

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公表特許公報(A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 511057

(P2003 - 511057A)

(43)公表日 平成15年3月25日(2003.3.25)

| (51) Int. Cl ⁷ | 識別記号 | F I | テ-マ-ト* (参考) |
|---------------------------|------|---------------|-------------|
| C 1 2 N 15/09 | ZNA | C 1 2 Q 1/02 | 2 G 0 4 5 |
| C 1 2 Q 1/02 | | 1/68 | A 4 B 0 2 4 |
| 1/68 | | G 0 1 N 33/53 | S 4 B 0 6 3 |
| G 0 1 N 33/53 | | 33/577 | B |
| 33/577 | | 33/15 | Z |

審査請求 未請求 予備審査請求(全 22数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 529450(P2001 - 529450)

(86)(22)出願日 平成12年10月5日(2000.10.5)

(85)翻訳文提出日 平成14年3月29日(2002.3.29)

(86)国際出願番号 PCT/IL00/00621

(87)国際公開番号 W001/027319

(87)国際公開日 平成13年4月19日(2001.4.19)

(31)優先権主張番号 132313

(32)優先日 平成11年10月10日(1999.10.10)

(33)優先権主張国 イスラエル(IL)

(71)出願人 イエダ リサーチ アンド ディベロップ
メント カンパニー リミテッド
イスラエル国、76100 レホボト、ピーオー
ボックス 95、ワイズマン インスティチ
ュート オブ サイエンス(番地なし)

(72)発明者 ルピンステイン、メナケム
イスラエル国、54042 ギバット シュミュ
エル、ハトマー ストリート 16

(72)発明者 コーヘン、バトヤ
イスラエル国、64681 テル アビブ、レホ
ブ ブロク 48

(74)代理人 弁理士 朝日奈 宗太 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 レプチン検定

(57)【要約】

本発明は、試料におけるレプチンの存在を検出する方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 レプチンに応答してAng-2を発現する細胞または細胞株に試料を接触させ、ついで培地中のAng-2、Ang-2をコードする細胞RNAまたはAng-2プロモーターの活性化のいずれかを測定することからなる、レプチンまたはレプチン擬似剤の存在を測定する方法。

【請求項2】 真核細胞または真核細胞株が使用される請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記真核細胞または真核細胞株が哺乳動物のものである請求項2記載の方法。

【請求項4】 前記細胞株が分化するマウス脂肪細胞株から選択される請求項3記載の方法。

【請求項5】 前記細胞株がSwiss3T3F442Aマウス前駆脂肪細胞である請求項4記載の方法。

【請求項6】 前記細胞株がヒト細胞株から選択される請求項3記載の方法。

【請求項7】 前記細胞株がヒト骨髄間質細胞株hMS2-12である請求項6記載の方法。

【請求項8】 Ang-2が、免疫検定により従来の方法で培地において測定される請求項1、2、3、4、5、6または7記載の方法。

【請求項9】 Ang-2が、Ang-2に対するモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体からなる固相酵素免疫検定法(ELISA)により従来の方法で培地において測定される請求項1、2、3、4、5、6、7または8記載の方法。

【請求項10】 ハイスループットスクリーニングに適応される請求項8または9記載の方法。

【請求項11】 Ang-2 RNAの存在が、従来の方法の逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)により培養細胞または培養細胞株において測定される請求項1、2、3、4、5、6または7記載の方法。

【請求項12】 プロモーターおよび少なくとも1つのレプチン応答エレメ

ントを含有するAng-2プロモーター領域ならびに該プロモーター領域に有効に結合されるリポーター遺伝子からなるベクターを構築し、それによりレプチンに応答してAng-2を発現する宿主細胞にトランスフェクトし、試料とともにインキュベーションし、ついで従来の方法でリポーター遺伝子発現を測定することにより、Ang-2プロモーターの活性化を検出する請求項1、2、3、4、5、6または7記載の方法。

【請求項13】 プロモーターおよび少なくとも1つのレプチン応答エレメントを含有するAng-2プロモーター領域ならびに該プロモーター領域に有効に結合されるリポーター遺伝子をコードするヌクレオチド配列からなるベクター。

【請求項14】 請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12記載の方法を実行するための検定キット。

【発明の詳細な説明】**【0001】****[本発明の分野]**

本発明は、レプチン活性を測定するための検定系に関する。さらに詳しくは、本発明は、レプチンまたはレプチンの生物学的活性によく似た薬剤（以下、レプチン模擬剤）のインビトロ検定に関する。その検定は、たとえば分子ライブラリーのハイスループットスクリーニングにおける使用に適する。

【0002】**[本発明の背景]**

細身に健康な体容積に対する過剰な体脂肪として定義される肥満は、重大な心理学的状態ならびに、高血圧、上昇した血中脂肪およびII型もしくはインシュリン非依存型糖尿病（NIDDM）を含む重大な医学的病的状態に関連している。米国には、18%の年齢65歳の群を含む600～1000万人のNIDDMを患う人がいる（Kamel, HK, et al, Clin. Geriatr. Med., 1999, 15, 265）。NIDDMを患うおよそ45%の男性および70%の女性が肥満であり、彼らの糖尿病は減量によって実質上改善または排除される（Harris 1991, Diabetes Care, 14, 639）。肥満遺伝子の産物であるレプチンは（Zhang, Y., et al. 1994, Nature 372, 425）、食物摂取およびエネルギー代謝を調節する脳への抹消シグナルとして機能する。レプチンは、そのレセプターであるOB-Rを介して視床下部においてその作用を発揮すると考えられている（Tartaglia, L. A., et al, 1995, Cell 83, 1263）。レプチンまたは全長OB-Rのどちらかの正常な発現を妨げる変異を有するげっ歯類は、まったくの肥満、糖尿病であり、そして低下した代謝率を有する（Coleman, D. L. 1978, Diabetologia 14, 141）。しかしながら、ヒトの肥満は、レプチンまたはOB-Rをコードする遺伝子の変異に関連しているようにはみえない（Considine, R. V., et al. 1995, J. Clin. Invest. 95, 2986; Considine, R. V., et al, 1996, Diabetes 19, 992）。突然変異肥満遺伝子を有するマウスは組換えレプチンの投与によって正常な体重に戻ることができるが（Pelleymounter, M. A., et al. 1995, Science 269, 540; Halaa s, J. L., et al, 1995, Science 269, 543; Campfield. L. A., et al, Scienc

e 269, 546)、肥満の人の血清レプチンレベルは慢性的に上昇しているため、このアプローチが肥満の人において成功するとは思われない(Maffei, M., et al, 1995, Nature Med. 1, 1155; Considine, R. V., et al., 1996, N. Engl. J. Med. 334, 292; Sinha, M. K., et al., 1996, J. Clin. Invest. 98, 1277)。したがって、肥満の人は、おそらくは血液脳関門を越えるレプチン輸送の欠陥(Caro, J. F., et al, 1996, Lancet 348, 159)または不十分なOB-R応答のために、血清レプチンレベルに相応するシグナルを生み出さないという点で、「レプチン耐性」のようである(Maffei, M., et al, 1995, Nature Med. 1, 1155; Flier, J. S. & Elmquist, J. K. 1997, Nature Biotech. 15, 20; Campfield, L. A., et al, 1996, Horm. Metab. Res. 28, 619)。OB-Rのシグナル経路の分析は、レプチン耐性を克服しかつ肥満を逆転するために、OB-R応答を高める代替治療法を示し得る。レプチンおよびOB-Rはそれぞれ、4本のヘリックスの束からなるサイトカインおよび受容体サブファミリーのメンバーである(Tartaglia, L. A., et al, 1995, Cell 83, 1263; Madej, T., et al, 1995, FEBS Lett. 373, 13)。OB-Rは、シグナル経路が徹底的に研究されており、インターロイキン-6およびCNTFなどのサイトカインによって活性化されるgp130シグナル伝達受容体に最も密接に関連する(Kishimoto, T., et al, 1992, Science 258, 593; Stahl, N. & Yancopoulos, G. D. 1994, J. Neurobiology 25, 1454)。レプチン受容体は、異なる細胞質領域を有するいくつかの択一的にスプライシングされた産物として翻訳されるが(Tartaglia, L. A., et al, 1995, Cell 83, 1263; Lee, G.-H., et al, 1996, Nature 379, 632; Chen, H., et al, 1996, Cell 84, 491; Cioffi, J. A., et al, 1996, Nature Med. 2, 585; Wang, M. Y., et al, 1996, FEBS Lett. 392, 87)、ロングフォームまたはOB-Rbとして知られる1つのアイソフォームのみがレプチンの体重制御効果を媒介できるようである(Lee, G.-H., et al, 1996, Nature 379, 632; Chen, H., et al, 1996, Cell 84, 491; Ghilardi, N., et al, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 6231; Baumann, H., et al, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 8374)。肥満糖尿病(db)マウスは、長いOB-Rスプライスアイソフォームの発現を妨害する突然変異であって、レプチンの作用を適切に媒

介することができない突然変異を、OB-Rに有する (Lee, G. -H., et al, 1996, Nature 379, 632; Chen, H., et al, 1996, Cell 84, 491)。

【0003】

生命を脅かす病気の治療に対する薬剤として使用される新規な生物学的活性分子の発見は、(i) 化学合成もしくは天然資源からの単離のどちらかで製造した分子候補の事実上ランダムな選択、および(ii) 目的の特性に対する分子候補のテスト、の2つの基本的工程を含む。その発見サイクルは、所望の特性を備える分子が発見されるまで、無限に繰り返される。多くの場合において、テストのために選ばれる分子タイプは、かなり狭く定義される化学クラスに属している。たとえば、新規ペプチドホルモンの発見はペプチドに関する研究を含んでおり；新規治療用ステロイドの発見はステロイド核に関する研究を含んでいる。結果として、全くその場限りのものであり、かつ主に幸運な発見に依存する新規機能分子の発見は、非常に時間がかかり、骨が折れ、予測できない、そして高つく事業である。

【0004】

生物学的活性の現在の理論によると、生物学的活性、つまり生理学的活性状態は、分子認識事象の結果である。たとえば、相補的な一本鎖分子がハイブリダイズするために、ヌクレオチドは相補的な塩基対を形成することができ、遺伝子発現の制御に関わると思われる2重または3重のらせん構造を生じる。他の例では、リガンドと呼ばれる生物学的活性分子は他の分子、通常はリガンドアクセプター（たとえば受容体または酵素）と呼ばれる巨大分子に結合し、そしてこの結合は、たとえば正常な細胞増殖および分化、発ガンを導く異常な細胞成長、血圧調節、神経インパルス発生ならびに増殖などの生理学的状態を最終的に引き起こす一連の分子事象を誘導する。リガンドとリガンドアクセプターとの間の結合は、適当な三次元の構造配置および化学的相互作用に関して、幾何学的な特徴を示し、かつ非常に特異的である。

【0005】

病気の治療に使用され得る薬剤の開発に対して現在好まれている戦略は、各種の生物学的受容体のリガンド、酵素または同類の巨大分子の発見を含み、同類の

巨大分子とは、そのようなりガンドによく似ており、そのアクセプターまたは受容体によって誘導される活性を上昇させるか（すなわち作動させる）、抑制する（すなわち拮抗する）ものである。そのような所望のリガンドの発見は、分子（化学合成により製造された分子、または天然資源から単離された分子、たとえば K. Nakanishi, *Acta Pharm. Nord.*, 1992, 4, 319-328. 参照）のランダムスクリーニングによって、あるいは、通常は本来のリガンドの構造であるリード構造（lead-structure）の同定、ならびに構造の再設計および生物学的テストからなる多数のサイクルを経るその特性の最適化を含むいわゆる「合理的な」アプローチ（たとえば Testa, B. & Kier, L. B. *Med. Res. Rev.* 1991, 11, 3548 and Rostein, S. H. & Mureko, M. A., *J. Med. Chem.* 1993, 36, 1700 参照）によって、伝統的に実施されている。多くの有用な薬剤は「合理的な」アプローチを経ず、ランダムに選ばれた化合物のスクリーニングを経て発見されているため、最近では、特異的な生物学的活性に対してスクリーニングされるランダムにつくられた化学構造の巨大なライブラリーを構築するためのコンビナトリアル化学の使用に基づく、薬剤発見のためのハイブリッド法が用いられている（Brenner, S. & Lerner, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, 5381）。ランダムにつくられた化学構造からなるそのように巨大なライブラリーのスクリーニングは、自動化しやすい費用効果的な生物学的検定を必要とする。

【0006】

レプチンは、ob / ob マウスにレプチンを注入し、体容積の減少を観察することによって、伝統的にインビボで検定される。このバイオアッセイは煩雑で、時間がかかり、かつ再現性がない。このバイオアッセイは、たとえば何百万もの化合物を含むライブラリーのハイスループットスクリーニングにはおよそ不適切である。これまでのところ、より簡単ないくつかの検定系が記載されている。たとえば、OB-R のロングフォームが、STAT3 活性を特徴づけるモチーフ（Stahl, N., et al, (1995) *Science* 267, 1349）である配列 Y X X Q を含有するとの発見（Tartaglia, L. A., et al, (1995) *Cell* 83, 1263）は、STAT3 がレプチン応答の媒介に重要である可能性を提言した。最近の結果によると、STAT3 は、培養細胞（Ghilardi, N., et al, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA 93, 6231; Baumann, H., et al, (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 8374; Rosenblum, C. I., et al, (1996) Endocrinology 137, 5178) およびインビボ (Vaisse, C., et al, (1996) Nature Gen. 14, 95) の両方においてOB-Rのロングフォームによって活性化され、そして上部を欠失させたOB-Rまたは変異したYXXQモチーフを有するOB-Rのロングフォームによっては活性化されない (Baumann, H., et al, (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 8374; White, D. W., et al, (1997) J. Biol. Chem. 272, 4065) ことが証明された。PCT特許出願国際公開第9857177号パンフレットは、簡単なインビトロレプチンバイオアッセイの基準としてのSTAT3活性化の用途を提案するものである。しかしながら、STAT3は、IL-6、CNTF、インターフェロンアルファおよびベータ、成長ホルモンならびにより多くのサイトカインおよびポリペプチドホルモンを含む、多くの他のホルモンおよびサイトカインによって活性化される。したがって、STAT3の活性化を、レプチン活性の特異的マーカーとして使用することはできない。

【0007】

PCT出願国際公開第9740380号パンフレットは「レプチン応答エレメント」と呼ばれるDNAカセットの用途を開示するものである。チミジンキナーゼプロモーターなどのプロモーターおよびルシフェラーゼなどのリポーター遺伝子へのこのDNAカセットの結合により、適当なりポーターベクターが提供されるだろう。レプチン受容体OB-Rbを発現する細胞は、そのリポーターベクターを用いてトランスフェクトされる。そのような細胞はインビトロでのレプチン検定に対する道具として提案されている。しかしながら、PCT出願国際公開第9740380号パンフレットによると、提案された「レプチン応答エレメント」は、多くの他のサイトカイン、とくにインターフェロンガンマ、インターフェロンアルファおよびベータによって活性化される周知のエLEMENTである「ガンマ活性化配列 (gamma activation sequence)」に一致する。したがって、ガンマ活性化配列に基づく検定は、レプチン模擬活性と、たとえばインターフェロン模擬活性とを区別することができないだろう。

【0008】

他のインビトロでの検定は、IL-3受容体のようなリポーター受容体の膜貫通領域および細胞内領域に融合したOB-Rの細胞外領域からなるキメラ受容体に基づく。該キメラ受容体を発現するIL-3依存細胞は、細胞増殖を促進するレプチンの測定に使用できることが示されている。したがって、レプチンにさらすと該細胞は増殖し、その増殖はMTT染色により、または放射性標識したチミジンの取り込みによって検出され得る(Verploegen SA, et al. 1997, FEBS Lett. 405. 237)。この検定系は信頼でき、レプチンの測定に有用であり、かつハイスループットスクリーニングに使用しやすい。しかしながら、この検定に基づくハイスループットスクリーニングによって選択された分子は、レプチンに全く似ていない可能性がある。たとえば、ハイスループットスクリーニングによって発見された真のインシュリン模擬剤は、インシュリン受容体の細胞質領域と相互作用することによって作用することが示された(Zhang B., et al, 1999, Science 284, 974)。したがって、該レプチン-IL-3受容体キメラなどのキメラ受容体によって選択された分子は、キメラのIL-3由来の細胞質領域と相互作用し、つまりレプチンに似ているというよりむしろIL-3に似ているという危険性がある。したがって、この検定はレプチン模擬剤のスクリーニングに対しては信頼できない。

【0009】

肥満遺伝子の産物であるレプチンは、脂肪細胞で発現され、その視床下部の受容体OB-Rbをとおして、食物摂取およびエネルギー代謝を調節する。ob/obマウスの場合などのレプチン欠如、またはdb/dbマウスの場合などのOB-Rb欠如は、病的な肥満を引き起こす。しかしながら、人の肥満の最も一般的な症例は、レプチン欠陥に関連していない。事実、血清レプチンは、体容積指数に相互に関連し、したがって肥満群は高い血清レプチンレベルを有する。この関連は、肥満はある種のレプチン耐性に関連しているという見解を導く。考えられるレプチン耐性のメカニズムの1つは、血液脳関門を越えるレプチンの非効率的な輸送である。実際、抹消経路のレプチン投与に比較して、レプチンの脳室内投与は、げっ歯類の脂肪組織の容積減少に、大いに効果的である。

【0010】

血液脳関門を超えることができるレプチン模擬剤の開発は、レプチン耐性の問題を解決し得る。この目的において、レプチン模擬活性を示す個々の薬剤を同定するために、低分子量の薬剤からなるライブラリーをスクリーニングすることは有利である。このようなスクリーニングには、レプチン活性の簡単で特異的なバイオアッセイが必要である。今までのところ、前述したように、レプチンの生物学的活性は動物における検定でのみ規定できる。このような検定は煩雑で、それゆえに何百もの異なる物質からなるライブラリーをスクリーニングするためには適当ではない。いくつかのインビトロ検定が記載されたが、それらはレプチン特異的ではない。したがって、簡単に自動的に使用できるような、レプチン活性の簡単でかつ特異的な検定を確立する必要がある。

【0011】

[本発明の要旨]

本発明はこのように、レプチンに応答してAng-2を発現する細胞または細胞株と試料とを接触させ、ついで培地のAng-2、Ang-2をコードする細胞のRNA、またはAng-2プロモーターの活性化のいずれかを測定することからなるレプチンまたはレプチン模擬剤を検出する方法を提供する。

【0012】

好ましくは真核細胞または細胞株、より好ましくは哺乳類の細胞または細胞株が使用される。

【0013】

適当な細胞株は、たとえばSwiss3T3F442Aマウス前駆脂肪細胞などの分化されるマウス脂肪細胞の細胞株、またはヒトの骨髄間質細胞株hMS2-12などのヒトの細胞株である。

【0014】

本発明により、Ang-2は、Ang-2に対するモノクローナルおよびポリクローナル抗体からなる固相酵素免疫検定法(ELISA)により、培地において従来のように測定される。

【0015】

このようなELISAは、ハイスループットスクリーニングなどの現在のスク

リーニング方法に適応され得る。

【0016】

Ang - 2 RNAの存在は、従来のように逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT - PCR）によって、培養細胞または培養細胞株において測定される。

【0017】

ANG - 2プロモーターの活性化は、本発明により、プロモーターおよび少なくとも1つのレプチン応答エレメントを含有するAng - 2プロモーター領域、ならびに該プロモーター領域に有効に結合されたリポーター遺伝子からなる構築物であって、好ましくは適切なベクター中に配置された構築物を構築し、それを用いてレプチンに応答してAng - 2を発現する宿主細胞をトランスフェクトし、試料とともに培養し、ついで従来の方法でリポーター遺伝子の発現を測定することによって検出される。

【0018】

本発明はまた、プロモーターおよび少なくとも1つのレプチン応答エレメントを含有するAng - 2プロモーター領域をコードするヌクレオチド配列、ならびに該プロモーター領域に有効に結合されたリポーター遺伝子からなるベクターを提供する。

【0019】

[本発明の詳細な説明]

本発明により、レプチンのインビトロ検定の方法を開示する。このような方法はレプチン模擬剤のハイスループットスクリーニングに適している。レプチンは、培養脂肪細胞において、アンジオポエチン - 2 遺伝子の発現をとくに誘導することが開示されている。レプチン模擬剤のハイスループットスクリーニングは、固相酵素免疫検定法（ELISA）によって、レプチンに誘導される分泌アンジオポエチン - 2 のレベルを測定することによって達成される。あるいは、リポーター遺伝子に結合され、培養脂肪細胞に挿入されたアンジオポエチン - 2 プロモーターの活性を測定することによって、レプチン活性は評価され得る。

【0020】

本発明により、レプチンのインビトロ検定のための方法を開示する。そのよう

な方法はまた、レプチン模擬剤のハイスループットスクリーニングに適している。1999年9月5日に提出された共に係属中 (co-pending) のイスラエル特許出願第131739号は、レプチンが培養脂肪細胞においてアンジオポエチン - 2の発現を特異的に誘導することを開示している。アンジオポエチン - 2はレプチン不存在下では培養脂肪細胞で発現されないため、レプチンによるアンジオポエチン - 2の誘導は非常に効果的であり、かつ非常に特異的である。したがって、適当な真核細胞をさまざまな量のレプチンまたはレプチン模擬剤で処理し、ついで培地中のアンジオポエチン - 2、アンジオポエチン - 2をコードする細胞mRNAのいずれかを測定することによって、またはアンジオポエチン - 2プロモーターの活性を測定することによって、レプチンおよびレプチン模擬剤の活性を測定し得る。該適当な哺乳類細胞は、レプチン処理に応答してアンジオポエチン - 2を発現するあらゆる細胞または細胞株であってよい。一般に、好ましい宿主細胞は、扱いやすい培養真核細胞であり、好ましくは哺乳類細胞であり、とくに好ましい実施態様においては分化されるマウス脂肪細胞である。最も好ましい細胞株はSwiss 3T3 F442Aマウス前駆脂肪細胞であり (Green, H., and Kehinde, O., 1975, Cell 5, 19)、該細胞株は、密集した細胞を10%ウシ胎仔血清 (FBS) で補充された培地中で6日間維持することにより、成熟脂肪細胞へと分化されるものである。もう1つの最も好ましい細胞株はヒトの骨髄間質細胞株hMS2-12であり、この細胞株はレプチン受容体を発現し、脂肪細胞への分化を誘導され得るものである (Thomas T., et al, 1999, Endocrinology 140, 1630)。

【0021】

多くの利用可能な一般的な方法は、当業者によって培地中のアンジオポエチン - 2、アンジオポエチン - 2をコードする細胞mRNAの測定に、またはアンジオポエチン - 2プロモーターの活性化の測定に適応され得る。本発明の実施態様において、固相酵素免疫検定法 (ELISA) が、マウスのアンジオポエチン - 2の定量的測定のために開発されている。ELISAは、ELISAプレートにアンジオポエチン - 2を捕捉するために、マウスモノクローナル抗体の開発を必要とする。精製されたモノクローナル抗体は、培養上清からAng - 2を捕らえ

るために、E L I S A プレートの第一層として使用される。ポリクローナル抗体は、宿主動物（たとえばウサギ）のアンジオポエチン - 2 に対しておこされる。抗体の開発に使用するアンジオポエチン - 2 は、レプチンによる誘導に用いる細胞株と同種の由来であるべきである、という点に注意しなければならない。この検定の実施のために、レプチン処理に応答してアンジオポエチン - 2 を発現する細胞は、たとえば96穴プレートで増殖される。レプチンの試料（ポジティブコントロール）または推定のレプチン模擬剤を培地に添加し、24～96時間インキュベーションを継続する。ついで、培地の分割量（aliquots）を取り出し、アンジオポエチン - 2 特異的な前記捕捉モノクローナル抗体でプレコートされたE L I S A プレートに移す。そのE L I S A プレートを1～16時間インキュベーションし、洗い、ついでアンジオポエチン - 2 の前記ポリクローナル抗体を添加する。そのE L I S A プレートを1～16時間インキュベーションし、洗い、ついで酵素 - 抗体複合体を添加する。典型的な複合体は、ペルオキシダゼまたはアルカリホスファターゼに接合したヤギ抗ウサギ免疫グロブリンである。そのE L I S A プレートを1～16時間インキュベーションし、洗い、適当な基質の添加によって発色させる。該E L I S A は自動化されたハイスループットスクリーニングに適している。

【0022】

本発明のほかの実施態様では、アンジオポエチン - 2 m R N A を、レプチンまたはレプチン模擬剤で処理された前記培養細胞において測定する。特異的なマウスアンジオポエチン - 2 m R N A は、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（R T - P C R）によって測定され得る。ハイスループットR T - P C R は、たとえば特異的な「モレキュラービーコン」（リサーチジェネティクス社（Research Genetics）製、ハンツビルアラバマ（Huntsville Alabama）、USA）を用いることによって考案され得る。蛍光色素および消光（quencher）色素の両方をそれぞれ5'末端および3'末端に含有する一本鎖オリゴヌクレオチドがある。そのオリゴヌクレオチドは、アンジオポエチン - 2 c D N A の配列に相補的なヘアピンループ配列を含むように設計される。そのオリゴヌクレオチドはまた、モレキュラービーコンがP C R で増幅されたアンジオポエチン - 2 c D N A に結合しない場合には

、エネルギー移動を経る3 消光色素によって蛍光が消光されて蛍光が発生しないように、ヘアピンステム構造を含むように設計される。しかしながら、PCRによって増幅されたアンギオポエチン-2 cDNAが添加された場合には、モレキュラービーコンの相補的なループは、ステムとの結合と比較して、標的PCR産物とより強い結合を形成する。このハイブリダイゼーションは、構造的な変化を引き起こしてステムを分離し、蛍光を引き起こす (Tyagi S., and Kumar F. R., 1996, Nature Biotech., 1649)。

【0023】

この検定を実施するために、レプチン処理に応答してアンギオポエチン-2を発現する細胞は、たとえば96穴プレートで増殖される。レプチンの試料(ポジティブコントロール)または推定のレプチン模擬剤をその培地に添加し、24~96時間インキュベーションを継続する。そのプレートを洗い、全RNAを細胞単層から抽出する。そのRNAをランダムプライマーを用いて逆転写し、得られるcDNAを特異的なマウスアンギオポエチン-2プライマーを用いて定量PCRに供する。そのアンギオポエチン-2 mRNAの量は、前記モレキュラービーコンの助けをかりて測定される標的PCR産物の量に反映する。この検定の全ての工程は、自動化されたハイスループットスクリーニングに適している。

【0024】

ほかの好ましい実施態様では、ヒトまたはマウスのアンギオポエチン-2プロモーターを、本分野における周知の方法で同定し、そしてゲノムDNAからクローニングする。該プロモーターおよびリポーター遺伝子は、好ましくは複製可能な哺乳類の発現ベクターにタンデムに結合される。しかしながら、アンギオポエチン-2プロモーターの機能を妨げないのであれば、介在配列が存在してもよい。リポーター遺伝子は、簡単に検出されるペプチドをコードするあらゆる遺伝子、またそうでない場合は転写または翻訳の簡単な検出を容易にするあらゆる遺伝子であってよい。一般に、リポーター遺伝子は、宿主細胞において自然に生じないタンパク質、または、宿主細胞により少量産生されるのみであるタンパク質をコードする。周知のリポーター遺伝子の例としては、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、緑色蛍光タンパク質(GFP)、ルシフ

エラーゼ（バクテリアまたはホタルのどちらか）、およびベータガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼなど、他の酵素に基づく検出系を含む。とくに好ましい実施態様においては、ルシフェラーゼがリポーター遺伝子である。

【0025】

リポーター遺伝子構築物は、a) プロモーターおよび少なくとも1つのレプチン応答エレメントを含有するアンギオポエチン-2プロモーター領域、およびb) 該プロモーター領域に有効に結合したリポーター遺伝子からなる。リポーター遺伝子構築物は、宿主細胞へのトランスフェクトに用いる適当なベクターに配置されるのが好ましい。そのベクターは、選択した宿主細胞において機能し得るプラスミド、コスミドおよびウイルスベクターを含むあらゆる既知のベクターであってよい。そのようなベクターは、本発明のさらに他の局面を形成する。宿主細胞は、レプチン処理にตอบสนองしてアンギオポエチン-2を発現するあらゆる細胞または細胞株であってよい。そのような細胞は、該リポーターベクターを用いて安定に、または一時的にトランスフェクトされる。一般に、好ましい宿主細胞は具合良く培養される真核細胞であり、好ましくは哺乳類細胞、およびより好ましい実施態様においては分化されるマウス脂肪細胞である。最も好ましい細胞株は、密集した細胞を10%ウシ胎仔血清(FBS)で補充した培地において6日間維持することにより成熟脂肪細胞へと分化する、Swiss 3T3 F442Aマウス前駆脂肪細胞(Green, H., and Kehinde O., 1975, Cell 5, 19)である。

【0026】

その検定の実施のために、レプチン処理にตอบสนองしてアンギオポエチン-2を発現する細胞または細胞株は、前記リポーターベクターを用いて、安定にまたは一時的にトランスフェクトされる。該細胞は96穴プレートで増殖し、分化する。レプチンの試料(ポジティブコントロール)または推定のレプチン模擬剤をその培地に添加し、インキュベーションを継続する。そのリポーター遺伝子産物のレベルを、24~96時間後にウェル中で測定する。この検定において、アンギオポエチン-2プロモーターの活性化は、該リポーター遺伝子構築物の遺伝子産物を測定することによって決定される。したがって、その遺伝子産物のレベルは、レプチンまたはレプチン模擬活性のレベルと一致する。

【0027】

本発明を、以下の実施例によってさらに説明するが、この実施例は、いずれにしてもその範囲に制限を課すと解釈されるべきものではない。それどころか、本発明の精神および/または添付の特許請求の範囲から逸脱することなく、本明細書中の記載を読んだ後に当業者に示唆され得るさまざまな他の実施様態、改変、それらに相当するものための手段となり得ることは、明確に理解されるべきである。

【0028】

[実施例]

実施例1：アンギオポエチン - 2のELISAによるレプチンおよびレプチン模擬剤の検定

マウスSwiss3T3F442A細胞を96穴プレートで増殖させ、そして分化させる。レプチンの試料(ポジティブコントロール)または推定のレプチン模擬剤を最終濃度1マイクログラム/mlまで培地に添加し、24時間インキュベーションを継続する。ついでレプチンに誘導されたまたはレプチン模擬誘導された培地の分割量を取り出し、そしてマウスアンギオポエチン - 2特異的な捕捉モノクローナル抗体でプレコートしたELISAプレートに移す。マイクロタイタープレート(ダイナテック社(Dynatech)製またはヌンク社(Nunc)製のMaxisorb)は、抗マウスアンギオポエチン - 2モノクローナル抗体(無血清ハイブリドーマ上清または腹水免疫グロブリン)により、一晚4℃でコートした。そのプレートをBSA(0.5%)およびTween20(0.05%)を含有するPBSで洗い、その同じ溶液で少なくとも2時間37℃で遮断する。ついで、レプチンに誘導されたまたはレプチン模擬誘導された培地の分割量を取り出し、そしてELISAプレート(100マイクロリットル/穴)に移し4時間37℃でおく。ついでそのプレートを、Tween20(0.05%)を含有するPBSで3回洗い、続いてウサギ抗マウスアンギオポエチン - 2血清を添加し(1:1000、100マイクロリットル/穴)、さらに一晚4℃でインキュベーションする。そのプレートを3回洗い、ヤギ抗ウサギ西洋ワサビペルオキシダーゼのコンジュゲートを添加し(HRP, Jackson Labs、1:10,000、100マイクロ

リットル/穴) 2時間室温に置いた。そのプレートを4回洗い、そして、基質として H_2O_2 と共にABTS(2,2'-アジノ-ビス-(3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸)、シグマ社(Sigma)製)により、色を発色させる。そのプレートは自動ELISAリーダーによって読みとられる。

【0029】

実施例2：アンギオポエチン-2のRT-PCRによるレプチンおよびレプチン模擬剤の検定

マウスSwiss3T3F442A細胞を96穴プレートで増殖させ、そして分化させる。レプチン刺激の前に、細胞を低血清(0.5%)で16時間維持する。レプチン(1マイクログラム/ml(ポジティブコントロール)または推定のレプチン模擬剤を培地に添加し、そしてインキュベーションを24時間継続する。そのプレートは排液され、全RNAをTRI試薬キット(モレキュラーリサーチセンター社(Molecular Research Center Inc.)製)により単離する。逆転写は、20マイクロリットル容量でRNaseH⁻逆転写酵素(SuperScript II、ギブコ-BRL社(GIBCO-BRL)製、USA)と1 μ g(N)。ランダムプライマー(ニューイングランドバイオラプス社(New England Biolabs)製、USA)を用いて実施する。逆転写産物の分割量(2マイクロリットル)は、VENT DNAポリメラーゼ(ニューイングランドバイオラプス社製)ならびにそれぞれmuanギオポエチン-2 mRNA、AF4326.gb_ro、ヌクレオチド637~657および1147~1167であるセンスおよびアンチセンスプライマーを用いるPCRに使用される。PCR反応は飽和する前に終わらせる。PCR産物を単離し、1M NaClにもち込み72℃で変性させ、そして5'ローダミン-GCTGAG-CTGGAGAAGAAGCTGGTGACA-CTCAGC-3'-ダブシル化(dabcyl)の構造のモレキュラービーコンに52℃でハイブリダイズさせる。そのループは、ジーンバンク登録番号AF004326であるマウスアンギオポエチン-2 mRNAのヌクレオチド898~918に該当し、そのステムループ構造のTmは61.6℃である。蛍光を放つ試料は、アンギオポエチン-2 mRNAを発現することによってレプチンに応答する培養物を意味する。

【0030】

実施例3：リポーターベクターによるレプチンおよびレプチン模擬剤の検定

マウス Swiss 3T3F442A 前駆脂肪細胞は、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子の前方にあるマウスアンギオポエチン - 2 の完全なプロモーター領域からなるリポーターベクターによって、安定にトランスフェクトされる。その細胞を、96穴プレートで増殖され、そして分化させる。レプチンの試料 (ポジティブコントロール) または推定のレプチン模擬剤を培地に添加し、そしてインキュベーションを継続する。緑色蛍光の出現は、細胞培養物がレプチンまたはレプチン模擬剤にさらされたことを示す。

【0031】

実施例4：リポーターベクターによるレプチンおよびレプチン模擬剤の検定

ヒトの hMS2-12 間質前駆脂肪細胞は、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子の前方にあるヒトアンギオポエチン - 2 の完全なプロモーター領域からなるリポーターベクターによって、安定にトランスフェクトされる。その細胞を、96穴プレートで増殖させ、そして分化させる。レプチンの試料 (ポジティブコントロール) または推定のレプチン模擬剤を培地に添加し、そしてインキュベーションを継続する。緑色蛍光の出現、細胞培養物がレプチンまたはレプチン模擬剤にさらされたことを示す。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| | | |
|---|--|--|
| | | Int. Appl. No. PCT/IL 00/00621 |
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 G01N33/74 C12Q1/68 C12N15/85 | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C12N C12Q | | |
| 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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | SHYU KOU-GI ET AL: "Direct intramuscular injection of plasmid DNA encoding angiotensin-1 but not angiotensin-2 augments revascularization in the rabbit ischemic hindlimb." CIRCULATION, vol. 98, no. 19, 10 November 1998 (1998-11-10), pages 2081-2087, XP000990740 ISSN: 0009-7322 page 2081, column 2, paragraph 2 -page 2082, column 1, paragraph 1 --- -/-- | 13 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Further documents are listed in the continuation of box C. | <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. |
| * Special categories of cited documents: | | |
| 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the international filing date 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention 'X' document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art '&' document member of the same patent family |
| Date of the actual completion of the international search 28 March 2001 | | Date of mailing of the international search report 12/04/2001 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Pellegrini, P |

I

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte Jonal Application No
PCT/IL 00/00621

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | TANAKA SHINJI ET AL: "Biologic significance of angiotensin-2 expression in human hepatocellular carcinoma." JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 103, no. 3, February 1999 (1999-02), pages 341-345, XP000990761 ISSN: 0021-9738 page 342, column 1, paragraph 2 -page 342, column 2, paragraph 2 --- | 13 |
| A | WO 97 40380 A (PLOEG LEONARDUS V D ; ROSENBLUM CHARLES I (US); CHEN FANG (US); CUL) 30 October 1997 (1997-10-30) cited in the application the whole document --- | 1-14 |
| P, A | YOON J CLIFF ET AL: "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma target gene encoding a novel angiotensin-related protein associated with adipose differentiation." MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 20, no. 14, July 2000 (2000-07), pages 5343-5349, XP002163933 ISSN: 0270-7306 the whole document ----- | 1-14 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. l. Application No
PCT/IL 00/00621

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 9740380 A | 30-10-1997 | CA 2252443 A | 30-10-1997 |
| | | EP 0914611 A | 12-05-1999 |
| | | JP 2000511406 T | 05-09-2000 |
| | | US 6007998 A | 28-12-1999 |

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テ-マコ-ト(参考) |
|---------------------------|--|--------------------------------|--------------|
| // G 0 1 N 33/15 33/50 | | G 0 1 N 33/50 C 1 2 N 15/00 | Z Z N A A |
| (81)指定国 | E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B Z , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W | | |
| Fターム(参考) | 2G045 CB01 DA13 DA77 FB01 FB02 FB03 4B024 AA11 CA12 DA02 EA04 FA02 FA10 GA11 4B063 QA01 QQ08 QQ13 QQ43 QQ79 QR33 QR62 QR77 QR80 QS05 QS24 QS25 QS38 QX02 | | |

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 瘦素测定 | | |
| 公开(公告)号 | JP2003511057A | 公开(公告)日 | 2003-03-25 |
| 申请号 | JP2001529450 | 申请日 | 2000-10-05 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 耶达研究及发展有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 耶达研究及发展有限公司 | | |
| [标]发明人 | ルビンスティンメナケム コーヘンバトヤ | | |
| 发明人 | ルビンスティン、メナケム コーヘン、バトヤ | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 C12N15/09 C12Q C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/577 G01N33/68 G01N33/74 | | |
| CPC分类号 | C12Q1/6883 C12Q2600/136 C12Q2600/158 G01N33/6893 G01N33/74 | | |
| FI分类号 | C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/53.S G01N33/577.B G01N33/15.Z G01N33/50.Z C12N15/00.ZNA.A | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA77 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA11 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA10 4B024/GA11 4B063/QA01 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ43 4B063/QQ79 4B063/QR33 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS05 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063/QS38 4B063/QX02 | | |
| 优先权 | 132313 1999-10-10 IL | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明提供了一种检测样品中瘦素的存在的方法。

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | Int. Appl. No. PCT/IL 00/0621 |
|---|---|--|
| IPC CLASSIFICATION SUBJECT MATTER G01N33/68 G01N33/74 C12Q1/68 C12N15/05 | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| CLASSIFICATION OF THE SUBJECT MATTER IPC Class. G01N C12N C12Q | | |
| Classification searched other than previous classification to confirm that such documents are relevant to the search | | |
| Classification data base consulted during the international search process or data base used, where practical, search system used EPO-Internal, WPI Data, PAJ, SIGSIS | | |
| DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category | Relevance to the art | Relevance to the search |
| X | SHYU KOU-GEI ET AL.: "Direct intramuscular injection of plasmid DNA encoding angiotensin-1 but not angiotensin-2 augments revascularization in the rabbit ischemic hindlimb." CIRCULATION, 1998, vol. 98, no. 10, pages 2081-2087, XP00990740 ISSN: 0009-7322 page 2081, column 2, paragraph 2 -page 2082, column 1, paragraph 1 | 13 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of table C1. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members and links to articles. | | |
| * General categories of cited documents: *X* required category for general class of the art which is not relevant to the particular subject *Y* required category for publication or after the international filing date of the application *Z* document which is not relevant to the art but which is cited for other reasons *W* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons *R* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons *S* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons *T* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons *U* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons *V* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons *W* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons *X* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons *Y* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons *Z* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons *W* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons *V* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons *U* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons *T* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons *S* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons *R* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons *Q* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons *P* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons *O* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons *N* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons *M* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons *L* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons *K* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons *J* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons *I* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons *H* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons *G* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons *F* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons *E* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons *D* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons *C* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons *B* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons *A* document which is relevant to the art but which is not cited for other reasons | | |
| Date of the latest correction of the international search | 28 March 2001 | Date of mailing of the international search report |
| Name and mailing address of the ISA | International Searching Authority, P.O. Box 10, Jerusalem 6100, Israel Tel. (+972) 524-5500, Telex 31 051 esp il, Fax (+972) 524-5510 | Authorised officer Pellegriani, P |