

(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2005-516073

(P2005-516073A)

(43) 公表日 平成17年6月2日(2005.6.2)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00 Z N A	2 G O 4 5
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/155	A 6 1 K 31/155	4 B O 6 3
A 6 1 K 31/198	A 6 1 K 31/198	4 C O 8 4
A 6 1 K 31/427	A 6 1 K 31/427	4 C O 8 6
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 55 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-564071 (P2003-564071)	(71) 出願人	301033259
(86) (22) 出願日	平成15年2月3日(2003.2.3)		ベス・イスラエル・ディーコネス・メディカル・センター, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年9月30日(2004.9.30)		アメリカ合衆国マサチューセッツ州02215, ボストン, ブルックリン・アヴェニュー 330
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/003065	(74) 代理人	100102842
(87) 国際公開番号	W02003/064451		弁理士 葛和 清司
(87) 国際公開日	平成15年8月7日(2003.8.7)	(72) 発明者	カントレー, ルイス, シー.
(31) 優先権主張番号	60/353, 758		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02138, ケンブリッジ, ラーチ ロード 43
(32) 優先日	平成14年2月1日(2002.2.1)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 I I β 型ホスホイノシチドリン酸キナーゼの調節

(57) 【要約】

本発明は、P I P K I I 関連疾患を処置するための、I I 型ホスホイノシチドリン酸キナーゼ (P I P K I I) を調節する方法を提供する。本発明はまた、P I P K I I 関連疾患を処置するための候補剤を同定する方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ⅠⅠ型糖尿病を有するか、または有する疑いがある対象を処置する方法であって、かかる処置が必要な対象に、対象における P I P K I I の活性を減少させる剤の有効量を、ⅠⅠ型糖尿病の処置として投与することを含む、前記方法。

【請求項 2】

組織のインスリンに対する感受性を増大させる薬剤を対象に投与することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

薬剤が、メトホルミン、ピオグリタゾンおよびロシグリタゾンからなる群から選択される、請求項 2 に記載の方法。 10

【請求項 4】

インスリン放出を増大させる薬剤をさらに投与することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

薬剤が、スルホニル尿素、ナテグリニドおよびレパグリニドからなる群から選択される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

スルホニル尿素が、グリベンクラミド（グリブライド）、グリクラジドおよびグリメピリドからなる群から選択される、請求項 5 に記載の方法。 20

【請求項 7】

インスリンを対象に投与することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

剤が、P I P K I I 阻害剤である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

剤が、P I P K I I アンチセンス配列である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

低下したインスリン感受性を有するか、または有する疑いがある対象を処置する方法であって、かかる処置が必要な対象に、対象における P I P K I I の活性を減少させる剤の有効量を、低下したインスリン感受性の処置として投与することを含む、前記方法。 30

【請求項 11】

組織のインスリンに対する感受性を増大させる薬剤を対象に投与することをさらに含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

薬剤が、メトホルミン、ピオグリタゾンおよびロシグリタゾンからなる群から選択される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

インスリン放出を増大させる薬剤をさらに投与することを含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

薬剤が、スルホニル尿素、ナテグリニドおよびレパグリニドからなる群から選択される、請求項 13 に記載の方法。 40

【請求項 15】

スルホニル尿素が、グリベンクラミド（グリブライド）、グリクラジドおよびグリメピリドからなる群から選択される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

インスリンを対象に投与することをさらに含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 17】

剤が、P I P K I I 阻害剤である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 18】

剤が、P I P K I I アンチセンス配列である、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 9】

肥満を有するか、または有する疑いがある対象を処置する方法であって、かかる処置が必要な対象に、対象における P I P K I I の活性を減少させる剤の有効量を、肥満の処置として投与することを含む、前記方法。

【請求項 2 0】

剤が、P I P K I I 阻害剤である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

剤が、P I P K I I アンチセンス配列である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2】

過剰な脂肪蓄積を有するか、または有する疑いがある対象を処置する方法であって、かかる処置が必要な対象に、対象における P I P K I I の活性を減少させる剤の有効量を、過剰な脂肪蓄積の処置として投与することを含む、前記方法。

10

【請求項 2 3】

剤が、P I P K I I 阻害剤である、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

剤が、P I P K I I アンチセンス配列である、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 5】

インスリンに対する増大した感受性を有するか、または有する疑いがある対象を処置する方法であって、かかる処置が必要な対象に、対象における P I P K I I の活性を増大させる剤を、インスリンに対する増大した感受性の処置として投与することを含む、前記方法。

20

【請求項 2 6】

P I P K I I 活性を減少させる剤を同定するための方法であって、
P I P K I I ポリペプチドの最初の活性の量を決定すること、
P I P K I I ポリペプチドを候補薬剤と接触させること、
接触させた P I P K I I ポリペプチドの活性の量を決定すること、
を含み、ここで、接触させた P I P K I I ポリペプチドの活性の量の、P I P K I I
ポリペプチドの最初の活性の量に対する減少は、候補薬剤が P I P K I I 活性を減少させることの表示である、前記方法。

30

【請求項 2 7】

P I P K I I ポリペプチドが、配列番号 1 で表される、または、配列番号 1 で表されるヌクレオチド配列と少なくとも約 9 5 % の相同性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子によってコードされる、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

P I P K I I ポリペプチドが、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 9】

P I P K I I 活性を増大させる剤を同定するための方法であって、
P I P K I I ポリペプチドの最初の活性の量を決定すること、
P I P K I I ポリペプチドを候補薬剤と接触させること、
接触させた P I P K I I ポリペプチドの活性の量を決定すること、
を含み、ここで、接触させた P I P K I I ポリペプチドの活性の量の、P I P K I I
ポリペプチドの最初の活性の量に対する増大は、候補薬剤が P I P K I I 活性を増大させることの表示である、前記方法。

40

【請求項 3 0】

P I P K I I ポリペプチドが、配列番号 1 で表される、または、配列番号 1 で表されるヌクレオチド配列と少なくとも約 9 5 % の相同性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子によってコードされる、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

50

P I P K I I ポリペプチドが、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 2】

対象における P I P K I I 関連疾患を診断する方法であって、
対象から生物学的試料を得ること、

生物学的試料における P I P K I I ポリペプチド分子の活性のレベルを決定すること

、
生物学的試料における P I P K I I ポリペプチド分子の活性のレベルを、対照組織に
おける P I P K I I ポリペプチド分子の活性のレベルと比較すること、

を含み、ここで、対象からの生物学的試料における P I P K I I ポリペプチド分子の活
性の、対照試料における P I P K I I ポリペプチド分子の活性より高いレベルは、対象
における P I P K I I 関連疾患の診断となる、前記方法。

10

【請求項 3 3】

P I P K I I ポリペプチドが、配列番号 1 で表される、または、配列番号 1 で表され
るヌクレオチド配列と少なくとも約 9 5 % の相同性を有するヌクレオチド配列を含む核酸
分子によってコードされる、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

P I P K I I ポリペプチドが、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含む、請求項 3
2 に記載の方法。

【請求項 3 5】

生物学的試料が、組織および細胞からなる群から選択される、請求項 3 2 に記載の方法

20

【請求項 3 6】

組織または細胞が、骨格筋、脳および脂肪組織からなる群から選択される、請求項 3 5
に記載の方法。

【請求項 3 7】

活性がキナーゼアッセイで決定される、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 8】

P I P K I I 関連疾患が、糖尿病および肥満からなる群から選択される、請求項 3 2
に記載の方法。

30

【請求項 3 9】

P I P K I I 分子の増大した活性を特徴とする疾患の動物モデルを作製する方法であ
って、非ヒト対象に P I P K I I 活性を増大させる P I P K I I 分子を導入すること
を含む、前記方法。

【請求項 4 0】

P I P K I I 分子が P I P K I I 核酸分子である、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

P I P K I I 核酸分子が、配列番号 1 で表される、または、配列番号 1 で表されるヌ
クレオチド配列と少なくとも約 9 5 % の相同性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項
4 0 に記載の発明。

40

【請求項 4 2】

P I P K I I 分子が P I P K I I ポリペプチドである、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 3】

P I P K I I ポリペプチドが、配列番号 1 で表される、または、配列番号 1 で表され
るヌクレオチド配列と少なくとも約 9 5 % の相同性を有するヌクレオチド配列を含む核酸
分子によってコードされる、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

P I P K I I ポリペプチドが、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含む、請求項 4
2 に記載の方法。

【請求項 4 5】

50

動物モデルが、I I型糖尿病、インスリンに対する不応性、過剰な脂肪蓄積および肥満からなる群から選択される疾患のものである、請求項39に記載の方法。

【請求項46】

PIP K I I 分子の減少した発現を特徴とする疾患の動物モデルを作製する方法であって、非ヒト対象にPIP K I I 活性を減少させる変異PIP K I I 分子を導入することを含む、前記方法。

【請求項47】

PIP K I I 分子が変異PIP K I I 核酸である、請求項46に記載の方法。

【請求項48】

PIP K I I 分子が変異PIP K I I ポリペプチドである、請求項46に記載の方法。 10

【請求項49】

候補薬剤の、PIP K I I 関連疾患への効果を評価するための方法であって、
PIP K I I 関連疾患を有する対象に候補薬剤を投与すること、
候補薬剤が投与されていない対象におけるPIP K I I ポリペプチドの活性レベルと比べた、候補薬剤のPIP K I I ポリペプチドの活性レベルへの効果を決定すること、
を含み、ここで、PIP K I I ポリペプチドの活性レベルの相対的増大または相対的減少は、候補薬剤のPIP K I I 関連疾患への効果を示す、前記方法。

【請求項50】

PIP K I I ポリペプチドの活性レベルがキナーゼアッセイで決定される、請求項49に記載の方法。 20

【請求項51】

PIP K I I ポリペプチドが、配列番号1で表される、または、配列番号1で表されるヌクレオチド配列と少なくとも約95%の相同性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子によってコードされる、請求項49に記載の方法。

【請求項52】

PIP K I I ポリペプチドが、配列番号2で表されるアミノ酸配列を含む、請求項49に記載の方法。

【請求項53】

PIP K I I 関連疾患が、I I型糖尿病、インスリンに対する不応性、過剰な脂肪蓄積および肥満からなる群から選択される、請求項49に記載の方法。 30

【請求項54】

候補薬剤の、PIP K I I 関連疾患への効果を評価するための方法であって、
PIP K I I 関連疾患を有する対象に候補薬剤を投与すること、
候補薬剤が投与されていない対象におけるPIP K I I 分子の発現のレベルと比べた、候補薬剤のPIP K I I 分子の発現のレベルへの効果を決定すること、
を含み、ここで、PIP K I I 分子の発現のレベルの相対的増大または相対的減少は、候補薬剤のPIP K I I 関連疾患への効果を示す、前記方法。

【請求項55】

PIP K I I 分子がPIP K I I 核酸分子である、請求項54に記載の方法。 40

【請求項56】

PIP K I I 核酸分子が、配列番号1で表される、または、配列番号1で表されるヌクレオチド配列と少なくとも約95%の相同性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項55に記載の発明。

【請求項57】

PIP K I I 分子がPIP K I I ポリペプチドである、請求項54に記載の方法。

【請求項58】

PIP K I I ポリペプチドが、配列番号1で表される、または、配列番号1で表されるヌクレオチド配列と少なくとも約95%の相同性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子によってコードされる、請求項57に記載の方法。 50

【請求項 59】

P I P K I I ポリペプチドが、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含む、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 60】

P I P K I I 関連疾患が、I I 型糖尿病、インスリンに対する不応性、過剰な脂肪蓄積および肥満からなる群から選択される、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 61】

対象における P I P K I I 関連疾患を診断する方法であって、

対象から生物学的試料を得ること、

生物学的試料における P I P K I I 核酸分子の発現のレベルを決定すること、

生物学的試料における P I P K I I 核酸分子の発現のレベルを、対照生物学的試料における P I P K I I 核酸分子の発現のレベルと比較すること、

を含み、ここで、対象からの生物学的試料における P I P K I I 核酸分子の発現の、対照生物学的試料におけるよりも高いレベルは、対象における P I P K I I 関連疾患の診断となる、前記方法。

10

【請求項 62】

P I P K I I 核酸分子が、配列番号 1 で表される、または、配列番号 1 で表されるヌクレオチド配列と少なくとも約 95% の相同性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項 61 に記載の発明。

【請求項 63】

生物学的試料が、組織および細胞からなる群から選択される、請求項 61 に記載の方法

20

【請求項 64】

組織または細胞が、骨格筋、脳および脂肪組織からなる群から選択される、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 65】

P I P K I I 関連疾患が、I I 型糖尿病、インスリンに対する不応性、過剰な脂肪蓄積および肥満からなる群から選択される、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 66】

P I P K I I 核酸分子の発現のレベルが、核酸ハイブリダイゼーションおよび核酸増幅からなる群から選択される方法により決定される、請求項 61 に記載の方法。

30

【請求項 67】

核酸ハイブリダイゼーションが、核酸マイクロアレイを用いて行われる、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 68】

核酸増幅が、P C R、R T - P C R、およびリアルタイム P C R からなる群から選択される、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 69】

対象における P I P K I I 関連疾患の進行または消退を決定する方法であって、

対象から 2 つの生物学的試料であって、同一の組織種を含み、かつ異なる時間に得られた試料を得ること、

2 つの生物学的試料における P I P K I I 核酸分子の発現のレベルを決定すること、

2 つの生物学的試料における発現のレベルを比較すること、

を含み、ここで、第 1 の生物学的試料における P I P K I I 核酸分子の発現の、第 2 の生物学的試料におけるよりも高いレベルは、P I P K I I 関連疾患の消退を示し、第 1 の生物学的試料における P I P K I I 核酸分子の発現の、第 2 の生物学的試料におけるよりも低いレベルは、P I P K I I 関連疾患の進行を示す、前記方法。

40

【請求項 70】

P I P K I I 核酸分子が、配列番号 1 で表される、または、配列番号 1 で表されるヌクレオチド配列と少なくとも約 95% の相同性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項

50

69に記載の発明。

【請求項71】

生物学的試料が、組織および細胞からなる群から選択される、請求項69に記載の方法。

【請求項72】

組織または細胞が、骨格筋、脳および脂肪組織からなる群から選択される、請求項71に記載の方法。

【請求項73】

P I P K I I 関連疾患が、I I型糖尿病、インスリンに対する不応性、過剰な脂肪蓄積および肥満からなる群から選択される、請求項69に記載の方法。

【請求項74】

P I P K I I 核酸分子の発現のレベルが、核酸ハイブリダイゼーションおよび核酸増幅からなる群から選択される方法により決定される、請求項69に記載の方法。

【請求項75】

核酸ハイブリダイゼーションが、核酸マイクロアレイを用いて行われる、請求項74に記載の方法。

【請求項76】

核酸増幅が、P C R、R T - P C R、およびリアルタイムP C Rからなる群から選択される、請求項74に記載の方法。

【請求項77】

対象におけるP I P K I I 関連疾患を診断する方法であって、
対象から生物学的試料を得ること、
生物学的試料におけるP I P K I I ポリペプチドのレベルを、対照生物学的試料におけるP I P K I I ポリペプチドのレベルと比較すること、
を含み、ここで、対象からの生物学的試料におけるP I P K I I ポリペプチドの、対照生物学的試料におけるP I P K I I ポリペプチドのレベルよりも高いレベルは、対象におけるP I P K I I 関連疾患の診断となる、前記方法。

【請求項78】

P I P K I I ポリペプチドが、配列番号1で表される、または、配列番号1で表されるヌクレオチド配列と少なくとも約95%の相同性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子によってコードされる、請求項77に記載の方法。

【請求項79】

P I P K I I ポリペプチドが、配列番号2で表されるアミノ酸配列を含む、請求項77に記載の方法。

【請求項80】

生物学的試料が、組織および細胞からなる群から選択される、請求項77に記載の方法。

【請求項81】

組織または細胞が、骨格筋、脳および脂肪組織からなる群から選択される、請求項80に記載の方法。

【請求項82】

P I P K I I 関連疾患が、I I型糖尿病、インスリンに対する不応性、過剰な脂肪蓄積および肥満からなる群から選択される、請求項77に記載の方法。

【請求項83】

P I P K I I ポリペプチドのレベルが、免疫組織化学および免疫沈降からなる群から選択される方法により決定される、請求項77に記載の方法。

【請求項84】

対象におけるP I P K I I 関連疾患の進行または消退を決定する方法であって、
対象から2つの生物学的試料であって、同一の組織種を含み、かつ異なる時間に得られた試料を得ること、

10

20

30

40

50

2つの生物学的試料におけるPIP K I I ポリペプチドのレベルを比較すること、を含み、ここで、第1の生物学的試料におけるPIP K I I ポリペプチドの、第2の生物学的試料におけるよりも高いレベルは、PIP K I I 関連疾患の消退を示し、第1の生物学的試料におけるPIP K I I ポリペプチドの、第2の生物学的試料におけるよりも低いレベルは、PIP K I I 関連疾患の進行を示す、前記方法。

【請求項85】

PIP K I I ポリペプチドが、配列番号1で表される、または、配列番号1で表されるヌクレオチド配列と少なくとも約95%の相同性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子によってコードされる、請求項84に記載の方法。

【請求項86】

PIP K I I ポリペプチドが、配列番号2で表されるアミノ酸配列を含む、請求項84に記載の方法。

【請求項87】

生物学的試料が、組織および細胞からなる群から選択される、請求項84に記載の方法。

【請求項88】

組織または細胞が、骨格筋、脳および脂肪組織からなる群から選択される、請求項87に記載の方法。

【請求項89】

PIP K I I 関連疾患が、I I型糖尿病、インスリンに対する不応性、過剰な脂肪蓄積および肥満からなる群から選択される、請求項84に記載の方法。

【請求項90】

PIP K I I ポリペプチドのレベルが、免疫組織化学および免疫沈降からなる群から選択される方法により決定される、請求項84に記載の方法。

【請求項91】

対象におけるPIP K I I 関連疾患を診断する方法であって、対象から生物学的試料を得ること、生物学的試料におけるPIP K I I 核酸分子のヌクレオチド配列を決定すること、対象試料におけるヌクレオチド配列を、対照PIP K I I 核酸分子のヌクレオチド配列と比較すること、を含み、ここで、対象生物学的試料におけるヌクレオチド配列と、対照PIP K I I 核酸分子との違いは、対象におけるPIP K I I 関連疾患の診断となる、前記方法。

【請求項92】

PIP K I I 核酸分子が、配列番号1で表される、または、配列番号1で表されるヌクレオチド配列と少なくとも約95%の相同性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項91に記載の発明。

【請求項93】

生物学的試料が、組織および細胞からなる群から選択される、請求項91に記載の方法。

【請求項94】

組織または細胞が、骨格筋、脳および脂肪組織からなる群から選択される、請求項93に記載の方法。

【請求項95】

PIP K I I 関連疾患が、I I型糖尿病、インスリンに対する不応性、過剰な脂肪蓄積および肥満からなる群から選択される、請求項91に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願

本出願は、その開示の全体が参照により本明細書に組み込まれる、2002年2月1日に出願された米国仮出願60/353,758について、35 U.S.C. § 119(e)に基づく利益を主張す

10

20

30

40

50

る。

【0002】

政府支援

本発明は、部分的に、国立衛生研究所（NIH）からの認可番号R01 GM36624に基づく政府支援、および国立糖尿病・消化器病・腎臓病研究所（NIDDK）からの認可番号5P30-DK36836-14に基づく政府支援によってなされた。政府は、本発明についてある種の権利を有し得る。

【0003】

発明の分野

本発明は、II型ホスホイノシチドリン酸キナーゼ（PIPKII）関連疾患を処置するための、PIPKII活性の調節に関する。さらに本発明は、PIPKII関連疾患の診断、モニタリングおよび処置へのPIPKII核酸分子およびポリペプチドの使用に関する。本発明はまた、PIPKII関連疾患の処置に有用な、PIPKII活性を調節する剤のスクリーニングにも関する。

【0004】

発明の背景

最近まで、II型ホスホイノシチドリン酸キナーゼは、ホスファチジルイノシトール-4-リン酸（PI4P）の5位をリン酸化することによりホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸（PI4,5P₂）を生成すると考えられてきた。しかしながら、1997年に、これらの酵素が、ホスファチジルイノシトール-5-リン酸（PI5P）からのPI4,5P₂の生成に関与する、新規な、以前には知られていない経路中にあることが示された（Rameh et al., 1997）。この経路のための酵素は、哺乳類から蠕虫類まで保存されているが、生物機能に対する重要性は知られていない。

【0005】

II型PIPKキナーゼが、ホスファチジルイノシトール-5-リン酸（PI5P）のイノシトール環の4位をリン酸化することにより、ホスファチジルイノシトール4,5二リン酸（PI4,5P₂）を生成することは現在知られている（Rameh et al., 1997）。PI4,5P₂の大多数は、ホスファチジルイノシトール-4-P（PI4P）のイノシトール環の5位をリン酸化するI型PIPKキナーゼ（PIPKI）によって生成される。PI4,5P₂を生成するためのこの2つの経路の進化は、I型およびII型PIPKキナーゼのいずれもが脊椎動物ばかりでなく、蠕虫やハエにおいても見出されることから、極めて古いものと見られる。哺乳類は、異なる遺伝子によってコードされる、II型PIPKキナーゼの3種のアイソフォーム、PIPKII（Divecha et al., 1995）、PIPKII（Castellino et al., 1997）およびPIPKII（Itoh et al., 1998）、を有している。これらの酵素は、異なるが、幾分重複する組織分布を有している。

【0006】

2つの経路がPI4,5P₂の生成のために進化した理由は知られていない。II型PIPKキナーゼは、細胞内のユニークな位置で、特定の目的のためにPI4,5P₂を産生している可能性がある。PI4,5P₂は、細胞内で多くの役割を果たしていることが知られており、それはいくつかのセカンドメッセンジャーの前駆体であり（Toker 1998）、そして、アクチン細胞骨格に影響する種々のタンパク質と相互作用することができる（総説としてTakenawa and Miki, 2000を参照）。PI4,5P₂を特異的に標的化する蛍光標識化PHドメインを用いた実験では、「フリーの」PI4,5P₂の局所集団（local population）が、種々のシグナル伝達によって調整されていることが示唆された（総説としてMartin, 2001を参照）。PI4,5P₂はまた、本来tubby遺伝子座に自然突然変異を有するマウス系統における肥満表現型の原因遺伝子として発見された、tubbyタンパク質の局在化に作用することが示された（Santagata et al., 2001）。tubbyは、PI4,5P₂に結合するそのSH2ドメインを介して、細胞膜へ局在化する。それは、Gタンパク質結合受容体の活性化に反応してホスホリパーゼCベータ（PLC）が活性化され、PI4,5P₂を分解してジアシルグリセロール（DAG）とイノシトール-1,4,5

- 三リン酸 (IP_3) を形成すると、細胞膜から放出される。これは、代替的な経路によって調整され得る、 PI_4 , $5P_2$ の分離したプールの別の例である。

【 0 0 0 7 】

また、 II 型 PIP キナーゼの重要性は、よく知られていない脂質である PI_5P のレベルを減少させることにある可能性もある。 PI_5P のシグナル伝達における役割はまだ解明されていない。しかしながら、種々のタンパク質ドメインは、特定の膜への局在化機構として特定のホスホイノシチドに結合する能力を進化させており (総説として、 Wishart et. al 2001、 Hurley and Meyer 2001、 Lemmon and Ferguson 2000、 Gillooly et. al, 2001 を参照、)、 PI_5P が特定のタンパク質の膜へのリクルートを媒介している可能性がある。

10

【 0 0 0 8 】

ホスホイノシチドはまた、インスリンシグナル伝達に重要な役割を果たす。インスリン受容体は、ホスホイノシチド 3 - キナーゼ (PI_3K) を活性化し、セカンドメッセンジャーであるホスファチジルイノシトール - 3 , 4 , 5 - 三リン酸 (PIP_3) が生成される。この脂質は、タンパク質 - Ser / Thr キナーゼ Akt (プロテインキナーゼ B としても知られる) を含む一連のタンパク質を膜にリクルートする。 PI_3K および Akt の活性化は、グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 ($GSK3$) の阻害およびブドウ糖輸送の活性化を含む、研究されたインスリン応答の大部分に必要とされる。

【 0 0 0 9 】

PIP_3 レベルは、 PI_3K によるその生成速度だけでなく、ホスファターゼによるその破壊速度によっても調整される。 $SH2$ ドメインを含むイノシトールホスファターゼである $SHIP1$ および $SHIP2$ は、イノシトール環の 5 位を脱リン酸化することにより PIP_3 を分解し、ホスファチジルイノシトール 3 , 4 - 二リン酸 ($PI_3, 4P_2$) を生成する。 $SHIP2$ ノックアウトマウスはインスリンに対して重度に高感受性であり、インスリン受容体が活性化している部位において増大した PIP_3 レベルがもたらされていることが予想された (Clement et al., 2001)。

20

【 0 0 1 0 】

患者におけるインスリンシグナル伝達および適正なインスリン応答は、 II 型糖尿病および肥満などの疾患の因子として同定されている。患者におけるインスリン不応性や減少したインスリン感受性は、成人型糖尿病 (II 型糖尿病) をもたらすことがあり、および / または、肥満に貢献する可能性があるが、いずれも個体に対して深刻な臨床上的結果を有し得る。1570万人の米国人が糖尿病を有していると推定されており、成人型の 2 型糖尿病を有する個体は、全糖尿病患者の 90 ~ 95 % を占める。米国の全糖尿病患者の約 1 / 3 は該疾患を有していることに気付いておらず、検出もコントロールもされていない糖尿病は、失明、心疾患、神経疾患および腎疾患などの深刻な悪影響を有する可能性がある。

30

【 0 0 1 1 】

肥満もまた、患者にとって多くのリスクを有しており、早期死亡をもたらし得る。肥満は少なくとも 3900 万人の米国人を冒しており、これは、全成人の 1 / 4 以上、そして、小児の約 5 人に 1 人である。毎年、肥満は、米国において少なくとも 300,000 件の余分な死亡をもたらしており、国に 1000 億ドルを負担させている。肥満は、米国における不必要な死の 2 番目の主要な原因である。

40

【 0 0 1 2 】

臨床リスクの増大に加え、肥満および II 型糖尿病のいずれも、罹患個体の生活の質の低下をもたらし得る。 II 型糖尿病および肥満は現代社会における主要疾患であり、健康および生活の質に深刻な影響を有するため、処置および / または確実な診断のための改善された方法が要求されており、またそれは、患者、その家族および医療提供者にとって有益であろう。

【 0 0 1 3 】

発明の要約

本発明は、部分的に、患者におけるインスリン感受性を高める方法に関し、そして II

50

型糖尿病、肥満、脂肪の過剰蓄積およびインスリンに対する低下した感受性などの疾患を処置する方法を提供する。

【0014】

本発明の1つの側面により、I I型糖尿病を有するか、または有する疑いがある対象を処置する方法が提供される。本方法は、かかる処置が必要な対象に、対象におけるP I P K I Iの活性を減少させる剤の有効量を、I I型糖尿病のための処置として投与することを含む。いくつかの態様では、本方法はさらに、組織のインスリンに対する感受性を増大させる薬剤を対象に投与することを含む。ある態様では、薬剤は、メトホルミン、ピオグリタゾンおよびロシグリタゾンからなる群から選択される。いくつかの態様では、本方法は、インスリン放出を増大させる薬剤を投与することをさらに含む。いくつかの態様では、薬剤はスルホニル尿素、ナテグリニドおよびレパグリニドからなる群から選択される。いくつかの態様では、スルホニル尿素は、グリベンクラミド(グリブライド)、グリクラジドおよびグリメピリドからなる群から選択される。いくつかの態様では、本方法は対象にインスリンを投与することをさらに含む。いくつかの態様では、剤はP I P K I I 阻害剤である。ある態様では、剤はP I P K I I のアンチセンス配列である。

10

【0015】

本発明の別の側面により、低下したインスリン感受性を有するか、または有する疑いがある対象を処置する方法が提供される。本方法は、かかる処置が必要な対象に、対象におけるP I P K I Iの活性を減少させる剤の有効量を、低下したインシュリン感受性の処置として投与することを含む。いくつかの態様では、本方法はさらに、組織のインスリン感受性を増大させる薬剤を対象に投与することを含む。ある態様では、薬剤は、メトホルミン、ピオグリタゾンおよびロシグリタゾンからなる群から選択される。いくつかの態様では、本方法は、インスリン放出を増大させる薬剤を投与することをさらに含む。いくつかの態様では、薬剤はスルホニル尿素、ナテグリニドおよびレパグリニドからなる群から選択される。いくつかの態様では、スルホニル尿素は、グリベンクラミド(グリブライド)、グリクラジドおよびグリメピリドからなる群から選択される。いくつかの態様では、本方法は対象にインスリンを投与することをさらに含む。いくつかの態様では、剤はP I P K I I 阻害剤である。ある態様では、剤はP I P K I I のアンチセンス配列である。

20

【0016】

本発明の別の側面により、肥満を有するか、または有する疑いがある対象を処置する方法が提供される。本方法は、かかる処置が必要な対象に、対象におけるP I P K I Iの活性を減少させる剤の有効量を、肥満の処置として投与することを含む。いくつかの態様では、本方法はさらに、組織のインスリン感受性を増大させる薬剤を対象に投与することを含む。ある態様では、剤はP I P K I I 阻害剤である。別の態様では、剤はP I P K I I のアンチセンス配列である。

30

【0017】

本発明のさらに別の側面により、過剰な脂肪蓄積を有するか、または有する疑いがある対象を処置する方法が提供される。本方法は、かかる処置が必要な対象に、対象におけるP I P K I Iの活性を減少させる剤の有効量を、過剰な脂肪蓄積の処置として投与することを含む。いくつかの態様では、本方法はさらに、組織のインスリン感受性を増大させる薬剤を対象に投与することを含む。ある態様では、剤はP I P K I I 阻害剤である。別の態様では、剤はP I P K I I のアンチセンス配列である。

40

【0018】

本発明の別の側面により、インスリンに対する増大した感受性を有するか、または有する疑いがある対象を処置する方法が提供される。本方法は、かかる処置が必要な対象に、対象におけるP I P K I Iの活性を増大させる剤を、インスリンに対する増大した感受性に対する処置として投与することを含む。

【0019】

本発明のさらに別の側面により、P I P K I I 活性を減少させる剤を同定するための方法が提供される。本方法は、P I P K I I ポリペプチドの最初の活性の量を決定する

50

こと、PIP K I I ポリペプチドを候補薬剤と接触させること、接触させたPIP K I I ポリペプチドの活性の量を決定することを含み、ここで、接触させたPIP K I I ポリペプチドの活性の量の、PIP K I I ポリペプチドの最初の活性の量に対する減少は、候補薬剤がPIP K I I 活性を減少させることの表示である。

【0020】

本発明のさらに別の側面により、PIP K I I 活性を増大させる剤を同定するための方法が提供される。本方法は、PIP K I I ポリペプチドの最初の活性の量を決定すること、PIP K I I ポリペプチドを候補薬剤と接触させること、接触させたPIP K I I ポリペプチドの活性の量を決定することを含み、ここで、接触させたPIP K I I ポリペプチドの活性の量の、PIP K I I ポリペプチドの最初の活性の量に対する増加は、候補薬剤がPIP K I I 活性を増大させることの表示である。

10

【0021】

本発明の別の側面により、対象におけるPIP K I I 関連疾患を診断する方法が提供される。本方法は、対象から生物学的試料を得ること、生物学的試料におけるPIP K I I ポリペプチド分子の活性のレベルを決定すること、生物学的試料におけるPIP K I I ポリペプチド分子の活性のレベルを、対照組織におけるPIP K I I ポリペプチド分子の活性のレベルと比較することを含み、ここで、対象からの生物学的試料におけるPIP K I I ポリペプチド分子の活性の、対照組織におけるPIP K I I ポリペプチド分子の活性より高いレベルは、対象におけるPIP K I I 関連疾患の診断となる。いくつかの態様では、生物学的試料は、組織および細胞からなる群から選択される。いくつかの態様では、組織または細胞は、骨格筋、脳、および脂肪組織からなる群から選択される。ある態様では、活性はキナーゼアッセイで決定する。いくつかの態様では、PIP K I I 関連疾患は、糖尿病および肥満からなる群から選択される。

20

【0022】

本発明の上記側面のいくつかの態様では、PIP K I I ポリペプチドは、配列番号1で表される、または、配列番号1で表されるヌクレオチド配列と少なくとも約95%の相同性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子によってコードされる。本発明の上記側面のいくつかの態様では、PIP K I I ポリペプチドは、配列番号2で表されるアミノ酸配列を含む。

【0023】

本発明の別の側面により、PIP K I I 分子の増大した活性を特徴とする疾患の動物モデルを作製するための方法が提供される。本方法は、非ヒト対象に、PIP K I I 活性を増大させるPIP K I I 分子を導入することを含む。いくつかの態様では、PIP K I I 分子は、PIP K I I 核酸分子である。いくつかの態様では、PIP K I I 核酸分子は、配列番号1で表される、または、配列番号1で表されるヌクレオチド配列と少なくとも約95%の相同性を有するヌクレオチド配列を含む。ある態様では、PIP K I I 分子はPIP K I I ポリペプチドである。いくつかの態様では、PIP K I I ポリペプチドは、配列番号1で表される、または、配列番号1で表されるヌクレオチド配列と少なくとも約95%の相同性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子によってコードされる。本発明の上記側面のいくつかの態様では、PIP K I I ポリペプチドは、配列番号2で表されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、動物モデルは、I I型糖尿病、インスリン不応性、過剰な脂肪蓄積、および肥満からなる群から選択される疾患についてのものである。

30

40

【0024】

本発明の別の側面により、PIP K I I 分子の減少した発現を特徴とする疾患の動物モデルを作製するための方法が提供される。本方法は、非ヒト対象に、PIP K I I 活性を減少させる変異PIP K I I 分子を導入することを含む。いくつかの態様では、PIP K I I 分子は、変異PIP K I I 核酸分子である。ある態様では、PIP K I I 分子は変異PIP K I I ポリペプチドである。

【0025】

50

本発明の別の側面より、候補薬剤の、P I P K I I 関連疾患への効果を評価するための方法が提供される。本方法は、P I P K I I 関連疾患を有する対象に候補薬剤を投与すること、候補薬剤を投与されていない対象におけるP I P K I I ポリペプチドの活性レベルと比べた、候補薬剤のP I P K I I ポリペプチドの活性レベルへの効果を決定することを含み、ここで、P I P K I I ポリペプチドの活性レベルの相対的増大または相対的減少は、候補薬剤のP I P K I I 関連疾患への効果を示す。いくつかの態様では、P I P K I I ポリペプチドの活性レベルは、キナーゼアッセイで決定される。いくつかの態様では、P I P K I I ポリペプチドは、配列番号1で表される、または、配列番号1で表されるヌクレオチド配列と少なくとも約95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子によってコードされる。ある態様では、P I P K I I ポリペプチドは、配列番号2で表されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、P I P K I I 関連疾患は、I I型糖尿病、インスリン不応性、過剰な脂肪蓄積、および肥満からなる群から選択される。

10

【0026】

本発明のさらに別の側面より、候補薬剤の、P I P K I I 関連疾患への効果を評価するための方法が提供される。本方法は、P I P K I I 関連疾患を有する対象に候補薬剤を投与すること、候補薬剤を投与されていない対象におけるP I P K I I 分子の発現のレベルと比べた、候補薬剤のP I P K I I 分子の発現のレベルへの効果を決定することを含み、ここで、P I P K I I 分子の発現のレベルの相対的増大または相対的減少は、候補薬剤のP I P K I I 関連疾患への効果を示す。いくつかの態様では、P I P K I I 分子は、P I P K I I 核酸分子である。ある態様では、P I P K I I 核酸分子は、配列番号1で表される、または、配列番号1で表されるヌクレオチド配列と少なくとも約95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、P I P K I I 分子はP I P K I I ポリペプチドである。いくつかの態様では、P I P K I I ポリペプチドは、配列番号1で表される、または、配列番号1で表されるヌクレオチド配列と少なくとも約95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子によってコードされる。ある態様では、P I P K I I ポリペプチドは、配列番号2で表されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、動物モデルは、I I型糖尿病、インスリン不応性、過剰な脂肪蓄積、および肥満からなる群から選択される疾患についてのものである。

20

【0027】

本発明の別の側面により、対象におけるP I P K I I 関連疾患を診断する方法が提供される。本方法は、対象から生物学的試料を得ること、生物学的試料におけるP I P K I I 核酸分子の発現のレベルを決定すること、生物学的試料におけるP I P K I I 核酸分子の発現のレベルを、対照組織におけるP I P K I I 核酸分子の発現のレベルと比較することを含み、ここで、対象からの生物学的試料におけるP I P K I I 核酸分子の発現の、対照生物学的試料におけるよりも高いレベルは、対象におけるP I P K I I 関連疾患の診断となる。

30

【0028】

本発明の別の側面により、対象におけるP I P K I I 関連疾患の進行または消退を決定するための方法が提供される。本方法は、対象から2つの生物学的試料であって、同一の組織種を含み、かつ異なる時間に得られた試料を得ること、2つの生物学的試料におけるP I P K I I 核酸分子の発現のレベルを決定すること、2つの生物学的試料における発現のレベルを比較することを含み、ここで、第1の生物学的試料におけるP I P K I I 核酸分子の発現の、第2の生物学的試料におけるよりも高いレベルは、P I P K I I 関連疾患の消退を示し、第1の生物学的試料におけるP I P K I I 核酸分子の発現の、第2の生物学的試料におけるよりも低いレベルは、P I P K I I 関連疾患の進行を示す。

40

【0029】

本発明の上記側面のいくつかの態様では、P I P K I I 核酸分子は、配列番号1で表される、または、配列番号1で表されるヌクレオチド配列と少なくとも約95%の同一性

50

を有するヌクレオチド配列を含む。本発明の上記側面のいくつかの態様では、生物学的試料は、組織および細胞からなる群から選択される。本発明の上記側面のある態様では、組織または細胞は、骨格筋、脳、および脂肪組織からなる群から選択される。本発明の上記側面のいくつかの態様では、PIP K I I 関連疾患は、I I型糖尿病、インスリン不応性、過剰な脂肪蓄積、および肥満からなる群から選択される。本発明の上記側面のいくつかの態様では、PIP K I I 核酸分子の発現のレベルは、核酸ハイブリダイゼーションおよび核酸増幅からなる群から選択される方法で決定される。本発明の上記側面のある態様では、核酸ハイブリダイゼーションは、核酸マイクロアレイを用いて行われる。本発明の上記側面のいくつかの態様では、核酸増幅は、PCR、RT-PCRおよびリアルタイムPCRからなる群から選択される。

10

【0030】

本発明の別の側面により、対象におけるPIP K I I 関連疾患を診断する方法が提供される。本方法は、対象から生物学的試料を得ること、生物学的試料におけるPIP K I I ポリペプチドのレベルを、対照生物学的試料におけるPIP K I I ポリペプチドのレベルと比較することを含み、ここで、対象からの生物学的試料におけるPIP K I I ポリペプチドの、対照生物学的試料におけるPIP K I I ポリペプチドのレベルよりも高いレベルは、対象におけるPIP K I I 関連疾患の診断となる。

【0031】

本発明のさらに別の側面により、対象におけるPIP K I I 関連疾患の進行または消退を決定するための方法が提供される。本方法は、対象から2つの生物学的試料であって、同一の組織種を含み、かつ異なる時間に得られた試料を得ること、2つの生物学的試料におけるPIP K I I ポリペプチドのレベルを比較することを含み、ここで、第1の生物学的試料におけるPIP K I I ポリペプチドの、第2の生物学的試料におけるよりも高いレベルは、PIP K I I 関連疾患の消退を示し、第1の生物学的試料におけるPIP K I I ポリペプチドの、第2の生物学的試料におけるよりも低いレベルは、PIP K I I 関連疾患の進行を示す。

20

【0032】

本発明の上記側面のいくつかの態様では、PIP K I I ポリペプチドは、配列番号1で表される、または、配列番号1で表されるヌクレオチド配列と少なくとも約95%の相同性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子によってコードされる。本発明の上記側面のいくつかの態様では、PIP K I I ポリペプチドは、配列番号2で表されるアミノ酸配列を含む。本発明の上記側面のいくつかの態様では、生物学的試料は、組織および細胞からなる群から選択される。本発明の上記側面のいくつかの態様では、組織または細胞は、骨格筋、脳、および脂肪組織からなる群から選択される。本発明の上記側面のいくつかの態様では、PIP K I I 関連疾患は、I I型糖尿病、インスリン不応性、過剰な脂肪蓄積、および肥満からなる群から選択される。本発明の上記側面のある態様では、PIP K I I ポリペプチドのレベルは、免疫組織化学および免疫沈降からなる群から選択される方法によって決定される。

30

【0033】

本発明のさらに別の側面により、対象におけるPIP K I I 関連疾患を診断する方法が提供される。本方法は、対象から生物学的試料を得ること、生物学的試料におけるPIP K I I 核酸分子のヌクレオチド配列を決定すること、対象試料におけるヌクレオチド配列を、対照PIP K I I 核酸分子のヌクレオチド配列と比較することを含み、ここで、対象生物学的試料におけるヌクレオチド配列と対照PIP K I I 核酸分子との違いは、対象におけるPIP K I I 関連疾患の診断となる。いくつかの態様では、PIP K I I 核酸分子は、配列番号1で表される、または、配列番号1で表されるヌクレオチド配列と少なくとも約95%の相同性を有するヌクレオチド配列を含む。ある態様では、生物学的試料は、組織および細胞からなる群から選択される。いくつかの態様では、組織または細胞は、骨格筋、脳、および脂肪組織からなる群から選択される。いくつかの態様では、PIP K I I 関連疾患は、I I型糖尿病、インスリン不応性、過剰な脂肪蓄積、およ

40

50

び肥満からなる群から選択される。

【0034】

別の側面では、本発明はまた、上記の剤、化合物および分子の、医薬、特に糖尿病、肥満および低下したインスリン感受性の処置のための医薬の製造への使用を提供する。

本発明のこれらのおよび他の側面を、以下でさらに説明する。

【0035】

発明の詳細な説明

ホスファチジルイノシトール-5-リン酸(PIP5)からのPI4,5P₂の生成を伴う経路の生理学的な役割を決定するために、筋肉に高度に発現しているII型PIPK酵素であるPIPKIIの発現に障害を有するマウスを作製した。驚くべきことに、PIPKIIマウスは、野生型同腹子に比べ、インスリンに対し高感受性であった。雄ノックアウトマウスはまた、普通食または高脂肪食を給餌した場合に、予期せぬことに、野生型同腹子に比べ体脂肪の蓄積が少なかった。PIPKIIノックアウトマウスは、生存性の低下またはその他の全体的な生理学的異常を何ら示さなかった。

10

【0036】

PIPKIIのインスリンシグナル伝達における役割をさらに調査するため、この酵素を、インスリン反応性のCHO-IR細胞に過剰発現させた。正常なCHO-IR細胞では、インスリンは、ホスホイノシチド3-キナーゼ(PI3K)とIRS-1/IRS-2タンパク質との間のシグナル伝達複合体の形成を刺激し、その結果ホスファチジルイノシトール3,4,5-三リン酸(PIP₃)が生成される。PIP₃は、タンパク質セリン/トレオニンキナーゼAktをリクルートし、活性化する。PIPKIIをCHO-IR細胞株で過剰発現させると、インスリンによるPI3K/IRS-1/IRS-2シグナル伝達複合体の刺激は正常だが、驚くべきことに、Aktの活性化が障害された(図6)。加えて、PIPKIIを過剰発現させたCHO-IR細胞ではPIP₃レベルは減少しており、PIPKIIの過剰発現がPIP₃の加水分解をもたらすことが示唆された(図7)。したがって、PIPKIIの欠損は、インスリンシグナル伝達を改善するが、PIPKIIの過剰発現はインスリンシグナル伝達を障害する。

20

【0037】

これらのデータは、PIPKII(GenBank受託番号NM_003559)の触媒活性または発現を特異的に阻害する薬剤が、肥満を減少させ、また、II型糖尿病に苦しむ患者におけるインスリン抵抗性を軽減することができることを示唆するものである。したがって、本発明は、これらの疾患を、PIPKIIの活性または発現を阻害することにより処置するのに有用な剤を同定するための方法を提供する。

30

【0038】

PIPKIIは、インスリンに応答して血液からブドウ糖を除去するように作用する主要な末梢組織の1つである骨格筋に、特異的に高く発現している。PIPKIIはまた、脳および脂肪組織に高く発現している。驚くべきことに、PIPKII活性の低下がインスリン感受性を増大させ、したがって、II型糖尿病およびインスリン不応性を処置するのに有用であることが今回見出された。さらに、PIPKII活性の阻害は、肥満および脂肪の過剰蓄積を処置するのにも有用である。また、PIPKII活性の増大が、インスリンシグナル伝達の減少をもたらすことも見出された。さらに、PIPKII核酸分子およびそれらがコードするポリペプチドの発現および/または活性のレベルは、II型糖尿病、インスリンへの不応性、過剰な脂肪蓄積および肥満を含むが、これらに限定されないPIPKII関連疾患の発症、進行および/または消退のマーカーとして有用であり得る。

40

【0039】

障害されたPIPKII活性の効果の同定は、II型糖尿病、低下したインスリン感受性、過剰な脂肪蓄積および肥満を含むが、これらに限定されないPIPKII関連疾患を処置する方法における、PIPKIIの活性を変更する薬剤の使用が可能にする。さらに、PIPKII核酸分子およびそれらがコードするポリペプチドの発現および/

50

または活性のレベルの決定は、PIPKII 関連疾患の診断アッセイとして有用であり得る。PIPKII ポリペプチドの触媒活性を決定するためのアッセイは、PIPKII 関連疾患を診断するための方法およびキットに有用であり得る。かかるアッセイはまた、PIPKII ポリペプチドの活性レベルを変更するのに用いるための候補化合物をスクリーニングし、それにより、PIPKII 関連疾患の処置に有用な薬剤を同定するのにも有用である。細胞および組織試料、および動物モデルは、PIPKII 活性の候補モジュレーターをスクリーニングするのに用いることができる。かかる方法、アッセイおよびキットはまた、ヒト対象におけるPIPKII 関連疾患を検出するため、そして、対象におけるPIPKII 関連疾患の発症、進行または消退を病期分類するために有用である。さらに、本明細書に記載された方法、アッセイおよびキットは、PIPKII 関連疾患に対する処置を評価するのに用いることができる。

10

【0040】

本明細書に記載された発明は、部分的に、II型糖尿病、低下したインスリン感受性、肥満および/または過剰な脂肪蓄積を含むが、これらに限定されないPIPKII 関連疾患において異常発現される、新規に同定された核酸およびそれらがコードするポリペプチドに関する。

【0041】

本明細書で用いる場合、用語「異常」は、正常でないことを意味し、増大した発現もしくは機能的活性および/または減少した発現もしくは機能的活性を包含し得る。PIPKII 核酸およびそれがコードするポリペプチドは、II型糖尿病、インスリンへの不応性（本明細書中では、低下したインスリンに対する感受性とも記載される）、過剰な脂肪蓄積および肥満を含むが、これらに限定されないPIPKII 関連疾患のためのマーカーとして用いることができる。さらに、PIPKII 核酸およびそれがコードするポリペプチドはまた、ヒトにおけるPIPKII 関連疾患の診断および処置評価に用いることもできる。

20

【0042】

本明細書で用いる場合、「PIPKII ポリペプチド」は、PIPKII 核酸分子（例えば、GenBank受託番号：NM_03559）によってコードされるポリペプチドを意味する。これらのPIPKII 核酸およびPIPKII ポリペプチドは、PIPKII 疾患を有する細胞、組織または対象において異常発現され得る。本発明はまた、部分的に、PIPKII ポリペプチドをコードする核酸分子の使用にも関し、そしてまた、部分的に、PIPKII ポリペプチドの使用にも関する。すべての態様において、ヒトPIPKII ポリペプチドおよびそれをコードする核酸分子が好ましい（例えば、GenBank受託番号：NM_03559）。本明細書で用いる場合、「それをコードする核酸分子」は、ポリペプチドをコードする核酸分子を意味する。本明細書で用いる場合、用語「分子」は、本発明の核酸およびポリペプチドを包含するとされる。

30

【0043】

本明細書で用いる場合、対象は好ましくはヒト、非ヒト霊長類、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコまたは齧歯類である。すべての態様において、ヒト対象が好ましい。いくつかの態様では、対象はPIPKII 関連疾患を有する疑いがあり、そして好ましい態様において対象は、II型糖尿病、低下したインスリン感受性、肥満および/または脂肪の過剰蓄積を有する疑いがある。いくつかの態様では、対象はPIPKII 関連疾患を有すると診断されており、そして好ましい態様においては、対象は、II型糖尿病、低下したインスリン感受性、肥満および/または脂肪の過剰蓄積を有すると診断されている。

40

【0044】

PIPKII 関連疾患を有する疑いがある対象を同定するための方法は、身体検査、対象の家族歴、対象の病歴、血液検査、視診、平均体格評価、およびまたは体重評価を包含するが、これらに限定されない。II型糖尿病、インスリン不応性、肥満および脂肪の過剰蓄積などのPIPKII 関連疾患のための診断方法は、医療分野の当業者によく知

50

られているが、これらは P I P K I I 活性に関するものではない。

【0045】

本明細書で用いる場合、生物学的試料は、組織、細胞または体液（例えば血液またはリンパ節液）を包含するが、これらに限定されない。液体試料は、細胞および/または液体を含むことができる。組織および細胞は、対象から得ることができ、または、培養中で増殖させることができる（例えば細胞株から）。生物学的試料の種類は、骨格筋、脳、および/または、本明細書で「脂肪」としても呼ばれる脂肪組織を包含するが、これらに限定されない。本発明のいくつかの態様では、生物学的試料は対照試料であり、かかる組織における本発明の P I P K I I 核酸分子または本発明の核酸分子によってコードされる P I P K I I ポリペプチドは、対照レベルである。

10

【0046】

本明細書で用いる場合、「対照」は既定の値であってもよく、それは種々の形態をとることができる。それは、中央値または平均値などの、単一のカットオフ値であることができる。それは、比較群、例えば、正常量の循環インスリンを有する群と正常ではない量の循環インスリンを有する群、または、正常な脂肪蓄積を有する個体と脂肪の過剰蓄積を有する個体などに基づいて確立することができる。比較群の別の例は、特定の疾患、状態（condition）または症状（symptom）を有する群と、当該疾患、状態または症状を有しない群であってもよい。別な比較群は、ある症状について家族歴を有する群と、かかる家族歴を有しない群であってもよい。当該既定値は調整することができ、例えば、被験集団は、低リスク群、中リスク群および高リスク群などの群に、または、4分位もしくは5分位に、最も低い4分位もしくは5分位は、最も低いリスクもしくは最も低い P I P K I I 核酸発現および/もしくはポリペプチド発現および/もしくは活性の量を有する個体であり、そして、最も高い4分位もしくは5分位は、最も高いリスクもしくは最も低い P I P K I I 核酸発現および/もしくはポリペプチド発現および/もしくは活性の量を有する個体であるように、均等に（または不均等に）分割される。

20

【0047】

既定値は、勿論、選択した特定の集団に左右され得る。例えば、一見して健康な集団は、正常でない P I P K I I 分子発現または活性に関する状態を有することが知られている集団とは異なる「正常」範囲を有するだろう。したがって、選択される既定値は、ある個体が属するカテゴリーを考慮に入れることができる。適切な範囲およびカテゴリーは、当業者により、ルーチンの実験を超えることなく選択することができる。正常でなく高いということは、選択した対照に比べて高いことを意味する。典型的には、対照は、適切な年齢層の一見して健康な正常個体に基づくことができる。

30

【0048】

いくつかの態様では、対照試料は、P I P K I I 関連疾患を有していない細胞、組織または対象からのものである。別の態様では、対照試料は、候補剤によって処置されていない試料である。例えば、候補剤の効果は、P I P K I I ポリペプチドを剤に接触させる前に、正常または正常でない P I P K I I ポリペプチドの触媒活性を決定し、そして、P I P K I I ポリペプチドを剤と接触させた後に再度決定することにより決定することができる。この場合、決定された触媒活性の初期レベルは、触媒活性の接触後のレベルに対して比較可能な対照レベルとすることができる。かかるアッセイにおいて、P I P K I I ポリペプチドの給源は、P I P K I I 関連疾患を有していないことが知られている生物学的試料であってもよく、または、既知の P I P K I I 関連疾患を有する細胞または組織からの試料であってもよく、そして、各場合において、接触前の触媒活性の決定は、接触後の触媒活性の決定の対照であってもよい。

40

【0049】

熟語「P I P K I I 関連疾患を有する疑いがある」は、本明細書で用いられる場合、当業者が、P I P K I I 核酸分子および/またはそれらがコードするポリペプチドの異常なレベルまたは活性を含むと考える、組織または組織試料を意味する。生検から試料を得るための方法の例としては、吸引、腫瘍の巨視的な分割、マイクロダイセクション、レ

50

ーザーによるマイクロダイセクション、または当該技術分野で公知のその他の細胞分離法などがあげら得る。

【0050】

罹患組織の生検材料における細胞種の多様性、および、用いる診断方法の感度の多様性のために、分析に必要な試料サイズは、1、10、50、100、200、300、500、1000、5000、10,000から、50,000個以上の細胞に及んでもよい。適切な試料サイズは、細胞の構成および生検の条件に基づいて決定することができ、そして、当該決定、およびそれに引き続く、本発明に用いる核酸の単離のための標準的な準備工程は、当業者によく知られている。この例としては、限定することを意図するものではないが、ある場合には、生検からの試料が増幅なしにRNA発現の評価に十分であるかも知れないが、他の場合には、小さな生検領域における適した細胞の欠如により、RNA変換および/もしくは増幅法、または核酸分子の分解能を向上させるための他の方法の使用が要求されるかも知れないということである。限られた生検材料の使用を可能にするかかる方法は当業者によく知られており、限定されることなく、直接RNA増幅、RNAからcDNAへの逆転写、リアルタイムRT-PCR、cDNAの増幅、または放射性標識核酸の作出などを包含する。

10

【0051】

いくつかの態様では、PIPKII 核酸分子は、配列番号1で表されるヌクレオチド配列であり、そして、PIPKII ポリペプチドは、配列番号1で表されるヌクレオチド配列によってコードされ、配列番号2で表されるアミノ酸配列を有する。他の態様では、PIPKII ポリペプチドは、配列番号1で表されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によってコードされる以外のポリペプチドを包含することができる。

20

【表1】

表1 PIPKII β 核酸およびアミノ酸の同定

配列の種類	受託番号	配列番号
核酸	NM_03559	1
タンパク質	NP_03550	2

【0052】

本発明は、いくつかの態様において、PIPKII 核酸分子の発現のレベルを決定すること、および/またはそれがコードするPIPKII ポリペプチドの存在もしくは活性レベルを決定することにより、PIPKII 関連疾患を診断またはモニタリングすることを含む。いくつかの重要な態様では、この決定は、対象、好ましくはPIPKII 関連疾患を有すると考えられるものからの組織試料を、PIPKII 核酸分子の発現のレベル、または本発明の核酸分子によってコードされるPIPKII ポリペプチドの量についてアッセイすることにより行われる。いくつかの態様では、対象からの組織試料のPIPKII ポリペプチドの触媒活性のレベルはまた、PIPKII 関連疾患の指標として決定することができる。

30

【0053】

PIPKII 活性がインスリン感受性に関連しているという驚くべき発見は、II型糖尿病、インスリン不応性、肥満および脂肪の過剰蓄積、または、異常なPIPKII 活性が関与しているその他の疾患の新規な処置方法を提供する。特に、II型糖尿病、低下したインスリン感受性、肥満および/または脂肪の蓄積を処置するための方法が本発明により提供され、そこではPIPKII 活性が阻害される。PIPKII 活性の阻害は、ホスホイノシチドのリン酸化を減少させる。PIPKII 活性により影響を受けるその他の生理学的活動にも、かかる阻害により影響を与えることができ、上記のインスリン感受性を増大させる効果などの好ましい効果をもたらすことができる。

40

【0054】

PIPKII 活性を阻害するための任意の方法が、II型糖尿病、低下したインスリ

50

ン感受性、過剰な脂肪蓄積および肥満などの P I P K I I 活性に関連する疾患の処置に有用であり得る。P I P K I I 活性は、酵素活性またはその発現の薬理的阻害剤により阻害することができる。P I P K I I 活性はまた、他の手段、例えば、抗 P I P K I I 抗体を結合させ、その活性を阻害すること、アンチセンス P I P K I I 核酸分子（遺伝子発現の R N A 干渉のための d s R N A を含む）を発現させることなどによっても阻害することができる。

【 0 0 5 5 】

P I P K I I 関連疾患のための処置は、限定されることなく、外科的介入、食餌療法、および薬物療法を包含することができる。いくつかの態様では、処置は、P I P K I I 活性の阻害により細胞または組織のインスリン感受性を増大させる薬剤の投与を包含することができる。P I P K I I 活性の阻害剤は、インスリンセンシタイザー、インスリン分泌促進剤、インスリンなどを包含する I I 型糖尿病の処置のためのその他の薬剤と一緒に投与することができる。

10

【 0 0 5 6 】

いくつかの態様において、処置は、本発明の P I P K I I 核酸分子および P I P K I I ポリペプチドの発現を減少させるアンチセンス分子を投与することを包含することができる。ある態様では、処置は、P I P K I I ポリペプチドに特異的に結合する抗体を投与することを包含することができる。抗体は、任意に、1または2以上の検出可能なマーカーまたは免疫調節剤に結合していることができる。検出可能なマーカーは、例えば、放射性マーカーまたは蛍光マーカーを包含する。他の態様では、異常なインスリンシグナル伝達を伴うある状態の処置は、細胞または組織のインスリン感受性を低下させる薬剤の投与を包含することができる。この低下は、P I P K I I 活性の増強または増大によるものであってもよい。

20

【 0 0 5 7 】

このように、本発明は、1つの側面において、P I P K I I ポリペプチド、これらのポリペプチドをコードする遺伝子、前記のものの機能的な修飾体および変異体、前記のものの有用な断片、ならびに、これらに関連する診断剤、およびこれらの診断的な使用に関連する。いくつかの態様では、P I P K I I ポリペプチド遺伝子は配列番号1に対応する。そのコードするポリペプチド（例えばタンパク質）、ペプチドおよび抗血清もまた診断に好ましく、配列番号2に対応する。

30

【 0 0 5 8 】

本明細書で P I P K I I ポリペプチドとして同定されたアミノ酸配列、およびそれらをコードするヌクレオチド配列は、GenBankなどのデータベースに寄託された配列である。これらの同定された P I P K I I 配列の、薬理的スクリーニングアッセイ、薬剤の決定、および P I P K I I 関連疾患のための診断アッセイにおける使用は新規である。

【 0 0 5 9 】

本発明の P I P K I I ポリペプチドをコードする核酸のホモログおよび対立遺伝子は、従来技法で同定することができる。したがって、本発明の1側面は、限定されることなく、P I P K I I ポリペプチドおよびそのポリペプチド断片（それらの触媒性ポリペプチドおよび触媒性断片、および/またはそれらの抗原性ポリペプチドおよび抗原性断片を包含する）をコードするこれらの核酸配列である。本明細書で用いる場合、P I P K I I ポリペプチドのホモログは、同定された P I P K I I ポリペプチドと高度の構造的な類似性を有する、ヒトまたは他の動物からのポリペプチドである。

40

【 0 0 6 0 】

P I P K I I ポリペプチドのヒトおよびその他の生物のホモログの同定は、当業者には日常的である。一般的に、核酸ハイブリダイゼーションは、既知の配列に対応する、別の種（例えば、ヒト、ウシ、ヒツジ）の相同配列の同定のための好適な方法である。標準的な核酸ハイブリダイゼーション法は、選択したパーセンテージの同一性を有する関連する核酸配列を同定するのに用いることができる。例えば、選択した組織（例えば、骨格筋、脳または脂肪）の m R N A から逆転写した c D N A のライブラリーを構築し、本明細書

50

で同定した P I P K I I ポリペプチドをコードする核酸を用いて、ライブラリーを関連ヌクレオチド配列についてスクリーニングすることができる。スクリーニングは好ましくは、配列同一性により緊密に関連づけられたこれらの配列を同定するために、高ストリンジエンシー条件を用いて行われる。このようにして同定した核酸はポリペプチドに翻訳することができ、ポリペプチドは活性、例えば触媒活性について試験することができる。

【0061】

本明細書で用いる用語「高ストリンジエンシー」は、当該技術分野でよく知られたパラメータを指す。核酸ハイブリダイゼーションのパラメータは、かかる方法をまとめた参考文献、例えば Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989、または Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New Yorkに見出すことができる。より具体的には、高ストリンジエンシー条件は、本明細書で用いる場合、例えば、65 での、ハイブリダイゼーションバッファー (3.5×SSC、0.02% Ficoll、0.02%ポリビニルピロリドン、0.02%ウシ血清アルブミン、2.5mM NaH₂PO₄ (pH7)、0.5% SDS、2mM EDTA) 中におけるハイブリダイゼーションを指す。SSCは0.15M塩化ナトリウム / 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7であり、SDSはドデシル硫酸ナトリウムであり、そしてEDTAはエチレンジアミン四酢酸である。ハイブリダイゼーション後、DNAが転写されたメンブレンは、例えば2×SSC中、室温で洗浄し、その後、0.1~0.5×SSC / 0.1×SDSにて、68 までの温度で洗浄する。

【0062】

同程度のストリンジエンシーをもたらす、使用可能な他の条件、試薬などが存在する。当業者はかかる条件に精通しており、したがって、ここではそれらを提供しない。しかしながら、当業者は、本発明の P I P K I I 核酸のホモログおよび対立遺伝子の明確な同定ができるように、条件を操作することが可能であると解される (例えば、より低いストリンジエンシーを用いることによる)。当業者はまた、細胞およびライブラリーをかかると分子の発現についてスクリーニングする方法論に精通しており、その後、細胞およびライブラリーは定法により単離され、次いで該当する核酸分子の単離および配列決定がなされる。上記の生化学的方法に加え、P I P K I I のホモログおよび対立遺伝子を同定するために、生物情報学的方法 (「in silicoクローニング」) を用いることができる。

【0063】

一般的に、ホモログおよび対立遺伝子は、P I P K I I 核酸およびポリペプチドの配列と、少なくとも90%のヌクレオチド同一性および / または少なくとも95%のアミノ酸同一性を有しており、場合によっては、少なくとも95%のヌクレオチド同一性および / または少なくとも97%のアミノ酸同一性を有し、別な場合には、少なくとも97%のヌクレオチド同一性および / または少なくとも99%のアミノ酸同一性を有する。相同性は、インターネットを介して得ることができる、NCBI (Bethesda, Maryland) によって開発された、種々の、公衆に利用可能なソフトウェアツールを用いて計算することができる。代表的なツールは、国立衛生研究所の国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI) のウェブサイトから入手可能なBLASTシステムを包含する。PairwiseおよびClustalWアライメント (行列設定BLOSUM30)、ならびにKyte-Doolittle疎水性分析は、MacVector配列分析ソフトウェア (Oxford Molecular Group) を用いて得ることができる。上記核酸のワトソンクリック相補体も、本発明に包含される。

【0064】

P I P K I I ポリペプチド遺伝子のスクリーニングにおいて、上述の条件を用い、検出可能に標識したプローブ (例えば、放射性または化学発光プローブ) と一緒に、ザンプロットを行うことができる。最終的にDNAが転写されたメンブレンを洗浄後、メンブレンをX線フィルムまたはホスホイメジャーに対して設置し、放射性または化学発光シグナルを検出することができる。P I P K I I ポリペプチド核酸の発現のスクリーニングにおいて、上述の条件を用いたノザンプロットハイブリダイゼーションを、P I P K I I 関連疾患を有する患者または正常でないP I P K I I 分子の発現または活性を特徴

とする状態を有する疑いがある対象から採取した試料について行うことができる。提示された配列にハイブリダイズするプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応などの増幅手順もまた、PIPKII ポリペプチド遺伝子またはその発現の検出に用いることができる。

【0065】

関連配列の同定はまた、RT-PCR、リアルタイムPCRを包含するポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、および関連核酸配列をクローニングするのに好適なその他の増幅技法を用いて達成することができる。好ましくは、PCRプライマーは、保存されていると考えられる核酸配列の部分(例えば、触媒ドメイン、DNA結合ドメインなど)を増幅するように選択する。また、核酸は、組織特異的ライブラリー(例えば、骨格筋、脳、脂肪)から増幅される。ヒトまたはその他の種における関連する抗原性タンパク質をコードする核酸を同定するために、本発明のポリペプチドに対する抗血清を用いた発現クローニングを用いることもできる。

10

【0066】

本発明はまた、縮重核酸を包含し、これはネイティブな材料中に存在するものに対する代替的なコドンを含む。例えば、セリン残基はコドンTCA、AGT、TCC、TCG、TCTおよびAGCによってコードされる。この6種のコドンの各々は、セリン残基をコードする目的については同等である。したがって、伸長しているPIPKII ポリペプチド中にセリン残基をin vitroまたはin vivoで組み込むべく、タンパク質合成装置を導くために、セリンをコードする任意のヌクレオチドトリプレットを用いることができることは、当業者にとって明らかである。同様に、他のアミノ酸をコードするヌクレオチド配列トリプレットは、限定されることなく、CCA、CCC、CCGおよびCCT(プロリンコドン)、CGA、CGC、CGG、CGT、AGAおよびAGG(アルギニンコドン)、ACA、ACC、ACGおよびACT(トレオニンコドン)、AACおよびAAT(アスパラギンコドン)、およびATA、ATCおよびATT(イソロイシンコドン)を包含する。その他のアミノ酸残基は、複数のヌクレオチド配列によって、同様にコードされ得る。したがって、本発明は、遺伝コードの縮重により、コドン配列において生物学的に単離された核酸と異なる縮重核酸を包含する。

20

【0067】

本発明はまた、1または2以上のヌクレオチド(好ましくは1~20ヌクレオチド)の付加、置換および欠失を含む変更された核酸分子を提供する。好ましい態様では、これらの変更された核酸分子および/またはそれらがコードするポリペプチドは、変更されていない核酸分子および/またはポリペプチドの少なくとも1つの活性または機能、例えば、触媒活性、抗原性などを保持する。ある態様では、変更された核酸分子は、変更されたポリペプチド、好ましくは、本明細書の他所に記載された保存的アミノ酸置換を有するポリペプチドをコードする。変更された核酸分子は、変更されていない核酸分子と構造的に関連しており、好ましい態様では、変更された核酸分子と変更されていない核酸分子とが、当業者に知られたストリンジェントな条件下でハイブリダイズするように、変更されていない核酸分子に構造的に十分に関連している。

30

【0068】

例えば、単一のアミノ酸の変化を有するポリペプチドをコードする変更された核酸分子を作製することができる。これらの核酸分子の各々は、本明細書に記載された遺伝コードの縮重に対応するヌクレオチドの変化を除いた、1個、2個または3個のヌクレオチド置換を有することができる。同様に、2個のアミノ酸の変化を有するポリペプチドをコードする変更された核酸分子を作製ことができ、これは、例えば2~6個のヌクレオチド変化を有する。これらに類する多数の変更された核酸分子は、当業者により容易に想起され得、これは、例えば、アミノ酸2および3、2および4、2および5、2および6などをコードするコドンにおけるヌクレオチドの置換を包含する。上記の例において、2個のアミノ酸の各々の組み合わせは、変更された核酸分子の組、ならびにアミノ酸置換をコードするすべてのヌクレオチド置換に包含される。追加の置換(即ち、3または4個以上)、付加または欠失(例えば、終止コドンまたはスプライシング部位の導入によるもの)を

40

50

有するポリペプチドをコードする追加の核酸分子もまた、当業者が容易に想起することができるため、作製することができ、本発明に包含される。上記の任意の核酸またはポリペプチドは、本明細書に開示された核酸および/またはポリペプチドに対する構造的な関連性または活性の保持について、日常的な実験により試験することができる。

【0069】

本発明はまた、PIPKII ポリペプチドの断片をコードする核酸分子を提供する。

断片は、かかる核酸を同定するため、サザンおよびノザンプロットアッセイにプローブとして用いることができ、または、限定されることなく、RT-PCRおよびリアルタイムPCRを包含するPCRを用いるものなどの、増幅アッセイに用いることができる。当業者に知られているように、サザンおよびノザンプロットなどある種の用途のためには、200、250、300ヌクレオチドまたはそれ以上の大きなプローブが好まれる一方、より小さな断片は、PCRなどの用途に好ましいだろう。断片はまた、抗体を作出するため、もしくはポリペプチド断片の結合を決定するための融合タンパク質を作製するのに用いることができ、または、イムノアッセイの構成要素を作出するのに用いることができる。同様に、断片は、例えば、抗体の作製およびイムノアッセイなどに有用な、PIPKII ポリペプチドの非融合断片を作製するのに用いることができる。好ましい断片は、PIPKII ポリペプチドに特異的に結合する基質剤により認識される、触媒的に活性化断片である。

10

【0070】

また、本発明により、PIPKII ポリペプチド遺伝子の「ロックアウト」、「ロックダウン」（例えば、RNA阻害によるもの）または「ロックイン」を、細胞および動物において構築することも可能となり、これは、II型糖尿病、インスリン不応性、肥満および脂肪の過剰蓄積などのPIPKII 関連疾患のある側面を研究するための、そして、PIPKII ポリペプチドの発現の調節の効果を研究するための材料を提供する。例えば、ロックインマウスを構築し、モデルと、上方調節されたPIPKII ポリペプチドの発現を有する、PIPKII 関連疾患罹患マウスとの間の臨床的な類似点を調査することができる。かかる細胞または動物モデルはまた、PIPKII ポリペプチド活性の候補阻害剤、インスリン感受性を増大させる候補剤、および、PIPKII 関連疾患に対する処置戦略を評価するのに有用であり得る。PIPKII 関連疾患用の、代替的な種類の細胞、組織および動物モデルを、本発明に基づいて開発することができる。

20

30

【0071】

本発明はまた、PIPKII 核酸によってコードされる単離ポリペプチド（全長タンパク質および部分タンパク質を包含する）を提供する。かかるポリペプチドは、例えば、抗体の作出に単独でまたは融合タンパク質として、および、イムノアッセイまたは診断アッセイの構成要素として有用である。PIPKII ポリペプチドは、組織または細胞のホモジネートを包含する生物学的試料から単離することができ、そして、種々の原核および真核発現系において、該発現系に適切な発現ベクターを構築し、該発現ベクターを発現系に導入し、そして、組み換え的に発現されたタンパク質を単離することにより、組み換え的に発現させることもできる。触媒的に活性化および/または抗原性のペプチドを包含するPIPKII 断片などの短いポリペプチドはまた、十分に確立されたペプチド合成法を用いて化学的に合成することができる。

40

【0072】

ポリペプチドの断片は、好ましくは、ポリペプチドの明確な機能的能力を保持している断片である。ポリペプチドの断片に保持できる機能的能力は、抗体との相互作用（例えば、抗原性断片）、他のポリペプチドまたはその断片との相互作用、核酸もしくはタンパク質の選択的な結合、および触媒活性を包含する。

【0073】

当業者はまた、PIPKII ポリペプチドに保存的アミノ酸置換を施し、前記ポリペプチドの機能的に等価な変異体またはホモログを提供できること、すなわち、該変異体が触媒活性または抗原性などの、PIPKII ポリペプチドの機能的能力を保持すること

50

を理解することができる。本明細書で用いる場合、「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸置換が施されたタンパク質の相対電荷 (relative charge) またはサイズ特性 (size characteristics) を変更しないアミノ酸置換を指す。変異体は、当業者に知られている、ポリペプチド配列を変更するための方法に従って作製することができ、当該方法は、かかる方法をまとめた参考文献、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 または Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New Yorkに見出される。PIP K I I

ポリペプチドの機能的に等価である典型的な変異体またはホモログは、本明細書に開示されたタンパク質のアミノ酸配列に保存的アミノ酸置換を含む。保存的アミノ酸置換は、次の群内のアミノ酸の間でなされる置換を包含する：(a) M、I、L、V；(b) F、Y、W；(c) K、R、H；(d) A、G；(e) S、T；(f) Q、N；および(g) E、D。

10

【0074】

例えば、PIP K I I ポリペプチドのアミノ酸配列に保存的アミノ酸置換を施し、それでもなお、その特定の抗体結合特性および/または触媒特性を保持するポリペプチドを得ることができる。あるいは、触媒的に不活性な、または、活性の低い突然変異体を作製することができる。

【0075】

機能的な等価な P I P K I I ポリペプチドの変異体を作製するための、P I P K I I

ポリペプチドのアミノ酸配列における保存的アミノ酸置換は、典型的には、P I P K I I

I ポリペプチドをコードする核酸の変更によりなされる。かかる置換は、当業者に既知の種々の方法により行うことができる。例えば、アミノ酸置換は、PCRによる突然変異、Kunkelの方法 (Kunkel, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 82: 488-492, 1985) による部位特異的変異導入、または、P I P K I I ポリペプチドをコードする遺伝子の化学合成により行うことができる。アミノ酸置換が、自己血清もしくは同種血清または細胞溶解性Tリンパ球により認識される抗原性エピトープなどの、P I P K I I ポリペプチドの小さなユニークフラグメントに施される場合、置換はペプチドを直接合成することにより行うことができる。P I P K I I ポリペプチドの断片の活性は、変更された P I P K I I

ポリペプチドをコードする遺伝子を細菌または哺乳類発現ベクターにクローニングし、ベクターを適切な宿主細胞に導入し、変更されたポリペプチドを発現させ、そして本明細書に開示されたとおりに P I P K I I ポリペプチドの機能的な能力について試験することにより、試験することができる。化学合成されたペプチドは、機能について、例えば、触媒活性、および/または関連する抗原を認識する抗血清への結合について、直接試験することができる。

20

30

【0076】

本明細書における、生理学的疾患に關与するものとしての P I P K I I ポリペプチドの同定はまた、当業者に、P I P K I I ポリペプチドの発現を特徴とし、そして、好ましくは P I P K I I ポリペプチドの機能的活性の変化を特徴とする疾患を診断することを可能にする。

40

【0077】

P I P K I I ポリペプチド発現に関する方法は、1種または2種以上の P I P K I I

核酸、および/またはコードされる P I P K I I ポリペプチド、および/またはそれらに由来するペプチドの発現を決定し、該発現を P I P K I I 関連疾患のない対象におけるものと比較することを含む。かかる決定は、ポリメラーゼ連鎖反応を包含する任意の標準的な核酸決定アッセイ、または標識されたハイブリダイゼーションプローブでアッセイすることを介して行うことができる。かかるハイブリダイゼーション法は、限定されることなく、マイクロアレイ技法を包含する。

【0078】

診断、予後判定、および治療目的のための P I P K I I ポリペプチドの触媒活性の決

50

定は、本発明の1側面である。PIPKII ポリペプチドの触媒活性を決定し、候補薬剤を、PIPKII 触媒活性を変化(増大または減少)させるそれらの能力について試験することができる。化合物がPIPKII 触媒活性を変化させるという決定は、該化合物が、II型糖尿病、インスリン不応性、肥満および脂肪の過剰蓄積などのPIPKII 関連疾患を処置する剤として有用であり得ることを示す。例えば、PIPKII ポリペプチドを、該ポリペプチドの基質と接触させ、そしてPIPKII の触媒活性をモニターおよび決定することができ、次いで、PIPKII ポリペプチドを候補剤と接触させ、そして、ポリペプチドの触媒活性を基質との接触により決定することができる。かかるアッセイは、in vitroで行うことができ、また、細胞またはヒトを包含する動物への触媒活性調節剤のin vivo投与の効果モニターするのに有用であり得る。いくつかの態様では、上記の種類のアッセイを、細胞または組織のインスリン感受性を増大させる候補剤を同定するのに用いることができ、別の態様では、かかる方法は、細胞および組織のインスリン感受性を低下させる候補剤を同定するのに有用であり得る。PIPKII ポリペプチドの触媒活性を阻害する候補剤はインスリン感受性を増大させることができ、したがって、II型糖尿病、インスリン不応性、肥満および脂肪の過剰蓄積などのPIPKII 関連疾患を処置するのに有用であり得る。本発明のアッセイはまた、PIPKII ポリペプチドの触媒活性を増強する候補剤を同定するのに用いることができる。かかるアッセイは、PIPKII ポリペプチド活性の増大が観察されるPIPKII 関連疾患の処置に用いるための候補剤を同定するのに有用であり得る。

10

【0079】

本発明はまた、PIPKII ポリペプチドに結合するポリペプチドなどの剤の使用に関連する。かかる結合剤は、例えば、PIPKII ポリペプチドおよびPIPKII ポリペプチドとその結合パートナーとの複合体の存在または欠如を検出するスクリーニングアッセイに、およびPIPKII およびPIPKII ポリペプチドとその結合パートナーとの複合体を単離する精製手順に用いることができる。かかる剤はまた、PIPKII ポリペプチドのネイティブな活性を、例えば、かかるポリペプチドに結合することにより阻害するのに用いることができ、そして、PIPKII 関連疾患の処置に有用であり得る。

20

【0080】

本発明は、したがって、例えば、PIPKII ポリペプチドに選択的に結合する能力を有する抗体または抗体のフラグメントであることができる、ペプチド結合剤を包含する。抗体は、従来の方法論にしたがって作製したポリクローナルおよびモノクローナル抗体を包含する。本明細書で用いる場合、PIPKII 抗体は、PIPKII ポリペプチドに特異的に結合する抗体である。

30

【0081】

注目すべきは、当該技術分野でよく知られているとおり、抗体分子の小部分であるパトープしか、抗体の、そのエピトープへの結合に関与していないということである(概して、Clark, W.R. (1986) The Experimental Foundations of Modern Immunology, Wiley & Sons, Inc., New York, Roitt, I. (1991) Essential Immunology, 7th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxfordを参照)。例えば、pFc'およびFc領域は、補体カスケードのエフェクターであるが、抗原結合には関与しない。pFc'領域を酵素的に切断した抗体、またはpFc'領域なしで作製した抗体は、F(ab')₂フラグメントと呼ばれ、インタクトな抗体の両方の抗原結合部位を保持する。同様に、Fc領域を酵素的に切断した抗体、またはFc領域なしで作製した抗体は、Fabフラグメントと呼ばれ、インタクトな抗体分子の一方の抗原結合部位を保持する。さらに続けると、Fabフラグメントは、共有結合した抗体軽鎖と、Fdと表される抗体重鎖の部分とからなる。Fdフラグメントは、抗体の特異性の主要な決定基であり(単一のFdフラグメントは、抗体の特異性を変えることなく、10種までの異なる軽鎖と会合することができる)、Fdフラグメントは単独でエピトープ結合能力を保持する。

40

【0082】

50

抗体の抗原結合部分には、当該技術分野でよく知られているとおり、抗原のエピトープと直接相互作用する相補性決定領域（CDR）、およびパラトープの3次構造を維持するフレームワーク領域（FR）がある（概して、Clark, 1986、Roitt, 1991を参照）。免疫グロブリンIgGの重鎖Fdフラグメントおよび軽鎖のいずれにも、3つの相補性決定領域（CDR1～CDR3）によってそれぞれ分離された4つのフレームワーク領域（FR1～FR4）がある。CDR、特にCDR3領域、そしてより特別には重鎖CDR3が、抗体の特異性に大きく関与している。

【0083】

哺乳類抗体の非CDR領域が、元の抗体のエピトープ特異性を保持しながら、同種特異的または異種特異的抗体の類似の領域と置換できることは、当該技術分野で現在よく確立

10

【0084】

完全にヒトのモノクローナル抗体はまた、ヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子座の大部分についてトランスジェニックなマウスを免疫することにより作製することができる。これらのマウス（例えば、XenoMouse (Abgenix)、HuMAb マウス (Medarex/GenPharm)）を免疫した後、モノクローナル抗体は、標準的なハイブリドーマ技術にしたがって作製

20

【0085】

したがって、当業者にとって明らかなように、本発明はまた、F(ab')₂、Fab、FvおよびFdフラグメント、Fcおよび/またはFRおよび/またはCDR1および/またはCDR2および/または軽鎖CDR3領域が、ヒトもしくは非ヒト相同配列で置換されたキメラ抗体、FRおよび/またはCDR1および/またはCDR2および/または軽鎖CDR3領域が、ヒトもしくは非ヒト相同配列で置換されたキメラF(ab')₂フラグメント、FRおよび/またはCDR1および/またはCDR2および/または軽鎖CDR3領域がヒトもしくは非ヒト相同配列で置換されたキメラFabフラグメント、お

30

【0086】

したがって、本発明は、PIPKII ポリペプチド、および、PIPKII ポリペプチドとその結合パートナーとの複合体に特異的に結合する多くのサイズおよび種類のポリペプチドに関連する。これらのポリペプチドは、抗体技術以外の給源に由来してもよい。例えば、かかるポリペプチド結合剤は、溶液中で、不動化形態で、またはフェージディスプレイライブラリーとして容易に作製することができる縮重ペプチドライブラリーにより提供することができる。また、コンビナトリアルライブラリーは、1個または2個以上

40

【0087】

フェージディスプレイは、本発明に有用な結合ペプチドを同定するのに特に効果的であり得る。簡潔には、4～約80アミノ酸残基のインサートを表示する、フェージライブラリー（例えばm13、fdまたはラムダフェージを用いたもの）を、慣用の手順により作製する。インサートは、例えば、完全に縮重された、または、バイアスをかけたアレイに相当してもよい。次に、PIPKII ポリペプチドに結合する、フェージに担持されたインサートを選択することができる。この過程は、PIPKII ポリペプチドに結合するフェージの再選択の数回のサイクルまで繰り返すことができる。回数を繰り返すことにより

50

、特定の配列を担持するファージの濃縮がもたらされる。発現されたポリペプチドの配列を同定するために、DNA配列分析を行うことができる。PIPKII ポリペプチドに結合する、配列の最小線状部分 (minimal linear portion) を決定することができる。最小線状部分の部分または全部に加え、1または2以上の追加の縮重残基をその上流または下流に含むインサートを含むバイアスがかかったライブラリーを用いて、この手順を繰り返すことができる。PIPKII ポリペプチドに結合するポリペプチドを同定するために、酵母ツーハイブリッドスクリーニング法を用いることもできる。

【0088】

したがって、本発明のPIPKII ポリペプチド(その断片を包含する)は、ファージディスプレイライブラリーを包含するペプチドライブラリーをスクリーニングし、本発明のPIPKII ポリペプチドのペプチド結合パートナーを同定および選択するのに用いることができる。かかる分子は、説明したとおり、スクリーニングアッセイ用に、精製手法用に、PIPKII ポリペプチドの機能性に直接干渉するために、そして、当業者に明らかなその他の目的のために、用いることができる。例は、限定する意図はないが、単離PIPKII ポリペプチドを基材(例えば、ポリスチレンビーズなどのクロマトグラフィー媒体、またはフィルター)に付着させることができ、次いで結合パートナーを含む疑いがある液体を基材に適用できるアッセイである。液中にPIPKII ポリペプチドと相互作用できる結合パートナーが存在すれば、これは次に基材に結合したPIPKII ポリペプチドに結合する。その後、結合パートナーを単離することができる。

10

【0089】

本明細書に詳説されているとおり、前記の抗体およびその他の結合分子は、例えば、組織が発現するタンパク質を同定するため、またはタンパク質を精製するために用いることができる。抗体はまた、PIPKII ポリペプチドを発現する細胞および組織を画像化するための特定の診断標識剤、または、治療に有用な剤に、標準的な結合手法に従って結合させることができる。

20

【0090】

本発明はまた、例えば、対象から逐時的に(at sequential times)試料を取得し、かかる試料を、PIPKII 核酸分子の発現のレベル、PIPKII ポリペプチド分子の発現のレベル、および/またはPIPKII ポリペプチドの活性のレベルについてアッセイすることにより、対象におけるPIPKII 関連疾患の発症、進行または消退をモニターする方法を包含する。対象は、PIPKII 関連疾患を有する疑いがあってもよく、または、PIPKII 関連疾患を有しないと考えられていてもよく、後のケースにおいては、試料の発現または活性レベルは、その後の試料との比較のための対照となり得る。

30

【0091】

状態の発症は、対象における状態に関連した変化の開始である。かかる変化は、生理学的な症状により明らかであってもよく、または、臨床的に無症状であってもよい。例えば、PIPKII 関連疾患の発症の後に、その時点では臨床症状は明らかでないかも知れないが、対象においてPIPKII の生理学的な変化があり得る時期が続くことがある。状態の進行は、発症に引き続く、状態の生理学的要素の進展であり、これは臨床症状の増悪によって明らかであってもなくてもよい。発症と進行は、いずれも、細胞または対象における疾患の特徴(例えば、PIPKII 関連疾患におけるPIPKII 分子の発現または活性)の増大を示す点で類似しており、発症は、この疾患の始まりであり、進行は、既存の状態の悪化である。

40

【0092】

発症および進行に対して、状態の消退は、状態の生理学的特徴の減少であり、これは恐らく症状の平行した減少を伴い、そして、処置の結果であってもよく、または状態の自然な逆行であってもよい。本発明はまた、部分的に、対象におけるPIPKII 核酸の異常な、または変異した配列の決定に、PIPKII 核酸配列を用いる方法に関する。このアッセイは、PIPKII 関連疾患の発症前診断および予防的処置に有用であり得る

50

。

【0093】

PIP K I I 関連疾患のためのマーカーは、PIP K I I ポリペプチドの抗体との特異的結合のレベルもしくは量、PIP K I I ポリペプチドの触媒活性のレベルもしくは量、または、PIP K I I 核酸の発現のレベルであってもよい。PIP K I I 関連疾患の発症は、対象試料におけるかかるマーカーの量の増加によって示すことができ、ここで、それ以前に決定されたかかるマーカーは少ない。例えば、PIP K I I 関連疾患のためのマーカーが、対象からの最初の試料において低いレベルであり（例えば、正常対照試料のレベルと同じか、それに近い）、PIP K I I 関連疾患マーカーが、対象からの2番目の、またはその後の試料において、より高いレベルで存在することが決定される場合、それは、PIP K I I 関連疾患の発症を示し得る。

10

【0094】

PIP K I I 関連疾患の進行および消退は、一般的に、対象の試料におけるマーカーのレベルの経時的な増加または減少によって、それぞれ示すことができる。例えば、PIP K I I 関連疾患のためのマーカーのレベルが、対象からの最初の試料中に存在することが決定され、そして、より高いレベルのPIP K I I 関連疾患のためのマーカーが、対象からの2番目の、またはその後の試料中に存在することが決定される場合、それはPIP K I I 関連疾患の進行を示し得る。PIP K I I 関連疾患の消退は、対象からの試料中存在することが決定されたマーカーのレベルが、2番目の、またはその後の対象からの試料において、より低いレベルで見出されることを見出すことにより示すことができる。

20

【0095】

PIP K I I 関連状態の進行および消退もまた、対象において決定されたPIP K I I ポリペプチドの特性に基づいて示すことができる。例えば、PIP K I I ポリペプチドは、PIP K I I 関連疾患の特定の病期に、異なるレベルで発現し得る（例えば、PIP K I I ポリペプチドの初期レベル、PIP K I I ポリペプチドの中期レベル、およびPIP K I I ポリペプチドの後期レベル）。

【0096】

限定されることなく、I I型糖尿病、インスリン不応性、肥満および脂肪の過剰蓄積を包含するPIP K I I 関連疾患の異なる種類は、異なるレベルのPIP K I I ポリペプチドおよびそれをコードする核酸分子を発現するか、または、異なる空間的もしくは時間的発現パターンを有し得る。かかる差異により、PIP K I I 関連疾患に特異的な診断および、その後の患者の特定の状態に合った処置が可能となる。

30

【0097】

本発明はまた、部分的に、I I型糖尿病、インスリンへの不応性、肥満および脂肪の過剰蓄積などのPIP K I I 関連疾患を処置する方法に関する。薬物治療の「有効量」とは、単独で、またはさらなる用量とともに、PIP K I I 活性を阻害し、所望の応答、例えば、I I型糖尿病の症状の軽減、インスリンへの感受性の増大、肥満の軽減、および/または過剰な脂肪蓄積の軽減などをもたらす剤の量である。

【0098】

特定の疾患または状態を処置する場合には、所望の応答は、該疾患または状態の進行を阻害することである。これは、疾患の進行を一時的に減速させることのみを含んでもよいが、より好ましくは、それは、疾患の進行を永久に停止させることを含む。これは、任意の特定の疾患について当業者に知られた日常的な診断方法によってモニターすることができる。疾患または状態の処置に対する所望の応答はまた、疾患または状態の発症を遅延させること、または発症を予防することでさえあり得る。

40

【0099】

かかる量は、勿論、処置される特定の状態、状態の重篤度、年齢、健康状態、体格および体重を包含する個々の患者のパラメータ、処置の継続期間、併用療法の性質（行っている場合は）、具体的な投与経路、および医師の知識と技能の範囲の同様の因子に左右され

50

る。これらの因子は当業者によく知られており、ルーチンを超える実験なしに対応することができる。一般的に、P I P K I I 活性を阻害する、剤の最大用量（単独または、他の治療剤と組み合わせて）、即ち、信頼できる医療判断による最も高い安全量を用いるのが好ましい。しかしながら、当業者は、患者が医学的理由、心理的理由、または実質的に他のあらゆる理由により、より低い用量または耐容できる用量を要求する場合があることを理解できる。

【0100】

上記の方法において用いられる医薬組成物は、好ましくは無菌であり、P I P K I I 活性を阻害して所望の応答を生じさせる有効量の剤を、患者への投与に好適な重量もしくは容量の単位に含有する。

10

【0101】

対象に投与されるP I P K I I 活性を阻害する剤の用量は、様々なパラメータに従って、特に用いる投与様式および対象の状況に従って、選択することができる。他の因子としては、所望の処置期間があげられる。対象の応答が、適用された初期用量では不十分な場合、より高い用量（または異なった、より限局された送達経路による、効果的なより高い用量）を、患者の耐容性が許容する範囲で用いることができる。

【0102】

P I P K I I 活性を阻害する剤を、所望の組織、細胞または体液に効率的に送達する種々の投与様式は、当業者によく知られている。投与は、局所、静脈内、経口、腔内、髄腔内、滑液包内、口腔内、舌下、鼻腔内、経皮、硝子体内、皮下、筋肉内、および皮内投与を包含する。本発明は、本明細書に開示された特定の投与様式に限定されない。当該技術分野の標準的な参考文献（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, 1990）は、医薬担体中の種々の医薬製剤および剤形の送達のための、投与様式および剤形を提供する。P I P K I I 活性を阻害する剤の投与に有用なその他の手順は当業者に知られており、そこでの用量、投与スケジュール、投与部位、投与様式（例えば、投与する器官）などは、本明細書に示されたものとは異なる。

20

【0103】

P I P K I I 活性を阻害する剤の、ヒト以外の哺乳類への投与、例えば、試験目的または獣医治療目的のためのものは、上記と実質的に同様の条件下で行う。この発明は、P I P K I I 活性を阻害する剤で処置できるヒトおよび動物疾患の療法に適用できることを、当業者は理解できる。従って、この発明は、ヒトの治療はもちろんのこと、畜産および獣医療に用いられることを目的としている。

30

【0104】

一般的に、I I型糖尿病、インスリンへの不応性、肥満および脂肪の過剰蓄積の処置には、P I P K I I 活性を阻害する用量の剤が処方され、P I P K I I を阻害する剤について0.2mg ~ 5000mgの用量で投与される。好ましくは、有効量は、当該技術分野の任意の標準的な手法に従い、P I P K I I を阻害する剤について約0.5mg ~ 500mgの範囲である。P I P K I I 活性を阻害する剤の、ヒト以外の哺乳類への投与、例えば、試験目的または獣医治療目的のためのものは、上記と実質的に同様の条件下で行う。治療に有効な量は、1日または2日以上、毎日1または2以上の用量の投与において、典型的には、0.01ng / kg ~ 約1000μg / kg、好ましくは、約0.1ng / kg ~ 約200μg / kg、そして最も好ましくは、約0.2ng / kg ~ 約20μg / kgの範囲で変動する。

40

【0105】

本発明の医薬製剤は、単独で、またはP I P K I I 関連疾患の標準的な処置と併行して投与することができる。例えば、本発明の薬剤によるI I型糖尿病の処置は、当該技術分野で知られ、そして実践されている糖尿病のための処置と並行して行うことができる。例えば、かかる処置は、限定されることなく、メトホルミン、ピオグリタゾンおよび/またはロシグリタゾンの投与を包含することができる。I I型糖尿病のためのその他の知られた処置は、インスリン放出を増大させる薬剤を包含し、これは、限定されることなく、スルホニル尿素、ナテグリニドおよびレパグリニドを包含することができる。いくつかの

50

処置方法において、スルホニル尿素は、限定されることなく、グリベンクラミド（グリブリド）、グリクラジドおよびグリメピリドを包含する。本発明のいくつかの態様では、インスリンを、本発明の処置方法と並行して、対象に投与することができる。

【0106】

投与時には、本発明の医薬製剤は、薬学的に許容し得る量で、薬学的に許容し得る組成物にて適用される。用語「薬学的に許容し得る」は、有効成分の生物学的活性の有効性に干渉しない、毒性のない材料を意味する。かかる製剤は、定法として、塩、緩衝剤、保存剤、適合性の担体、そして任意にその他の治療剤を含有することができる。医薬に用いる場合、塩は薬学的に許容し得るものであるべきだが、薬学的に許容し得ない塩は、その薬学的に許容し得る塩を製造するのに都合良く用いることができ、本発明の範囲から除外され 10
ない。かかる薬理学的および薬学的に許容し得る塩は、限定されることなく、以下の酸から製造されるものを包含する：塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、クエン酸、ギ酸、マロン酸、コハク酸など。また、薬学的に許容し得る塩は、ナトリウム塩、カリウム塩またはカルシウム塩などのアルカリ金属塩またはアルカリ土類塩として製造することができる。組成物の好ましい構成要素は、本発明の P I P K I I 活性を阻害する剤の説明と合わせて、上記されている。

【0107】

P I P K I I 活性を阻害する剤は、所望により、薬学的に許容し得る担体と組み合わせることができる。用語「薬学的に許容し得る担体」は、本明細書で用いる場合、ヒトへの投与に好適な、1種または2種以上の適合性の固体もしくは液体の充填剤、希釈剤または 20
カプセル化剤を意味する。用語「担体」は、天然または合成の有機または無機成分であって、適用を容易にするために有効成分と組み合わせられるものを意味する。医薬組成物の構成要素はまた、P I P K I I 活性を阻害する剤と、そして、相互に、所望の薬学的有効性を実質的に損なう可能性のある相互作用がないように混合することができる。

【0108】

本医薬組成物は、上記のとおり、好適な緩衝剤を含有することができ、これは、酢酸塩、リン酸塩、クエン酸塩、グリシン、ホウ酸塩、カルボン酸塩、重炭酸塩、水酸化物（およびその他の塩基）、および前記化合物の薬学的に許容し得る塩を包含する。

【0109】

本医薬組成物はまた、任意に、塩酸ベンザルコニウム、クロロブタノール、パラベンお 30
よびチメロサルなどの好適な保存剤を含有することができる。

本医薬組成物は、都合良く単位用量形態とすることができ、製薬分野でよく知られた任意の方法により製造することができる。すべての方法は、活性な剤を1種または2種以上の補助的な成分を構成する担体と会合させる工程を含む。一般的に、本組成物は、活性な化合物を、液体担体、微細に分割した固体担体、またはその両方と、均一かつ密接に会合させ、次いで、必要に応じて、製品を成形することにより製造する。

【0110】

経口投与に好適な組成物は、各々が既定量の活性な化合物を含有している分離した単位として、例えば、カプセル、錠剤、トローチ剤として提示されることができる。その他の組成物としては、シロップ、エリキシル、またはエマルションなどの、水性液または非水 40
性液中の懸濁物があげられる。

【0111】

非経腸投与に好適な組成物は、都合良く P I P K I I 活性を阻害する剤を含む。この製剤は、好適な分散または湿潤剤、および懸濁化剤を用いた公知の方法に従って製剤することができる。無菌の注射可能な製剤はまた、例えば、1,3-ブタンジオール中の溶液のような、毒性のない、経腸的に許容し得る希釈剤または溶媒中の無菌の注射可能な溶液または懸濁液であることができる。使用可能な許容し得るビヒクルおよび溶媒としては、水、リンゲル液、および等張塩化ナトリウム溶液があげられる。さらに、無菌の固定油が、溶媒または懸濁媒体として慣用的に用いられる。この目的のために、合成モノグリセリドまたはジグリセリドを包含する、任意のブランドの固定油を用いることができる。さら 50

に、オレイン酸などの脂肪酸を、注射剤の製造に用いることができる。経口投与、皮下投与、静脈内投与、筋肉内投与などに好適な担体の処方は、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PAに見出すことができる。

【0112】

長期持続放出性のインプラントもまた、本薬剤組成物の投与に用いることができる。「長期」放出は、本明細書で用いる場合、インプラントが、治療レベルの有効成分を、少なくとも30日間、そして好ましくは60日間放出するように構築および調整されていることを意味する。長期持続放出性のインプラントは当業者によく知られており、上記したいくつかの放出システムを包含する。かかるインプラントは、望ましくないPIPKII活性を特徴とする状態の処置に特に有用であることができ、これは、インプラントをかか 10
る活性に影響された対象の部分の近くに設置し、それにより本発明の化合物の限局された高用量をもたらすことによるものである。本発明はまた、部分的に、PIPKIIポリペプチドの触媒活性を決定するのに用いるアッセイに関する。PIPKIIポリペプチドは、表面に付着させ、次いで、基質分子と接触させることができ、そして、PIPKIIポリペプチドまたはその断片の触媒活性のレベルは、標準的な方法を用いてモニターおよび定量することができる。上記のアッセイは、限定することを意図していない。触媒活性のためのアッセイはまた、液中の構成要素により、当該技術分野で認識された種々の検出方法を用いて、および/または、当業者に知られたその他のキナーゼアッセイ法により行うこともでき、そのいくつかは以下で説明する。

【0113】

本発明はさらに、薬理的な剤、またはキナーゼ活性を阻害もしくはモニターするのに有用な剤のためのリード化合物を同定する効率的な方法を提供する。概して、本スクリーニング方法は、切断される化合物、または、基質のリン酸化を阻害もしくは増強する化合物についてアッセイすることを含む。かかる方法は、化合物の自動化された、ハイスループットスクリーニングに適応できる。 20

【0114】

薬理的な剤についての幅広い種類のアッセイが提供され、これは、標識化in vitroキナーゼリン酸化アッセイ、細胞ベースのリン酸化アッセイなどを包含する。例えば、in vitroキナーゼリン酸化アッセイは、例えば、PIPKII またはその断片による基質のリン酸化における候補となる薬理的な剤の効果を、迅速に調査するのに用いられる。候補となる薬理的な剤は、例えば、ペプチドまたは小分子のコンビナトリアルライブラリーから得ることができる。かかるアッセイのための都合の良い試薬は当該技術分野で知られている。 30

【0115】

本発明のアッセイ方法に用いられる基質は、一般的に、単離された分子として、アッセイ混合物に添加される。PIPKII とともに用いる場合、好ましい基質はPI5Pである。アッセイ混合物は、PIPKII によりリン酸化されたホスホイノシチドを容易に検出できるように、検出可能なリン酸化合物（例えば、³²Pまたは³³P）を含むことができる。あるいは、基質に対するPIPKII の活性は、特異的なリン酸化イノシチドの抗体による捕捉、クロマトグラフィーによる手段などの他の検出可能な手段を用いて測定することができる。 40

【0116】

典型的なアッセイ混合物は、リン酸化部位モチーフを有するペプチドおよび候補となる薬理的な剤を含む。典型的には、種々の濃度に対する異なる応答を得るため、異なる剤濃度の複数のアッセイ混合物を並行処理する。典型的には、これらの濃度の1つは陰性対照となり、すなわち、剤濃度が0であるか、または、アッセイの検出限界未満の剤濃度である。候補剤は、多種の化学的クラスを包含するが、典型的には有機化合物である。好ましくは、候補となる薬理的な剤は、小有機分子、すなわち、50より大きいが、約2500未満の分子量を有するものである。候補剤は、ポリペプチドとの構造的な相互作用に必要な機能的な化学基を含み（例えば、キナーゼ部位）、そして典型的には、少なくともアミノ 50

基、カルボニル基、ヒドロキシル基またはカルボキシル基、好ましくは少なくとも2個の機能的化学基、そして、より好ましくは少なくとも3個の機能的化学基を含む。候補剤は、1または2以上の上記の機能的な基によって置換された、環状炭素構造もしくは複素環構造および/または芳香族もしくは多環芳香族構造を含むことができる。候補剤はまた、ペプチド、糖類、脂肪酸、ステロール、イソプレノイド、プリン、ピリミジン、これらの誘導体もしくは構造類似体、またはこれらの組み合わせなどの生物分子であることができる。剤が核酸（即ちアプタマー）である場合、剤は、典型的には、DNAまたはRNA分子であるが、非天然の結合またはサブユニットを有する改変された核酸も意図される。

【0117】

PIPKII 阻害剤はまた、PCT/US98/10876およびそこに記載された参考文献に記載の方法などの、構造に基づいた合理的方法（rational structure-based method）を用いて設計することができる。

【0118】

候補剤は、合成または天然化合物のライブラリーを包含する、幅広い種類の給源から得られる。例えば、幅広い種類の有機化合物および生物分子のランダムな、および、指向性のある合成のための多数の手段が利用可能であり、これは、ランダム化されたオリゴヌクレオチドの発現、ランダムもしくは非ランダムペプチドライブラリー、合成有機コンビナトリアルライブラリー、ランダムペプチドのファージディスプレイライブラリーなどを包含する。あるいは、細菌、真菌、植物および動物抽出物の形態の、天然化合物のライブラリーは入手可能であるか、またはすでに作製されている。加えて、天然の、および、合成的に作製されたライブラリーおよび化合物は、慣用の化学的、物理的、および生化学的手段によって容易に改変することができる。さらに、公知の薬剤は、アシル化、アルキル化、エステル化、アミド化などの指向性のあるまたはランダムな化学的修飾に供し、該剤の構造的なアナログを作製することができる。

【0119】

種々のその他の試薬も、該混合物に含めることができる。これらは、塩、バッファー、中性タンパク質（例えばアルブミン）、界面活性剤などの、最適なタンパク質-タンパク質および/またはタンパク質-核酸結合を促進するのに用いることができる試薬を包含する。かかる試薬はまた、反応構成要素の非特異的なまたはバックグラウンド相互作用を減少させることができる。ヌクレアーゼ阻害剤、抗微生物剤などの、アッセイの効率を向上させるその他の試薬も用いることができる。

【0120】

前記アッセイ材料の混合物は、候補薬剤の存在がなければ、PIPKII がホスホイノシトール基質をリン酸化する条件下でインキュベートする（PIPKII ポリペプチド阻害研究に関して）。構成要素の添加の順序、インキュベーション温度、インキュベーション時間、およびその他のアッセイパラメーターは、容易に決定することができる。かかる実験は、アッセイの基本的な構成ではなく、単にアッセイパラメーターの最適化に関連するにすぎない。インキュベーション温度は、典型的には4 ~ 40 の間である。インキュベーション時間は、好ましくは迅速な、ハイスループットスクリーニングを容易にするために最短化され、典型的には、1分~10時間の間である。

【0121】

インキュベーション後、基質のリン酸化または結合の存在または欠如を、ユーザーが利用可能な都合の良い任意の方法で検出する。無細胞結合型のアッセイについては、結合した構成要素を結合していない構成要素から分離するために、分離工程を用いることができる。分離工程は、種々の方法で達成することができる。便利なのは、構成要素の少なくとも1つを固体基材に不動化することであり、そこから未結合の構成要素を容易に分離することができる。固体基材は、例えばマイクロタイプレート、マイクロビーズ、ディップスティック、樹脂粒子など、幅広い種類の材料で、幅広い種類の形態に作製することができる。基材は、好ましくは、最大の信号対ノイズ比のために、主としてバックグラウンド結合を最小化するために、ならびに、分離の容易さおよび費用により選択される。

【0122】

分離は、例えば、リザーバーからビーズもしくはディップスティックを取り出し、マイクロタイタープレートなどのリザーバーを空にするか、もしくは希釈し、ビーズ、粒子、クロマトグラフィーカラムもしくはフィルターを洗浄液もしくは溶媒ですすぐことにより行うことができる。分離工程は、好ましくは多数回のすすぎまたは洗浄を含む。例えば、固体基材がマイクロタイタープレートである場合、ウェルを、塩、バッファー、界面活性剤、非特異的タンパク質などの、特異的な結合もしくは相互作用に関与しないインキュベーション混合物の構成要素を典型的に含む洗浄液で、数回洗浄することができる。固体基材が磁性ビーズである場合、ビーズは、洗浄液で1回または2回以上洗浄し、磁石を用いて単離することができる。

10

【0123】

検出は、任意の好都合な方法を用いて行うことができる。リン酸化は、直接的または間接的に検出可能な生成物、例えばPI5Pを生成する。アッセイでは、構成要素の1つは、通常、検出可能な標識を含むか、これと結合している。幅広い種類の標識、例えば、直接的な検出（例えば、放射活性、蛍光、光学または電子密度など）、または、間接的な検出（例えば、FLAGエピトープなどのエピトープタグ、西洋ワサビペルオキシダーゼなどの酵素タグなど）を提供するものを用いることができる。標識は、本明細書の他所に記載されているように、基質もしくは阻害剤に、または、候補薬剤に結合していることができる。

20

【0124】

標識を検出するために種々の方法を用いることができ、これは、標識の性質およびその他のアッセイの構成要素に依存する。例えば、標識は、固体基材に結合している時に、または、固体基材からの分離の後に検出することができる。標識は、光学もしくは電子密度、放射性放射（radioactive emission）、非放射エネルギー移行（nonradiative energy transfer）などにより直接的に検出し、または、抗体結合、ストレプトアビジン-ビオチン結合などにより間接的に検出することができる。標識を検出する方法は、当該技術分野でよく知られている。

【0125】

したがって、本発明は、基質のリン酸化を阻害する能力を有する化合物を、直接的に（PIPKII ポリペプチドを結合することにより）、または間接的に（デコイ基質となることにより）同定するための自動化されたスクリーニングアッセイを包含する。この自動化された方法は、好ましくは、試薬溶液を容器の複数の所定の区画に送達すること、および、この所定の区画中の検出可能な分子における変化を測定することが可能な装置中で行われる。典型的な方法は、次の工程を含む。最初に、PIPKII に曝されると検出可能な変化を生じる基質を含有する、1または2以上の区画を有する分割された容器を準備する。PIPKII は、区画中の細胞内に、溶液中に、または、区画内に不動化して存在することができる。次に、1または2以上の所定の区画を所定の位置に整列させ（例えば、自動ピペットの流出口に合わせて整列させ）、そして、PIPKII キナーゼ活性を阻害する能力について試験する化合物または化合物の混合物を含有する溶液のアリコットを、所定の区画に自動ピペットで送達する。基質は、化合物と一緒に、または、化合物の添加の後に添加することもできる。最後に、基質により放出される検出可能な信号を、所定の時間量にわたって、好ましくは、該細胞含有区画を検出器に合わせて整列させることにより測定する。好ましくは、例えば、バックグラウンド値および/またはベースライン値を確立するために、区画に化合物を添加する前にも、信号を測定する。競合アッセイについては、化合物は、基質または阻害剤の添加とともに、またはその後に、PIPKII ポリペプチド含有区画に添加することができる。当業者は、特定のアッセイのための、アッセイの構成要素の適切な添加の順序を容易に決定することができる。

30

40

【0126】

反応の構成要素を添加後の適切な時間に、必要に応じてプレートを移動し、アッセイウェルが信号測定のための位置になるようにする。信号の変化は、試験化合物の添加後の最

50

初の数秒間に始まることがあるので、アッセイウェルを可能な限り迅速に信号検出器に合わせて整列させるのが望ましく、約2秒以下の時間が望ましい。装置がウェルの底を介して検出するように設計され、そして化合物をウェルの上から添加する本発明の好ましい態様では、試薬の添加のためにプレートを移動する必要がないので、読み取りは、実質的に連続して行うことができる。ウェルと検出器デバイスとは、信号の変化を測定し、記録するのに好適な所定の時間、整列されたままであるべきである。

【0127】

本発明の装置は、アッセイ手順を、所定の第1ウェル（または、ウェルの横列もしくは縦列）から開始し、プレートの縦列を下方に、そして、横列を横に、所定の経路で、ウェル番号nまで、順次続けるようにプログラム可能である。信号の計算のために、同じ化合物で処置した、複製したウェルからのデータを、収集および記録する（例えば、コンピュータのメモリーに記憶させる）のが好ましい。

10

【0128】

迅速な化合物の添加および迅速な応答の読み取りを達成するために、検出器は、自動ピペッターを取り付け、検出器および自動ピペッターの両方に及ぶ正確なコンピュータ制御を達成するためのソフトウェアプログラムを開発することにより、改変することができる。蛍光光度計と自動ピペッターとの組み合わせを組み込み、そして、検出器および自動ピペッターへの指令を制御するためのマイクロコンピュータを用いることにより、試薬の添加と検出器による読み取りとの間の遅延時間を顕著に減少させることができる。さらにまた、コンピュータは、当該過程を何度も正確に繰り返すので、試薬の手動添加に比べ、より高い再現性と、より大きな信号対ノイズ比の両方を達成することができる。さらにまた、この装置構成により、複数のアッセイを、オペレーターの介入なしに、同時に行うことが可能となる。したがって、試薬の自動送達と、これに引き続く複数の信号測定により、アッセイの信頼性、ならびに、1日に行うことができるアッセイの数は、有利に増大する。

20

【0129】

本明細書に記載された方法により同定されたPIPKIIポリペプチド活性の阻害剤は、II型糖尿病、低下したインスリンへの感受性、肥満、および/または脂肪の過剰蓄積などを包含する、過剰なまたは望ましくないPIPKIIポリペプチド活性に起因する疾患または状態を処置するのに有用である。かかる状態の処置のために、PIPKIIポリペプチド阻害剤の有効な阻害量を、対象に投与する。阻害剤はまた、特定のPIPKIIポリペプチドを検出するために、診断用途に用いることができる。

30

【0130】

本発明は、PIPKIIポリペプチドの存在をアッセイするためのキットを包含する。キットの例は、PIPKIIポリペプチドに特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含むことができる。抗体またはその抗原結合フラグメントは、PIPKII関連疾患を有する患者、PIPKII関連疾患を有する疑いがある患者、またはPIPKII関連疾患を有しないと考えられる患者からの組織または細胞に適用することができる。試料は、その後、抗体と、ポリペプチドもしくは試料のその他の構成要素との間に特異的結合が生じるかどうかを評価するために処理される。

40

【0131】

本発明のキットの別の例は、本発明のPIPKII核酸分子の発現のレベルを決定するのに必要な構成要素を備えるキットである。かかる構成要素は、PIPKII核酸分子の増幅に有用なプライマーおよび/またはPCR増幅のためのその他の化学物質を包含することができる。

本発明のキットの別の例は、本発明のPIPKII核酸分子の発現のレベルを、ハイブリダイゼーション法によって決定するのに必要な構成要素を備えるキットである。

本発明のキットの別の例は、本発明のPIPKIIポリペプチドの活性レベルを、酵素アッセイ法によって決定するのに必要な構成要素を備えるキットである。

前記キットは、該キットの種々の構成要素を、診断目的のためにどのように使用するか

50

についての使用説明書またはその他の印刷物を含むことができる。

【0132】

本発明は、PIPKII ポリペプチドまたはかかるポリペプチドをコードする核酸を有する、核酸またはタンパク質マイクロアレイをさらに包含する。本発明のこの側面では、PIPKII ポリペプチドの発現を評価するため、および/または、かかるポリペプチドに結合する生物学的な構成物質を同定するために、標準的なマイクロアレイ技術の技法を用いる。タンパク質チップ技術および固相タンパク質アレイ技術を包含する他の名称でも知られる、タンパク質マイクロアレイは、当業者によく知られており、同定されたペプチドまたはタンパク質のアレイを、固定された基材上に得ること、標的分子または生物学的な構成物質を該ペプチドに結合させること、そして、かかる結合を評価することに基づくが、これに限定されない。例えば、G. MacBeath and S.L. Schreiber, "Printing Proteins as Microarrays for High-Throughput Function Determination," Science 289 (5485):1760-1763, 2000を参照。核酸アレイ、特にPIPKII ペプチドを結合するアレイもまた、PIPKII ポリペプチド発現を特徴とする条件を有する対象を同定するためなどの、診断用途に用いることができる。

10

【0133】

マイクロアレイ基材は、限定されることなく、ガラス、シリカ、アルミノケイ酸塩、ホウケイ酸塩、アルミナおよび酸化ニッケルなどの金属酸化物、種々の粘土、ニトロセルロースまたはナイロンを包含する。マイクロアレイ基材は、基材上のプローブ（ペプチドまたは核酸）の合成を増強するための化合物でコートされていてもよい。基材上のカップリング剤またはカップリング基は、最初のヌクレオチドまたはアミノ酸を基材に共有結合させるのに用いることができる。種々のカップリング剤またはカップリング基が当業者に知られている。ペプチドまたは核酸プローブは、こうして、基材上の所定のグリッドに直接合成することができる。あるいは、ペプチドまたは核酸プローブは、基材上にスポットすることができるが、かかる場合には、基材は、プローブの基材への結合を増強する化合物でコートされていてもよい。これらの態様では、好ましくは、接触プリント方式で、または、インクジェットもしくはピエゾ電気送達などの非接触プリント方式でプローブを基材に適用するコンピュータ制御ロボットを用いることにより、事前に合成したプローブを、正確な、所定の容量およびグリッドパターンで基材に適用する。プローブは、基材に共有結合により連結されてもよい。

20

30

【0134】

標的はペプチドまたはタンパク質であり、天然または合成であってもよい。組織は対象から得てもよく、または、培養で増殖させてもよい（例えば、細胞株から）。

本発明のいくつかの態様では、1または2以上の対照ペプチドまたはタンパク質分子が、基材に付着している。好ましくは、対照ペプチドまたはタンパク質分子により、ペプチドまたはタンパク質の品質および結合特性、試薬の品質および有効性、ハイブリダイゼーションの成否、および、分析の閾値および成否などの因子を決定することが可能となる。

【0135】

DNAチップ技術、遺伝子チップ技術、および固相核酸アレイ技術を包含するその他の名称でも知られている核酸マイクロアレイ技術は、当業者に良く知られており、同定された核酸プローブのアレイを、固定された基材上に得ること、標的分子をレポーター分子（例えば、放射性タグ、化学発光タグ、または、フルオレセイン、Cye3-dUTPもしくはCye5-dUTPなどの蛍光タグ）で標識し、標的核酸をプローブにハイブリダイズさせ、そして、標的 - プローブのハイブリダイゼーションを評価することに基づくが、これに限定されない。標的配列に完全に合致する核酸配列を有するプローブは、一般的に、完全な合致が少ないプローブよりも、強いレポーター分子信号の検出をもたらす。核酸マイクロアレイ技術で用いられる多くの構成要素および技法は、The Chipping Forecast, Nature Genetics, Vol.21, Jan 1999に示されており、その全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0136】

本発明によれば、核酸マイクロアレイの基材は、限定されることなく、ガラス、シリカ

50

、アルミノケイ酸塩、ホウケイ酸塩、アルミナおよび酸化ニッケルなどの金属酸化物、種々の粘土、ニトロセルロースまたはナイロンを包含することができる。すべての態様において、ガラス基材が好ましい。本発明によれば、プローブは、限定されることなくDNA、ゲノムDNA、cDNAおよびオリゴヌクレオチドを包含する核酸の群から選択され、天然または合成であってもよい。オリゴヌクレオチドプローブは、好ましくは、20~25マーのオリゴヌクレオチドであり、DNA/cDNAプローブは、好ましくは500~5000塩基長であるが、その他の長さを用いることもできる。適切なプローブ長は、当業者が、当該技術分野で知られている手法に従って決定することができる。1つの態様では、好ましいプローブは、本明細書に記載されたPIPKIIポリペプチド核酸分子である。プローブは、混入物を除去するために、ゲルろ過または沈殿などの、当業者に知られた標準的な方法を用いて精製することができる。

10

【0137】

1つの態様では、マイクロアレイ基材は、基材上のプローブの合成を増強する化合物でコートされていてもよい。かかる化合物は、限定されることなく、オリゴエチレングリコールを包含する。別な態様では、基材上のカップリング剤またはカップリング基は、最初のヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを基材に共有結合させるのに用いることができる。これらの剤または基は、例えば、アミノ基、ヒドロキシ基、プロモ基、およびカルボキシ基を包含することができる。これらの反応基は、好ましくは、2価のアルキレンまたはフェニレン基などのヒドロカルビル基を介して基材に付着しており、1つの原子価位置は鎖結合で占められ、残りのものは反応基に付着する。これらのヒドロカルビル基は、約10個までの炭素原子、好ましくは約6個までの炭素原子を含むことができる。アルキレン基は、通常は、主鎖に2~4個の炭素原子を含むのが好ましい。当該方法に関するこれらの、または追加の詳細は、例えば、その全体が参照により組み込まれる米国特許第4,458,066号に開示されている。

20

【0138】

1つの態様では、プローブは、光による化学合成(light-directed chemical synthesis)、光化学脱保護、またはヌクレオチド前駆体の基材への送達と、その後のプローブ生成などの方法を用い、基材上に、所定のグリッドパターンで、直接合成される。

別の態様では、基材は、プローブの基材への結合を増強する化合物でコートされていてもよい。かかる化合物は、限定されることなく、ポリリシン、アミノシラン、アミノ反応性シラン(Chipping Forecast, 1999)またはクロムを包含する。この態様では、接触プリント方式で、または、インクジェットもしくはピエゾ電気送達などの非接触プリント方式でプローブを基材に適用するコンピュータ制御ロボットを用いることにより、事前に合成したプローブを、正確な、所定の容量およびグリッドパターンで基材に適用する。プローブは、UV照射を包含するが、これに限定されない方法により、基材に共有結合させてもよい。別な態様では、プローブは熱で基材と連結される。

30

【0139】

マイクロアレイの標的は、限定されることなく、DNA、ゲノムDNA、cDNA、RNA、mRNAを包含する群から選択される核酸であり、天然または合成であってもよい。すべての態様において、ヒト組織からの核酸標的分子が好ましい。組織は対象から得てもよく、または、培養で増殖させてもよい(例えば、細胞株から)。

40

本発明の態様では、1または2以上の対照核酸分子が、基材に付着している。好ましくは、対照核酸分子により、核酸の品質および結合特性、試薬の品質および有効性、ハイブリダイゼーションの成否、および、分析の閾値および成否などの因子を決定することが可能となる。対照核酸は、限定されることなく、ハウスキーピング遺伝子などの遺伝子の発現産物、またはその断片を包含することができる。

いくつかの態様では、1または2以上の対照核酸分子が、基材に付着している。好ましくは、対照核酸分子は、結合特性、試薬の品質および有効性、ハイブリダイゼーションの成否、および、分析の閾値および成否などの因子を決定することを許容する。

【0140】

50

例例 1方法P I P K I I^{-/-} マウスの作出

P I P K I I^{-/-} の発現を欠くマウスは、Lexicon Genetics, Inc. (The Woodlands, TX) から得た P I P K I I^{+/+} E S 細胞から作出した。Lexiconは、レトロウイルス挿入 ジーントラップ法を用いて、129Sv/Evの遺伝的背景を有するマウス胚性幹細胞 (Zambrowicz et al., 1998) においてランダムに遺伝子を破壊した。P I P K I I^{-/-} 遺伝子座が破壊されていることが報告されたクローン # 39557は、Lexicon Geneticsから得た。これらの細胞は、Lexiconのプロトコルに従って発明者らの実験室で成長および増殖させ、Beth Israel Deaconess Transgenic Facilityにて、胚盤胞に注入した。3匹のキメラマウスが得られ、それぞれ、2匹の野生型C57Bl/6マウスの雌と交配させ、C57Bl/6×129Sv/Evの混合された遺伝的背景のコロニーを確立した。すべての実験は、C57Bl/6×129Sv/Evの遺伝的背景における P I P K I I^{+/+} マウス間の交雑に由来する野生型、ヘテロ接合およびノックアウト同腹子で行った。

10

【0141】

P I P K I I^{-/-} のマウス遺伝子座の配列は、セレーデータベースからのコンティグをアセンブルすることにより決定した。E S 細胞クローン # 39557の P I P K I I^{-/-} 遺伝子座の第1イントロン内のLexiconの挿入位置は、P C Rで決定した。最初に、プライマー対を用いて、野生型およびノックアウト試料からのゲノムD N Aの以下の断片を増幅することによって、位置を大まかにマッピングした：327-924、887-1412、1397-1946、1805-2405、2369-2883、2913-3540、3393-4001、3994-4512、4400-4998、4984-5636、5371-5977、5806-6363、6332-6833、6808-7376、7282-7721 (ここで、番号は、第1イントロン内の位置を示す)。この分析は、挿入が、イントロンの最初の924塩基内にあることを示した。挿入の正確な位置を同定するために、Lexiconの挿入ベクターの3'末端からのフォワードプライマーと、P I P K I I^{-/-} 遺伝子座の第1イントロンの塩基2883-2906に相当するリバープライマーとを用いて、挿入部位に及ぶ~4kbの断片を増幅した。この断片を、塩基924-944に相当するプライマーを用いて配列決定し、Lexiconの挿入の正確な位置を決定した(818位、ここで1 = 翻訳開始部位A T GのA)。

20

【0142】P C Rによるマウスの遺伝子タイピング

プライマー3種の組を用いて、野生型試料、または、ノックアウト試料のいずれかに存在するゲノムD N Aの領域を増幅した。このために、イントロンの塩基924-942に相当する単一のアンチセンスプライマー(p R)を用いた。2つのセンスプライマー、一方は、イントロンの塩基327-350に相当するもの(p w t F)、そして他方は、Lexiconの挿入の3'末端の範囲にあるもの(p k o F)も用いた。挿入物の第2カセットのコード部分の3'末端の配列は、挿入物の境界に及ぶP C Rによって得られた4kbの断片を配列決定することにより決定した。用いたプライマーの配列は、p R : 5' - ACC ATC CCA AAG CA C CCA GGA CC - 3' (配列番号3)、p w t F : 5' - CGT GCGT ATG CCG TCG TCG TTT C C - 3' (配列番号4)、p k o F : 5' - AGA AGC GAG AAG CGA ACT GAT TGG - 3' (配列番号5)であった。プライマー対p w t F / p Rは597bpの断片を増幅することが予想され、プライマー対p k o F / p Rは651bpの断片を増幅することが予想された。

30

40

【0143】R T - P C R

内因性のP I P K I I^{-/-} 転写物に相補的なc D N Aは、P I P K I I^{-/-} のエクソンV I I Iにおける29塩基に相補的なプライマーを用いて作製した(5' - CCT CGT CCT CTG CC C GCT CCT CCA CCT CC - 3'、配列番号6)。内因性のコード配列の塩基51-902に相当する断片は、エクソンIからのフォワードプライマー(5' - CGC CAG CAA GAC AAG ACC AA G AAG AAG - 3'、配列番号7)と、エクソンV I I Iに対する入れ子リバープライマー(5' - CGC TCC TCC ACC TCC ATC TCC TCC - 3'、配列番号8)を用いて増幅した。

50

P I P K I I の第1エクソンを、Lexiconのレトロウイルス挿入ベクターの5'カセットにスプライシングすることにより生成されたハイブリッド転写物に相補的なcDNAは、Lexiconベクター内のgeo配列に相補的なプライマーを用いて作製した。ハイブリッド転写物からの断片は、エクソンIからのフォワードプライマー(上記のもの)と、Lexicon挿入ベクターにおけるgeo配列からの入れ子リバースプライマー(5'-GCA TCC TTC AGC CCC TTG TTG-3'、配列番号9)とを用いて増幅した。

【0144】

身体組成分析

身体組成分析は、2つの方法によって行った。二重エネルギーX線吸収スキャン(DEXAScan)を、10週齢および26週齢でマウスの体脂肪量を測定するのに用いた。死体分析(carcass analysis)(サポニン化と、それに引き続くグリセロール含量のアッセイ)を、36週齢のマウスの脂肪含量を測定するのに用いた。

【0145】

DEXAScan

PIXIMusデンストメータ(GE Medical Systems, Waukesha, WI)を用いて、P I P K I I マウスの脂肪組織の量を分析した。マウスは、ケタミン/キシラジンで麻酔し、測定のために装置上においた。

【0146】

死体の化学分析

マウスを解剖し、胃および腸の内容物を除去し、空の胃および腸を死体に戻した。死体は、重量を測定した後、60のオープン中に置き、3週間までの間乾燥した。死体は、連日重量を測定し、いつ水分が完全に蒸発したかを決定した。乾燥の前と後の重量の変化を、各死体の水分重量とみなした。乾燥後、死体を、30%水酸化カリウム1部と100%エタノール2部との溶液中で、60にて1週間までの間サポニン化した。得られた死体に存在するグリセロールの量を、酵素による変換、およびSigmaトリグリセリド試薬A(Sigma #337-40-A)による比色検出、およびトリグリセリド標準物質(Sigma #339-11)(Sigma-Aldrich, St. Louis MO)との比較によって決定した。

【0147】

インスリン耐性試験

マウスを午前10:00に清潔なケージ(餌なし)に置き、午後1:00にノボリン-R(Novo Nordisk Pharmaceuticals Inc, Princeton, NJ)を、体重1kgあたり0.5~0.75単位の用量で腹腔内注射した。血糖値は、尾部出血により、One Touch Basicグルコメーターを用いて、インスリン注射の前、および、インスリン注射の15、30、45、60および90分後に測定した。

【0148】

統計分析

身体組成分析実験の結果は、studentのt検定により統計学的有意性について分析した。インスリン耐性試験の結果は、反復測定ANOVAにより分析した。すべての統計分析は、StatView software version 4.1(StatView Software, Cary, NC)で行った。

【0149】

P I P K I I D 2 7 8 A 突然変異体の構築

触媒的に障害されたP I P K I I D 2 7 8 Aは、CLONTECH部位特異的変異導入キット(CLONTECH Laboratories Inc., Palo Alto, CA)で構築した。細菌により発現させた組み換えP I P K I I D 2 7 8 Aのキナーゼ活性を、ホスファチジルセリン90%およびEchelon, Inc.からの合成P I 5 P 10%の基質を用いたキナーゼアッセイを行うことにより、野生型と比較した。P I P K I I D 2 7 8 Aは、野生型P I P K I I のキナーゼ活性の約3%を有することが見出された。

【0150】

細胞培養、トランスフェクションおよびインスリンによる刺激

CHO-HIR細胞およびCos-7細胞は、DMEM+10%ウシ胎児血清中で増殖

させ、DEAE/デキストラントランスフェクションによりトランスフェクトした。細胞は、血清を欠乏させ、10 nMのインスリンで10分間刺激した。細胞は、免疫沈降およびウェスタンブロット法による分析のために、NP40ベースの溶解バッファー中で、トランスフェクション約48時間後に溶解した。

【0151】

ウェスタンブロット法 - pAkt、抗HA、PIPKII、pTyr

CHO-HIR細胞を、対照ベクター、または種々のPIPK遺伝子を発現するベクターでトランスフェクトした。HAタグ付きAktをレポーター遺伝子としてトランスフェクトした。細胞は、血清を欠乏させ、10 nMのインスリンで溶解前に10分間刺激し、またはしなかった。HA-Aktを溶解物から免疫沈降し、抗pT308抗体でプロッティングし、その活性状態を決定した。また、免疫沈降物を抗HA-Akt抗体、抗PIPKII抗体および抗ホスホチロシン(pTyr)でもプロッティングした。

【0152】

in vivo標識およびHPLC

in vivo標識は、細胞を、³²P-ATPの存在下で、インスリン刺激(10 nMインスリン中で10分)および溶解の前4時間増殖させることによって行った。脂質は、クロロホルム-メタノールで抽出し、脱アシル化し、分離およびPIP₃レベルの検出のために、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に供した。

【0153】

結果

PIPKII^{-/-}マウス

PIPKIIの発現を欠くマウスは、Lexicon Genetics, Inc.から得たPIPKII^{+/-}ES細胞から作出した。マウスはPCRにより遺伝子タイピングし、PIPKII遺伝子発現の破壊は、複数の組織のRT-PCR分析により確認した。これらのノックアウトマウスに関する発明者らの初期の研究により、PIPKIIがインスリン応答性および体脂肪蓄積に関与していることが決定された。PIPKII^{-/-}マウスは生育可能であり、繁殖力があり、概して健康である。PIPKII^{+/-}間の交雑により、261匹の子孫を得、このうち60匹(23%)はPIPKII^{+/+}であり、145匹(55.5%)はPIPKII^{+/-}であり、56匹(21.5%)はPIPKII^{-/-}であった。この数は、常染色体遺伝子のメンデルの期待値の範囲内であり、PIPKII遺伝子発現の破壊は、致死をもたらさないことを示唆するものである。PIPKIIマウスは、その後、明確な病理組織学的異常なしに、2年間にわたって生存することが観察された。

【0154】

雄のPIPKII^{-/-}マウスは、普通食または高脂肪食を給餌した場合に、野生型の同腹子に比べ有意に少ない脂肪を蓄積した。定期的にマウスの体重を測定することにより、PIPKII^{-/-}マウスが、野生型同腹子より有意に小さいことが観察された。

この違いの原因を調査するために、PIXIMusデンストメータを用いて、マウスの脂肪組織の量を分析した。マウスに低脂肪(普通)食を給餌した場合、10週齢ではその身体組成に有意な違いがないことが見出された。しかしながら、26週齢では、雄のPIPKII

マウスは、その野生型同腹子より有意に少ない脂肪を有していた(図1)。マウスに離乳時から継続的に高脂肪食を給餌した場合、PIPKII^{-/-}の雄は、10週齢でも有意に低い体脂肪率を示した(図2)。また、身体組成分析を、36週齢の雄マウスに、サポニン化およびグリセロールの定量によって行ったが、結果はより一層劇的であった(図3)。雄マウスにおける脂肪蓄積の違いが脂肪細胞数の減少によるものなのか、または、個々の脂肪細胞の大きさの減少によるものなのかを決定するために、白色脂肪体(white fat pad)を単離し、各脂肪体の細胞数およびトリグリセリドの量を、標準的な手順を用いて測定した。

【0155】

PIPKII^{-/-}マウスはまた、野生型同腹子と比べた場合、インスリン応答性に

ついて違いを示した。インスリンへの感受性は、インスリン耐性試験を8週齢、16週齢および24週齢で行うことにより評価した。PIPK1I^{-/-}マウスは、成人型(即ちII型の)インスリン抵抗性を発症しないが、その野生型同腹子は発症することが見出された(図4)。ノックアウトマウスで観察されたインスリンへの高感受性は、脂肪蓄積の違いとは独立したものであることが見出された。雌のノックアウトマウスは、24週齢で、その野生型同腹子よりもインスリンに対して有意に感受性が高かったが、これらは同等の量の体脂肪を有していた(図5)。個々の組織におけるインスリンシグナル伝達へのPIPK1I^{-/-}遺伝子発現の効果を調査するために、正常血糖-高インスリンクランプ法を行い、筋肉および脂肪組織の両方への放射性標識ブドウ糖の取り込みを個々に測定し、これらの末梢組織の一方または両方が動物全体のインスリン応答性の違いに関与しているのかを決定した。野生型およびノックアウトマウスからの単離した筋肉および脂肪における、インスリンに刺激されたブドウ糖の取り込みを、標準的な手順を用いて調査した。インスリン刺激についての効果が、各組織に固有のものなのかどうか、または、それが分泌された因子の存在によるものなのかどうかを決定するために、標準的な手順を用いた。PIPK1I^{-/-}がインスリン応答性をもたらす背景をよりよく理解するために、これらのマウスにおけるTNF α のインスリン応答性に対する効果も決定した。

【0156】

細胞株におけるPIPK1I^{-/-}の過剰発現

PIPK1I^{-/-}の欠損がマウスにおいてインスリン感受性を増大させたため、この酵素の過剰発現が細胞株におけるインスリンシグナル伝達に影響を与え得るかどうかを調査した。CHO-HIR細胞は、ヒトインスリン受容体を発現しており、インスリン受容体活性化の下流の細胞内シグナル伝達事象を研究するのに頻りに用いられる。CHO-HIR細胞を、野生型PIPK1I^{-/-}、PIPK1I^{-/-}D278A(触媒活性の減少した突然変異体)、または、I型PIPキナーゼであるPIPK1もしくはPIPK1^{-/-}、または、ベクターのみでトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞は、インスリン(10nMインスリンで10分間)で刺激し、溶解し、HA-Aktを溶解物から免疫沈降し、抗pT308抗体でプロットングし、その活性化状態を決定した。Aktは、この酵素の活性化形態に特異的な抗体でのプロットングにより判断したところ、活性化していた(図6)。しかしながら、PIPK1I^{-/-}を過剰発現している細胞では、Aktのインスリン依存性の活性化の有意な減少があった。この効果は、触媒的に障害されたPIPK1I^{-/-}変異体(PIPK1I^{-/-}D278A)を用いた場合は、それほど明確ではなかった。I型PIPキナーゼであるPIPK1またはPIPK1^{-/-}の過剰発現は、Aktの活性化に効果がなかった。これらの結果は、高レベルのPIPK1I^{-/-}活性は、Aktのインスリン依存性活性化の阻止をもたらすことを示唆する。

【0157】

Akt活性化の1つの考えられる機構は、PI3K-IRS-1またはPI3K-IRS-2複合体の形成の阻止である。しかしながら、PIPK1I^{-/-}を過剰発現させた細胞において、これらの複合体におけるPI3K活性の減少は何ら検出されなかった(データは示さず)。

別な可能性は、PIPK1I^{-/-}が、Aktを活性化するのに必要なPI3Kの産物であるPIP₃の分解を促進するというものである。PIP₃はインスリンに反応してPI3Kにより生成され、SHIP2などのホスファターゼにより分解される。構成的に活性化PI3Kと、PIPK1I^{-/-}および/またはSHIP2とでトランスフェクトしたCos細胞におけるPIP₃のレベルを調査した。細胞は、血清を欠乏させ、[³H]-イノシトールで24時間標識した。脂肪を抽出し、脱アシル化し、PtdIns-3,4,5-P₃レベルをHPLCで分析した。PIPK1I^{-/-}またはSHIP2のいずれかの発現は、PIP₃の減少をもたらし、両方のタンパク質の発現は、PIP₃のほぼ完全な枯渇をもたらした(図7)。したがって、減少したAktのインスリンに反応した活性は、PIPK1I^{-/-}を過剰発現した細胞におけるPIP₃の増強された分解により説明できる。PIPK1I^{-/-}がPIP₃生成に影響を与える機構をさらに調べるために、脂質ホスファタ

ーゼ S H I P 2 の活性および局在化に対するその効果を決定した。

【 0 1 5 8 】

要約すれば、マウスにおける P I P K I I の欠損はインスリン感受性の増大をもたらす一方、培養中の細胞におけるこの同じ酵素の過剰発現は、A k t のインスリンによる活性化の減少をもたらす。これらの結果は、P I P K I I が、インスリンシグナル伝達を負に調節する経路にあることを示している。したがって、P I P K I I の機能を阻止する薬物は、インスリン抵抗性および糖尿病を処置するのに有効である。さらに、P I P K I I を欠くマウスがより低いレベルの脂肪を有することから、P I P K I I 阻害剤は、肥満の処置、および脂肪蓄積の減少に有効である。

【 0 1 5 9 】

参考文献

Cantley LC (2001) Transcription. Translocating tubby. Science 292(5524): 2019-21.

Fruman DA, Mauvais-Jarvis F, Pollard DA, Yballe CM, Brazil D, Bronson RT, Kahn CR, Cantley LC (2000) Hypoglycaemia, liver necrosis and perinatal death in mice lacking all isoforms of phosphoinositide 3-kinase p85 alpha. Nat Genet 2000 26(3):379-82.

Gillooly DJ, Simonsen A, Stenmark H (2001) Cellular functions of phosphoinositoid 3-phosphate and FYVE domain proteins. Biochemical J. 355(Pt 2):249-58.

Hurley JH, Meyer T (2001) Subcellular targeting by membrane lipids. Curr Opin Cell Biol. 13(2):146-52. 20

Lemmon MA, Ferguson KM (2000) Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. Biochem J. 350(Pt 1):1-18.

Li J, DeFea K, Roth FA (1999) Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by an Akt/phosphatidylinositol 3-kinase pathway. J Biol Chem 274(14):9351-6.

【 0 1 6 0 】

Martin TF (2001) PI(4,5)P2 regulation of surface membrane traffic. Current Opinion in Cell Biology 13:493-99.

Ozes ON, Akca H, Mayo LD, Gustin JA, Maehama T, Dixon JE, Donner DB (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98(8):4640-5. 30

Rameh LE, Tolias KF, Duckworth BC, and Cantley LC (1997) A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate Nature 390(6656):192-6.

Santagata S, Boggon TJ, Baird CL, Gomez CA, Zhao J, Shan WS, Myszka DG, Shapiro L (2001) G-protein signaling through tubby proteins. Science 292(5524): 2041-50.

Takenawa T, and Miki H (2001) J. Cell Science 114(Pt 10):1801-9.

Toker A (1998) The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. Curr Opin Cell Biol 10(2):254-61.

Wishart MJ, Taylor GS, Dixon JE (2001) Phoxy lipids: revealing PX domains as phosphoinositide binding modules. Cell 105(7):817-20. 40

Zambrowicz BP, Friedrich GA, Buxton EC, Lilleberg SL, Person C, Sands AT (1998) Nature 392(6676):608-11.

【 0 1 6 1 】

本発明のその他の側面は、当業者には明らかであり、ここで繰り返す必要はない。本明細書に引用された各参考文献は、その全体が参照により組み込まれる。

使用した用語および表現は、説明のための用語として用いたのであり、限定の用語として用いたのではなく、かかる用語および表現を、示され、記載された特徴またはその部分の任意の均等物を除外するのに用いる意図はなく、本発明の範囲内で種々の変更が可能であることが認識される。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0162】

【図1】26週齢のPIP4K1I^{-/-}雄マウスおよび野生型雄マウスにおける脂肪組織のパーセンテージを比較した棒グラフである。

【図2】高脂肪食を給餌した場合の、10週齢のPIP4K1I^{-/-}雄マウスおよび野生型雄マウスにおける脂肪組織のパーセンテージを比較した棒グラフである。

【図3】36週齢のPIP4K1I^{-/-}雄マウスおよび野生型雄マウスにおける脂肪組織のパーセンテージを比較した棒グラフである。

【図4】8週齢、16週齢、および24週齢における雄マウスのインスリン耐性の結果を表したグラフの組である。PIP4K1I^{-/-}は成人型のインスリン耐性を発症しないが、野生型対象はインスリン耐性を発症することを示している。

10

【図5A】雌ノックアウトマウスが野生型対照と同様の量の体脂肪を有することを示したグラフである。

【図5B】24週齢において、雌ノックアウトマウスが、野生型同腹子よりインスリンに対して有意に感受性であることを示したグラフである。

【図6】II型PIP4Kの過剰発現がインスリンシグナル伝達を負に調節することを示したイムノプロットのデジタル化された画像である。HA-Aktを溶解物から免疫沈降し、抗pT308抗体でプロットングしてその活性化状態を決定した。

【図7】II型PIP4KおよびSHIP2の過剰発現に起因する細胞性PtdIns-3,4,5-P₃のレベルの減少を表した棒グラフである。

20

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER, INC.
 CANTLEY, Lewis C.
 LAMIA, Katja A.
 RAMEH, Lucia
 KAHN, Barbara
 PERONI, Odile 10

<120> MODULATION OF TYPE II β PHOSPHOINOSITIDE PHOSPHATE KINASE

<130> B00662.70052.WO

<150> US 60/353,758
 <151> 2001-02-01 20

<160> 9

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1
 <211> 3743
 <212> DNA 30
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (481)..(1728)

<400> 1
 ttgcgggaaa gagctaaacc ctggcgttgg ggggcccggg cggggagccc ctcccgcggt 60
 40

ccacagcgac gcctgcccag ccctcctccc ctctccggctc cggcacgggg ccccgaggcg	120	
ttcggaggcc agggcgggtt ctgtcaggcc cggggaggag gggcgggcgg ggccggccgt	180	
gcctccccgg gacgggccc accacgggga cggggaggac ggggcccagg gactgcaggg	240	
cggctgcacc gcccgggggc ggggtgcgga cgggcccggc ggctccccgg ggccggggcg	300	
gagggcgggg cgtggggcgg acggaaccac cggggcgggg tgggaggtaa cgggacgggc	360	
gcgaccatgg cgcggtgagg gagcgggggt ggggatcggg ccgggggagg cctgaggccg	420	
ctggtttgtg cgtgtctctc gccgcccccc tctttcggcg ccgcccgcgc cgcctccggc	480	
atg tcg tcc aac tgc acc agc acc acg gcg gtg gcg gtg gcg ccg ctc	528	10
Met Ser Ser Asn Cys Thr Ser Thr Thr Ala Val Ala Val Ala Pro Leu		
1 5 10 15		
agc gcc agc aag acc aag acc aag aag cat ttc gtg tgc cag aaa	576	
Ser Ala Ser Lys Thr Lys Thr Lys Lys His Phe Val Cys Gln Lys		
20 25 30		
gtg aag cta ttc cgg gcc agc gag ccg atc ctc agc gtc ctg atg tgg	624	
Val Lys Leu Phe Arg Ala Ser Glu Pro Ile Leu Ser Val Leu Met Trp		
35 40 45		
ggg gtg aac cac acg atc aat gag ctg agc aat gtt cct gtt cct gtc	672	
Gly Val Asn His Thr Ile Asn Glu Leu Ser Asn Val Pro Val Pro Val		
50 55 60		20
atg cta atg cca gat gac ttc aaa gcc tac agc aag atc aag gtg gac	720	
Met Leu Met Pro Asp Asp Phe Lys Ala Tyr Ser Lys Ile Lys Val Asp		
65 70 75 80		
aat cat ctc ttc aat aag gag aac ctg ccc agc cgc ttt aag ttt aag	768	
Asn His Leu Phe Asn Lys Glu Asn Leu Pro Ser Arg Phe Lys Phe Lys		
85 90 95		
gag tat tgc ccc atg gtg ttc cga aac ctt cgg gag agg ttt gga att	816	
Glu Tyr Cys Pro Met Val Phe Arg Asn Leu Arg Glu Arg Phe Gly Ile		
100 105 110		
gat gat cag gat tac cag aat tca gtg acg cgc agc gcc ccc atc aac	864	
Asp Asp Gln Asp Tyr Gln Asn Ser Val Thr Arg Ser Ala Pro Ile Asn		
115 120 125		30
agt gac agc cag ggt cgg tgt ggc acg cgt ttc ctc acc acc tac gac	912	
Ser Asp Ser Gln Gly Arg Cys Gly Thr Arg Phe Leu Thr Thr Tyr Asp		
130 135 140		
cgg cgc ttt gtc atc aag act gtg tcc agc gag gac gtg gcg gag atg	960	
Arg Arg Phe Val Ile Lys Thr Val Ser Ser Glu Asp Val Ala Glu Met		
145 150 155 160		
cac aac atc tta aag aaa tac cac cag ttt ata gtg gag tgt cat ggc	1008	
His Asn Ile Leu Lys Lys Tyr His Gln Phe Ile Val Glu Cys His Gly		
165 170 175		
aac acg ctt ttg cca cag ttc ctg ggc atg tac cgc ctg acc gtg gat	1056	
		40

Asn Thr Leu Leu Pro Gln Phe Leu Gly Met Tyr Arg Leu Thr Val Asp		
180	185	190
ggt gtg gaa acc tac atg gtg gtt acc agg aac gtg ttc agc cat cgg	1104	
Gly Val Glu Thr Tyr Met Val Val Thr Arg Asn Val Phe Ser His Arg		
195	200	205
ctc act gtg cat cgc aag tat gac ctc aag ggt tct acg gtt gcc aga	1152	
Leu Thr Val His Arg Lys Tyr Asp Leu Lys Gly Ser Thr Val Ala Arg		
210	215	220
gaa gcg agc gac aag gag aag gcc aag gac ttg cca aca ttc aaa gac	1200	
Glu Ala Ser Asp Lys Glu Lys Ala Lys Asp Leu Pro Thr Phe Lys Asp		
225	230	235
aat gac ttc ctc aat gaa ggg cag aag ctg cat gtg gga gag gag agt	1248	
Asn Asp Phe Leu Asn Glu Gly Gln Lys Leu His Val Gly Glu Glu Ser		
245	250	255
aaa aag aac ttc ctg gag aaa ctg aag cgg gac gtt gag ttc ttg gca	1296	
Lys Lys Asn Phe Leu Glu Lys Leu Lys Arg Asp Val Glu Phe Leu Ala		
260	265	270
cag ctg aag atc atg gac tac agc ctg ctg gtg ggc atc cac gac gtg	1344	
Gln Leu Lys Ile Met Asp Tyr Ser Leu Leu Val Gly Ile His Asp Val		
275	280	285
gac cgg gca gag cag gag gag atg gag gtg gag gag cgg gca gag gac	1392	
Asp Arg Ala Glu Gln Glu Glu Met Glu Val Glu Glu Arg Ala Glu Asp		
290	295	300
gag gag tgt gag aat gat ggg gtg ggt ggc aac cta ctc tgc tcc tat	1440	
Glu Glu Cys Glu Asn Asp Gly Val Gly Gly Asn Leu Leu Cys Ser Tyr		
305	310	315
ggc aca cct ccg gac agc cct ggc aac ctc ctc agc ttt cct cgg ttc	1488	
Gly Thr Pro Pro Asp Ser Pro Gly Asn Leu Leu Ser Phe Pro Arg Phe		
325	330	335
ttt ggt cct ggg gaa ttc gac ccc tct gtt gac gtc tat gcc atg aaa	1536	
Phe Gly Pro Gly Glu Phe Asp Pro Ser Val Asp Val Tyr Ala Met Lys		
340	345	350
agc cat gaa agt tcc ccc aag aag gag gtg tat ttc atg gcc atc att	1584	
Ser His Glu Ser Ser Pro Lys Lys Glu Val Tyr Phe Met Ala Ile Ile		
355	360	365
gat atc ctc acg cca tac gat aca aag aag aaa gct gca cat gct gcc	1632	
Asp Ile Leu Thr Pro Tyr Asp Thr Lys Lys Lys Ala Ala His Ala Ala		
370	375	380
aaa acg gtg aaa cac ggg gca ggg gcc gag atc tcg act gtg aac cct	1680	
Lys Thr Val Lys His Gly Ala Gly Ala Glu Ile Ser Thr Val Asn Pro		
385	390	395
gag cag tac tcc aaa cgc ttc aac gag ttt atg tcc aac atc ctg acg	1728	
Glu Gln Tyr Ser Lys Arg Phe Asn Glu Phe Met Ser Asn Ile Leu Thr		
405	410	415
tagttctctt ctaccttcag ccgagaccga gagactggat atggggtcgg ggatcgggac	1788	

10

20

30

40

ttagggagaa ggggtgattt gggctagatg ggaggggtggg agcgagatcg ggtttgggag 1848
 ggcttttagca atgagacttg cagcctgtga caccgaaaga gacttttagct gaagaggagg 1908
 gggatgtgct gtgtgtgcac cagctcacag gatgtaacce caccttctgc ttacccttga 1968
 tttttctec ccatttgaca ccaggttaa aaaggggttc ctttttggg accttgtaac 2028
 cttttaagat accttggggc tagagatgac ttctgtgggt tatttgggtt ttgtttctga 2088
 aatttcattg ctccaggttt gctatttata atcatatttc atcagcctac ccaccctccc 2148
 catctttgct gctctcagtt cccttcaatt aaagagatac ccagtagacc cagcacaagg 2208
 gtccttcag aaccaagtgc tatggatgca agattggaga ggtcagacac ctgcacctgc 2268
 tgcatttctc cttgtctgga ttaactttgt aatttatgga gtattgtgca caacttctc 2328
 cacctttccc ttggattcaa gtgaaaactg ttgcattatt cctccatcct gtctggaata 2388
 caccaggta acaccagaga tctcagatca gaatcagaga tctcagaggg gaataagtcc 2448
 atcctcatgg gatgggtgagg ggcaggaaag cggctgggct cttggacacc ctggttctca 2508
 gagaaccctg tgatgatcac ccaagcccca ggtgtctta gccctggag ttcagaagtc 2568
 ctctctgtaa atcctgcctc ccactaggtc aagaggaaact agagtacctt tggatttacc 2628
 aggacctca tgtttaaag gttatttccc ttgggaaaa cttcagaaac tgatgtatca 2688
 aatgaggccc tgtgacctcg atctatttcc ttcttctctc tgaacctctc ccaggcactc 2748
 ttacttctag cgaactctt agctctgggc agatctccaa gcgcctggag tgctttttag 2808
 cagagacacc tegttaaget cgggatgac cttgtaggag atctgtctcc cctgtgacctg 2868
 gagagttaca gccagaaagg tgccccatc ttagagtgtg gtgtccaaac gtgaggtggc 2928
 ttctagtta catgaggatg tgatccagga aatccagttt ggaggcttga tgtgggtttt 2988
 gacctggcct caccttgggg ctgtttttcc ttgttgcccc gctctagact tttagcagat 3048
 ctgcacctac aggtttttt ggaaggagtg gcttctctga ggtgttccac ctgcttccga 3108
 gcctgccacc caggccctca gaactgacca caggctgctc tggccaggag agaaacagct 3168
 ctgttgttct gcattggggg aggtacattc ctgcattctc tcacctctc aaccaggaac 3228
 tggggatttg ggatgagata tggtcagact tntagataac cccaagatg tgaagatcgc 3288
 ttgtgaaacc abtttgaatg aatagattgg ttctctgtgg ctccctccaa acctggccaa 3348
 gccagcttc cgaagcagga accagcactg tctctgtgcc tgaactcacag catataggtc 3408
 aggaaagaat ggagacggca ttcttgact tcactggggc tgcctggattg gatgggaaac 3468
 cttctggaag aggcagatgg gggcacaacc actgccttgc ccaggaagg ggccataggt 3528
 aggtctgaac aactgccgga agaccactac atgaactagg gaacttgaaa ccaactggct 3588

10

20

30

40

catggagaaa acaaatttga cttgggaaag ggattatgta ggaataatgt ttggacttga 3648
 tttccccacg tcataatgaa gaatggaagt ttggatctgc tcctcgtcag gcgcagcacc 3708
 tctgaagctt ggaaagctgt cttccagggt tgtaa 3743

<210> 2

<211> 416

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 2

Met Ser Ser Asn Cys Thr Ser Thr Thr Ala Val Ala Val Ala Pro Leu
 1 5 10 15

Ser Ala Ser Lys Thr Lys Thr Lys Lys Lys His Phe Val Cys Gln Lys
 20 25 30

Val Lys Leu Phe Arg Ala Ser Glu Pro Ile Leu Ser Val Leu Met Trp
 35 40 45

Gly Val Asn His Thr Ile Asn Glu Leu Ser Asn Val Pro Val Pro Val
 50 55 60

Met Leu Met Pro Asp Asp Phe Lys Ala Tyr Ser Lys Ile Lys Val Asp
 65 70 75 80

Asn His Leu Phe Asn Lys Glu Asn Leu Pro Ser Arg Phe Lys Phe Lys
 85 90 95

Glu Tyr Cys Pro Met Val Phe Arg Asn Leu Arg Glu Arg Phe Gly Ile
 100 105 110

Asp Asp Gln Asp Tyr Gln Asn Ser Val Thr Arg Ser Ala Pro Ile Asn
 115 120 125

Ser Asp Ser Gln Gly Arg Cys Gly Thr Arg Phe Leu Thr Thr Tyr Asp
 130 135 140

Arg Arg Phe Val Ile Lys Thr Val Ser Ser Glu Asp Val Ala Glu Met
 145 150 155 160

20

30

His Asn Ile Leu Lys Lys Tyr His Gln Phe Ile Val Glu Cys His Gly
 165 170 175

Asn Thr Leu Leu Pro Gln Phe Leu Gly Met Tyr Arg Leu Thr Val Asp
 180 185 190

Gly Val Glu Thr Tyr Met Val Val Thr Arg Asn Val Phe Ser His Arg
 195 200 205

Leu Thr Val His Arg Lys Tyr Asp Leu Lys Gly Ser Thr Val Ala Arg
 210 215 220

Glu Ala Ser Asp Lys Glu Lys Ala Lys Asp Leu Pro Thr Phe Lys Asp
 225 230 235 240

Asn Asp Phe Leu Asn Glu Gly Gln Lys Leu His Val Gly Glu Glu Ser
 245 250 255

Lys Lys Asn Phe Leu Glu Lys Leu Lys Arg Asp Val Glu Phe Leu Ala
 260 265 270

Gln Leu Lys Ile Met Asp Tyr Ser Leu Leu Val Gly Ile His Asp Val
 275 280 285

Asp Arg Ala Glu Gln Glu Glu Met Glu Val Glu Glu Arg Ala Glu Asp
 290 295 300

Glu Glu Cys Glu Asn Asp Gly Val Gly Gly Asn Leu Leu Cys Ser Tyr
 305 310 315 320

Gly Thr Pro Pro Asp Ser Pro Gly Asn Leu Leu Ser Phe Pro Arg Phe
 325 330 335

Phe Gly Pro Gly Glu Phe Asp Pro Ser Val Asp Val Tyr Ala Met Lys
 340 345 350

Ser His Glu Ser Ser Pro Lys Lys Glu Val Tyr Phe Met Ala Ile Ile
 355 360 365

Asp Ile Leu Thr Pro Tyr Asp Thr Lys Lys Lys Ala Ala His Ala Ala
 370 375 380

Lys Thr Val Lys His Gly Ala Gly Ala Glu Ile Ser Thr Val Asn Pro
 385 390 395 400

10

20

30

Glu Gln Tyr Ser Lys Arg Phe Asn Glu Phe Met Ser Asn Ile Leu Thr
 405 410 415

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 3

accatcccaa agcaccagg acc

23

10

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 4

cgtcgtatg ccgctcgt ttec

24

20

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 5

agaagcgaga agcgaactga ttgg

24

30

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 6

cctcgtcctc tgcccgtcc tccacctcc

29

40

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 7

cgccagcaag acaagaccaa gaagaag

27

<210> 8

10

<211> 24

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 8

cgctectcca cctccatctc ctcc

24

<210> 9

20

<211> 21

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 9

gcaccccttca gcccttgtt g

21

【 図 1 】

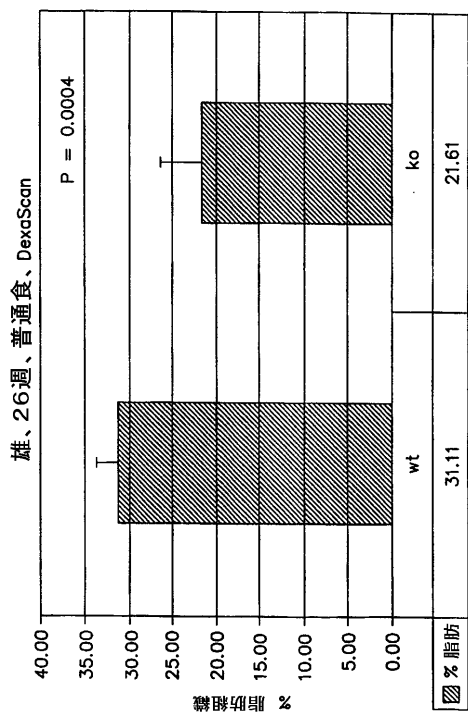


図 1

【 図 2 】

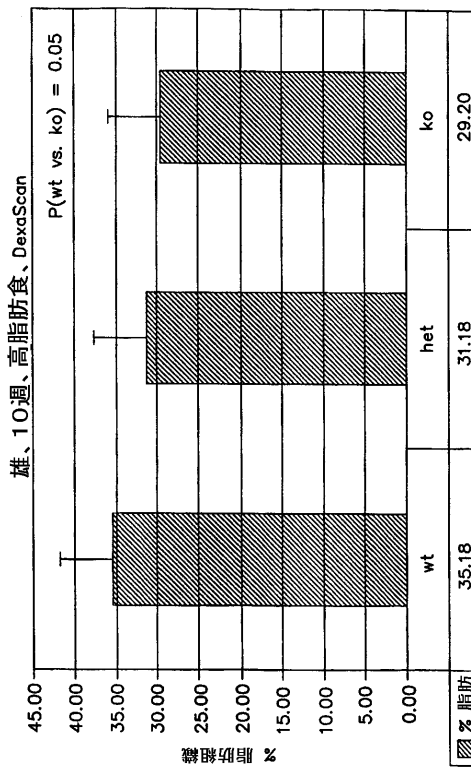


図 2

【 図 3 】

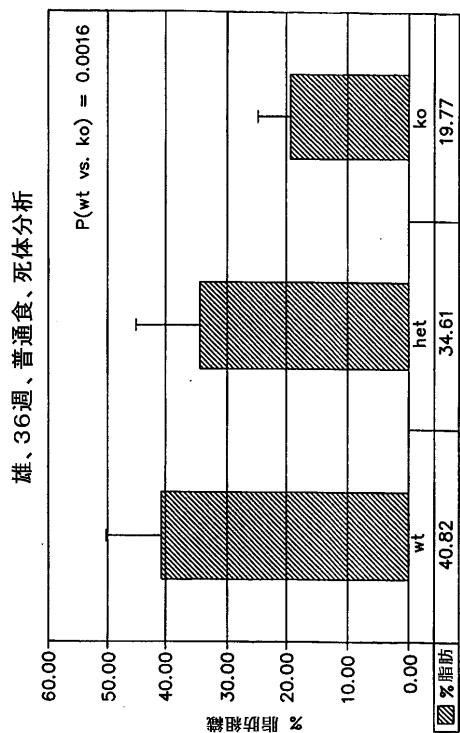


図 3

【 図 4 】

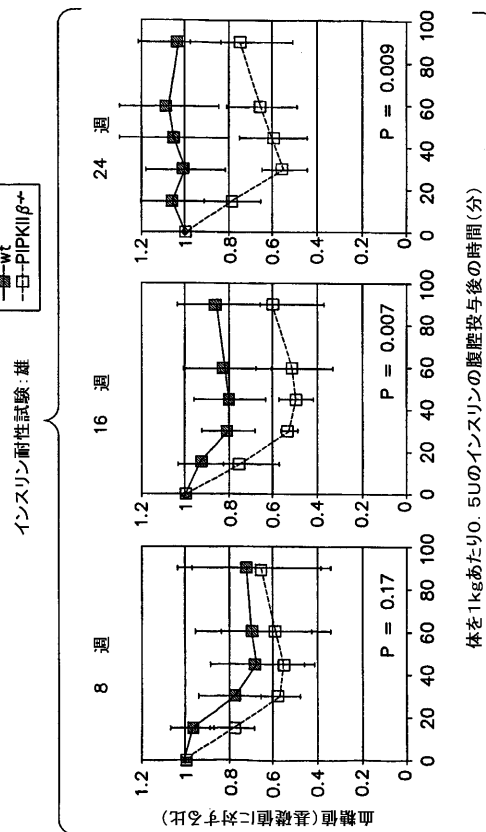


図 4

【 図 5 A 】

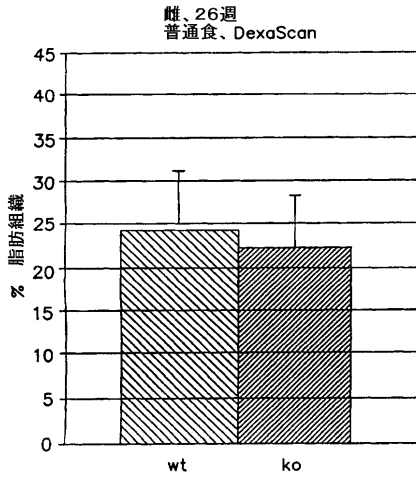


図 5A

【 図 5 B 】

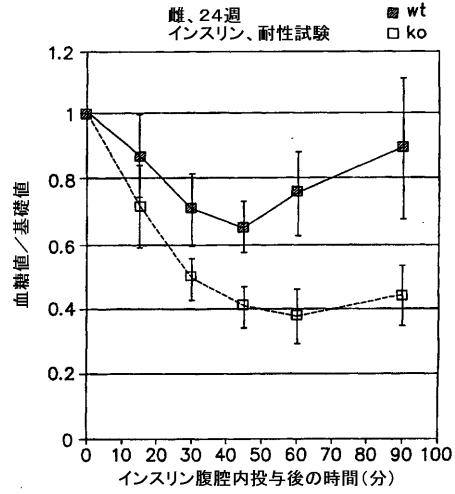


図 5B

【 図 6 】

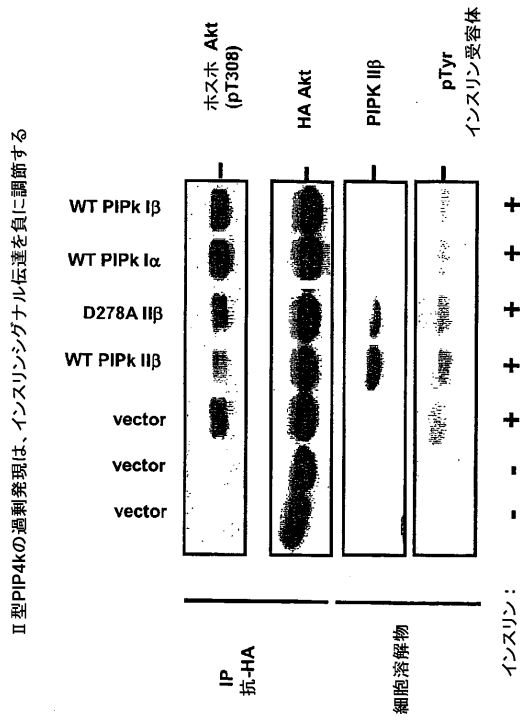


図 6

【 図 7 】

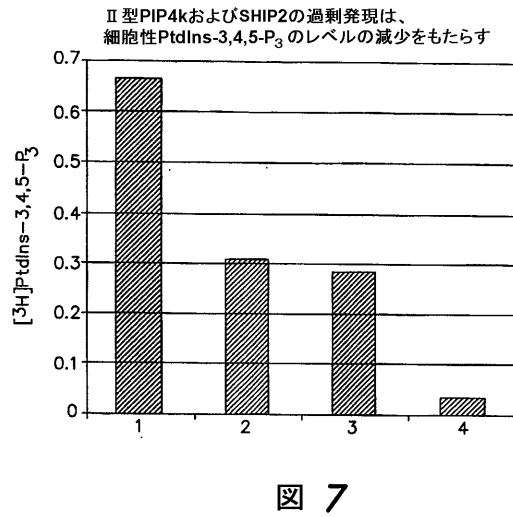


図 7

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/03065		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/68; A01N 43/04; C07H 21/04; A61K 31/07 US CL : 514/44; 536/24.5, 24.1, 23.1, 24.3; 435/6, 325, 375, 91.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/44; 536/24.5, 24.1, 23.1, 24.3; 435/6, 325, 375, 91.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
A	CASTELLINO et al. A Novel Interaction Between the Juxtamembrane Region of the p55 Tumor Necrosis Factor Receptor and Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-Kinase. Journal of Biological Chemistry, Vol. 272, No. 9, pages 5861-5870, see entire article.	1-95		
X	WO 01/94629 A2 (YOUNG et al) 20 May 2001 (20.5.2001), see claim 32, SEQ ID NO: 7454 and alignment attachment.	1-95		
X	WO 01/83688 A2 (MAO et al) 28 April 2001 (28.04.2001), see Abstract.	1-95		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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 </td> <td style="width: 50%;"> "I" 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 </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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	"I" 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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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	"I" 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 08 May 2003 (08.05.2003)		Date of mailing of the international search report 23 JUL 2003		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Terra C. Gibbs <i>Terra C. Gibbs</i> Telephone No. (703) 308-0196		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/03065

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

CaPlus, Medline, Biosis, Embase, Cancerlit

PIP5KII Beta, Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, PIP5K, type II and antisense

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/4439	A 6 1 K 31/4439	4 C 2 0 6
A 6 1 K 31/4453	A 6 1 K 31/4453	
A 6 1 K 31/64	A 6 1 K 31/64	
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 38/28	A 6 1 K 45/06	
A 6 1 K 45/06	A 6 1 P 3/04	
A 6 1 P 3/04	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 43/00	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/48	Z
C 1 2 Q 1/48	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 33/53	M
// C 1 2 N 15/09	G 0 1 N 37/00	1 0 2
G 0 1 N 33/15	A 6 1 K 37/26	
G 0 1 N 33/50	C 1 2 N 15/00	A
	G 0 1 N 33/15	Z
	G 0 1 N 33/50	Z

(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, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, 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, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 ラミア, カッジャ, エイ .

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 6、ブルックライン、# 4、ハーバード アヴェニュー 3 6

(72) 発明者 ラメ, ルシア

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 7 8、ベルモント、ピアソン ロード 4 1

(72) 発明者 カーン, バーバラ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 2 1 5、ボストン、アールエヌ - 3 2 5、ブルックライン アヴェニュー 3 3 0、シーノオー ベス イスラエル ディーコネス メディカル センター, インコーポレーテッド

(72) 発明者 ペローニ, オディール

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 2 1 5、ボストン、アールエヌ - 3 2 5、ブルックライン アヴェニュー 3 3 0、シーノオー ディビジョン オブ エンドクライノロジー メタボリズム、ベス イスラエル ディーコネス メディカル センター, インコーポレーテッド

F ターム(参考) 2G045 AA29 AA34 AA35 CB01 CB17 DA13 DA36 FB02 FB03
 4B024 AA01 AA11 BA10 BA80 CA04 CA11 DA02 DA05 EA04 GA11
 HA14 HA17
 4B063 QA01 QA05 QA13 QA18 QA19 QQ08 QQ13 QQ44 QQ52 QR08
 QR32 QR56 QR62 QR77 QR80 QR84 QS25 QS34 QS36 QS38
 QX02
 4C084 AA02 AA17 AA18 NA14 ZA701 ZC201 ZC351
 4C086 AA01 AA02 BC21 BC82 DA21 EA16 GA08 GA10 MA04 NA14

ZA70 ZC20 ZC35
4C206 AA01 AA02 FA53 HA31 MA04 NA14 ZA70 ZC20 ZC35

专利名称(译)	调节II型β型磷酸肌醇磷酸激酶		
公开(公告)号	JP2005516073A	公开(公告)日	2005-06-02
申请号	JP2003564071	申请日	2003-02-03
申请(专利权)人(译)	贝斯以色列女执事医疗中心有限公司		
[标]发明人	カントレーリスシー ラミアカツジャエイ ラメルシア カーンバーバラ ペローニオディール		
发明人	カントレー,ルイス,シー. ラミア,カツジャ,エイ. ラメ,ルシア カーン,バーバラ ペローニ,オディール		
IPC分类号	A01K67/027 A61K31/155 A61K31/198 A61K31/427 A61K31/4439 A61K31/4453 A61K31/64 A61K31/7088 A61K38/00 A61K38/28 A61K45/00 A61K45/06 A61K49/00 A61P3/04 A61P3/10 A61P43/00 C12N9/12 C12N15/09 C12N15/85 C12Q1/02 C12Q1/48 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/573 G01N37/00		
CPC分类号	A01K67/0276 A01K2217/075 A01K2227/105 A01K2267/0325 A61K38/00 A61K49/0008 A61P3/04 C12N9/1205 C12N15/8509 C12Q1/485 G01N33/573		
FI分类号	A61K45/00.ZNA A01K67/027 A61K31/155 A61K31/198 A61K31/427 A61K31/4439 A61K31/4453 A61K31/64 A61K31/7088 A61K45/06 A61P3/04 A61P3/10 A61P43/00.111 C12Q1/02 C12Q1/48.Z C12Q1/68.A C12Q1/68.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N37/00.102 A61K37/26 C12N15/00.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA29 2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA10 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA14 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ44 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QR84 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS38 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/AA18 4C084/NA14 4C084/ZA701 4C084/ZC201 4C084/ZC351 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC21 4C086/BC82 4C086/DA21 4C086/EA16 4C086/GA08 4C086/GA10 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA70 4C086/ZC20 4C086/ZC35 4C206/AA01 4C206/AA02 4C206/FA53 4C206/HA31 4C206/MA04 4C206/NA14 4C206/ZA70 4C206/ZC20 4C206/ZC35		
优先权	60/353758 2002-02-01 US		
其他公开文献	JP2005516073A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种调节II型磷酸肌醇磷酸激酶 (PIPKIIβ) 用于治疗PIPKIIβ相关疾病的方法。本发明还提供了鉴定用于治疗PIPKIIβ相关疾病的候选药剂的方法。

5) Int. Cl. ⁷	F I	ターマコード (参考)
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00 Z N A	2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/027	A 0 1 K 67/027	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/155	A 6 1 K 31/155	4 B 0 6 3
A 6 1 K 31/198	A 6 1 K 31/198	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/427	A 6 1 K 31/427	4 C 0 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 55 頁) 最終頁に続く

2) 出願番号	特願2003-564071 (P2003-564071)	(71) 出願人	301033258
3) (2) 出願日	平成15年2月3日 (2003.2.3)		
35) 翻訳文提出日	平成16年9月30日 (2004.9.30)		
36) 国際出願番号	PCT/US2003/003065	(71) 出願人	ベス・イスラエル・ディーコネス・メディア カル・センター、インコーポレイテッド アメリカ合衆国マサチューセッツ州022 15、ボストン、ブルックリン・アヴェニ ュー 330
37) 国際公開番号	W02003/064451	(74) 代理人	100102842 弁理士 葛和 清司
37) 国際公開日	平成15年8月7日 (2003.8.7)	(72) 発明者	カントレー、ルイス、シー、 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 2138、ケンブリッジ、ラーチ ロード 43
31) 優先権主張番号	60/353,758		
32) 優先日	平成14年2月1日 (2002.2.1)		
33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く