sambrook and Russel, 2001)(本明細書では一括してSambrookと呼ぶ); Current Protocols in Molecular Biology (F.M Ausubel et al., eds., 1987. 2001年までの補遺を含む); PCR: The Polymerase Chain Reaction (Mullis et al., eds., 1994); Harlow and Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York及びHarlow and Lane (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (本明細書では一括してHarlow and Laneと呼ぶ); Beaucage et al., eds., Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2000).

【0325】

II. 用語の意味

「抗体」(Ab)及び「免疫グロブリン」(Ig)は同じ構造的特徴をもつ糖タンパク質である

。抗体は特定の抗原に対して結合特異性を示すが、免疫グロブリンは抗体だけでなく抗原特異性を欠く他の抗体様分子をも含む。後者の種類のポリペプチドはたとえばリンパ系で低レベルに、また骨髄腫で高レベルに、産生される。用語「抗体」は最広義で使用され、特にインタクトなモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、2以上のインタクト抗体から形成される多重特異性抗体(たとえば二重特異性抗体)、一本鎖抗体、ダイアボディ(dia body)、トリアボディ(triabody)、テトラボディ(tetrabody)、及び所望の生物活性を示す限りでの抗体断片などを非限定的に含む。

【0326】

「抗体断片」はインタクト抗体の一部、好ましくはインタクト抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例はFab、Fab'、F(ab')₂及びFv断片；ダイアボディ；直線状抗体(Zapata et al., ProteinEng., 8 10: 1057-1062 [1995])；単鎖抗体分子；及び抗体断片から形成された多重特異性抗体などである。

【0327】

本明細書で使用する用語「モノクローナル抗体」は実質的に同種の抗体の集団(少量存在する可能性がある天然突然変異を別にすればまったく同じ個体からなる集団)から得られる抗体をいう。モノクローナル抗体は特異性が高く、単一の抗原決定基を認識する。さらに種々の決定基(エピトープ)を認識する種々の抗体を含むのが普通である通常の(ポリクローナル)抗体調製品とは異なり、各モノクローナル抗体は抗原上の単一決定基を認識する。モノクローナル抗体はその特異性に加えて、ハイブリドーマ培養によって、他免疫グロブリンの汚染を受けずに合成されるという利点もある。「モノクローナル」という修飾語は、実質的に同種の抗体集団から得られるという該抗体の特性を表わし、該抗体の生産に特定の方法が必要になるという意味ではない。たとえば本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature, 256:495 [1975]が最初に開示したハイブリドーマ法で生産してもよいし、組換えDNA法(たとえば米国特許第4,816,567号明細書を参照)で生産してもよい。「モノクローナル抗体」はまた、例えばClackson et al., Nature, 352:624-628 [1991]及びMarks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)で開示の技法を使用してファージ抗体ライブラリーから単離してもよい。

【0328】

本明細書ではモノクローナル抗体は特に、H鎖及び/又はL鎖の一部が特定生物種に由来する又は特定抗体クラス又はサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一又は相同である一方で、該H鎖及び/又はL鎖の残りの部分は別の生物種に由来する又は別の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一又は相同であるような「キメラ」抗体(免疫グロブリン)を、また所望の生物活性を示す限りでそうした抗体の断片を、含む。それらはまた、「ヒト化」抗体を含む。

【0329】

本明細書で開示するようなアディポネクチンの各グリコアイソフォームに対するモノクローナル特異抗体は本明細書で開示するようなアディポネクチン疾患又は障害の診断又は処置に使用することができるものと見込まれる。

【0330】

「ポリクローナル抗体」

ポリクローナル抗体の作製方法は技術上周知である。ポリクローナル抗体は哺乳動物に、たとえば免疫剤及び必要ならアジュバントの1回又は複数回注射により産生させることができる。

【0331】

一般に、該免疫剤及び/又はアジュバントは複数回、皮下又は腹腔内注射する。該免疫剤は本発明のアディポネクチンポリペプチド又はその融合タンパク質を含む。

【0332】

該免疫剤は場合によって、免疫処理しようとする哺乳動物で免疫原性を有すると判明しているタンパク質へと結合させるのが有効である。そうした免疫原性タンパク質の非限定的な例は、キーホールリンベットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシ・サイログロブリ

ン及びダイズ・トリブシン阻害因子などである。使用可能なアジュバントの例はフロイド完全アジュバント及びMPL-TDMアジュバント(モノホスホリルリピドA、合成トレハロースジコリノミコラート)などである。当業者は免疫法プロトコールを過度の実験にまつことなく選択することができよう。

【0333】

「モノクローナル抗体」

アディポネクチンポリペプチド抗体はまた、モノクローナル抗体でもよい。モノクローナル抗体はKohler and Milstein, Nature, 256:495 [1975]が開示しているようなハイブリドーマ法で生産してもよい。ハイブリドーマ法では一般に、マウス、ハムスター又は他の好適な宿主動物を免疫剤で免疫処理し、該免疫剤に特異的に結合する抗体を産生する又はそうした抗体の産生能を有するリンパ球を活性化させる。

【0334】

あるいはリンパ球をin vitroで免疫にしてもよい。

【0335】

免疫剤の例は一般にアディポネクチンポリペプチド及びその断片、そうしたタンパク質の融合タンパク質又はその断片などである。一般に、ヒト由来細胞が望ましいなら末梢血リンパ球(PBL)を使用し、またヒト以外の哺乳動物に由来する細胞が望ましいなら脾臓細胞又はリンパ節細胞を使用する。次いで好適な融合剤たとえばポリエチレングリコールを使用してリンパ球を不死化細胞系と融合してハイブリドーマ細胞を形成する[Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press (1996) pp. 59-103]。不死化細胞系は通常、哺乳動物の形質転換細胞特にげっ歯類、ウシ又はヒト由来の骨髓腫細胞である。通常、ラット又はマウスの骨髓腫細胞系を使用する。ハイブリドーマ細胞は、非融合不死化細胞の増殖又は生存を阻害するような1又は複数の物質を含むのが好ましい好適な細胞培地で培養することができる。

【0336】

好ましい不死化細胞系は、効率的に融合し、特定の抗体産生細胞による安定した高レベルの抗体発現を支え、またHAT培地などの培地に対し感受性を有するような細胞系である。より好ましい不死化細胞系はマウス骨髓腫細胞系であり、それはたとえばSalk Institute Cell Distribution Center (San Diego, California)及びAmerican Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, Virginia)から入手することができる。ヒト骨髓腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髓腫細胞系もまたヒトモノクローナル抗体産生用として開示されている[Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York (1987) pp. 5163]。

【0337】

次いでハイブリドーマ細胞の培地をアッセイしモノクローナル抗体の有無を調べる。ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は免疫沈降法又はin vitro結合アッセイ法たとえば放射線イムノアッセイ(RIA)又は酵素免疫測定法(ELISA)などで決定する。そうした技法やアッセイ法は技術上周知である。モノクローナル抗体の結合アフィニティーはたとえばMunson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)のスキッチャード法で決定することができる。

【0338】

目的のハイブリドーマ細胞が確認されたら、そのクローンを限界希釈培養法でサブクローニングし、標準方法で増殖させることができる。この目的のための好適な培地にはダルベッコの改良イーグル培地やRPMI-1640培地などがある。あるいはハイブリドーマ細胞を哺乳動物中で腹水としてin vivo増殖させてもよい。

【0339】

サブクローンが分泌するモノクローナル抗体は通常の免疫グロブリン精製法たとえばプロテインAセファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又はアフィニティークロマトグラフィーなどにより培地又は腹水から単離又は精製す

ることができる。

【0340】

モノクローナル抗体はまた組換えDNA法で作製してもよい。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは通常の方法を使用して(たとえばマウス抗体のH鎖及びL鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用して)容易に単離し配列を決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞はそうしたDNAの好ましい供給源として役立つ。該DNAはひとたび単離したら発現ベクターに挿入し、次いでベクターごと宿主細胞に導入して、その組換え宿主細胞にモノクローナル抗体を合成させる。該DNAは修飾体でもよい。

【0341】

該抗体は一価抗体でもよい。一価抗体の作製方法は技術上周知である。

【0342】

一価抗体の作製にはin vitro法も適する。抗体の消化によるその断片特にFab断片の作製は当業者に知られている通常の技法を用いて行うことができる。

【0343】

「ヒト及びヒト化抗体」

非ヒト(たとえばマウス)抗体のヒト化型は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含むキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖又はその断片[抗体のFv、Fab、Fab'、F(ab')₂又は他の抗原結合部分配列など]である。ヒト化抗体は、受容者の相補性決定領域(CDR)に由来する残基が所望の特異性、アフィニティー及び能力をもつマウス、ラット、ウサギなどヒト以外の生物種のCDR(供与者抗体)に由来する残基に置き換わっているヒト免疫グロブリン(受容者抗体)を含む。

【0344】

場合によっては、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基が対応する非ヒト残基に置き換わる。ヒト化抗体はまた、受容者抗体にも外来CDR又はフレームワーク配列にも見られない残基を含んでもよい。一般にヒト化抗体は少なくとも1つの(一般的には2つの)可変ドメインを実質的に全部含むであろうが、そこではCDRの全部又は実質的に全部が非ヒト免疫グロブリンのそれに対応しFR領域の全部又は実質的に全部がヒト免疫グロブリンのコンセンサス配列のそれに対応している。ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部分を、特にヒトのそれを含むのが最適であろう。

【0345】

非ヒト抗体をヒト化する方法は技術上周知である。一般に、ヒト化抗体には非ヒト由来の1又は複数のアミノ酸残基が導入されている。これらの非ヒト由来アミノ酸残基はしばしば「外来」残基というが、大体が「外来」可変領域に由来する。ヒト化は基本的にWinterらの方法[Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536 (1988)]に従い、げっ歯類CDR又はCDR配列をヒト抗体の対応配列に置換することで行うことができる。

【0346】

従って、そうした「ヒト化」抗体はキメラ抗体であり、インタクトなヒト可変領域に実質的に満たない部分がヒト以外の生物種に由来する対応配列によって置き換わっている。実際には、ヒト化抗体は大体がヒト抗体であり、若干のCDR残基及び場合によっては若干のFR残基をげっ歯類抗体の類似部位に由来する残基で置換してある。

【0347】

ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリー[例えば、Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]を含む当業者に知られている種々の技法を用いて作製してもよい。

【0348】

ヒトモノクローナル抗体の作製にはCole et al.及びBerner et al.の技法も使用可能である[Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)及びBerner et al., J. Immunol., 147 (1): 86-95 (1991)]。同様に、ヒト免疫グ

ロブリン遺伝子座をトランスジェニック動物(たとえば内在免疫グロブリン遺伝子を部分的又は完全に不活性化したマウス)に導入してヒト抗体を作製することもできる。抗原暴露後、遺伝子再編成、組立、抗体レパートリーなどを含むすべての点でヒトに見られるものに類似したヒト抗体の産生が観測される。

【0349】

「二重特異性抗体」

二重特異性抗体は少なくとも2つの形態の抗原に対応した結合特異性をもつモノクローナル(好ましくはヒト又はヒト化)抗体である。

【0350】

二重特異性抗体の作製方法は技術上周知である。二重特異性抗体の遺伝子組換え技術による産生は伝統的に2つの免疫グロブリンH鎖/L鎖ペアの同時発現を利用するものであり、その場合、2つのH鎖は異なる特異性を有している[Milstein and Cuello, *Nature*, 305: 537-539 (1983)]。免疫グロブリンH鎖及びL鎖の組合せはランダムなので、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は10種類の潜在的な抗体分子混合物を産み出すが、そのうち正しい二重特異性構造を有するのは1種類だけである。正しい分子は通常、アフィニティークロマトグラフィーで精製する。

【0351】

所望の結合特異性(抗体-抗原結合部位)をもつ抗体可変ドメインは免疫グロブリン定常ドメイン配列へと融合することができる。二重特異性抗体作製の詳細についてはたとえばSuresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)を参照。

【0352】

PCT公開WO 96/27011号明細書に開示の別の方法では、抗体分子ペアの間の境界面を工夫することにより、組換え細胞培養から回収されるヘテロ二量体の割合を極大化することができる。好ましい境界面は抗体定常ドメインのCH3領域の一部を少なくとも含む。

【0353】

この方法では、第1抗体分子の境界面に由来する1又は複数の小アミノ酸側鎖をもっと大きなアミノ酸側鎖(チロシン又はトリプトファンなど)に置き換える。

【0354】

この大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相殺的な「空洞」を第2抗体分子の界面に、大きなアミノ酸側鎖をもっと小さなアミノ酸側鎖(アラニン又はトレオニンなど)に置き換えることにより、設ける。これは、ホモ二量体などのような無用の最終生成物に対してヘテロ二量体の収量を高めるためのメカニズムを提供する。

【0355】

二重特異性抗体は完全長抗体又は抗体断片[たとえばF(ab')₂二重特異性抗体]として作製することができる。抗体断片から二重特異性抗体を作製する技法は文献で開示されている。たとえば二重特異性抗体は化学結合法で作製することができる。Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)はインタクト抗体をタンパク質分解によりF(ab')₂断片へと切断する方法を開示している。これらの断片はジチオール錯化剤である亜ヒ酸ナトリウムの存在下に還元して、近隣ジチオールを安定させ分子間ジスルフィド形成を防止する。生成したFab'断片は次にチオニトロ安息香酸(TNB)誘導体へと変換する。Fab'-TNB誘導体の一方を次にメルカプトエチルアミンによる還元でFab'-チオールへと再変換し、等モル量の他Fab'-TNB誘導体と混合して二重特異性抗体とする。作製された二重特異性抗体は選択的酵素固定化剤として使用することができる。

【0356】

Fab'断片はE. coliから直接回収し、化学結合により二重特異性抗体へと形成してもよい。Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992)は完全ヒト化二重特異性抗体F(ab')₂分子の作製を開示している。E. coliから別個に分泌された各Fab'断片をin vitro直接化学結合により二重特異性抗体へと作製する方法である。

【0357】

組換え細胞培養から二重特異性抗体の断片を直接生成し単離する種々の技法もまた開示

されている。たとえば二重特異性抗体の作製にロイシンジッパーを使用する方法がある。

【0358】

Kostelny et al., J. Immunol., 148 (5): 1547-1553 (1992)。Fos及びJunタンパク質に由来するロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により2種類の抗体のFab'部分へと結合させ、抗体ホモ二量体をヒンジ領域で還元して単量体を形成させ、次いで再酸化して抗体ヘテロ二量体を形成させた。この方法は抗体二量体の作製にも利用することができる。

【0359】

例えば、Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)が開示した「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作製する代替手段を提供してきた。該断片はH鎖可変ドメイン(VH)とL鎖可変ドメイン(VL)を、これら2ドメインを同じ分子鎖上で対合させるには短すぎるリンカーで連結して含む。

【0360】

従って、ある断片のVH及びVLドメインを他断片の相補的なVL及びVHドメインと強制的にペアにし、それによって2つの抗原結合部位をむりやり設ける。単鎖Fv(scFv)二量体を使用して二重特異性抗体を作製するという別の方法も報告されている。Gruber et al., J. Immunol. 152: 5368 (1994)を参照。

【0361】

2価超の抗体も見込まれる。たとえば三重特異性抗体の作製が可能である[Tutt et al., J. Immunol., 147:60 (1991)]。

【0362】

例示的な二重特異性抗体は本明細書中の任意のポリペプチド上の2種類のエピトープに結合しよう。

【0363】

あるいは抗ポリペプチド・アームをT細胞受容体分子(たとえばCD2、CD3、CD28又はB7)又はIgGのFc受容体(FcγR)[たとえばFcγRI(CD64)、FcγRII(CD32)及びFcγRIII(CD16)]などのような白血球上のトリガー分子に結合するアームと結び付けて、細胞防御機構を、該特定ポリペプチドを発現する細胞へと集中させるようにすることができよう。二重特異性抗体はまた、特定ポリペプチドを発現する細胞に細胞毒を局在化させるために使用することもできよう。これらの抗体はポリペプチド結合アームと細胞毒又は放射性核種キレート化剤たとえばEUTOBE、DPTA、DOTA又はTETAなどを結合するアームとをもつ。興味深い別の二重特異性抗体は該ポリペプチドを結合し、また組織因子(TF)をさらに結合する。

【0364】

「ヘテロ複合抗体」

ヘテロ複合抗体は2つの共有結合抗体からなる。該抗体は架橋剤の使用を伴う方法を含めた合成タンパク質化学の周知の方法によりin vitroで作製されるものと見込まれる。たとえば抗毒素はジスルフィド交換反応を使用して、又はチオエーテル結合の形成によって作製されよう。この目的のための好適な試薬はイミノチオラート、メチル-4-メルカプトブチルイミダート、及びたとえば米国特許第4,676,980号明細書で開示の試薬などである。

【0365】

「スクリーニングアッセイ」は天然PRO又はPRO受容体の生物活性によく似た活性を示すリード化合物を見つけ出すためにある。そうしたスクリーニングアッセイは、化学ライブラリーの高スループットスクリーニングになじみ低分子の薬物候補の特定に特に適するようなアッセイを含もう。見込まれる低分子は合成有機又は無機化合物などである。アッセイはタンパク質-タンパク質結合アッセイ、生化学スクリーニングアッセイ、イムノアッセイ及び細胞ベースアッセイなど、解明が十分に進んでいる多様な様式で行うことができる。

【0366】

「イムノアッセイ」はELISA、放射線イムノアッセイ、ウェスタンブロット等を含む。好適な抗体アッセイ標識は技術上周知であり、酵素標識のグルコースオキシダーゼ、及び

放射性同位体のヨウ素 (^{125}I 、 ^{121}I)、炭素 (^{14}C)、硫黄 (^{35}S)、三重水素 (^3H)、インジウム (^{112}In)及びテクネチウム ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、蛍光標識のフルオレセインやローダミン、ビオチン、それに蛍光性の放射性同位体、蛍光プロキシミティ標識及び当業者に知られている他の諸々の標識などがある。

【0367】

「実質的に相同(の)」又は「実質的に同一(の)」は、最大限の一致を求めて比較し、アラインメントし、次のうちいずれかの配列比較アルゴリズムを使用して、又は目視検査で、測定したときに、約50%以上の配列が同一であるような配列相同性、好ましくは約60%以上、好ましくは約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上のヌクレオチド又はアミノ酸残基の同一性をいう。2つの(アミノ酸又はヌクレオチド)配列は全長にわたって(たとえば両配列の長さが実質的に異なる場合には、短いほうの配列の全長にわたって)比較することができる。配列比較では、一般に一方の配列が基準用配列として試験用配列の比較対象となる。配列比較アルゴリズムを使用するときは、試験用及び基準用配列をコンピュータに入力し、必要ならば部分配列座標を指定し、また配列比較アルゴリズムのプログラムパラメーターを指定する。後は配列比較アルゴリズムが指定のプログラムパラメーターを基に基準用配列に対する試験用配列の配列一致率を計算する。比較のための最適配列アライメントは、たとえばSmith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482(1981)のローカルホモロジーアルゴリズムによって、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)のホモロジーアラインメントアルゴリズムによって、Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)の類似性検索法によって、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実行(Wisconsin Genetics Software Packageに収められたGAP、BESTFIT、FASTA及びTFASTA; Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)によって、又は目視検査によって、行うことができる(一般にAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, supraを参照)。前記いずれかのアルゴリズムを使用するとき、Window長、ギャップペナルティ等についてはデフォルトパラメーターを使用する。2つの核酸配列又はポリペプチドが実質的に同一であることのさらなる表れとして、第1ポリペプチド(たとえば第1核酸によってコードされるポリペプチド)は第2ポリペプチド(たとえば第2核酸によってコードされるポリペプチド)と免疫学的に交差反応性である。従って、たとえば2つのポリペプチドは一般に、同類置換が異なるだけという場合には、実質的に同一である。

【0368】

用語「実質的に純粋な」又は「単離(された)」は、タンパク質又はポリペプチドについていう場合には、それらのポリペプチドが天然には一体化しているタンパク質又は他不純物から所望のように分離されていることを意味する。タンパク質又はポリペプチドが実質的に純粋であるとみなされるのは、該タンパク質が該タンパク質を含む組成物の全タンパク質分の約50%超を占める場合、一般には全タンパク質分の約60%超を占める場合である。もっと一般的には、実質的に純粋な又は単離されたタンパク質又はポリペプチドは全タンパク質分の約75%以上より好ましくは約90%以上を占めよう。好ましくは、該タンパク質は組成物中の全タンパク質分の約90%超、より好ましくは約95%超を占めよう。

【0369】

「有効量」は、有益な又は所望の臨床的結果を含む有益な又は所望の結果をもたらすに足る量である。有益な結果は個体のインスリン感受性の改善、インスリン抵抗性の低下、高血糖の低下、及び個体の体重又は肥満、あるいは他の病状又は症状の改善などを非限定的に含む。有効量は種々の投与経路により1回又は複数回投与で投与することができる。

【0370】

「処置」は本明細書では、臨床的結果を含むのが好ましい有益な又は望ましい結果をもたらすためのやり方である。有益な又は臨床的結果は個体のインスリン感受性の改善、インスリン抵抗性の低下、高血糖の低下、及び個体の体重又は肥満、あるいは他の病状又は症状の改善などを非限定的に含む。処置計画は一定期間にわたる場合があり、複数投与量、複数回投与及び/又は種々の投与経路を伴う場合もある。一般に、処置目的のためには

グリコシル化アディポネクチン、例えばグリコシル化アディポネクチンポリペプチドアゴニストを含んで成る組成物を有効量投与する。アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニスト療法は、一見正常な循環アディポネクチン濃度が存在するときでも有効な場合がある。従って正常アディポネクチン濃度の存在はアディポネクチン療法への禁忌ではない。

【0371】

「生物試料」は個体から獲得される種々の試料タイプを包含し、また診断又はモニター検査に使用することができる。この定義は生物起源の血液又は他の体液試料、生検標本又は組織培養又はそれらに由来する細胞などのような固形組織試料、及びその子孫を包含する。この定義はまた、獲得後に何らかの操作たとえば試薬による処理、可溶化、又はタンパク質やヌクレオチドなど特定成分の濃縮などを経た試料を含む。用語「生物試料」は臨床的試料を包含し、また培養細胞、細胞上清、細胞溶解物、血清、血漿、体液、及び組織試料を含む。

【0372】

用語「統計的に有意の」、「統計的に有意の差」などは本明細書では通常の技術的な意味を有し、また観測差が偶然に生じる確率(又は「統計的に類似の」測量的場合には観測差が存在しない確率)(p値)はある既定値すなわち <0.05 好ましくは <0.01 最も好ましくは <0.001 であるp値を下回することを意味する。統計的有意性の測定には当業者に知られている好適な統計的手法が種々利用可能である[たとえば2標本を比較するためのステューデントのtアッセイ、分散分析のANOVA、信頼区間分析; SASシステムVersion 8(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)など]。

【0373】

「個体」は、対象者、例えば脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくは、例えばヒトである。哺乳動物は家畜、スポーツ動物、ペット、霊長類、マウス及びラットを非限定的に含む。

【0374】

「剤形」は本明細書では、哺乳動物、特にヒトへの投与に適したタンパク質製剤に好適な当業者に知られている任意適切な剤形、特に(非限定的ながら)哺乳動物好ましくはヒトに投与するための治療用タンパク質の溶液の安定化に好適な剤形を含む。これはアディポネクチンを含む組成物の形のいかなるものを問わない。

【0375】

一例は経口投与型の錠剤、カプセル剤、トローチ剤など、又は液剤のシロップ剤、水剤、乳剤などであり、たとえば経口型ならば消化管内にあって治療用タンパク質を、効果の誘発に先立つ分解から保護することができる。

【0376】

経皮投与型の例は経皮貼付、経皮包帯などである。

【0377】

局所投与型の例はローション、スティック、スプレー、軟膏、ペースト、クリーム、ジェルなどであり、皮膚に直接適用するか又はパッド、パッチなどを媒介にして適用する。

【0378】

座剤の例は開口に挿入可能な固形等の剤形である(特に肛門直腸、膣、尿道に挿入する座剤)。

【0379】

経粘膜投与型の例はデポジットリー、浣腸剤、ペッサリー、タンポン、クリーム、ジェル、ペースト、フォーム、噴霧液、散剤及び類似の製剤であり、活性成分の他に当業者に知られている適切な担体などを含む。

【0380】

デポ投与型の例は活性成分のペレット又は小シリンダー、又は活性成分を生物分解性高分子のマトリックス、マイクロエマルジョン、リポソーム又はマイクロカプセルに閉じ込めた固形剤である。

【0381】

埋め込み型注入装置の例は、活性成分を生物分解性高分子又は合成高分子(シリコーン、シリコーンゴム、SILASTIC又は類似高分子など)の内部に封入し又は分散させた任意の固形剤である。

【0382】

あるいは注入装置はリポソームデリバリーシステムを使用するような剤形でもよい。

【0383】

ボーラス投与型の例は、静脈内、皮下、皮内、筋内又は経口の各投与経路による単回又は頻回投与剤を含む。

【0384】

吸入投与型の例は、医薬として許容される水性又は有機溶媒を使用した溶液及び/又は懸濁液を含む組成物、又はそれらの混合物及び/又は粉末である。

【0385】

タンパク質の同類置換はあるアミノ酸の、類似の大きさと電荷をもつアミノ酸による置換である。等価であるとして一般に知られているアミノ酸群は当業界で理解されており、例えば：(a) Ala, Ser, Thr, Pro及びGly; (b) Asn, Asp, Glu及びGln; (c) His, Arg及びLys; (d) Met, Glu, Ile及びVal; (e) Phe, Tyr及びTrpを含む。

【0386】

III. アディポネクチンとアディポネクチン組成物

本発明は広く、生物学的に活性なアディポネクチン、ポリペプチドアゴニストを含むアディポネクチンアゴニスト、及び1又は複数の前述のものを含む組成物に関する。多数のアディポネクチンアイソフォームが存在し、異なる生物活性を有することを思いがけず発見した。本発明のアディポネクチン、アディポネクチンアゴニストと関連組成物は、とりわけ処置、診断及び他の用途に有用である。本発明は一側面において、グリコシル化され、且つ組換え体であるか、単離され、精製され又は合成されたアディポネクチンポリペプチドを提供する。該アディポネクチンポリペプチドはヒトアディポネクチンであるのが好ましく、そして、例えば、ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101(ヒトペプチドに基づく残基番号)に対応する少なくとも1つ、好ましくは1以上の残基はグリコシル化されているのが好ましい。

【0387】

別の側面において、本発明は、グリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドを含む組成物を提供する。該組成物のアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストは、組換え、単離、生成又は合成体であるのが好ましい。該組成物のアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストは、ヒトアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストであるのがなお好ましい。ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101(ヒトペプチドに基づく残基番号)に対応する1以上の残基はグリコシル化されているのが好ましい。

【0388】

別の側面において、本発明はヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101(ヒトペプチドに基づく残基番号)に対応する1以上の残基がグリコシル化され、且つ組換え体であるか、単離され、精製され又は合成されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドを含む組成物を提供する。

【0389】

リシン残基65、68、77及び101のグリコシル化(又はその欠如)を互いの相違点とするアディポネクチンポリペプチドは、本明細書ではときに「グリコアイソフォーム」という。

【0390】

A. アディポネクチンポリペプチド

「アディポネクチンポリペプチド」は本明細書では、組換え体であるか、単離され、精製されているか又は合成のものであってもよい。一態様において、アディポネクチンは天然に存在する動物(たとえばヒト、ヒト以外の霊長類、マウス、ラット、イヌ又はウシ)由

来アディポネクチンの配列を有する。たとえば図5を参照。別の態様において、アディポネクチンポリペプチドはプレプロ型のシグナル配列を欠く成熟型のグリコシル化されている。別の態様において、該アディポネクチンポリペプチドは、天然アディポネクチンタンパク質の(天然又は組換え)付加若しくは短縮及び/又は同類置換、並びに誘導体化によって天然アディポネクチンと異なる。一態様において、アディポネクチンは天然に存在するアディポネクチンの配列たとえば図5の配列と実質的に類似する(すなわち実質的に同一の)配列を有する。一態様において、短縮アディポネクチンポリペプチド及び同類置換は天然アディポネクチンと実質的に相同であり、その生物活性を本明細書で開示するようになお維持する。本発明の組成物に有用であるアディポネクチンポリペプチドは、多様な実施態様において、図5のアディポネクチンの変異体、特異的スプライシング変異体、可変スプライシング変異体、及び図5のアディポネクチンに対して実質的相同性又は所望の相同性を有する他の天然アディポネクチン変異体を含む。他の有用なアディポネクチン変異体は、完全長アディポネクチンの1又は複数のアミノ酸残基の欠失又は完全長アディポネクチンの短縮によって得られるような、完全長アディポネクチンの断片である。アディポネクチンの活性断片又はその一部分はアディポネクチンペプチドのN末端又はC末端からの、又は内部からの、アミノ酸残基の段階的削除によって確かめることができる。あるアミノ酸を削除してもアディポネクチンの生物活性に実質的な低下が見られなければ、該アミノ酸は活性断片の一部分を含まないことになる(又はその不必要な部分を含んで成ることもある)。

【0391】

アディポネクチンのそうした活性断片又はその一部分は当業者に知られている方法によって他ポリペプチドと融合し、キメラポリペプチドを形成させてもよい。天然アディポネクチンの生物活性を保持するそうしたキメラポリペプチドもまた、本発明のアディポネクチンポリペプチドであるとみなされる。

【0392】

アディポネクチンの機能的変異体はその生物学的機能によって、アディポネクチンと同じ生物学的応答を誘発することができるアディポネクチン作用部位のアゴニストであると特徴付けることができる。そうした機能的変異体は本明細書で定義するアディポネクチンポリペプチドであるとみなされる。

【0393】

本明細書では特に糖又は糖混合物によるグリコシル化に、又はさらに具体的にはグルコシルガラクトシル部分などのような種々の化学種に言及するが、該用語はその範囲に、そのもっとも厳密な非限定部分に類似の生物活性を誘発するような該グリコシル化部分の任意の拡張又は変異を含む。

【0394】

本明細書ではヒドロキシル化について特に言及するが、該用語はその範囲に、そのもっとも厳密な非限定部分に類似の生物活性を誘発するような該ヒドロキシル化部分の任意の拡張又は変異を、他の修飾と共に含む。

【0395】

本明細書ではヒドロキプロリンについて特に言及するが、該用語はその範囲に、そのもっとも厳密な非限定部分に類似の生物活性を誘発するような任意のアミノ酸及び修飾アミノ酸を含む。

【0396】

アディポネクチン調製物はヒトへの投与に適するやり方で、好ましくは皮下(s.c.)、皮下(i.d.)、静脈内(i.v.)、腹腔内(i.p.)又は経皮などの経路による非経口投与用の剤形に調製することができる。該アディポネクチンを経口、経直腸、経膈、膀胱内、くも膜下、脳室内、大脳内等当業者に知られている経路で投与するような他の製剤も見込まれる。

【0397】

好ましい投与経路は非経口である。非経口投与に適したアディポネクチン又はそのアゴニストは、安定化用の緩衝液を含む水溶液中で、好ましくは等張又はほぼ等張に、且つ任

意に、哺乳動物特にヒトへの投与に適したタンパク質製剤用として当業者が知っているか又は学習している防腐、消泡、抗沈殿等の安定化剤、特に哺乳動物好ましくはヒトに投与するための治療用タンパク質溶液の安定化に適した安定化剤と一緒に調製される。

【0398】

本発明の一態様において該組成物は、アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、例えば、*in vitro*アッセイにおいて、例えば実施例で示すように肝細胞の対インスリン応答能を測定することで検出可能な生物活性を有するものを含む。別の態様において、アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドは少なくともインスリンの効果の増強、個体のインスリン抵抗性の減少、糖新生の阻害、高血糖の低下、又は肥満になりやすい個人の健康増強といった生物活性をもつ。種々の態様において、本発明の組成物のアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの生物活性は、図5に示す配列をもつアディポネクチンポリペプチドたとえば図5のヒトアディポネクチンポリペプチドの約50%以上であり、且つしばしば約95%以上である。

【0399】

B. アディポネクチンアイソフォーム

一側面において、本発明はアディポネクチンのアイソフォームを1つ又は複数含む組成物に関する。アディポネクチン「アイソフォームは」本明細書ではpI及び見掛け分子量から区別されるアディポネクチンポリペプチドの種類である。種々のアイソフォームは電気泳動などの標準方法で識別することができる。図1に示すように、脂肪細胞から単離されるアディポネクチンには少なくとも8種類のアイソフォームがあるが、それらは図1及び2に示すように等電点(pI)と電気泳動度(見掛け分子量)に応じて区別することができる。いくつかのアイソフォームがグリコシル化されており(例：アイソフォーム3、4、5及び6)、そして他はグリコシル化されていない(例：アイソフォーム1及び2)。

【0400】

C. アディポネクチンのグリコアイソフォーム

後述のように、哺乳動物細胞中で産生されるアディポネクチンはグリコシル化などのような翻訳後修飾を受ける場合がある。発明者はマウスアディポネクチンのリシン残基68、71、80及び104、及び対応するヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101はグリコシル化の標的であることを発見した。一側面において、本発明は、例えばヒトアディポネクチン、ヒト以外の生物種に由来するアディポネクチン及びヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上の残基でグリコシル化されたアディポネクチンポリペプチドアゴニストを含む組成物を提供する。ヒト以外の生物種のアディポネクチン、アディポネクチン変異体又は図5に示すヒトアディポネクチンとは異なる短縮アディポネクチンに言及するとき、該アディポネクチンの残基は当然、対応するヒト配列残基の番号を(両配列の最適アラインメントを通じて割り出し)使用して呼ぶことができる。図5は種々の動物に関するアディポネクチンの配列アラインメントを示す。たとえば天然に存在するマウスアディポネクチンでは、対応するリシン残基は68、71、80及び104である。ある生物種(たとえばヒト又はマウス)の残基番号を明示する場合は、その明示には他生物種の相当する番号をも示す狙いがあるものとする。

【0401】

一側面において、本発明はグリコシル化され、且つ組換え体であるか、単離され、精製され又は合成されたアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドを提供する。別の態様において、該アディポネクチンポリペプチドは、ヒトアディポネクチンである。別の態様において、リシン残基68、71、80及び104(マウス)又はリシン残基65、68、77及び101(ヒト)に対応する1以上のリシン残基がグリコシル化されている。一態様においてアディポネクチンは完全にグリコシル化されている。「完全にグリコシル化されている」とは、アディポネクチンポリペプチド内部のすべてのリシン残基が1以上の糖部分によってグリコシル化されている[たとえばリシン残基68、71、80及び104(マウス)又はリシン残基65、68、77及び101(ヒト)に対応する4リシン残基がみなグリコシル化されている]というアディポネクチンポリペプチド上のグリコシル化の状態をいう。更なるグリコシ

ル化が加えられることもあり、そして／あるいは既存のグリコシル化部位が、生物学的活性にとって所望のように移動されることもある。

【0402】

リシン残基のグリコシル化は、典型的には0結合型であり、各リシン残基に1又は複数の糖部分が付加される結果となる。本発明の一側面において、リシン残基に付加される糖部分はグリコシルガラクトシル部分又はガラクトシルグリコシル部分である。別の側面において、アディポネクチンポリペプチドは、例えばリシン残基68、71、80及び104(マウス)又はリシン残基65、68、77及び101(ヒト)の各々に1以上のグリコシルガラクトシル部分又はガラクトシルグリコシル部分をもつ。別の態様において、アディポネクチンポリペプチドはリシン残基68、71、80及び104(マウス)又はリシン残基65、68、77及び101(ヒト)のうち1以上の又はすべての残基に構造X1を有する。ただし各X1はグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルガラクトシル部分及びガラクトシルグルコシル部分のうち1つ又は複数より独立に選択される。一態様において、アディポネクチンのすべてのリシン残基が完全にグリコシルされている。

【0403】

グリコシル化アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドはまた、その生物学的効果によって特徴付けることができる。一態様において、グリコシル化アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの哺乳動物への投与は、本明細書でいうアディポネクチン調節に関連する病状の処置に有効である。別の態様において、グリコシル化アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの哺乳動物への投与は実施例で説明するようにインスリンの効果を増強する。別の態様において、グリコシル化アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドは動物に投与すると糖新生を阻害する。

【0404】

別の側面において、本発明はグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドを含む組成物を提供する。一態様において、アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドは組換え、単離、生成又は合成体である。別の態様においてアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドはヒトアディポネクチンである。別の態様において、該組成物は哺乳動物患者への投与に適するように、他の医薬として許容される賦形剤、補助剤、希釈剤等と共に、又は単独で、調製する。別の態様において該組成物はインスリン又はインスリン類似体を追加的に含む。該インスリン又は類似体は約50pM～約400pMの血中インスリン又は類似体濃度を誘発するに足る量又は濃度であるのが好ましい。インスリン又は類似体は、約100pM～約300pMの血中インスリン類似体濃度を誘発するに足る量又は濃度であるのがなお好ましい。インスリン又は類似体は、約200pMの血中インスリン又は類似体濃度を誘発するに足る量又は濃度であるのが最も好ましい。

【0405】

別の側面において、本発明はリシン残基68、71、80及び104(マウス)又はリシン残基65、68、77及び101(ヒト)に対応する1以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの組成物を提供する。一態様においてアディポネクチンは完全にグリコシル化されている。「完全にグリコシル化されている」とは、アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド内部のすべてのリシン又は他の関連残基が1以上の糖部分によってグリコシル化されているというアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド上のグリコシル化の状態をいう。

【0406】

リシン残基のグリコシル化は、典型的には0結合型であり、各リシン残基に1又は複数の糖部分が付加される結果となる。本発明の一側面において、リシン残基に付加される糖部分はグリコシルガラクトシル部分又はガラクトシルグリコシル部分である。別の側面において、アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドはリシン残基68

、71、80及び104(マウス)又はリシン残基65、68、77及び101(ヒト)の各々に1以上のグリコシルガラクトシル部分又はガラクトシルグリコシル部分をもつ。別の態様において、アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドはリシン残基68、71、80及び104(マウス)又はリシン残基65、68、77及び101(ヒト)のうち1以上の又はすべての残基に構造X1を有する。ただし各X1はグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルガラクトシル部分及びガラクトシルグルコシル部分のうち1つ又は複数より独立に選択される。一態様において、アディポネクチンのすべてのリシン残基が完全にグリコシル化されている。さらなる態様において、アディポネクチンはアディポネクチンアイソフォーム3、4、5又は6のうち任意の1つである。

【0407】

グリコシル化アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの組成物はまた、その生物学的効果によって特徴付けることができる。一態様において、該組成物の哺乳動物への投与は実施例で説明するようにインスリンの効果を増強する。別の態様において、グリコシル化アディポネクチンポリペプチドの組成物は動物に投与すると糖新生を阻害する。

【0408】

一側面において、本発明は1以上の非グリコシル化アディポネクチンアイソフォームを実質的に含まないアディポネクチンの組成物を提供する。一側面において、該組成物はアイソフォーム1及び/又はアイソフォーム2を実質的に含まない。別の側面において、該組成物はいかなる非グリコシル化アディポネクチンアイソフォームも実質的に含まない。本明細書では、組成物がアイソフォームを「実質的に含まない」のは、該アイソフォームが該組成物のアディポネクチンタンパク質の約20(重量)%未満、好ましくは約10%未満、好ましくは約5%未満、最も好ましくは約1%又は約0.1%未満のときである。そうした組成物を得る方法は実施例で開示の方法及びタンパク質精製及びクロマトグラフィー技術の分野で周知の方法などである。

【0409】

さらに別の側面において、本発明は唯一の又は支配的なアディポネクチン分子種が完全にグリコシル化されているアディポネクチン又はアゴニストを含む組成物を提供する。一態様において、例えば、該組成物は、複数のアディポネクチンアイソフォーム及び/又は複数のグリコシル化状態のアディポネクチンを含む。該組成物はアイソフォーム3、4、5又は6のいずれか1つが該組成物中の支配的なアディポネクチンであるようにすることができる。この場合の「支配的」は組成物中のアディポネクチンポリペプチドの約50%以上が、好ましくは約60%以上、約70%以上、約80%以上、約90%以上、約95%以上、及び約98%以上が規定のグリコシル化状態にあるか又は規定のアイソフォームであることをいう。

【0410】

グリコシル化アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの組成物はまた、その生物学的効果によって特徴付けることができる。一態様において、該組成物の哺乳動物への投与は実施例で説明するようにインスリンの効果を増強する。別の態様において、グリコシル化アディポネクチンポリペプチドの組成物は動物に投与すると糖新生を阻害する。

【0411】

D. グリコシル化アディポネクチンを得る方法

本発明の組成物を得るにはいくつかの方法がある。アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドは、組換え又は合成手段によって生産することができ、あるいは適宜天然供給源から単離又は精製することができることは理解されよう。

【0412】

一態様において、1又は複数のアディポネクチンアイソフォーム又はグリコアイソフォームあるいはアディポネクチンアゴニストポリペプチドを組換え方法で調製する。アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドは組換え手法を用い、該タンパク質をコードするポリヌクレオチド(通常はDNA)配列を発現ベクターに挿入し適当な宿主

中で該ペプチドを発現させることによって生産してもよい。目的のポリペプチドを(融合又は成熟型として、また分泌を可能にするシグナル配列の有無を問わず)コードするポリヌクレオチドは、任意の好都合な宿主に適した発現ベクターに挿入してよい。当業者に知られている多様な発現ベクターのうち任意のものを使用してよいが、真核細胞はグリコシル化などの翻訳後修飾を行うことができるので真核発現系が推奨される。発現は、組換えペプチドをコードするDNA分子を収めた発現ベクターを予め導入してある任意の好適な宿主細胞で起こさせる。真核宿主細胞の例は技術上周知であり、酵母、鳥、昆虫、植物及び動物の細胞、たとえばCOS7、HeLa、CHO及び他の哺乳動物細胞などがある。標準組換え生産技法はたとえば前掲Sambrookで開示されている。アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドは、アディポネクチン又は図5に記載の任意の動物(ヒト、マウスなど)の配列を有するポリペプチド又はその生物活性断片若しくは付加物、又は他の変異体若しくはそのアゴニストをコードする組換えポリヌクレオチドの哺乳動物細胞中での発現によって得ることができる。

【0413】

別の態様において、アディポネクチン(アイソフォーム及びグリコアイソフォームの混合物を含む)は血清又は脂肪細胞などを非限定的に含む動物組織から精製する。脂肪細胞からアディポネクチンを精製する方法は技術上周知であり、且つ実施例でもさらに開示する。グリコシル化アディポネクチンの組成物を獲得する源としての動物の非限定的な例はヒト、マウス、ラット、イヌ、ウシ及びヒト以外の霊長類などである。

【0414】

組換え手法により又は動物組織から得たアディポネクチンは、分子量、pI及び/又はアディポネクチンポリペプチド中のグリコシル化の程度に応じて、通常の方法たとえば実施例で開示の電気泳動又はクロマトグラフィーによって分離することができる。本発明の側面において、前記のように、規定のアディポネクチンアイソフォーム又はグリコアイソフォームを含むアディポネクチン組成物をディファレンシャル精製法で調製する。たとえば本発明の方法によれば、これはグリコシル化の程度又はタイプが異なる2種類以上のアディポネクチンを含む第1組成物を得るステップ、次いでグリコシル化の程度又はタイプに応じてアディポネクチンを種類分けするステップを伴う。この方法により、アディポネクチンプロファイルが第1組成物とは異なる第2組成物が得られる。

【0415】

グリコシル化アディポネクチンポリペプチドはタンパク質精製の分野では周知のいくつかの方法により他ポリペプチドから分離することができる。一態様において、該分離は2次元電気泳動法とそれに続くゲルからのタンパク質の切り出しと溶出によって行う。別の態様において、電荷に基づく選択法であるアフィニティークラム法で分離する。別の態様において、レクチン添加アフィニティークラム法で分離する。他の態様において代替タンパク質精製法たとえばイムノアフィニティークラム、サイズ排除カラム、レクチンアフィニティー、疎水性相互作用、逆相、陰イオン及び陽イオン交換クロマトグラフィー等を使用する[一般にR. Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y. (1982)及びD. M. Green, Methods in Enzymology, Vol. 182: Guide to Protein Purification, Academic Press, Inc. N.Y. (1990)を参照]。

【0416】

一態様において、レクチンカラムたとえばコンカナバリンA又は小麦胚凝集素カラムを使用してグリコシル化アディポネクチンポリペプチドを結合することにより、支配的グリコシル化アディポネクチンポリペプチドを含む組成物が得られる。非グリコシル化アディポネクチンはカラムに結合しないので、カラムを通過することになる。次いでグリコシル化アディポネクチンポリペプチドをカラムから溶出すれば、支配的グリコシル化アディポネクチンポリペプチドを含む組成物が得られる。

【0417】

別の態様において、組換え手法により又は動物組織から得たアディポネクチンを2次元ゲル電気泳動にかけ、グリコシル化分子種を(実施例の要領で)抗体によって識別し、グリ

コシル化アディポネクチンアイソフォームのスポット又はバンドを切り出し、該バンドからグリコシル化アディポネクチンアイソフォームを溶出して1つのグリコシル化アディポネクチンアイソフォームからなる実質的に純粋な組成物を得るという方法で、種々のアイソフォーム及び/又はグリコアイソフォームを得る。当然、本発明の組成物は前記技法など、特定のアイソフォーム及び/又はグリコアイソフォーム分離し再結合して所望の実施態様を調製する方法を含めた通常の技法により、調製することができる。

【0418】

IV. 方法

A. 発現のモニタリング

アディポネクチンのアイソフォーム及びグリコアイソフォームの発現はモニタリングすることができる。本発明の一側面において、例えば、発現は、アディポネクチン調節に関連する病状又は発病しやすい素因をもつ個体の診断のためにモニタリングされ、又は決定される。種々の態様において、例えば該病状は高血糖症、インスリン抵抗性、インスリン抵抗性に関連する代謝症候群、II型糖尿病、高血圧を含む代謝症候群、動脈硬化症、冠状動脈性心臓病、虚血性心疾患又は多嚢胞性卵巣症候群、又はアディポネクチン又は肥満に関連する他病状である。アディポネクチンは、例えば血清又は血液などのような体液から採取し、電気泳動法、HPLC又は質量分析法で分析することができる。発現プロファイルは、例えば本明細書で開示する又は当業者に知られている任意の方法(たとえば2次元電気泳動法)でモニタリングすることができる。

【0419】

モニタリングは、例えば、特定アディポネクチンアイソフォームのレベル、2以上のアディポネクチンアイソフォーム又ははグリコアイソフォームの発現プロファイルを対象に行う。一態様において、個体の該レベル又は発現プロファイルを基準プロファイルと比較し、基準プロファイルと比較した場合の統計的に有意の相関を状態の診断に用いる。該基準プロファイルは、例えば高血糖症、インスリン抵抗性、インスリン抵抗性に関連する代謝症候群、II型糖尿病又は肥満症の家族歴がある別の個体に由来しても、本人が高血糖症、インスリン抵抗性、インスリン抵抗性に関連する代謝症候群、II型糖尿病又は肥満症二価かっている個体に由来してもよい。基準プロファイルはまた、例えば病歴たとえば高血糖症、インスリン抵抗性、インスリン抵抗性に関連する代謝症候群、II型糖尿病又は肥満症の病歴に応じてグループ分けされた個体群に由来してもよい。

【0420】

特定グリコシル化アディポネクチンアイソフォームの発現レベル又は発現パターンを統計分析すれば、本明細書に記載の任意のアディポネクチン関連病状に対応するある範囲のレベル又は発現パターンを決定することができる。次いで統計的に有意の相関を使用して、良好な(又は芳しくない)予後に相関するようなグリコシル化アディポネクチンアイソフォームのレベル又はパターンを決定することができる。次いで、生体試料(たとえば患者試料)に由来するグリコシル化アディポネクチンアイソフォームの発現レベル又は発現パターンを決定し、基準のレベル又はパターンと比較して臨床的な結果を予測することができる。

【0421】

好ましい態様において、例えばモニタリング方法に使用するいずれか1又は複数のアディポネクチンアイソフォームは、ヒトアディポネクチンである。別の好ましい態様において該個体はヒトである。

【0422】

B. 処置及び薬剤調製の方法

本発明はまた、例えば個体のアディポネクチン調節に関連する病状の処置を提供する。該病状の非限定的な例は、例えば高血糖症、インスリン抵抗性、インスリン抵抗性に関連する代謝症候群、II型糖尿病、高血圧を含む代謝症候群、動脈硬化症、冠状動脈性心臓病、虚血性心疾患又は多嚢胞性卵巣症候群、又はアディポネクチン又は肥満に関連する他病状である。

【0423】

処置計画は、広く有効量のグリコシル化アディポネクチン組成物の、処置対象個体への投与を含む。有効量は、実施例で開示するように、たとえばインスリン増感のための生物活性の評価によって決定することができる。当業者はグリコシル化組成物の有効量を、投与量の段階的増加と各段階での生物学的機能の評価によって決定してもよい。

【0424】

グリコシル化アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストの組成物は、医薬として許容される賦形剤に混ぜて投与してもよい。医薬として許容される賦形剤は技術上周知であり、且つ薬効物質の投与を容易にするような比較的不活性の物質である。実施態様によっては、本発明のアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストの組成物は、(たとえば腹腔内、静脈内、皮下、筋内などの)注射投与用に調製する。

【0425】

従って、グリコシル化アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストの組成物は、例えば、医薬として許容される担体、例えば生理食塩水、リンガー液、デキストロース液などと混合してもよい。具体的な投薬計画すなわち用量、タイミング及び頻度は特定個体又は該個体の病歴に依存しよう。処置は一定期間にわたる多数回の投与を含んでもよい。処置は、血糖値、空腹時血糖値試験及びin vitroインスリン増感試験などを非限定的に含む通常の臨床検査により生物学的機能について評価することができる。

【0426】

静菌的又は静真菌的な濃度の抗菌剤もまた、米国薬局方(USP)の規定に従う限りで添加してもよい。これらの抗菌剤は複数回投与用容器入りの製剤に添加しなければならない。使用時には、たとえば皮下注射針で内容物を部分的に吸い上げる際に製剤中に不用意に導入された微生物の増殖を防止するに足る濃度で存在しなければならない。

【0427】

特に等張又はほぼ等張でなければ投与部位に相当の炎症や痛みが起こるような非経口製剤では、組成物の張度を調整するために塩化ナトリウム等の塩を加えてもよい。

【0428】

本発明は当然、本明細書で開示するアディポネクチン及びアディポネクチンアゴニスト組成物の、医薬組成物の調製への使用をも提供する。

【0429】

さらに別の側面において本発明は、アディポネクチン調節に関連する病状の処置に有効な、インスリンの効果の増強に有効な、又は糖新生の阻害に有効な、哺乳動物患者用の剤形又は医薬組成物又は薬剤の調製へのグリコシル化アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドの使用にある。一態様において、アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドは、組換え体であるか、単離され、精製され又は合成されている。別の態様において、アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドはヒトアディポネクチンである。別の態様においてリシン残基68、71、80及び104(マウス)又はリシン残基65、68、77及び101(ヒト)に対応する1以上の残基、例えばリシン残基は、グリコシル化されている。別の態様において該剤形又は医薬組成物又は薬剤は、インスリン又はインスリン類似体を追加的に含む。該インスリン又は類似体は、約50pM～約400pMの血中インスリン又は類似体濃度を誘発するに足る量存在するのが好ましい。該インスリン又は類似体は、約100pM～約300pMの血中インスリン又は類似体濃度を誘発するに足る量又は濃度である。該インスリン又は類似体は、約200pMの血中インスリン又は類似体濃度を誘発するに足る量存在するのが好ましい。

【0430】

本発明の非経口製剤の好適な投与経路は筋内、静脈内、皮下、皮内、関節内、くも膜下などである。皮下経路が好ましい。経粘膜投与もまた許容される。

【0431】

本発明は、組成物又は製剤としてインスリン又はインスリン類似体との同時投与又は順次投与及び/又は混合が可能であるものと見込まれる。これは事情と患者に依存しよう。

好適な処置計画は患者ごとに医師又は開業医が決定するのが最善であろう。種々のインスリン製剤がEli Lilly & CompanyやNovo Nordiskなど多数の会社から出ている。使用可能なインスリン製剤のタイプは速効型、中間型及び持続型である。これらの区分内にもさまざまなタイプがある。インスリン又は類似体と本明細書で規定するアディポネクチンポリペプチド又はアディポネクチンアゴニストの比は、特定患者の個別のニーズに依存しよう。好適な処置計画は患者ごとに医師又は開業医が決定するのが最善であろう。

【0432】

本発明に有用な組成物は一般に受け入れられている方法で成分を混合して調製する。たとえば特定成分を混合機又は他の標準装置で混合して濃縮混合物とした後、水又は増粘剤を加え、また場合によってはpH調整用の緩衝液又は張度調整用の追加溶質を加えて、最終濃度及び粘度へと調整する。

【0433】

C. スクリーニング

本発明の組成物は、アディポネクチンの調節及びもっと一般的には代謝に関連する化合物のスクリーニングに使用することができる。一態様において、アディポネクチンを発現する哺乳動物の細胞たとえば培養細胞を試験化合物と接触させ、次いでアディポネクチンアイソフォームのレベル又は発現パターンの変化をモニタリングする。一態様においてアディポネクチンは自然に発現させる。別の態様においてアディポネクチンは組換え的に発現させる。別の態様において、1又は複数のアディポネクチンアイソフォームのレベルの変化を、試験化合物との接触前のアディポネクチンアイソフォーム量を定量しその量を細胞に試験化合物を接触させた後の量と比較することによって、検出する。タンパク質の定量は技術上周知であり、たとえばウェスタンブロット法で行うことができる。別の態様において、アディポネクチンアイソフォームを定量する。定量にはタンパク質スポット又はバンドの相対レベルを検出するデンシトメーターを使用する。そうした計測器の例はMolecular Dynamics社のLaser Densitometer又はBio-Rad社のGS-700である。別の態様において発現パターンの変化を2次元電気泳動法で検出する。

【0434】

試験化合物は一般的な種類が多様であり、ポリペプチド；オリゴ糖や多糖などの糖質；ポリヌクレオチド；脂質又はリン脂質；脂肪酸；ステロイド；又はアミノ酸類似体などを非限定的に含む。試験化合物はまた化学的な種類が多様であり、複素環式化合物、炭素環式化合物、ラクタム、ポリカーバメート、オリゴマー-N-置換グリシン、ベンゾジアゼピン、チアゾリジノン及びイミダゾリジノンなどを非限定的に含む。ある種の試験化合物は合成有機化合物を含む低分子である。試験化合物は天然物ライブラリー又はコンビナトリアルライブラリーなどのようなライブラリーから入手することができる。多数の異なるタイプのコンビナトリアルライブラリー及びそうしたライブラリーの作製方法が、たとえばPCT公開WO 93/06121号、WO 95/12608号、WO 95/35503号、WO 94/08051号及びWO 95/30642号の各明細書ですでに開示されている。

【0435】

一態様において、例えば、ある生物学的機能はインスリンの効果に対し肝細胞を増感させるアディポネクチンの能力であり、肝細胞に対するインスリンの効果は、実施例で説明するようにアディポネクチンポリペプチド又はアゴニストが増強する。アディポネクチンポリペプチド又はアゴニストが誘発する肝細胞に対するインスリンの効果の増強は当業者に知られているインスリン活性試験によって確定されよう。ひとたびそうした周知の試験で細胞のグルコース生産又は糖新生に対するインスリンの効果が確定されたら、この試験はインスリンの効果を激化、増強又は減衰させるような作用物質の能力の判定に使用することができる。化合物類を段階的に分析して、例えばどの化合物がアディポネクチンの活性を阻害又は増強するかを判定することができる。

【0436】

以下の実施例は本発明の例示であり、本発明をいかなる点でも限定しない。

【実施例】

【0437】

実施例1: 実験方法

資材 - デキサメタゾン、3-イソブチル-1-メチルキサンチン (IBMX)、 α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸 (CHC)、コラゲナーゼ、ラット尾コラーゲンI型、アミノ酸標品、FLAGペプチド、抗FLAG M2アフィニティーゲル及びグルコースTrinderアッセイキットはSigmaから購入した。ヒトインスリン (Actrapid)はNovo Nordiskから得た。全細胞RNA抽出試薬 (TRIzol)、TEVプロテアーゼ、哺乳動物発現ベクターPCDNA3.1(+)及び原核生物発現ベクターpPROEX HTbはInvitrogenから得た。QuikChange部位指定突然変異誘発キットはStratageneから得た。BCAタンパク質アッセイ試薬はPierceから得た。糖タンパク質検出用のImmu-BlotキットはBio-Rad Laboratoriesから得た。FuGENE 6トランスフェクション試薬、トリプシン及びASP-Nエンドプロテイナーゼ、それに改良ケミルミネセンス (ECL)検出システムはRoche Molecular Biochemicalsから得た。Ni-NTAアガロースカラムはQIAGENから得た。2次元ゲル電気泳動用の諸々の消耗品、3H-1ガラクトース及び3H-1グルコースはAmersham Pharmacia商品であった。諸々のアミノ酸分析試薬及び質量分析計用Cal Mix 2検量標品はApplied Biosystemsから得た。

【0438】

3T3-L1細胞の分化と細胞培地由来タンパク質の濃縮 - 3T3-L1細胞を10%ウシ胎仔血清添加DMEM中にサブコンフルエント培養物として維持した。分化のために、細胞を150mmプレートにまき、100%コンフルエントに到達させ、コンフルエント1日後に0.25 μ Mデキサメタゾン、0.5mM IBMX及び10 μ g/mlインスリンを含む前記培地で分化を2日間誘発した。これに続いて10 μ g/mlインスリンと2日間インキュベートする。次いで細胞を10%ウシ胎仔血清添加DMEM中にさらに4日間維持した。

【0439】

脂肪細胞から分泌されたタンパク質を回収するために、分化8日後の細胞をPBSで3回洗浄し、次いで無血清培地でさらに4時間インキュベートした。培地を回収し、3000 \times gで10分間遠心にかけて、0.20 μ mフィルターでろ過し、次いでMWC0(分画分子量)が5000 Daの濃縮フィルター (Vivascience Ltd, Gloucestershire, UK)を使用して濃縮、脱塩した。次いでBCA試薬を使用してタンパク質を定量し、マイナス80 $^{\circ}$ Cで用時まで貯蔵した。

【0440】

2次元ゲル電気泳動 (2-DE)、免疫プロット法及び糖鎖検出 - 脂肪細胞又は3T3-L1前脂肪細胞から分泌されたタンパク質は2-DEにより既述の要領で[24]分離した。分離したタンパク質は銀又はCoomassie Brilliant Blue R250 (CBB)で染色した。免疫プロット法では、2-DEで分離したタンパク質を、Multiphor II Novablot電気泳動トランスファーユニット (Pharmacia)により、ニトロセルロース膜にプロットした。膜をブロッキングし、次いでウサギ抗アディポネクチンポリクローナル抗体 (1:1000)と4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。さらに1時間、室温で、西洋ワサビペルオキシダーゼを結合させた二次抗体とインキュベートした後、結合抗体をECLキットで検出した。糖タンパク質は市販のImmun-Blotキットを使用してメーカーの説明書に従って検出した。

【0441】

ゲル内トリプシン消化及び逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) - SDS-PAGE又は2-DEで分離した目的のタンパク質を切り出し、ゲル片を記述の要領で[25]ゲル内トリプシン消化した。抽出されたトリプシン消化ペプチド混合物をJupiter 5 μ C18カラム (250 \times 2.00mm, Phenomenex)によるRP-HPLCで分画した。予暖 (37 $^{\circ}$ C)カラムを0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸で7分間洗浄し、次いで50分間のリニアグラジエント (8% - 36%アセトニトリル)により200 μ l/分の送液量で溶出した。各画分を手動で回収し、後述の要領でさらに分析した。 3 H標識糖タンパク質を液体シンチレーションカウンターで検出した。

【0442】

アミノ酸配列決定とアミノ酸分析 - 2-DEで分離したタンパク質スポットをPVDF膜にプロットし、CBBで染色し、切り出し、Perkin-Elmerタンパク質配列解析機 (Procise, Model 492)を使用してエドマン分解法でアミノ酸配列を決定した。内部アミノ酸配列はRP-HPLC分

画後のトリプシン消化ペプチドの配列解析によって求めた。

【0443】

アミノ酸分析では、トリプシン消化ペプチド5 μ gを減圧乾燥し6N HCl、1%フェノールの気相中、110 $^{\circ}$ で24時間加水分解した。この処理によって糖残基は分解されたが、ヒドロキシリシン及びヒドロキシプロリンの検出と定量はなお可能であった[26]。遊離アミノ酸残基を40 μ lの0.025% K3EDTAに溶解し、フェニルイソチオシアネート(PITC)で誘導体化し、Sepheri-5 PTC 5 μ カラム(220 \times 2.1mm)で分離し、421アミノ酸分析機(Applied Biosystems)で分析した。

【0444】

マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF MS)による分析-トリプシン消化ペプチド混合物又はRP-HPLC分離ペプチド0.5 μ lを等量のCHCマトリックス(10mg/ml。60%アセトニトリル/0.3%TFAに溶解)と混合し、サンプルプレートに滴下し、風乾させた。パルスレーザービーム(窒素レーザー、 λ =337nm)使用のVoyager DE PR Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems)でリフレクトロン質量分析を行った。イオンスペクトルはすべてポジティブモードで、加速電圧20.0kVを使用して記録した。分析計はCal Mix 2標準混合物を使用して外部校正した。

【0445】

マウスアディポネクチンのクローニング-全RNAを3T3-L1脂肪細胞から、TRIZOL試薬を使用してメーカーの説明書に従って精製した。全RNA由来のオリゴ-dTプライムドcDNAを、マウスアディポネクチンヌクレオチド配列(登録番号: U37222)に基づくPCRクローニングの鋳型として使用した。次いでアディポネクチンの完全長cDNAをpGEMT-easyベクターに挿入し、その配列をDNA配列解析で確認した。タンパク質配列はメチオニン残基から勘定した。

【0446】

アディポネクチン及びその変異体の組換え発現及び精製-マウスアディポネクチンに対応する原核生物用発現プラスミドを調製するために5' ATCGGGATCCGAAGATGACGTTACTACAAC 3' をセンスプライマーとし、また5' TACGAATTCTCAGTTGGTATCATGGTAGAG 3' をアンチセンスプライマーとして使用してDNA配列を増幅した。増幅DNA生成物のBamHI/SaII断片をpPRO EX HTbプラスミド中にサブクローニングして、N末端に6 x His標識を付けた完全長アディポネクチンをコードする発現ベクターpPRO-His-Adを得た。5' ATCGGGATCCGCCGCTTATATGTA TCGCTC 3' がセンスプライマーである以外は同様の方法で、アディポネクチンのHis標識球状領域(アミノ酸残基110~247)を発現する原核生物用発現ベクターpPRO-His-gAdを構築した。His標識完全長アディポネクチン又はその球状領域のBL21細胞中での発現を、増殖培地への1mMイソプロピル β -D-チオガラクトピラノシドの添加によって誘発した。完全長アディポネクチン又はその球状領域は細菌溶解物からNi-NTAアガロースカラムを使用してメーカー説明書に従って精製した。精製後、N末端標識を組換えTEVプロテアーゼによる切断で除去した。タンパク質の純度はSDS-PAGEとHPLCで確認した。

【0447】

哺乳動物でアディポネクチンを発現させるためのベクターは、5' GCC CGC GGA TCC ATG CTA CTG TTG CAA GCT CT 3' をセンスプライマーとして、また5' GGC CGC GAA TTC TCA C TT GTC ATC GTC GTC CTT GTA GTC GTT GGT ATC ATG GTA GAG 3' をアンチセンスプライマーとして使用してcDNA増幅で生成させた。BamHI/EcoRIで消化後の断片を、C末端にFLAGエピトープを標識として付けた完全長アディポネクチンをコードするpcDNA-Ad-Fを産生させるためにpcDNA3.1ベクターに挿入した。次いでこの発現ベクターを鋳型として使用して、QuikChange部位指定突然変異誘発キットを使用して4リシン(残基68、71、80及び104)をアルギニンに置き換えたアディポネクチン変異体をコードするベクターを構築した。変異原性オリゴヌクレオチドプライマーはメーカー推奨基準に従って、AAGからGCGへのコドン変更(残基68及び80に対応)又はAAAからCGAへのコドン変更(残基71及び104に対応)を盛り込むよう設計した。4リシンすべてをアルギニンに置き換えたFLAG標識アディポネクチン変異体をコードするプラスミド[pcDNA-Ad(K R)-Fと命名]は各部位の逐次突然変異によって

獲得し、またすべての突然変異をDNA配列解析で確認した。

【0448】

これらの哺乳動物用発現ベクターはFuGENE 6トランスフェクション試薬を使用してCOS-7細胞又はHEK-293細胞に導入し、該細胞にアディポネクチンを無血清培地中に48時間分泌させた。次いで培地を回収し、3000×gでの10分間の遠心分離とそれに続く0.2μmフィルターによるろ過で細胞残屑を除去した。40%硫酸アンモニウムを添加し4で一晩攪拌してタンパク質を沈殿させた。8000×gでの1時間の遠心分離の後、ペレットをTBS中に再懸濁させ、MWCO 7000DaのSnakeSkinチューブを使用して同じ緩衝液に対して透析した。FLAG標識アディポネクチンは抗FLAG M2アフィニティゲルを使用して精製し、また150μg/mlのFLAGペプチドで溶出した。

【0449】

抗体の産生 - E. coliから産生されたHisタグ組換えアディポネクチンをフロインド完全アジュバントと混合し、Wistar雌ラットに腹腔内注射(50μg/頭)するか又はNew Zealand雌ウサギに皮下注射(100μg/頭)した。これらの動物にはフロインド不完全アジュバントと混合した同量のタンパク質を2回ブースター注射し、最後のブースター注射の1週間後に採血した。

【0450】

初代培養ラット肝細胞の単離と肝グルコース産生の測定 - 初代培養肝細胞をWistar雄ラット(200g)から、既述の要領で[27]、2段階コラゲナーゼ溶液灌流法により調製した。単離後の細胞は、10%ウシ胎仔血清、10mM Hepes (pH 7.4)、2mM L-グルタチオン、100nMデキサメタゾン及び1mMインスリンを添加したDMEMで3回洗浄した。各洗浄間に細胞を200gで2分間遠心分離した。この手順後のトリパンプルー分染法で推定した細胞生存率は通常80%超であった。細胞はI型コラーゲン塗布(12穴)プレート上の前記培地中に50万個細胞/穴をプレーティングした。細胞を24時間かけて培養ディッシュ上に接着させ、次いで5.5mMグルコース添加、インスリン又はデキサメタゾン無添加のDMEM中で一晩インキュベートした。その後、細胞を種々の濃度のインスリン及び/又はアディポネクチンでさらに24時間刺激した。次いで培地を、各5mMのアラニン、バリン、グリシン、ピルビン酸塩及び乳酸塩を添加したフェノールレッド抜き、無グルコースDMEM 0.5mlに取り換えた。6時間のインキュベーション後、グルコースTrinderアッセイキットを使用して培地のグルコース濃度を測定した。

【0451】

動物と食餌 - 実験動物の愛護に関する施設指針に従って体重25~30gのFVB/N雄マウスを明/暗周期12時間のステンレス鋼金網底ケージに収容した。マウスには脂肪44%、タンパク質16%、糖分5.5%、及びエタノール34%又は対照としての等カロリーのマルトースデキストリンを含む改良高脂肪/低糖分流動食を与えた²¹。エタノール濃度は給餌第1週に17%から34%へと逡増させ、さらに5週間同じ濃度に保った。

【0452】

血清アディポネクチン、TNF- α 及びALT濃度の測定 - 血清アディポネクチン濃度はインハウスRIAにより、アディポネクチンに対するウサギポリクローナル抗体を使用して測定した¹⁹。循環TNF- α は市販ELISAキット(Chemico)を使用して定量した。血清ALT活性は市販試薬(Sigma)を使用して測定した。

【0453】

RNA抽出とノーザンブロット法 - Trizol試薬(Invitrogen)を使用して肝組織から全RNAを抽出した。各試料に由来する全RNA 20μgを変性アガロースゲルによって分離し、ナイロン膜上にブロットし、マウスTNF- α 、FAS又はCD36をそれぞれコードする³³P標識cDNA断片でプローブした。これらのcDNA断片はそれらの特異的プライマーを使用してマウス肝組織由来cDNAのPCR増幅によって得た。各遺伝子の相対的存在量をリン光画像法で定量した。

【0454】

組織分析 - 肝標本を緩衝ホルムアルデヒド(10%)で一晩固定し、パラフィンに包埋した。ヘマトキシリン-エオシン染色切片について脂肪変化、炎症及び壊死の程度を盲式でラ

ランク付けした。肝臓あたり10低倍率視野を調べた。脂肪浸潤の程度は0～4でランク付けしたが、0は無脂肪を、4は細胞の75%超が脂肪を含むことを、それぞれ示す。

【0455】

統計分析 - 実験は群あたり5～6頭のマウスを対象に規定どおり実施し、値を平均±SEとして表わした。分析は表示の代表的データを用いて反復した。統計的有意性は一元配置ANOVAによって決定した。諸々の統計的比較では、0.05>のP値を使用して有意差を示した。

【0456】

実施例2: 多数のアイソフォームとして存在する脂肪細胞分泌アディポネクチン

2-DE分析では未分化3T3-L1前脂肪細胞ではなく脂肪細胞から優先的に発現、分泌される8つのタンパク質スポットが識別された(図1、パネルA及びB)。これらのタンパク質の性質を解明するために、脂肪細胞から回収した分泌タンパク質500 µgを分離用2-DEで分離し、PVDF膜にブロットし、CBBで染色した。N末端アミノ酸配列解析により、これらのタンパク質(スポット1～8)はどれも同じN末端配列(EDDVTTE)を共有することが判明したが、その配列はもっぱら脂肪細胞から発現する分泌タンパク質であるマウスアディポネクチンのアミノ酸残基18～25に紛れもなく対応する[5,7]。この配列決定した断片(EDDVTTE)は推定シグナルペプチド切断部位の直後に位置しており、異種アディポネクチンアイソフォームが分泌時の異なる酵素による切断には起因しないことを示唆する。これらのタンパク質のアディポネクチンとしての独自性は、8種類のタンパク質がどれもマウスアディポネクチンに対する抗体に対して免疫反応性であることを示したウェスタンブロット法でもさらに確認された(図1、パネルC)。E. coliから産生された組換えアディポネクチンの2-DEによる分離では単一スポットだけが検出された(データ不掲載)が、これは脂肪細胞から産生される複数のアディポネクチンアイソフォームの存在が分泌時の翻訳後修飾に起因することを示唆する。COS-7及びHEK-293細胞から一過性に発現、分泌される組換えアディポネクチンの2-DE分析でもまた、このタンパク質の複数アイソフォームが脂肪細胞由来のアディポネクチンと類似するパターンで観測された(データ不掲載)。

【0457】

2-DEで分離したタンパク質の糖鎖検出では、脂肪細胞に由来する6つのアディポネクチンアイソフォーム(スポット3～8)がグリコシル化されていると判明し(図6)、またE. coli産生アディポネクチンでは糖鎖が検出されなかった(データ不掲載)。これはグリコシル化がアディポネクチンの異種性に少なくとも部分的には寄与していることを示唆する。2つのコンセンサスN結合型グリコシル化部位(Asn 53及び233)が存在するものの、N結合型グリコシル化の阻害剤である[28]ツニカマイシンで処理してもグリコシル化パターンには影響がなかった(データ不掲載)ので、アディポネクチンではN結合型グリコシル化の可能性が排除されることになる。エンドグリコシダーゼH処理(endo H treatment)を使用した過去の研究でもアディポネクチンではNグリコシル化は起きないことが確認されている[5]。哺乳動物タンパク質のムチン型Oグリコシル化部位に関するニューラルネットワーク予測を産み出すNetOGlyc 2.0予測サーバー[29]を使用する限りでは、Oグリコシル化することが予測される潜在セリン及びトレオニン残基は存在しなかった。

【0458】

実施例3: コラーゲン様ドメインのいくつかの保存リシン残基上で起こるアディポネクチンのグリコシル化

アディポネクチンについてグリコシル化の特性をさらに解明し、またグリコシル化部位を解析するために、脂肪細胞又は一過性トランスフェクトCOS-7細胞に由来するか又はE. coli細胞に由来する各アディポネクチンアイソフォームからのトリプシン消化ペプチド混合物をMALDI-TOF MSで分析した。これらの試料の質量スペクトルの比較から、6つのグリコシル化アイソフォームだけに存在しE. coli由来の2つの非グリコシル化アディポネクチンアイソフォームには存在しない3つの際立ったペプチド断片(その質量はそれぞれ1679 Da、4260 Da及び4276 Daである)を検出した(図3)。そのうえ、これら3つのトリプシン消化ペプチド断片の質量は非修飾トリプシン消化アディポネクチン断片のいずれにも対応させることができなかった。これはアディポネクチンのグリコシル化がこれら3つの断片内で

起こる可能性のあることを示唆する。

【0459】

これら3つのペプチド断片を単離するため、諸々のグリコシル化アイソフォームからのトリプシン消化ペプチド混合物をプールし、RP-HPLCで分離し、各画分をMALDI-TOF MSで分析した(図4)。この分析により、16.4%のアセトニトリルで溶出した画分Aは質量1679 Daのペプチドを含むことが判明した。質量4276 Da及び4260 Daのペプチドは、それぞれ18%、18.4%のアセトニトリルで溶出された画分B及びC中に検出された。質量1679 Daのペプチドはアミノ酸配列解析によりKGEPGEAAYVYRと確認された。これはマウスアディポネクチンのアミノ酸残基104~115に対応する断片である。質量4260 Da及び4276 Daのペプチドは同じ断片(DGTPGEKGEGDAGLLGPKGETGDVGMTGAEGPR)に由来し、アディポネクチンのアミノ酸残基62~95に対応する。特に、アミノ酸配列解析ではこれら3つのペプチド断片の全アミノ酸残基が、4リシン残基(質量1679 Daペプチドのリシン104、質量がそれぞれ4260 Da及び4276 Daのペプチドのリシン68、71及び80)を除いて、容易に検出された。この結果は、これらのリシン残基が糖鎖などの親水基によって修飾される可能性があること、また通常の液相配列決定法による親水性アミノ酸誘導体の効率的な無極性溶媒抽出は不可能であることを示唆する。これらの4リシン残基が修飾されているとの結論は、これら4リシン残基がアルギニン又はリシンのC末端を特異的に切断するプロテイナーゼであるトリプシンによる消化を受けにくいという所見からも裏付けられた。興味深いことに、これら4リシン残基(Lys 68、71、80及び104)はどれもアディポネクチンのコラーゲン様ドメイン内にあり、周辺モチーフGXKGE(D)を従えている。配列アラインメントから、これら4リシンとその周辺モチーフは諸々のアディポネクチン分子種を通じて保存性がきわめて強いと判明した(図5)。

【0460】

これらの4リシンの修飾を確認するために、前記の3精製ペプチドを6N HClによる110、24時間の加水分解後、さらにアミノ酸分析にかけた。その結果、リシン残基以外のアミノ酸残基はすべて期待モル比で検出されるにもかかわらず、リシン残基は予測位置に存在しないことが判明した(図6)。これらのスペクトルのさらなる分析はこれら3ペプチドのリシン残基がすべてヒドロキシル化されていることを示した。ペプチドBではヒドロキシル化プロリン残基もまた検出された。このヒドロキシプロリンは結局Pro 94(下文を参照のこと)に帰属させた。

【0461】

ヒドロキシル化とそれに続くヒドロキシリシンのグリコシル化による-1,2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシン(GG-Hyl)の形成は、コラーゲン様ドメインを有するいくつかの分泌タンパク質で以前に開示されてきた[30, 31]。我々は、同じタイプの修飾は前記の3単離ペプチド内の4リシン(Lys 68、71、80及び104)でも起こることを決定した。この決定はこれら3ペプチドのMALDI-TOF MSデータの分析によって裏付けられた(図4)。ペプチドAでは、実験的に計測された質量(1679)とその理論質量(1339)との差は340 Daであり、これはグルコシルガラクトシル-ヒドロキシル(GG-Hyl)基の質量とまったく同じである。ペプチドCでは実験的に計測された質量と理論質量の差は1020 Daであり、これはペプチドC内の3つのリシン残基(Lys 68、71及び80)に結合する可能性のある3つのGG-Hyl基に対応する期待質量に相当する。ペプチドBでは実験的に計測された質量(4276 Da)と理論質量の差は1036 Daであり、これは3つのGG-Hyl基に図6で検出されたもう1つのヒドロキシル基をプラスした場合の期待値に相当する。

【0462】

ペプチドB及びCの各リシンは340 Daの結合グリコシド基をもつというこの発見は、アスパラギンのN末端を特異的に切断するエンドプロテイナーゼAsp-Nによるこれら2ペプチドの消化によってさらに裏付けられた。MALDI-TOF分析により、Lys 80を含む断片の実験的に測定された質量はその理論質量よりも340 Daだけ大きかったのに対して、Lys 68及び71を含む断片の実測質量とその理論質量との差は680 Daであった(図7)。この結果もまた、ペプチドB内の追加のヒドロキシル化がプロリン94で起きていることを示差した。プロリ

ン94のヒドロキシル化もまたアミノ酸分析及びアミノ酸配列決定によって確認された。

【0463】

4リシン残基に結合したグリコシドがグルコシルガラクトシル基であることをさらに確認するために、FLAG標識アディポネクチンを一過性に発現するCOS-7細胞を³H-ガラクトース又は³H-グルコースで放射性標識した。これらの細胞培地から精製した放射性標識アディポネクチンのトリプシン消化混合物をRP-HPLCで分画し、ペプチドA、B及びCを図4のように単離した。液体シンチレーションカウンティングにより、³H-ガラクトースと³H-グルコースの両方がこれらの3ペプチドに取り込まれていることが判明した(図8)。

【0464】

実施例5: アディポネクチンのコラーゲン様ドメインでの4リシン(Lys 68、71、80及び104)の置換はそのインスリン増感活性を弱める

アディポネクチンの生物活性に対する4ヒドロキシル化リシンのグリコシル化の作用を調べるために、4リシンをアルギニンに置き換えたアディポネクチン変異体をコードするコンストラクト[pCDNA-Ad(K R)-F]を生成させた。トランスフェクト細胞の³⁵Sメチオニンによるパルスチェイス標識により、アディポネクチン変異体(K R)は野生型アディポネクチンの場合(データ不掲載)とほぼ同じ速度で細胞培地中に分泌されることが明らかとなった。我々は、このようにその分泌にはコラーゲン様ドメインの4リシンに対する修飾が必要とはされないらしいことも発見した。SDS-PAGE分析では、COS-7から分泌される野生型アディポネクチンは分子質量がやや異なる3つのバンドとして移動することが判明した(図9)。上方の2バンドは全アディポネクチンの~85%を占めるが、グリコシル化されていた。その一方、アディポネクチン変異体(K R)は主に、野生型アディポネクチンの2大グリコシル化バンドよりやや速く移動する単一の非グリコシル化バンドからなった。この結果はアディポネクチンのグリコシル化が主にコラーゲン様ドメインの4リシン残基で起こるという我々の決定をさらに確認付けた。

【0465】

最近の研究で、アディポネクチンは初代培養ラット肝細胞でグルコース産生を阻害するインスリンの作用を増強しうることが報告された[9]。この報告とも整合するが、本発明者の研究結果は濃度50pMのインスリンが初代培養ラット肝細胞でのグルコース産生に有意の影響を及ぼさないことを示した(図10)。半値抑制は濃度200pMで観測された。生理的濃度を下回るインスリン濃度のこうした肝グルコース産生抑制能は、哺乳動物細胞から産生されるアディポネクチンにより有意に増強された。20 µg/mlのアディポネクチンの存在下では50pMのインスリンでもグルコース産生を~40%激減させた。ある濃度依存研究によれば、アディポネクチンのEC50は~4 µg/mlのレベル、すなわち生理的アディポネクチン濃度範囲内の濃度であった[15,16]。アディポネクチン変異体(K R)の肝糖新生に対するインスリン増感能は野生型アディポネクチンに比して有意に低下していた。4 µg/mlのアディポネクチン変異体の存在下では、50pMのインスリンはグルコース産生に有意の作用を及ぼさなかったし、また20 µg/mlのアディポネクチン変異体の存在下でも~13%の減少を招いたにすぎない。細菌由来の完全長アディポネクチン(図10)及び球状領域は糖新生抑制というインスリンの肝性作用を増強するような生物学的効果をもたない。

【0466】

実施例6: アディポネクチンのin vivoでの生物学的効果

マウスのアルコール性肝障害モデルを使用して、本明細書で開示の要領で単離したアディポネクチンを哺乳動物に投与したときの効果を評価した。

【0467】

改良高脂肪-対照流動食(HF/LC)及び高脂肪-エタノール流動食(HF/LE)を与えられたマウス³²は6週間の処置期間中ずっと体重が増え続けた。体重増加はHF/LCマウスのほう(7.2±0.6g)がやや大きいものの、HF/LEマウスのそれ(6.8±0.5g)と大差なかった。LE食マウスのエタノール摂取量は約17~19 g/kg-体重/日であった。検死ではLE食マウスの肝/体重比(8.3±0.6%)はLC食マウスのそれ(6.2±0.4%)を有意に上回った(P<0.05)。

【0468】

常習的なエタノール摂取は循環アディポネクチン濃度の有意の低下を招いた。血漿アディポネクチンはHF/LE食給餌の3週間後に $32.1 \pm 2.9\%$ 低下し、また4週間後には $40.3 \pm 4.6\%$ 低下した(図11A)。アディポネクチン濃度の低下は肝障害の発現と密接な相関関係があることは、血清のアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)活性レベルから判定される(図11B)。常習的なHF/LE食の摂取の後では循環アディポネクチン濃度とTNF- α レベルの間に反比例関係が発見された(図11C)。特にアディポネクチンとTNF- α とのインキュベーションは3T3-L1脂肪細胞でのアディポネクチンの発現の著減を招くことが示された³³。アルコール性肝障害の初期段階でのTNF- α 産生はアルコール性肝障害の発現時におけるアディポネクチン産生の低下の少なくとも一因であると考えられる。

【0469】

アルコール性肝障害に対するアディポネクチンの働きを調べるために、他で開示した要領により³⁴、FLAGエピトープ標識マウスアディポネクチンをコードするベクターを一過性にトランスフェクトしたHEK293細胞から完全長の組換えアディポネクチンを発現させ、精製した。HF/LE食を与えて3週間後に、組換えアディポネクチン又は生理食塩水(対照)を30 μ g/日投与するための浸透圧ポンプ(Alzet, Newark, DE)をマウスに埋め込んだ。この用量のアディポネクチン投与は循環アディポネクチン濃度を非処置LEマウスに比して 2.7 ± 0.3 倍上昇させた。アディポネクチン処置は食物摂取量、脂肪組織質量又は体重増加に有意の影響を及ぼさなかったが、2週間にわたる連続アディポネクチン投与は肝/体重比を有意に低下させた(図12A)。それはまた、血清ALT活性のエタノール誘発性の上昇を顕著に緩和した(図12B)。

【0470】

肝標本の組織評価により、HF/LE給餌マウスに限って大きな汎小葉性小滴性及び大滴性脂肪症、並びにまばらな炎症部位の存在が明白になった(図13)。アディポネクチンの投与は脂肪の蓄積を背景レベルへと劇的に低下させ、また炎症をほぼ解消した(顕微鏡下に炎症部位の不存在によって判定)。我々の結果は、マウスのアルコール性肝障害に対するアディポネクチンの防護的な役割を立証した。

【0471】

アディポネクチンの投与は肝臓でのTNF- α 産生と脂肪酸シンターゼ及び脂肪酸運搬体タンパク質CD36の発現を阻害した。

【0472】

肝組織内のクッパー細胞からのTNF- α 産生の増加は、初期アルコール性肝障害の重要な媒介因子でありうる³⁵。我々は、アッセイを終えたばかりの本発明者の仮説は、アディポネクチンはアルコールに誘発されたTNF- α 産生の増加を抑制することによりアルコール性肝障害を緩和しようとする(仮説に縛られたくはないが)。この仮説のアッセイに際して、HF/LEマウスを組換えアディポネクチンで処置すると、アルコールに誘発された循環TNF- α の上昇だけでなく肝中でのこのサイトカインのmRNA産生もまた鈍った(図14)。

【0473】

仮説に縛られるつもりはないが、アディポネクチンはTNF- α 産生を抑制する他に、肝組織内でのTNF- α の傷害作用に直接拮抗する可能性もあると考えられる。アディポネクチンとTNF- α は多数の相互に反対の作用を誘発する。TNF- α は、伝えるところによると、インスリン抵抗性の原因物質であるのに対しアディポネクチンはインスリン感受性を増強させる³⁶。アディポネクチンは抗アテローム発生活性を有するのに^{37, 38}、TNF- α はアテローム性動脈硬化症の発現に寄与する³⁹。これら両ホルモンの拮抗関係は最近、筋細胞で明らかになったが、そこでは両者がグルコース/脂質代謝の調節で互いに相手の作用を妨げる⁴⁰。肝組織では、TNF- α がインスリン感受性を低下させ、また糖新生を増強する一方で、アディポネクチンはまったく正反対の機能を有することが判明した⁹。

【0474】

アルコールはミトコンドリア脂肪酸酸化の阻害によって、又は肝脂質生成経路の活性化によって、肝臓の脂肪浸潤を誘発する。エタノールの酸化はNADH/NAD⁺比を高め、以ってミトコンドリア脂肪酸酸化の要NAD⁺ステップを阻害する⁴¹。さらに、ヒト及びげっ歯類では

常習的なエタノール摂取は脂質生成経路で主要酵素の発現を誘発することにより脂肪酸合成を増加させる可能性がある^{42, 43}。

【0475】

次に、アディポネクチンがこれらの過程のいずれかを妨げることにより肝臓の脂肪蓄積を抑制するかどうかを調べた。過去の報告とも整合するが⁴¹、HF/LE食の常習的な摂取は肝NADH/NAD⁺比を有意に上昇させ、また脂肪酸シンターゼ(FAS)mRNAの存在量を有意に増加させた(図14)。アディポネクチン処置は上昇後のNADH/NAD⁺比には何の効果もなかったが、FAS mRNAの発現を著しく減少させた(図14)。さらに脂肪酸運搬体タンパク質CD36の発現はアディポネクチン処置後に著しく阻害された。

【0476】

アディポネクチンの他の代謝効果もまたアルコール性肝脂肪蓄積の抑制に寄与する可能性があることに注目するのも重要である。たとえばアディポネクチンの短縮型C00H末端球状領域断片のin vivo投与は循環遊離脂肪酸及びトリグリセリドのクリアランスを高めると判明しているが⁴、それは肝臓への脂肪酸流入源を縮小することになる。アルコール性障害後のNADH/NAD⁺比の上昇は影響を受けないが、アディポネクチンが他の機序によって肝臓のミトコンドリア酸化を直接促進するという可能性はなお残る。実際、もっと最近の研究では、完全長アディポネクチンがラット肝細胞の5'-AMP活性化キナーゼを活性化すると判明しており、それはアセチル-CoAカルボキシラーゼ(ACC)をリン酸化し、またこの酵素の活性を弱めることになる³⁰。肝細胞中のACCの不活性化はその生成物すなわちマロニル-CoAの濃度の低下を招き、以って肝組織中の脂肪酸酸化を誘発するであろう³¹。このように、アディポネクチンは、多数の協調的な代謝経路を調節することによってアルコール性脂肪肝をなくすることができる(図15)。

【0477】

過剰な肝脂肪蓄積の減少に対するアディポネクチンのこうした著しい効果は、インスリン抵抗性の患者におけるアディポネクチン不足と肝脂肪蓄積との密接な相関とも整合する⁴⁴。特に四塩化炭素で処置したマウスに由来する肝臓では、大量のアディポネクチンが蓄積し肝細胞に近接する細胞外マトリックスに結合していることが判明した⁴⁵。該ホルモンは、CCl₄誘発肝障害の修復過程に関係する抗炎症因子として作用しうる。

【0478】

アディポネクチン又はそのアゴニストは抗糖尿病及び抗アテローム発生薬としての可能性だけでなく¹、新規な肝疾患処置薬としての可能性をも秘めている。

【0479】

実施例7: 考察

アディポネクチンの抗糖尿病作用は最近の何件かの報告で別個に示されている。しかしながら、どの種類のアディポネクチンが機能的に活性なのはなお議論の的になっている。LodishらとKadowakiらの研究報告では、アディポネクチンの球状ドメインに対応する短縮型断片が高血糖の低下とインスリン抵抗性の解消に有効であることが明らかとなった。細菌由来の完全長アディポネクチンは活性を示さなかった[10, 11]。これらの発見の生理学的関係は不確かである。大多数の血清アディポネクチンは見掛けMWが30 kDaの完全長タンパク質として存在する[5, 6]。2-DE分離タンパク質を免疫沈降法、ウェスタンブロット法どちらで分析しても(データ不掲載)、ヒト及びマウス血清中にアディポネクチンのいかなるタンパク質分解断片も検出することができなかった。さらにアミノ末端配列分析により、脂質細胞から分泌される主要アディポネクチンアイソフォームはいずれも同じN末端を共有すると判明したが(図1)、それはこのタンパク質が分泌時に細胞内で切断されていないことを示唆する。Lodishらは25 kDaの弱いバンドを報告したが、この実験は免疫沈降法、ウェスタンブロット法のどちらにも同じ抗体を使用しているため、MWが~25 kDaの抗体L鎖をも視覚化してしまったという可能性がある。

【0480】

これらの報告とは対照的に、Schererらは哺乳動物細胞に由来する完全長アディポネクチンがいくつかの糖尿病動物モデルで高血糖を実際に低下させることができたのに対し、

E. coli由来の完全長アディポネクチンはその球状ドメインも含めてそうした活性をもたないことを報告した[9]。

【0481】

2-DE分析では脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンは広範囲に修飾を受けてpIやMWの異なる多数のアイソフォームになることが判明したが、この異質性はグリコシル化によって少なくとも部分的には説明がつく(図1及び図2)。グリコシル化されていないアイソフォームとグリコシル化されているアイソフォームの質量スペクトルを比較すると、コラーゲン様ドメイン内の4リシン(Lys 68、71、80及び104)を潜在グリコシル化部位として識別することができる(図3)。これら4リシンがグリコシル化されているという結論は次のような証拠からもさらに裏付けられた: 第1に、これら4リシンは配列を決定することができず、またトリプシン切断にも強かったが、それは4リシンが修飾されている可能性のあることを示唆する。第2に、アミノ酸分析によりこれら4リシンがどれもヒドロキシ化されていることが判明した(図6)。第3に、アディポネクチンのグリコシル化はこれら4リシンのアルギニンへの置換後に大幅に鈍る(図9)か、又はヒドロキシラーゼ阻害物質である、 α -ジピリジルによる処理後に大幅に鈍った(未公開の研究結果)。特に、これら4部位でのヒドロキシリシルグリコシル化は脂肪細胞分泌アディポネクチン全体の85%超を占める6大グリコシル化アイソフォームのいずれでも検出されたが、それはこのグリコシル化がアディポネクチンに見られる主要な翻訳後修飾の1つであることを示唆する。興味深いことに、これら4リシン残基はどれも、これまでに同定された諸々のアディポネクチン分子種を通じて保存性がきわめて強いコンセンサス配列のGXKGE(D)内に位置する(図5)。

【0482】

リシンのヒドロキシ化とそれに続くガラクトース及びグルコースによるグリコシル化、グルコシルガラクトシルヒドロキシリシン(GlcGaHyl-Lys)の形成は過去に、コラーゲン様ドメインをもつ多数の分泌タンパク質たとえば補体成分C1q及び肺表面活性タンパク質などで観測されてきた[30]。この修飾の機能的な関連性は目下不明である。4リシンに結合したグリコシドがグリコシルガラクトシル基でありうることを示唆するような証拠は挙がっている。質量分析ではリシン80及び104上のグリコシド基の質量は340 Daであったが、これはGlcGaHyl残基の期待サイズである(図7)。放射性標識実験で、グリコシドが ^3H -ガラクトースと ^3H -グルコースの両方を含むことも判明した(図8)。

【0483】

4ヒドロキシ化リシンのグリコシル化がもつ生理学的な重要性は、アディポネクチン変異体(K R)使用の機能分析によって示唆された。そこでは、これらの残基のアルギニンによる置換は生理的濃度を下回る濃度のアディポネクチンの、グルコース産生を抑制するインスリンの対肝作用を増強する機能を著しく弱めることが示された。この結果はまた、コラーゲン様ドメインもアディポネクチンのインスリン増感機能に関与することを際立たせた。コラーゲン様ドメインでこれら4リシンに結合したグリコシドがアディポネクチンのインスリン増感効果を増強する機序はなお不明である。4リシン残基のうち1残基だけをアルギニンに置換したアディポネクチン変異体のインスリン増感能は、野生型アディポネクチンのそれをずっと下回ったが、4つの部位すべてで変異を起こした変異体のそれ(データ不掲載)を有意に上回った。これは各リシンに結合したグリコシドが協調的に機能する可能性のあることを示唆する。これらのグリコシドはリガンド-受容体相互作用に直接関わっているかもしれない。あるいはそれは適正なフォールディングと生物学的機能に必要とされる3次元構造の安定化にとって重要なかもしれない。これらの可能性は発明者の研究施設で目下研究中である。

【0484】

また、マウスアディポネクチンのマウス体内の循環濃度は高脂肪の含エタノール食の常習的な摂取後に著しく低下することも明らかにすることができた。組換えマウスアディポネクチンをこれらマウスに投与すると肝腫脹と及び脂肪症(脂肪肝)の劇的な緩和、及び炎症と高レベルの血清アラニンアミノトランスフェラーゼの著しい後退が見られた。マウスアディポネクチン処置はTNF- α の肝産生を、また脂肪酸シンターゼと脂肪酸運搬体タンパ

ク質CD36の発現を、低下させることが判明した。

【 0 4 8 5 】

【 表 1 】

文献リスト：

1. Molina, P.E. et al. *Molecular pathology and clinical aspects of alcohol-induced tissue injury*. Alcoholism: Clin. Exp. Res. 26, 120-128 (2002).
2. Stewart, S., Jones, D. & Day, C.P. Alcoholic liver disease: new insights into mechanisms and preventative strategies. Trends Mol. Med. 7, 408-413 (2001).
3. Tsukamoto, H. & Lu, S.C. Current concepts in the pathogenesis of alcoholic liver injury. FASEB J. 15, 1335-1349 (2001).
4. Diehl, A.M. Cytokine regulation of liver injury and repair. Immunol. Rev. 174, 160-171 (2000).
5. Tilg, H. & Diehl, A.M. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. New Eng. J. Med. 343, 1467-1476 (2000).

【表 2】

6. Thurman, R.G. et al. Mechanisms of alcohol-induced hepatotoxicity: studies in rats. *Front. Biosci.* 4, e42-46 (1999).
7. McClain, C.J., Barve, S., Deaciue, J., Kugelmas, M. & Hill, D. Cytokines in alcoholic liver disease. *Semin. Liver Disease* 19, 205-219 (1999).
8. Adachi, Y., Bradford, B.U., Gao, W., Bojes, H.K. & Thurman, R.G. Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury. *Hepatology* 20, 453-460 (1994).
9. Jarvelainen, H.A. et al. Kupffer cell inactivation alleviates ethanol-induced steatosis and CYP2E1 induction but not inflammatory responses in rat liver. *J. Hepatol.* 32, 900-910 (2000).
10. Imuro, Y., Gallucci, R.M., Luster, M.I., Kono, H. & Thurman, R.G. Antibodies to tumor necrosis factor alpha attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. *Hepatology* 26, 1530-1537 (1997).
11. Yin, M. et al. Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology* 117, 942-952 (1999).
12. Enomoto, N. et al. Thalidomide prevents alcoholic liver injury in rats through suppression of Kupffer cell sensitization and TNF-alpha production. *Gastroenterology* 123, 291-300 (2002).
13. Berg, A.H., Combs, T.P. & Scherer, P.E. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 13, 84-89 (2002).
14. Shaprio, L. & Scherer, P.E. The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Curr. Biol.* 8, 335-338 (1998).
15. Maeda, N. et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat. Med.* 8, 731-737 (2002).
16. Yamauchi, T. et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat. Med.* 7, 941-946 (2001).

【表 3】

17. Fruebis, J. et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 2005-2010 (2001).
18. Berg, A.H., Combs, T.P., Du, X., Brownlee, M. & Scherer, P.E. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat. Med* 7, 947-953 (2001).
19. Wang, Y., Xu, A., Knight, C., Xu, L.Y. & Cooper, G.J. Hydroxylation and glycosylation of the four conserved lysine residues in the collagenous domain of adiponectin. Potential role in the modulation of its insulin-sensitizing activity. *J. Biol. Chem.* 277, 19521-19529 (2002).
20. Yokota, T. et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood* 96, 1723-1732 (2000).
22. Hotta, K., et al., *Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys.* *Diabetes*, 2001. 50(5): p. 1126-1133.
23. Lindros, K.O. & Jarvelainen, H.A. A new oral low-carbohydrate alcohol liquid diet producing liver lesions: a preliminary account. *Alcohol Alcoholism* 33, 347-353 (1998).
24. Fasshauer, M., Klein, J., Neumann, S., Esslinger, M. & Paschke, R. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 1084-1089 (2002).
25. Stepan, C.M. & Lazar, M.A. Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Trends Endocrinol. Metab.* 13, 18-23 (2002).
26. Ouchi, N. et al. A novel adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 100, 3967 (1999).
27. Ouchi, N. et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 100, 2473-2476 (1999).
28. Ross, R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *New Eng. J. Med.* 340, 115-126 (1999).

【表 4】

29. Eaton, S., Record, C.O. & Bartlett, K. Multiple biochemical effects in the pathogenesis of alcoholic fatty liver. *Eur. J. Clin. Invest.* 27, 719-722 (1997).
30. You, M., Fischer, M., Deeg, M.A. & Crabb, D.W. Ethanol induces fatty acid synthesis pathways by activation of sterol regulatory element-binding protein (SREBP). *J. Biol. Chem.* 277, 29342-29347 (2002).
31. Siler, S.Q., Neese, R.A. & Hellerstein, M.K. De novo lipogenesis, lipid kinetics, and whole-body lipid balances in humans after acute alcohol consumption. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 928-936 (1999).
32. Funabiki, A., Maeda, K., Ishihara, K., Okada, Y. & Kasuga, M. Adiponectin is associated with insulin resistance in liver. *Diabetes* 51 (suppl 2), A32 (2002).
33. Yoda-Murakami, M. et al, Change in expression of GBP28/adiponectin in carbon tetrachloride-administrated mouse liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 372-377 (2001).

他の文献：

- Bradley, R.L., K.A. Cleveland, and B. Cheatham, *The adipocyte as a secretory organ: mechanisms of vesicle transport and secretory pathways*. Recent Progress in Hormone Research, 2001. 56: p. 329-58.
- Fruhbeck, G., et al., *The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation*. American Journal of Physiology - Endocrinology & Metabolism, 2001. 280(6): p. E827-47.
- Kim, S. and N. Moustaid-Moussa, *Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte*. Journal of Nutrition, 2000. 130(12): p. 3110S-3115S.
- Steppan, C.M. and M.A. Lazar, *Resistin and obesity-associated insulin resistance*. TRENDS in endocrinology & metabolism, 2002. 13(1): p. 18-23.
- Scherer, P.E., et al., *A Novel Serum-Protein Similar to C1q, Produced Exclusively in Adipocytes*. Journal of Biological Chemistry, 1995. 270(45): p. 26746-26749.
- Nakano, Y., et al., *Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma*. Journal of Biochemistry, 1996. 120(4): p. 803-12.

【 0 4 8 6 】

当然ながら、本明細書に収めた実施例及び実施態様はもっぱら例証が目的であり、それらに照らした種々の変更態様又は修正が当業者には思い浮かぶであろうが、それらもまた本明細書の精神と範囲並びに添付請求項の範囲に包含される。本明細書で引用した諸々の出版物、特許及び特許出願は参照により本明細書にその全体が組み込まれるが、それはあたかも各個別出版物、特許及び特許出願が参照により組み込まれる旨を個別的具体的に指示されているのと同様である。

【図面の簡単な説明】

【 0 4 8 7 】

【図1】図1は2次元電気泳動法(2-DE)による脂肪細胞分泌タンパク質の分離及び複数のアディポネクチンアイソフォームである。サブコンフルエントな3T3-L1前脂肪細胞(A)又は分化誘導8日後の脂肪細胞(B)をPBSで3回すすぎ洗いし、次いで無血清DMEMで4時間インキュベートした。培地を回収、濃縮し、各試料から50 μ gのタンパク質を2-DEで分離し、実験的方法(実施例1)で開示するように銀染色法で視覚化した。脂肪細胞で選択的に分泌されたタンパク質を番号付きの矢印で示した。(C)では脂肪細胞からの分泌タンパク質を前述の2-DEで分離し、ニトロセルロース膜にブロットし、ウサギ抗アディポネクチン抗体により1:1000希釈で検出した。矢印で示した8つのタンパク質はすべて抗アディポネクチン抗体に対して免疫反応性である点に注意。

【図2】図2は2-DE分離後の脂肪細胞分泌生成物の糖タンパク質の検出を示す。脂肪細胞の培地から回収したタンパク質200 μ gを図1の要領で2-DEにより分離し、ニトロセルロース膜にブロットし、糖タンパク質検出用の免疫ブロット法キットを使用して検出した。図1と同様に番号付きの矢印で8種類のアディポネクチンアイソフォームを示した。

【図3】図3は種々のアディポネクチンアイソフォームに由来するトリプシン消化ペプチド混合物のMALDI-TOF質量スペクトルを示す。細菌産生アディポネクチン(A)、脂肪細胞分泌アディポネクチンのアイソフォーム1(B)及びアイソフォーム3(C)、それにCOS-7細胞中で発現したアディポネクチンのアイソフォーム3(D)をトリプシンによりゲル内消化し、トリプシン消化物をMALDI-TOF MSで分析した。矢印で示した3つのペプチド(質量1679、4260及び4276 Da)は2つの非グリコシル化アイソフォーム(1及び2)又は細菌産生アディポネクチンではなく、脂肪細胞とCOS-7細胞の両方で産生されたすべてのグリコシル化アイソフォーム(3~8)で、再現可能に観測されたことに注意。

【図4】図4はアディポネクチン由来のトリプシン消化ペプチドのRP-HPLC、MALDI-TOF MS及びアミノ酸配列解析による分画及び解析を示す。2-DEで分離したすべてのグリコシル化アディポネクチンアイソフォームをゲルから切り出し、プールし、トリプシンで消化した。トリプシン消化ペプチド混合物をRP-HPLCで分離した。各画分を回収してMALDI-TOF MSで分析した。質量1679、4260及び4276 Daのペプチドを含む3つの画分をそれぞれA、B及びCで示した。下部の表はこれら3ペプチドのアミノ酸配列、実測質量、理論質量及び質量差を示す。

【図5】図5は、アディポネクチンのコラーゲン様ドメインの4つの修飾リシン(マウス付番方式で残基番号68、71、80及び104)がどの種でも観察されることを示す。マウス、ヒト、ウシ、サル及びイヌの各アディポネクチンの配列はそれぞれ登録番号BAB22597、NP_004788、AAK58902、AAK92202及びAAL09702で参照する。4つの修飾リシンとそれらの周辺モチーフは強調表示してある。

【図6】図6は図4で分離した3つのトリプシン消化ペプチドのアミノ酸分析を示す。ペプチドA(質量1679 Da)、ペプチドB(質量4260 Da)及びペプチドC(質量4276Da)を6N HClにより110℃で24時間消化し(この処理で糖残基は分解されたが、ヒドロキシリシン及びヒドロキシプロリンの検出と定量はなお可能であった[26])、遊離アミノ酸残基をPITCで誘導体化し、421アミノ酸分析機で分析した。a:アミノ酸標品スペクトル、b: ヒドロキシプロリン標品スペクトル、c: ヒドロキシリシン標品スペクトル、d: ペプチドAスペクトル、e: ペプチドCスペクトル、f: ペプチドBスペクトル。

【図7】図7はAsp-N消化ペプチドB及びC由来のペプチド混合物のMALDI-TOF MSスペクトルを示す。図4で分離したペプチドC(I)及びB(II)をAsp-Nでさらに消化してから、MALDI-TOF MSにより図3の場合と同様に分析した。各ピークの上にペプチド配列と各質量に帰属させられる潜在的な修飾を示した。Pro94のヒドロキシ化プロリンとしての帰属もまたアミノ酸分析によって確認されたことに注意。

【図8】図8は4つのヒドロキシリシン上のグリコシドがグルコシル及びガラクトシル基を含むことを示す。COS-7細胞にpcDNA-Ad-Fを導入し、次いで100 μ Ci/ml 3H-1-ガラクトース/DMEM+2mMグルコースで48時間又は100 μ Ci/ml 3H-1-グルコース/DMEM+2mMガラクトースで48時間、放射性標識した。FLAG標識アディポネクチンを細胞培地から精製し、未標識又は放射性標識アディポネクチンに由来するトリプシン消化ペプチド混合物を図4の要領でR

P-HPLCにより分離しペプチドA、B及びCを得た。放射能を比較するため各ペプチドを分取し液体シンチレーションカウンターにかけた。

【図9】図9はFLAG標識アディポネクチン変異体(K R)の発現と糖鎖検出を示す。COS-7細胞にpcDNA-Ad-F又はpcDNA-Ad(K R)-Fを導入した。(注: pcDNA-Ad-FはFLAG標識野生型マウスアディポネクチンを発現するpcDNAベクターであり、且つpcDNA-Ad(K R)-Fは野生型分子ではヒドロキシル化及びグリコシル化されているのが普通である4リシン残基をアルギニン残基に変化させたマウスアディポネクチン変異体を発現させる同等ベクターである。) 48時間後にFLAG標識アディポネクチン又はアディポネクチン変異体(K R)を細胞培地から精製した。各試料からタンパク質500ngを、15% SDS-PAGEで分離し、Coomassie Brilliant Blue (CBB)で染色する(パネルA)か又は糖タンパク質検出用免疫ブロットキットで検出した(パネルB)。アディポネクチン変異体(K R)では大半のグリコシル化が解消されていることに注意。

【図10】図10は初代培養ラット肝細胞でのインスリン誘発型のグルコース産生阻害に対するアディポネクチン及びアディポネクチン変異体の効果を示す。上パネル(パネルA)は、COS-7細胞産生アディポネクチン又はアディポネクチン変異体(K R) 20 µg/ml又は細菌産生アディポネクチン20 µg/mlの存在又は不存在下に逓増量のインスリンで処理した後の肝細胞グルコース産生の阻害を示す。下パネル(パネルB)は50pMのインスリンと逓増量のCOS-7細胞産生アディポネクチン又はアディポネクチン変異体(K R)で処理した後の肝細胞グルコース産生の阻害を示す。結果は、非処理細胞のグルコース産生に対するグルコース産生減少率として、また平均値±標準偏差(n=4)として表わしている。Ad: COS-7細胞由来のアディポネクチン; Ad variant: COS-7細胞由来のアディポネクチン変異体(K R); pAd: E.coli由来のアディポネクチン。

【図11】図11は常習的なアルコール摂取が血清アディポネクチンを減少させ、TNF- α を増加させ、また肝障害を誘発することを示す。マウスに高脂肪(HF)の対照流動食を与えた後(破線)又は高脂肪の含エタノール食を与えた後(実線)に血漿試料を採取し、次いでテキスト中の説明のようにアディポネクチン(A)、ALT (B)及びTNF- α (C)の各濃度を定量した。*P<0.05エタノール食対対照食 (n=6)。

【図12】図12はアディポネクチンによる処理がマウスのアルコール誘発性の肝:体重比(A)及び血漿ALT濃度(B)の上昇を無効にすることを示す。5週間にわたる対照流動食(LC)、エタノール流動食(LE)又はエタノール流動食+最後2週間のアディポネクチン処理(LE+Ad)の後、血漿試料を採取し検死で肝:体重比(A)と血清ALT濃度(B)を求めた(n=5)。*P<0.05 LE食だけを与えたマウスとの比較。

【図13】図13はアルコール性の脂肪症及び炎症に対するアディポネクチンの効果を示す。5週間にわたる対照流動食(LC)、エタノール流動食(LE)又はエタノール流動食+最後2週間のアディポネクチン処理(LE+Ad)の後、マウス肝標本を採取してオイルレッドO(上パネル)又はヘマトキシリン+エオシン(下パネル)で染色した。結果は6回の独立実験に由来する代表的な顕微鏡写真である。

【図14】図14はアディポネクチンが脂肪酸シンターゼ(FAS)及びCD36のmRNA発現を減らし肝臓中のTNF- α 産生を抑える(A)ことを示す。対照流動食、アルコール流動食又はアディポネクチン処理アルコール流動食を与えたマウスの肝臓に由来する全RNAを抽出し、³³P標識したTNF- α 、FAS又はCD36をそれぞれ使用しノーザンブロット法で分析した(B)。パネルAの結果をリン光画像法で定量した(n=5)。すべてのRNA濃度は16S RNAの存在度を基にした標準化の後に、非処理HF/LCペア対照食に対する相対値として表わしている(C)。血漿中TNF- α レベルはChemicoのELISAキットを使用して定量した(n=5)。**P<0.01 HF/LE食対HF/LE食+アディポネクチン処理、FAS=脂肪酸シンターゼ、TNF- α =腫瘍壊死因子アルファ。

【図15】図15はアディポネクチンの肝保護作用の根底にある潜在的機序の略図である。FA=遊離脂肪酸、ACC=アセチルCoAカルボキシラーゼ、AMPK=5'-AMP活性化キナーゼ、FAS=脂肪酸シンターゼ、TNF- α =腫瘍壊死因子アルファ。

【図16】図16は、アディポネクチンのコラーゲン様ドメイン内の数個の保存リシン残基(マウスアディポネクチンのLys 68、71、80及び104又は他生物種やアディポネクチン変異

体の対応する残基)のグリコシル化及びヒドロキシ化、それに周辺モチーフのGXKGE(D)を示す。

【手続補正書】

【提出日】平成15年11月13日(2003.11.13)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項184

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項184】

アディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチドは次のうちの1つ又は複数から選択される請求項183に記載の製剤又は剤形：

i) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する1以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド

ii) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1又は複数による、i)に定義したアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド

iii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する2以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド

iv) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1又は複数による、iii)に定義したアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド

v) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する3以上のリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド

vi) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1又は複数による、v)に定義したアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド

vii) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する4つすべてのリシン残基がグリコシル化されているアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド

viii) グリコシル化がグルコシルガラクトシル部分、グルコシルグルコシル部分、ガラクトシルグルコシル部分又はガラクトシルガラクトシル部分のいずれか1又は複数による、vii)に定義したアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド

ix) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンであるアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド、及び

x) ヒトアディポネクチンのリシン残基65、68、77及び101に対応する残基が -1-2-グルコシルガラクトシル-0-ヒドロキシリシンであり、且つヒトアディポネクチンのプロリン残基91に対応する残基がヒドロキシプロリンではないアディポネクチン又はアディポネクチンアゴニストポリペプチド。

【手続補正2】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項288

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項288】

アディポネクチン及び/又はアディポネクチンの作用部位のアゴニストの使用であって、TNF- α レベルを、投与なしに存在していたであろう又はおそらく存在していたであろうレベル以下に抑制するのに有効な投与単位又は医薬組成物の製造における他の1又は複数の材料(賦形剤、補助剤、希釈剤等及び/又は投与単位を規定する容器)と一緒に使用。

【手続補正3】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項291

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項291】

製造品であって、

アディポネクチン及び/又はアディポネクチン作用部位のアゴニストを含む容器；

TNF- α 疾患又は障害及び/又はTNF- α 疾患又は障害の何らかの特徴の処置、緩和、予防及び/又は逆転への使用に有効であるアディポネクチン又はアディポネクチン作用部位のアゴニストの(たとえば該容器に入れた状態での)使用に関する説明書を含んで成る又は含む製造品。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/NZ03/00002
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl. ⁷ : C07K 14/47; A61K 38/17; A61P 29/00, 9/12, 1/16, 17/06; G01N 33/53; C12Q 1/68		
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)		
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) STN searched: Medline, Chemical Abstracts, WPIDS, BIOSIS. Keywords: Adiponectin, ACRP30, ADIPOQ, GBP28, GLYCOSYL?, GLUCOS?, GALACTOS?		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Medline Abstract, AN 2000172546, PubMed ID: 10707555, & Matsuzawa, Y., "Adipocyte function and insulin resistance", NIPPON RINSHO. (JAPANESE JOURNAL OF CLINICAL MEDICINE), February 2000, Vol. 58, No. 2, pages 338-343	1, 2, 63, 68, 99, 134, 138, 152-154, 158-161, 169, 173, 275-279, 281, 288-291
X	Chemical Abstracts, Vol. 136, abstract No. 292301, & Ouchi, N et al, "Role of adipocytes in multiple risk factor syndrome", DIABETES FRONTIER, 2001, Vol. 12, No. 3, pages 340-345	1, 2, 63, 68, 99, 134, 138, 152-154, 158-161, 169, 173
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input type="checkbox"/> See patent 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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 May 2003		Date of mailing of the international search report 19 MAY 2003
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustalia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929		Authorized officer GAVIN THOMPSON Telephone No : (02) 6283 2240

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/NZ03/00002

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Berg, A. H. et al, "The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action", NATURE MEDICINE, Vol. 7, No. 8, August 2001, pages 947-953 See abstract	1, 2, 63, 68, 99, 134, 138, 152-154, 158-161, 173
X	Combs, T. C. et al, "Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30", THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, Vol. 108, No. 12, December 2001, pages 1875-1881 See abstract	1, 2, 63, 68, 99, 134, 138, 152-154, 158-161, 173
P, X	Wang, Yu et al., "Hydroxylation and glycosylation of the four converted lysine residues in the collagenous domain of adiponectin", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 277, No. 22, 31 May 2002, pages 19521-19529 See abstract	1-291

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

F I

テーマコード(参考)

4 H 0 4 5

A 6 1 P 1/18
 A 6 1 P 3/04
 A 6 1 P 3/06
 A 6 1 P 3/08
 A 6 1 P 3/10
 A 6 1 P 5/00
 A 6 1 P 7/00
 A 6 1 P 7/06
 A 6 1 P 9/00
 A 6 1 P 9/02
 A 6 1 P 9/04
 A 6 1 P 9/06
 A 6 1 P 9/10
 A 6 1 P 9/12
 A 6 1 P 9/14
 A 6 1 P 11/00
 A 6 1 P 11/02
 A 6 1 P 11/06
 A 6 1 P 11/08
 A 6 1 P 13/10
 A 6 1 P 13/12
 A 6 1 P 15/00
 A 6 1 P 15/12
 A 6 1 P 17/06
 A 6 1 P 19/00
 A 6 1 P 19/02
 A 6 1 P 19/10
 A 6 1 P 21/04
 A 6 1 P 25/00
 A 6 1 P 25/14
 A 6 1 P 25/16
 A 6 1 P 25/28
 A 6 1 P 25/32
 A 6 1 P 27/02
 A 6 1 P 27/06
 A 6 1 P 27/14
 A 6 1 P 29/00
 A 6 1 P 31/04
 A 6 1 P 31/06
 A 6 1 P 31/12
 A 6 1 P 31/14
 A 6 1 P 31/16
 A 6 1 P 31/20
 A 6 1 P 31/22
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 35/04
 A 6 1 P 37/02

A 6 1 P 3/06
 A 6 1 P 3/08
 A 6 1 P 3/10
 A 6 1 P 5/00
 A 6 1 P 7/00
 A 6 1 P 7/06
 A 6 1 P 9/00
 A 6 1 P 9/02
 A 6 1 P 9/04
 A 6 1 P 9/06
 A 6 1 P 9/10
 A 6 1 P 9/10
 A 6 1 P 9/12
 A 6 1 P 9/14
 A 6 1 P 11/00
 A 6 1 P 11/02
 A 6 1 P 11/06
 A 6 1 P 11/08
 A 6 1 P 13/10
 A 6 1 P 13/12
 A 6 1 P 15/00
 A 6 1 P 15/12
 A 6 1 P 17/06
 A 6 1 P 19/00
 A 6 1 P 19/02
 A 6 1 P 19/10
 A 6 1 P 21/04
 A 6 1 P 25/00
 A 6 1 P 25/14
 A 6 1 P 25/16
 A 6 1 P 25/28
 A 6 1 P 25/32
 A 6 1 P 27/02
 A 6 1 P 27/06
 A 6 1 P 27/14
 A 6 1 P 29/00
 A 6 1 P 29/00
 A 6 1 P 31/04
 A 6 1 P 31/06
 A 6 1 P 31/12
 A 6 1 P 31/14
 A 6 1 P 31/16
 A 6 1 P 31/20
 A 6 1 P 31/22
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 35/04
 A 6 1 P 37/02

1 0 1

1 0 1

A 6 1 P	37/08	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	39/00	A 6 1 P	39/00	
A 6 1 P	41/00	A 6 1 P	41/00	
A 6 1 P	43/00	A 6 1 P	43/00	1 0 1
C 0 7 K	16/26	A 6 1 P	43/00	1 0 5
C 1 2 N	5/10	A 6 1 P	43/00	1 1 1
C 1 2 Q	1/02	A 6 1 P	43/00	1 2 1
C 1 2 Q	1/68	C 0 7 K	16/26	
G 0 1 N	33/50	C 1 2 Q	1/02	
G 0 1 N	33/53	C 1 2 Q	1/68	A
G 0 1 N	33/68	G 0 1 N	33/50	P
// C 1 2 N	15/09	G 0 1 N	33/53	D
		G 0 1 N	33/68	
		C 1 2 N	5/00	B
		A 6 1 K	37/02	
		A 6 1 K	37/26	
		C 1 2 N	15/00	A

- (31)優先権主張番号 523410
 (32)優先日 平成14年12月23日(2002.12.23)
 (33)優先権主張国 ニュージーランド(NZ)
 (31)優先権主張番号 60/436,178
 (32)優先日 平成14年12月23日(2002.12.23)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/436,148
 (32)優先日 平成14年12月23日(2002.12.23)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(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,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

- (72)発明者 シュー, アイミン
 ニュージーランド国, オークランド, マウント イーデン, ドミニオン ロード 4 4 7 エー
 (72)発明者 ワン, ユー
 ニュージーランド国, オークランド, マウント イーデン, ドミニオン ロード 4 4 7 エー
 (72)発明者 クーパー, ガース ジェイムス スミス
 ニュージーランド国, オークランド, ポンソンビー, クランマー ロード 2

F ターム(参考) 2G045 BA11 CA25 CB01 DA14 DA36 FA36 FB02 FB03 FB05 FB06
 FB08
 4B024 AA01 AA11 BA01 CA01 CA12 DA02 GA05 HA12
 4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ08 QQ53 QQ91 QQ96 QR08 QR32 QR48
 QR55 QR62 QR77 QS24 QS25 QS32 QS33 QS34
 4B065 AA90X AA90Y AB04 AC14 BA08 CA24 CA25 CA44 CA46
 4C084 AA02 AA03 AA07 BA02 BA08 BA22 BA23 BA44 CA18 CA25
 DB01 DB34 MA02 NA14 ZA011 ZA021 ZA081 ZA151 ZA161 ZA331
 ZA341 ZA361 ZA421 ZA431 ZA441 ZA451 ZA541 ZA551 ZA591 ZA681
 ZA751 ZA811 ZA891 ZA961 ZA971 ZB051 ZB071 ZB111 ZB131 ZB151

ZB211 ZB261 ZB271 ZB331 ZB351 ZC021 ZC022 ZC031 ZC032 ZC331
ZC351 ZC371 ZC391 ZC541 ZC751
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA53 CA40 DA30 DA76 EA25
EA30 EA50 FA72

专利名称(译)	脂联素的Glyco同种型及其用途		
公开(公告)号	JP2005535561A	公开(公告)日	2005-11-24
申请号	JP2003562152	申请日	2003-01-17
[标]申请(专利权)人(译)	普罗特米克斯公司		
申请(专利权)人(译)	- 蛋白拌匀公司Rimitido		
[标]发明人	シューアイミン ワンユー クーバーガースジェイムススミス		
发明人	シュー,アイミン ワン,ユー クーバー,ガース ジェイムス スミス		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K38/28 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/08 A61P3/10 A61P5/00 A61P7/00 A61P7/06 A61P9/00 A61P9/02 A61P9/04 A61P9/06 A61P9/10 A61P9/12 A61P9/14 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P11/08 A61P13/10 A61P13/12 A61P15/00 A61P15/12 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P25/32 A61P27/02 A61P27/06 A61P27/14 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/06 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/16 A61P31/20 A61P31/22 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/02 A61P37/08 A61P39/00 A61P41/00 A61P43/00 C07K14/575 C07K16/26 C12N5/10 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/08 A61P3/10 A61P5/00 A61P7/00 A61P7/06 A61P9/00 A61P9/02 A61P9/04 A61P9/06 A61P9/10 A61P9/12 A61P9/14 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P11/08 A61P13/10 A61P13/12 A61P15/00 A61P15/12 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P25/32 A61P27/02 A61P27/06 A61P27/14 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/06 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/16 A61P31/20 A61P31/22 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/02 A61P37/08 A61P39/00 A61P41/00 A61P43/00 C07K14/5759 Y02A50/463		
FI分类号	C07K14/575.ZNA A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/08 A61P3/10 A61P5/00 A61P7/00 A61P7/06 A61P9/00 A61P9/02 A61P9/04 A61P9/06 A61P9/10 A61P9/10.101 A61P9/12 A61P9/14 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P11/08 A61P13/10 A61P13/12 A61P15/00 A61P15/12 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P25/32 A61P27/02 A61P27/06 A61P27/14 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P31/04 A61P31/06 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/16 A61P31/20 A61P31/22 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/02 A61P37/08 A61P39/00 A61P41/00 A61P43/00.101 A61P43/00.105 A61P43/00.111 A61P43/00.121 C07K16/26 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/50.P G01N33/53.D G01N33/68 C12N5/00.B A61K37/02 A61K37/26 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/BA11 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB06 2G045/FB08 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA01 4B024/CA01 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/GA05 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ91 4B063/QQ96 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063/QS32 4B063/QS33 4B063/QS34 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/BA44 4C084/CA18 4C084/CA25 4C084/DB01 4C084/DB34 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA021 4C084/ZA081 4C084/ZA151 4C084/ZA161 4C084/ZA331 4C084/ZA341 4C084/ZA361 4C084/ZA421 4C084/ZA431 4C084/ZA441 4C084/ZA451 4C084/ZA541 4C084/ZA551 4C084/ZA591 4C084/ZA681 4C084/ZA751 4C084/ZA811 4C084/ZA891 4C084/ZA961 4C084/ZA971		

4C084/ZB051 4C084/ZB071 4C084/ZB111 4C084/ZB131 4C084/ZB151 4C084/ZB211 4C084/ZB261
4C084/ZB271 4C084/ZB331 4C084/ZB351 4C084/ZC021 4C084/ZC022 4C084/ZC031 4C084/ZC032
4C084/ZC331 4C084/ZC351 4C084/ZC371 4C084/ZC391 4C084/ZC541 4C084/ZC751 4H045/AA10
4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA53 4H045/CA40 4H045/DA30 4H045
/DA76 4H045/EA25 4H045/EA30 4H045/EA50 4H045/FA72

代理人(译)
青木 笃
石田 敬
渡边洋一
西山雅也

优先权
516706 2002-01-18 NZ
60/349885 2002-01-18 US
523411 2002-12-23 NZ
523410 2002-12-23 NZ
60/436178 2002-12-23 US
60/436148 2002-12-23 US

其他公开文献
JP2005535561A5

外部链接
[Espacenet](#)

摘要(译)
脂联素多肽 (特别是那些被糖基化的多肽, 优选在赖氨酸残基65,68,77和101上制备并且对应于人脂联素, 特别是用脯氨酸羟基化的那些多肽)。已被证明可有效治疗多种症状。还公开了相关的组合物, 用途和方法。

