

(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2012-506406

(P2012-506406A)

(43) 公表日 平成24年3月15日 (2012.3.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04	4 C 0 8 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁)		

(21) 出願番号 特願2011-532646 (P2011-532646)
 (86) (22) 出願日 平成21年10月23日 (2009.10.23)
 (85) 翻訳文提出日 平成23年6月20日 (2011.6.20)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2009/063985
 (87) 国際公開番号 W02010/046474
 (87) 国際公開日 平成22年4月29日 (2010.4.29)
 (31) 優先権主張番号 08380303.1
 (32) 優先日 平成20年10月24日 (2008.10.24)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 511102321
 プロジェック、サイエンス、トゥー、テク
 ノロジー、ソシエダッド、リミターダ
 PROJECH SCIENCE TO
 TECHNOLOGY, S. L.
 スペイン国マドリッド、トレス、カントス
 、パルケ、シエンティフィコ、デ、マドリ
 ッド、ペテエメ、サンティアゴ、グリソリ
 ア、2
 (74) 代理人 100117787
 弁理士 勝沼 宏仁
 (74) 代理人 100091487
 弁理士 中村 行孝
 (74) 代理人 100107342
 弁理士 横田 修孝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 走化性因子阻害剤

(57) 【要約】

本発明らは、驚くべきことに、o b / o b マウスが、骨格筋、心臓、脂肪組織および肺を含む、いくつかの器官の常在間葉系幹細胞プールの劇的な減少を示すことを発見した。さらに、本明細書で示された結果は、この減少が前記M S C細胞の脂肪組織への遊走によるものであることを示している。また、前記遊走プロセスは脂肪組織内での高レベルの炎症性サイトカインの生産によって大部分は説明されるという証拠も提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

肥満症の処置のための医薬としての使用のための走化性因子阻害剤。

【請求項 2】

前記阻害剤が幹細胞の脂肪組織への遊走を阻害する、請求項 1 に記載の走化性因子阻害剤。

【請求項 3】

前記幹細胞が内因性幹細胞または移植された幹細胞である、請求項 2 に記載の走化性因子阻害剤。

【請求項 4】

前記幹細胞が間葉系幹細胞である、請求項 2 または 3 に記載の走化性因子阻害剤。

【請求項 5】

前記走化性因子阻害剤がサイトカイン阻害剤である、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の走化性因子阻害剤。

【請求項 6】

前記サイトカインが炎症性サイトカインである、請求項 5 に記載の走化性因子阻害剤。

【請求項 7】

前記炎症性サイトカインが、IL-1、TNF-α、IL-6、IFN-α、IFN-γ、IL-11、TGF-β、LIF、IL-8、PF-4、MIP-1a/b、MCP-1、MCP-2、MCP-3、Rantes、IL-12、およびリンホタクチンからなる群から選択される、請求項 6 に記載の走化性因子阻害剤。

【請求項 8】

前記サイトカインが TNF-α である、請求項 7 に記載の走化性因子阻害剤。

【請求項 9】

前記サイトカインが MCP-1 である、請求項 7 に記載の走化性因子阻害剤。

【請求項 10】

前記阻害剤が、抗体、アンタゴニスト、可溶性結合タンパク質、可溶性受容体変異体、非機能的誘導体、アンチセンスポリヌクレオチド、RNA 干渉オリゴヌクレオチド、DNA ザイム、リボザイム、三重鎖形成オリゴヌクレオチド (TFO)、および化学的または生物学的化合物からなる群から選択される化合物である、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の走化性因子阻害剤。

【請求項 11】

組織変性状態の処置のための医薬としての使用のための走化性因子阻害剤であって、前記走化性因子阻害剤が幹細胞の脂肪組織への遊走を阻害する、走化性因子阻害剤。

【請求項 12】

前記組織変性状態が肥満症依存性組織変性である、請求項 11 に記載の走化性因子阻害剤。

【請求項 13】

前記組織変性状態が骨格筋変性、心臓組織変性、骨組織変性、神経組織変性、肺変性、肝臓変性、腎臓変性または同時の 2 つ以上の前記組織変性状態である、請求項 11 または 12 に記載の走化性因子阻害剤。

【請求項 14】

前記幹細胞が内因性幹細胞または移植された幹細胞である、請求項 11 ～ 13 のいずれか一項に記載の走化性因子阻害剤。

【請求項 15】

前記幹細胞が間葉系幹細胞である、請求項 11 ～ 14 のいずれか一項に記載の走化性因子阻害剤。

【請求項 16】

前記走化性因子阻害剤がサイトカイン阻害剤である、請求項 11 ～ 15 のいずれか一項に記載の走化性因子阻害剤。

10

20

30

40

50

【請求項 17】

前記サイトカインが炎症性サイトカインである、請求項 16 に記載の走化性因子阻害剤。

【請求項 18】

前記炎症性サイトカインが、IL-1、TNF-α、IL-6、IFN-α、IFN-γ、IL-11、TGF-β、LIF、IL-8、PF-4、MIP-1a/b、MCP-1、MCP-2、MCP-3、Rantes、IL-12、およびリンホタクチンからなる群から選択される、請求項 17 に記載の走化性因子阻害剤。

【請求項 19】

前記サイトカインが TNF-α である、請求項 18 に記載の走化性因子阻害剤。

10

【請求項 20】

前記サイトカインが MCP-1 である、請求項 18 に記載の走化性因子阻害剤。

【請求項 21】

前記阻害剤が、抗体、アンタゴニスト、可溶性結合タンパク質、可溶性受容体変異体、非機能的誘導体、アンチセンスポリヌクレオチド、RNA 干渉オリゴヌクレオチド、DNA ザイム、リボザイム、三重鎖形成オリゴヌクレオチド (TFO)、および化学的または生物学的化合物からなる群から選択される化合物である、請求項 11～20 のいずれか一項に記載の走化性因子阻害剤。

【請求項 22】

肥満症の処置のためおよび／または組織変性状態の処置のための化合物の同定のためのイン・ビトロの方法であって、

20

i) 幹細胞の集団を、それらを走化性因子に向かって遊走させる条件で培養すること；

ii) 工程 i) による細胞集団を試験化合物と接触させること；および

iii) 前記細胞集団の遊走能力を評価すること；

を含んでなる方法

{ここで、前記化合物が前記幹細胞の遊走を阻害する能力のある場合には、前記試験化合物が肥満症および／または組織変性状態の処置のための医薬として使用されうること示す}。

【請求項 23】

前記走化性因子がサイトカインである、請求項 22 に記載の方法。

30

【請求項 24】

前記サイトカインが炎症性サイトカインである、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記炎症性サイトカインが、IL-1、TNF-α、IL-6、IFN-α、IFN-γ、IL-11、TGF-β、LIF、IL-8、PF-4、MIP-1a/b、MCP-1、MCP-2、MCP-3、Rantes、IL-12、およびリンホタクチンからなる群から選択される、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記幹細胞が間葉系幹細胞である、請求項 22～25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

前記組織変性状態が肥満症依存性組織変性である、請求項 22～26 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 28】

肥満症の処置のためおよび／または組織変性状態の処置のための化合物のイン・ビボでの同定のための方法であって、

i) 試験化合物を非ヒト動物に投与すること（ここで、前記動物は対照動物と比べて幹細胞の脂肪組織への遊走を増大させていることを特徴とする）；および

ii) 前記動物における前記細胞集団の分布を評価すること；

を含んでなる方法。

{ここで、前記化合物が前記幹細胞の脂肪組織への遊走を阻害する能力のある場合には、

50

前記試験化合物が肥満症および／または組織変性状態の処置のための医薬として使用されうることを示す}。

【請求項 29】

前記非ヒト動物が遺伝子改変動物である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記幹細胞が間葉系幹細胞である、請求項 28 または 29 に記載の方法。

【請求項 31】

組織変性状態の処置のための化合物の同定のための非ヒト動物の使用であって、前記動物が対照動物と比べて幹細胞の脂肪組織への遊走を増大させていることを特徴とする、使用。

【請求項 32】

前記非ヒト動物が遺伝子改変動物である、請求項 31 に記載の使用。

【請求項 33】

前記幹細胞が間葉系幹細胞である、請求項 31 または 32 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【発明の分野】

【0001】

本発明の技術分野は、肥満症および／または肥満症関連疾患の処置におけるならびに組織変性状態の処置のための、走化性因子阻害剤の治療的使用に関する。

【発明の背景】

【0002】

肥満症は、アテローム性動脈硬化症、高血圧症、2 型糖尿病（インスリン非依存性糖尿病（NIDDM））、脂質異常症、冠動脈性心疾患、および変形性関節症ならびに様々な悪性疾患などの非常によくある多くの疾患の発症の周知の危険因子である。また、肥満症は、運動性が低下し生活の質が低下することにより相当な問題も引き起こす。

【0003】

肥満症とは、脂肪組織の過剰を意味する。これに関連して、肥満症は、健康上の危険性を与える任意の程度の過剰の脂肪過多と考えることが最もよい。正常個体と肥満個体との区別は単に概算によるが、肥満症によって受ける健康上の危険性は恐らく脂肪蓄積の増加と一体である。

【0004】

軽度の肥満症でも早死、糖尿病、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、胆嚢疾患および特定種の癌の危険性を高める。西欧の工業先進国では肥満症の罹患率は過去数十年間に大幅に高まった。肥満症の罹患率の高さとその健康上の影響から、その処置は高い優先度の公衆衛生であるべきである。

【0005】

現在の肥満症処置としては食事療法が挙げられる。しかしながら、いくつかの食事療法が減量の効果的な方法としてかなり普及しているが、厳格に実施された大規模臨床試験において非常に優れていると証明されたものはない。現在のガイドラインでは、食事および行動の修正に十分に応じられなかった対象、とりわけ、肥満症に関連した他の健康状態を伴う人に対しては薬物処置が推奨されている。肥満症の処置に利用可能な薬物療法は限られている。副作用に対する懸念が、食欲抑制薬、特に、フェンフルラミンに対する熱狂を減少させ、フェンフルラミンは重大な危険性を伴い市場から回収された。いずれを服用した個体も医師の検査を受ける必要がある。フェンテルミンは依然として入手可能であるが、短期使用にのみ認可されている。シブトラミン（セロトニン作動性およびノルアドレナリン機構を介して作用する）は長期使用に認可されているが、血圧の上昇を引き起こす可能性があり、注意して、かつ、定期的に医学的なモニタリングを行いながら使用すべきである。オルリスタットは、食事脂肪の吸収を遮断する薬物であり、同様に長期使用に認可されている。しかしながら、オルリスタットは、不快な副作用（脂肪便）を引き起こし、食事に脂溶性ビタミンを補給する必要もある。

10

20

30

40

50

【0006】

外科手術（例えば、胃バイパス術など）は肥満症の処置のための最後の手段であるが、それは、かかる手術が、とりわけ、術後期に大きな危険性を伴う可能性があるためである。コンセンサス勧告は、外科的療法を病的肥満症の患者（BMI > 40）に限定している。

【0007】

よって、重篤で（致命的でもあり）よくある疾患における危険因子としての肥満症の重要な影響から、肥満症および肥満症関連障害の処置において有用な医薬化合物が依然として必要である。

【0008】

最近の進歩は、多くの生理学的プロセスおよび病理学的プロセス、例えば、肥満症、糖尿病、心血管疾患および筋障害などにおける脂肪細胞に関係している。エネルギー代謝における脂肪細胞の積極的な役割は、レプチンの発見および肥満症の病因におけるその役割により証明された。重要性が増している1つの因子は、過剰栄養供給または食物（とりわけ、脂肪分の高いまたは脂肪もしくは脂肪代謝産物前駆体を含む食物）の摂取、および／あるいは体脂肪組成の大きな増加に応答したさらなる脂肪細胞の生成である。新たな脂肪細胞の生成は、前駆脂肪細胞の増殖および脂質生成を調節するいくつかの脂肪細胞特異的転写因子により制御される。一般に、これらの脂肪細胞特異的因子は、脂質生成誘導後に発現される。

【0009】

脂肪組織において、脂肪細胞は細胞総数の3分の2である。残る細胞には血液および内皮細胞とともに脂肪細胞前駆体（脂肪間葉系幹細胞）が含まれる。脂質生成は、間葉系幹細胞（MSC）がクローン増殖により増殖することができ、ある時点で、これらの細胞の一部が前駆脂肪細胞または脂質（すなわち、脂肪）で満たされその後脂肪細胞となることが約束された細胞へと分化することができるプロセスである。脂肪細胞は、さらなる脂質の蓄積により大きくなることができる。その細胞の体積は、主に脂質蓄積のため1000倍ほど増大することができる。

【0010】

大部分の成体組織は、細胞総数の少ない割合に相当し、間葉系統内のいくつかの細胞種へと分化する能力を有する幹細胞亜集団（間葉系幹細胞）を収容している。近年に至って、間葉系前駆体（MP）またはMSCには、組織修復および再生における役割が次第に与えられてきた。それらの多能性および自己再生能力から、幹細胞には、1型糖尿病、パーキンソン病、心臓発作、および脊髄損傷などの状態により損傷を受けた組織を再生する大きな可能性がある。種々の組織損傷モデルにおいて、MSCは、少なくとも、2つの証明された機構を通じて損傷した組織の回復を向上させる：抗炎症活性を有する可溶性因子を放出することによる機構および局所再生プロセスを促進し強化することによる機構。

【0011】

炎症誘発性サイトカインは、ある特定の細胞種において細胞接着分子若しくは他のサイトカインの合成を誘導するそれらの能力により、または直接的に炎症を加速し炎症反応を調節するサイトカインである。早期応答に関与する主な炎症誘発性サイトカインはIL1ーアルファ、IL1ーベータ、IL6、およびTNFーアルファである。

【0012】

TNFアルファは、主としてマクロファージにより産生されるが、リンパ系細胞、肥満細胞、内皮細胞、心筋細胞、脂肪細胞、繊維芽細胞および神経組織を含む、広く様々な種類の他の細胞種によっても産生される。それは、一般的には、ILー1およびインターロイキンー6（ILー6）とともに、様々な器官系に対して複数の作用を及ぼす。また、それは、インスリンのシグナル伝達を害するインスリン受容体基質ー1（IRSーI）のセリンリン酸化を促進することによりインスリン抵抗性も誘導する。それは、好中球の有力な走化性因子であり、遊走のために好中球が内皮細胞にくっつく手助けをする。腫瘍壊死因子は炎症応答を促進し、そしてそれが次には自己免疫障害に関連する臨床的問題の多く

10

20

30

40

50

の原因となる。これらの障害は、TNF阻害剤を使用することにより処置されることもある。

【0013】

TNF α mRNAの発現は、いくつかの肥満症および糖尿病の齧歯類モデル由来および肥満ヒト由来の脂肪組織において上方制御されることが報告されている(Hube et al (1999) Eur J Clin Invest, Aug; 29(8): 672-8; Hotamisligil GS, et al J (1995) May; 95(5):2409-15)。最後の場合では、肥満の対象における体重減少は、脂肪組織におけるTNF α -mRNA発現の低下とも関連していた。サイトカインにおけるこの過剰発現は、脂肪分解を刺激し脂肪組織の肥大を止めることにより作用すると考えられている。

10

【0014】

ob遺伝子の産物は、脂肪組織において合成され血流中に分泌される16 kDaのタンパク質であるレプチンである。その分子は脳に移動し、そこで脂肪制御シグナル(adipostat signal)として作用することができる、すなわち、脳に脂肪組織量を知らせ食欲減退を起こす。TNF α 投与により循環レプチン濃度の増加が起るため、TNF α は体重管理に關与する脂肪制御分子(adipostatic molecule)である。

【発明の概要】

【0015】

本発明の著者らは、驚くべきことに、ob/obマウス（レプチン欠損ホモ接合体マウス）が、骨格筋、心臓、脂肪組織および肺を含む、いくつかの器官の常在MSCプールの劇的な減少を示すことを発見した。さらに、本明細書で示された結果は、この減少が常在器官由来の前記MSC細胞の脂肪組織への遊走によるものであることを示している。脂肪組織内に入ると、遊走性MSCは脂肪分化を受け、脂肪の腹部腫瘤内に最終分化した新たな脂肪細胞を生み出す。また、前記遊走プロセスは脂肪組織内での高レベルの炎症性サイトカインの生産によって大部分は説明されるという証拠も提供される。

20

【0016】

よって、第1の態様において、本発明は、肥満症の処置のための医薬としての使用のための走化性因子阻害剤に関する。

【0017】

第2の態様において、本発明は、組織変性状態の処置のための医薬としての使用のための走化性因子阻害剤であって、前記阻害剤が幹細胞の脂肪組織への遊走を阻害する、走化性因子阻害剤に関する。

30

【0018】

第3の態様において、本発明は、肥満症の処置のためおよび／または組織変性状態の処置のための化合物の同定のためのイン・ビトロの方法であって、

- i) 幹細胞の集団を、それらを走化性因子に向かって遊走させる条件で培養すること；
- ii) 工程a)による細胞集団を試験化合物と接触させること；および
- iii) 前記細胞集団の遊走能力を評価すること；

を含んでなる方法

{ここで、前記化合物が前記幹細胞の遊走を阻害する能力のある場合には、前記試験化合物が肥満症の処置のためおよび／または組織変性状態の処置のための医薬として使用されうことを示す}

40

に関する。

【0019】

さらなる態様において、本発明は、肥満症の処置のためおよび／または組織変性状態の処置のための化合物のイン・ビボでの同定のための方法であって、

- i) 試験化合物を非ヒト動物に投与すること（ここで、前記動物は対照動物と比べて幹細胞の脂肪組織への遊走を増大させていることを特徴とする）；および
- ii) 前記動物における前記細胞集団の分布を評価すること；

を含んでなる方法

50

{ここで、前記化合物が前記幹細胞の脂肪組織への遊走を阻害する能力のある場合には、前記試験化合物が肥満症の処置のためおよび／または組織変性状態の処置のための医薬として使用されうることを示す}

に関する。

【0020】

もう1つの態様において、本発明は、組織変性状態の治療のための化合物の同定のための非ヒト動物の使用であって、前記動物が対照動物と比べて幹細胞の脂肪組織への遊走を増大させていることを特徴とする、使用に関する。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】図1は、間葉系前駆体(MP)の脂肪組織内への遊走および生着。A. 雌C57マウスまたは雌ob／obマウスへの静脈内(i. v.)または筋肉内(i. m.)への雄MPの注射の6時間後または2ヶ月後のイプシロン染色体RT-PCRについての結果を示す。ob／obマウスにおけるMPの脂肪組織への動員に注目(赤色の矢印を参照)。

【図2】図2は、間葉系前駆体の遊走特性の解析を示す。A. 様々な条件の存在下または非存在下における6時間後のMPのイン・ビトロでの遊出：模擬、SN(600μlの脂肪細胞の上清)、組換えネズミTNFα(50ng/mlの抗TNF(10μg/mlの抗体の存在下での600μlの脂肪細胞の上清)、およびMCP1(20ng/ml)を示す。B. 抗TNF-α処置を行った場合のC57またはob／ob静脈内注射の6時間後のMP集団の異なる組織内へのイン・ビボでの遊走。Ob／obマウスの脂肪組織中でのMPの減少に注目(赤色の矢印)。

【発明の具体的説明】

【0022】

上述のとおり、本発明は、肥満のレプチン欠損ホモ接合体マウスがいくつかの器官の常在間葉系幹細胞(MSC)プールの劇的な減少を示すことおよびこの減少が常在器官由来の前記MSC細胞の脂肪組織への遊走によるものであることを示している。加えて、本発明は、炎症性サイトカイン、例えば、TNFαなどの阻害によって、前記遊走プロセスが減少することを示している。

【0023】

本明細書および添付の特許請求の範囲において用いられるように、「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」という単数形は、特に明示されない限り、複数のものを含む。

【0024】

特に定義されない限り、本明細書において用いられる総ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野における通常の技術を有する者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。

【0025】

よって、第1の態様において、本発明は、肥満症の処置のための医薬としての使用のための走化性因子阻害剤であって、前記阻害剤が幹細胞の脂肪組織への遊走を阻害する、走化性因子阻害剤に関する。

【0026】

本明細書において用いられる「走化性因子」とは、運動性細胞において走化性誘導因子効果を有する任意の無機物質または有機物質を意味する。本明細書において用いられる「走化性」とは、細胞がそれらの環境においてある特定の化学薬品および非化学物質によりそれらの運動に影響を与える現象を意味する。本発明によれば、「運動性細胞」とは、走化性因子に向かって遊走する能力のある細胞を意味し；特に、前記細胞は幹細胞である。本発明の特定の実施形態において、前記幹細胞は間葉系幹細胞である。

【0027】

本発明のもう1つの特定の実施形態において、前記幹細胞は内因性幹細胞または移植さ

10

20

30

40

50

れた幹細胞である。本明細書において用いられる「内因性幹細胞」とは、大部分の成体組織が収容している幹細胞の自己プールを意味する。従って、本明細書において用いられる「移植された幹細胞」とは、外部から供給された幹細胞、すなわち、外部供給源からの細胞を意味する。本発明の特定の実施形態では、前記細胞は自己幹細胞である。もう1つの実施形態では、前記細胞は同種異系幹細胞である。移植された細胞は、自己細胞、すなわち、ある個体から採取され同じ個体に戻された幹細胞であることが好ましい。

【0028】

本明細書において用いられる「阻害剤」または「阻害すること」、「中和する」または「中和すること」、「下方制御すること」およびそれらの同種の用語は、走化性因子の活性が走化性因子阻害剤により、同じ阻害剤の非存在下での前記走化性因子の活性または発現と比べて低下することを意味する。活性または発現の低下は、好ましくは、下に説明される基準値に対して少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、またはそれ以上である。

10

【0029】

本発明の特定の実施形態において、前記阻害剤は、走化性因子の活性または発現を阻害する化合物または薬剤である。走化性因子の活性または発現を下方制御する能力のある薬剤とは、走化性因子の活性または発現を阻害する能力のある、化学薬品、核酸またはタンパク質性分子などの分子またはその組合せを意味する。

【0030】

タンパク質またはそれをコードするmRNA転写物の活性または発現を下方制御する能力のある薬剤は、当技術分野で周知である。本発明の特定の実施形態において、本発明による前記阻害剤は、抗体、アンタゴニスト、可溶性結合タンパク質、可溶性受容体変異体、非機能的誘導体、アンチセンスポリヌクレオチド、RNA干渉オリゴヌクレオチド、DNAザイム、リボザイム、三重鎖形成オリゴヌクレオチド(TFO)、および化学的または生物学的化合物からなる群から選択される化合物である。

20

【0031】

特定の場合において、前記阻害剤は抗体である。好ましくは、その抗体はタンパク質の少なくとも1つのエピトープと特異的に結合する。本明細書において用いられるように、「エピトープ」とは、抗体のパラトープが結合する抗原における任意の抗原決定基を意味する。エピトープの決定基は通常アミノ酸または炭水化物側鎖などの分子の化学的に活性な表面基からなり、通常、特定の三次元構造特性、および特定の電荷特性を有する。本発明において用いられる「抗体」としては、例えば、マクロファージによって提示された抗原と結合する能力のあるFab、F(ab')₂、およびFvなどの完全な分子ならびにその機能的フラグメントが挙げられる。これらの機能的抗体フラグメントは、以下のように定義される：(1) Fab、抗体分子の一価の抗原結合フラグメントを含むフラグメントであり、酵素パパインで抗体全体を消化して完全な軽鎖と一本の重鎖の一部を生成することにより作製することができるフラグメント；(2) Fab'、ペプシンで全抗体を処理し続いて還元を行って完全な軽鎖と重鎖の一部を生成することにより得ることができる抗体分子のフラグメント；1抗体分子当たり2つのFab'フラグメントが得られる；(3) (F(ab')₂)、酵素ペプシンで抗体全体を処理することによりその後還元を行わずに得ることができる抗体のフラグメント；F(ab')₂は2つのジスルフィド結合により結合している2つのFab'フラグメントの二量体である；(4) Fv、二本の鎖として表される軽鎖の可変領域と重鎖の可変領域を含有する遺伝子操作されたフラグメントとして定義される；および(5) 一本鎖抗体(「SCA」)、遺伝子融合された一本鎖分子として好適なペプチドリinkerによって連結された、軽鎖の可変領域と重鎖の可変領域を含有する遺伝子操作された分子。

30

40

【0032】

ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体ならびにそのフラグメントの作製方法は、当技術分野で周知である(例えば、Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988を参照)。本発明による抗体フラ

50

グメントは、前記抗体のタンパク質分解による加水分解によるかまたは前記フラグメントをコードするDNAを大腸菌または哺乳類細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞培養物または他のタンパク質発現系）において発現させることにより調製することができる。抗体フラグメントは、従来法による抗体全体のペプシン消化またはパパイン消化により得ることができる。例えば、抗体フラグメントは、 $F(a b')$ 2と表される5Sフラグメントを提供するように、ペプシンによる抗体の酵素的切断により作製することができる。このフラグメントは、チオール還元剤を使用し、所望により、ジスルフィド結合の切断の結果として生じるスルフィドリル基の保護基を使用してさらに切断して、3. 5S

$F a b < 1 >$ 一価フラグメントを作製することができる。あるいは、ペプシンを用いた酵素的切断により2つの一価の $F a b < 1 >$ フラグメントおよびFcフラグメントを直接作製してもよい。これらの方法は、例えば、Goldenberg、米国特許第4, 036, 945号公報および同第4, 331, 647号公報ならびにそこに含まれる参照文献により記載されている。Porter, R. R. [Biochem. J. 73: 119-126 (1959)]も参照。抗体の他の切断方法、例えば、一価の軽-重鎖フラグメントを形成するための重鎖の分離、フラグメントのさらなる切断、または他の酵素的、化学的、もしくは遺伝的技術なども、それらのフラグメントが、完全な抗体により認識される抗原と結合する限りにおいて使用してよい。

【0033】

Fvフラグメントは、VH鎖およびVL鎖の結合を含んでなる。この結合は非共有結合によるものであってよい。あるいは、それらの可変鎖は、分子間ジスルフィド結合によって連結されうるしまたはグルタルアルデヒドなどの化学薬品によっても架橋されうる。好ましくは、Fvフラグメントは、ペプチドリinkerによって連結されたVH鎖およびVL鎖を含んでなる。これらの単鎖抗原結合タンパク質(sFv)は、オリゴヌクレオチドによって連結されたVHドメインおよびVLドメインをコードするDNA配列を含んでなる構造遺伝子を構築することによって調製される。構造遺伝子は発現ベクター中に挿入され、続いて、このベクターは、大腸菌などの宿主細胞中に導入される。組換え宿主細胞は、2つのVドメインを架橋するリンカーペプチドを有する単一ペプチド鎖を合成する。sFvを作製するための方法は、例えば、[Whitlow and Filpula [(1991), Methods 2: 97-105]; Pack et al, [(1993), BioTechnology 11 :1271-77];および米国特許第4, 946, 778号公報によって記載されている。

【0034】

抗体フラグメントのもう1つの形態は、単一の相補性決定領域(CDR)をコードするペプチドである。CDRペプチド(「最小認識単位」)は、対象となる抗体のCDRをコードする遺伝子を構築することにより得ることができる。かかる遺伝子は、例えば、抗体産生細胞のRNAから可変領域を合成するためにポリメラーゼ連鎖反応を用いることにより調製される。例えば、Larrick and Fry [(1991) Human Antibodies and Hybridomas, 2:172-189および米国特許第6, 580, 016号公報]を参照。非ヒト(例えば、ネズミ)抗体のヒト化型は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含む免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそのフラグメント(例えば、Fv、Fab、Fab<1>、 $F(a b')$ 、sub. 2または抗体の他の抗原結合部分配列など)のキメラ分子である。ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)を含み、ここで、レシピエントの相補性決定領域(CDR)由来の残基が、所望の特異性、親和性および能力を有するマウス、ラットまたはウサギなどの非ヒト種(ドナー抗体)のCDR由来の残基によって置換されている。いくつかの例において、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体においても移入されるCDRまたはフレームワーク配列においても見られない残基も含んでなってもよい。一般的に、ヒト化抗体は、少なくとも1つの、典型的には2つの、可変ドメインの実質的に総てを含んでなり、ここで、CDR領域の総てまたは実質的に総ては非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FR領域の総てまたは実質的に総てはヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンの少なくとも一部を含んでなることも最

10

20

30

40

50

適であろう[Riechmann et al, Nature, 332:323-329 (1988);およびPresta, Curr. Op. Struct. Biol, 2:593-596 (1992)]。

【0035】

非ヒト抗体をヒト化するための方法は当技術分野で周知である。一般的に、ヒト化抗体は、ヒトではない供給源からその抗体へ導入された1つ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は多くの場合移入残基と呼ばれ、これは典型的には移入可変ドメインから得られる。ヒト化は、当技術の現状において周知の方法に従い、齧歯類CDRまたはCDR配列とヒト抗体の対応配列とを置換することによって本質的に行うことができる。従って、かかるヒト化抗体はキメラ抗体であり、ここで、実質的に完全ではないヒト可変ドメインは、非ヒト種由来の対応配列によって置換されている。実際には、ヒト化抗体は、典型的には、いくつかのCDR残基、さらに場合によってはいくつかのFR残基が、齧歯類抗体における類似部位からの残基によって置換されているヒト抗体である。ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーを含む、当技術分野で公知の様々な技術を用いて作製することができる。同様に、ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座をトランスジェニック動物、例えば、内在性免疫グロブリン遺伝子が部分的にまたは完全に不活性化されているマウス内へ導入することによって作ることができる。抗原投与により、ヒト抗体産生が観察され、このヒト抗体は、遺伝子再構成、集合、および抗体レパートリーを含む、総ての点でヒトにおいて見られるものとよく似ている。

【0036】

あるいは、走化性因子の活性を下方制御する能力のある別のタンパク性薬剤はその非機能的誘導体（すなわち、ドミナントネガティブ）であってよい。これらの非機能的誘導体によく似たペプチドおよび他のものは当技術分野で周知でありJohn Morrow Stewart and Janis Dillaha Young, [Solid Phase Peptide Syntheses (2nd Ed., Pierce Chemical Company, 1984)]によりさらに記載されている固相ペプチド合成手法を用いて合成することができる。合成ペプチドは分取高速液体クロマトグラフィーにより精製することができ、その組成はアミノ酸配列決定により確認することができる。

【0037】

また、本発明のこの態様の薬剤は、走化性因子の遺伝子の発現を下方制御する能力のある薬剤であってよい。この意味において、所与の遺伝子の発現を修飾するために、複数の技術が利用可能である。遺伝子発現は、DNAコードのmRNAへの転写、mRNAのリボソームへの移動、およびRNAメッセージのタンパク質への翻訳を含むプロセスである。加えて、遺伝子発現レベルや遺伝子活性浸透度の大きな変動に寄与する他の因子も存在する：1）mRNA分子はほぼ安定でありうるためmRNAレベルの変化に寄与する。2）選択的スプライシングを受けうる成熟mRNA分子の前駆体が存在し、mRNA発現調節機構を複雑にする。3）mRNAは、例えば、RNAアーゼの存在または他のより複雑なシステムのような内因性細胞機構により分解されうる。4）タンパク質への翻訳もまた異なるレベル（すなわち、翻訳の開始など）で調節されうる。最後に、5）タンパク質は翻訳後修飾されうるためそれらの活性、それらの分子の安定性などが変化する。

【0038】

遺伝子を抑制する現在の方法としては、例えば、アンチセンスの使用、共抑制、およびRNA干渉が挙げられる。よって、走化性因子の下方制御は、前記走化性因子をコードするmRNA転写物と特異的にハイブリダイズする能力のあるアンチセンスポリヌクレオチドを使用することによって達成することができる。前記遺伝子を効率的に下方制御するために使用することができるアンチセンス分子の設計は、アンチセンスアプローチにとって重要な2つの側面を考慮しながら行う必要がある。第1の側面は、オリゴヌクレオチドの適当な細胞の細胞質内への送達であるが、第2の側面は、細胞内で指定のmRNAと特異的に結合してその翻訳を阻害するオリゴヌクレオチドの設計である。先行技術により、オリゴヌクレオチドを様々な種類の細胞種内に効率的に送達するために使用することができる複数の送達戦略が教示されている[例えば、Luft J Mol Med 76: 75-6 (1998); Kronenwett et al, Blood 91 : 852-62 (1998); Rajur et al, Bioconjug Chem 8: 935-40 (199

7); Lavigne et al, Biochem Biophys Res Commun 237: 566-71 (1997)およびAoki et al, (1997) Biochem Biophys Res Commun 231 : 540-5 (1997)を参照]。

【0039】

加えて、標的mRNAおよびオリゴヌクレオチドの両方における構造変化のエネルギー論を明らかにする熱力学的サイクルに基づき、標的mRNAに対して最大の予測結合親和性を有する配列を同定するためのアルゴリズムも利用可能である[例えば、Walton et al, Biotechnol Bioeng 65: 1-9 (1999)を参照]。かかるアルゴリズムは、細胞におけるアンチセンスアプローチを実行するために使用するのに成功している。例えば、Walton et alによって開発されたアルゴリズムにより、科学者はウサギベータグロビン(RBG)およびマウス腫瘍壊死因子-アルファ(TNF α)転写物に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計するのに成功することができた。同じ研究グループは、動的PCR技術によって評価した、細胞培養物における3つのモデル標的mRNA(ヒト乳酸デヒドロゲナーゼAおよびBならびにラットgp130)に対する合理的に選択されたオリゴヌクレオチドのアンチセンス活性が、ホスホジエステルおよびホスホロチオエートオリゴヌクレオチド化学を用いた2つの細胞種における3つの異なる標的に対する試験を含む、ほぼ総ての場合において有効であることが証明されたことを最近になって報告している。加えて、イン・ビトロ系を用いて特異的オリゴヌクレオチドを設計およびその有効性を予測するためのいくつかのアプローチも公開された(Matveeva et al, Nature Biotechnology 16: 1374-1375 (1998))。

【0040】

いくつかの臨床試験によってアンチセンスオリゴヌクレオチドの安全性、実現可能性および活性が立証された。例えば、癌の治療に好適なアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用に成功しており[Homlund et al, Curr Opin Mol Ther 1 :372-85 (1999)]、一方、c-myc遺伝子、p53およびBcl-2を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドを介した血液悪性腫瘍の治療は臨床試験の段階に入っており、患者が耐えられることが明らかになっている[Gerwitz Curr Opin Mol Ther 1 :297-306 (1999)]。最近になって、ヒトヘパルナーゼ遺伝子発現のアンチセンス媒介抑制は、マウスモデルにおいてヒト癌細胞の胸膜播種を抑制することが報告された[Uno et al, Cancer Res 61 :7855-60 (2001)]。

【0041】

よって、現在のコンセンサスは、上記のように、精度の高いアンチセンス設計アルゴリズムおよび様々な種類のオリゴヌクレオチド送達システムをもたらしたアンチセンス技術の分野における最近の発展により、当業者は、過度の試行錯誤実験を用いる必要なく、既知配列の発現を下方制御するために好適なアンチセンスアプローチを設計し実行することができるということである。

【0042】

本明細書において用いられるように、「低分子干渉RNA」とは、走化性因子遺伝子のポリヌクレオチド配列と少なくとも部分的に相補的でありその走化性因子遺伝子ポリヌクレオチド配列と相互作用することができる1以上の短い配列を含むRNA構築物を意味する。

【0043】

相互作用は、低分子干渉RNAの相補(アンチセンス)配列と標的のポリヌクレオチド配列との間の直接結合の形であってよく、または低分子干渉RNAのアンチセンス配列が標的配列を認識することを可能にする酵素機構(例えば、タンパク質複合体)を介する間接的な相互作用の形であってもよい。場合によっては、低分子干渉RNAによる標的配列の認識は、低分子干渉RNAの認識(アンチセンス)配列によって認識される標的部位内またはその近くの走化性因子配列の開裂を引き起こす。低分子干渉RNAは、リボヌクレオチド残基を排他的に含むことができ、または低分子干渉RNAは1つ以上の修飾残基を、特に低分子干渉RNAの末端にもしくは低分子干渉RNAのセンス鎖上に含むことができる。本明細書において用いられる「低分子干渉RNA」とは、shRNAおよびsiRNAを包含し、それらはどちらも特定の特徴および種類の構造を有するRNA構築物を意

味することは当業者には理解され公知である。本明細書において用いられるように、「s hRNA」とは、二本鎖領域および一方の末端にヘアピンループを形成するループ領域を含んでなるRNA配列を意味する。二本鎖領域は、典型的にはステムの各々の側において約19ヌクレオチド長～約29ヌクレオチド長であり、ループ領域は、典型的には約3～約10ヌクレオチド長である（3'末端または5'末端の一本鎖突出ヌクレオチドは任意選択である）。

【0044】

本明細書において用いられるように、「siRNA」とは、各末端に非相同残基の3'突出部を有する二本鎖領域を含んでなるRNA分子を意味する。二本鎖領域は、典型的には約18～約30ヌクレオチド長であり、突出部は、任意の長さの非相同残基、例えば、2ヌクレオチド、3ヌクレオチド、4ヌクレオチド、5ヌクレオチド、6ヌクレオチド、7ヌクレオチド、8ヌクレオチド、9ヌクレオチド、10ヌクレオチド、11ヌクレオチド、12ヌクレオチド、13ヌクレオチド、14ヌクレオチド、15ヌクレオチド、16以上のヌクレオチドのものであってよい。siRNAは、不對領域によって分離された19～30塩基対の2つ以上のセグメントも含んでなることができる。

【0045】

本発明に関する使用に好適なRNA分子の合成は以下のように行うことができる。まず、mRNA配列標的を、AAジヌクレオチド配列についてAUG開始コドンの下流でスキャンする。各AAおよび3'隣接19ヌクレオチドの出現を、可能性のあるsiRNA標的部位として記録する。非翻訳領域(UTR)は調節タンパク質結合部位においてより富んでいるため、オープンリーディングフレームからsiRNA標的部位を選択することが好ましい。UTR結合タンパク質および／または翻訳開始複合体は、siRNAエンドヌクレアーゼ複合体の結合に干渉しうる。しかし、GAPDHについて証明されているように（5'UTRに向けられたsiRNAは、細胞のGAPDH mRNAの約90%の減少を媒介し、タンパク質レベルを大幅に低下させた）(www.ambion.com/techlib/tn/91/912.html)、非翻訳領域に向けられたsiRNAもまた有効でありうることから分かるであろう。

【0046】

次に、任意の配列アラインメントソフトウェア、例えば、NCBIサーバ(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)から利用可能なBLASTソフトウェアなどを使用して、可能性のある標的部位を適当なゲノムデータベース（例えば、ヒト、マウス、ラットなど）と比較する。他のコード配列に対して有意な相同性を示す推定標的部位を除去する。siRNA合成の鋳型として適した標的配列を選択する。好ましい配列は低G/C含量のものであり、これらがG/C含量が55%より高いものと比べて遺伝子サイレンシングの媒介においてより有効であると証明されているためである。評価では標的遺伝子の長さに沿っていくつかの標的部位を選択することが好ましい。選択したsiRNAをより良く評価するために、陰性対照とともに使用することが好ましい。陰性対照siRNAは、siRNAと同じヌクレオチド組成を含むがゲノムと有意な相同性はないことが好ましい。よって、siRNAのスクランブルヌクレオチド配列は、任意の他の遺伝子に対して有意な相同性を示さない限りにおいて、使用されることが好ましい。

【0047】

前記走化性因子を下方制御する能力のある別のオリゴヌクレオチド薬剤は、標的のmRNA転写物またはDNA配列を特異的に切断する能力のあるDNAザイム分子である。DNAザイムは、一本鎖標的配列および二本鎖標的配列の両方を切断する能力のある一本鎖ポリヌクレオチドである。DNAザイムの一般的なモデル（「10-23」モデル）が提案されている。「10-23」DNAザイムは、各々7-9デオキシリボヌクレオチドの2つの基質認識ドメインが側面に配置された、15デオキシリボヌクレオチドの触媒ドメインを有する。このタイプのDNAザイムは、プリン：ピリミジン連結部でその基質RNAを効率的に切断することができる。一本鎖および二本鎖標的切断部位を認識する合成の人工DNAザイムの構築および増幅の例は、米国特許第6,326,174号公報に開示

10

20

30

40

50

されている。

【0048】

前記走化性因子を下方制御する能力のある別の薬剤は、前記走化性因子をコードするmRNA転写物を特異的に切断する能力のあるリボザイム分子である。リボザイムは、対象となるタンパク質をコードするmRNAの切断による遺伝子発現の配列特異的阻害のためにますます使用されるようになっていく。任意の特異的標的RNAを切断するようにリボザイムを設計する可能性からリボザイムは基礎研究および治療用途の両方において有益な手段となった。治療学分野において、リボザイムは、感染性疾患におけるウイルスRNA、癌における優性癌遺伝子および遺伝的障害における特異的体細胞突然変異を標的とするために利用されている。とりわけ、HIV患者についてのいくつかのリボザイム遺伝子療法プロトコルがすでに第1相試験にある。最近になって、リボザイムは、トランスジェニック動物研究、遺伝子標的検証および経路解明のために使用されている。いくつかのリボザイムが臨床試験の様々な段階にある。ANGIOZYMEは、ヒト臨床試験において研究するための最初の化学合成されたリボザイムであった。ANGIOZYMEは、脈管形成経路における重要な成分であるVEGF-r（血管内皮成長因子受容体）の形成を特異的に阻害する。リボザイムファーマシューティカルズ社(Ribozyme Pharmaceuticals, Inc.)および他の企業が動物モデルにおいて抗脈管形成治療学の重要性を証明している。C型肝炎ウイルス(HCV)RNAを選択的に破壊するように設計されたリボザイムであるHEPTAZYMEは、細胞培養アッセイにおいてC型肝炎ウイルスRNAを減少させることに有効であるとわかった(リボザイムファーマシューティカルズ社 -www.rpi.com/index.html)。 10 20

【0049】

細胞における走化性因子遺伝子の発現を調節するさらなる方法は、三重鎖形成オリゴヌクレオチド(TFO)を介する。ここ10年間で、研究により、二本鎖らせんDNAにおけるポリプリン/ポリピリミジン領域を配列特異的に認識しそれと結合することができるTFOを設計することができることが示された。これらの認識規則は、Maher III, L. J., et al, Science (1989) 245:725-730; Moser, H. E., et al, Science (1987)238:645-630; Beal, P. A., et al, Science (1991) 251:1360-1363; Cooney, M., et al, Science(1988)241,456-459)により概説されている。オリゴヌクレオチドの修飾、例えば、インターカレーターの導入および主鎖置換など、ならびに結合条件の最適化(pHおよびカチオン濃度)は、電荷反発および不安定性などのTFO活性固有の障害の克服の助けとなり、また最近では、合成オリゴヌクレオチドを特異的配列に向けることができることが示された。一般的に、三重鎖形成オリゴヌクレオチドは以下の配列の対応を有する：オリゴ3'-A G G T 二重鎖 5'~A G C T 二重鎖 3'~T C G A。しかしながら、A-A TおよびG-G Cトリプレットは最大の三重らせん安定性を有することが示されている。よって、調節領域における任意の所与の配列について、三重鎖形成配列を考案しうる。三重鎖形成オリゴヌクレオチドは、好ましくは、少なくとも15ヌクレオチド長、より好ましくは25ヌクレオチド長、さらに好ましくは30ヌクレオチド長以上、50bpまたは100bpまでである。 30 40

【0050】

TFOでの細胞のトランスフェクション(例えば、カチオン性リボソームを介する)、および標的DNAとの三重鎖らせん構造の形成は、立体的および機能的な変化を誘導し、これにより転写の開始および伸長を妨げ、内因性DNAにおける所望の配列変化の導入を可能にし、また遺伝子発現の特異的な下方制御をもたらす。TFOにより処置した細胞における遺伝子発現のかかる抑制の例としては、哺乳類細胞におけるエピソードsupFG1遺伝子および内因性HPR T遺伝子のノックアウト、ならびに、前立腺癌の病因において重要なEts2転写因子の発現の配列特異的および標的特異的な下方制御、炎症誘発性ICAM-1遺伝子が挙げられる。加えて、Vuyisich and Bealは、最近、配列特異的なTFOがdsRNAと結合することができ、RNA依存性キナーゼなどのdsRNA依存性酵素の活性を阻害することを示した(Vuyisich and Beal, Nuc. Acids Res (2000); 28: 50

2369-74)。

【0051】

加えて、上述の原理に従って設計されたTFOは、DNA修復を行う能力のある定方向突然変異誘発を起こすことができ、そのため内因性遺伝子の発現の下方制御および上方制御の両方を提供する。有効なTFOの設計、合成および投与の詳細な説明は、米国特許出願第2003017068号公報および同第20030096980号公報ならびに米国特許第5,721,138号公報において見ることができる。

【0052】

治療用オリゴヌクレオチドは、生物学的利用性、治療効力を増大させ細胞毒性を低減しうる塩基修飾および／または主鎖修飾をさらに含んでよいことは理解される。かかる修飾は、Younes (2002) [Current Pharmaceutical Design 8:1451-1466]に記載されている。例えば、本発明のオリゴヌクレオチドは、3'－5'＜1＞ホスホジエステル結合により結合した、プリン塩基およびピリミジン塩基からなるヘテロシリックスヌクレオシドを含んでよい。好ましくは、使用するオリゴヌクレオチドは、本明細書において以下に広く記載するように、主鎖、ヌクレオシド間結合または塩基において修飾されたものである。

【0053】

本発明のこの態様により有用な好ましいオリゴヌクレオチドの具体的な例としては、修飾主鎖または非天然ヌクレオシド間結合を含有するオリゴヌクレオチドが挙げられる。好ましい修飾オリゴヌクレオチド主鎖としては、例えば、通常の3'－5'結合を有するホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチルおよび他のアルキルホスホネート（3'－アルキレンホスホネートおよびキラルホスホネートを含む）、ホスフィネート、ホスホルアミデート（3'－アミノホスホルアミデートおよびアミノアルキルホスホルアミデートを含む）、チオホスホルアミデート、チオアルキルホスホネート、チオアルキルホスホトリエステル、およびボラノホスフェート、これらの2'－5'結合類似体、およびヌクレオシド単位の隣接対が3'－5'から5'－3'または2'－5'から5'－2'結合している正反対の極性を有するものが挙げられる。様々な塩、混合塩および遊離酸形態も使用することができる。

【0054】

あるいは、リン原子を内部に含まない修飾オリゴヌクレオチド主鎖は、短鎖アルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、混合ヘテロ原子およびアルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、または1つ以上の短鎖ヘテロ原子もしくは複素環ヌクレオシド間結合によって形成された主鎖を有する。これらには、モルホリノ結合（一部はヌクレオシドの糖部分から形成される）；シロキサン主鎖；スルフィド主鎖、スルホキシド主鎖およびスルホン主鎖；ホルムアセチル主鎖およびチオホルムアセチル主鎖；メチレンホルムアセチル主鎖およびチオホルムアセチル主鎖；アルケン含有主鎖；スルファメート主鎖；メチレンイミノ主鎖およびメチレンヒドラジノ主鎖；スルホネート主鎖およびスルホンアミド主鎖；アミド主鎖；ならびに混合N、O、SおよびCH₂成分部分を有する他の主鎖を有するものが挙げられる。

【0055】

本発明により使用することができる他のオリゴヌクレオチドは、糖およびヌクレオシド間結合の両方が修飾されたもの、すなわち、ヌクレオチド単位の主鎖が新たな群で置換されているものである。塩基単位は、適当なポリヌクレオチド標的との相補性のために維持される。かかるオリゴヌクレオチド模倣物の例としては、ペプチド核酸（PNA）が挙げられる。PNAオリゴヌクレオチドとは、糖主鎖がアミド含有主鎖、特にアミノエチルグリシン主鎖で置換されているオリゴヌクレオチドを意味する。塩基は、保持され、主鎖のアミド部分のアザ窒素原子と直接または間接的に結合する。PNA化合物の調製を教示する米国特許には、限定されるものではないが、米国特許第5,539,082号公報；同第5,714,331号公報；および同第5,719,262号公報が挙げられる。

【0056】

本発明のオリゴヌクレオチドはまた、塩基の修飾または置換も含みうる。本明細書において用いられるように、「非修飾」または「天然」塩基としては、プリン塩基であるアデニン（A）およびグアニン（G）、ならびにピリミジン塩基であるチミン（T）、シトシン（C）およびウラシル（U）が挙げられる。修飾塩基としては、限定されるものではないが、5-メチルシトシン（5-me-C）、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6-メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2-プロピルおよび他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミンおよび2-チオシトシン、5-ハロウラシルおよびシトシン、5-プロピニルウラシルおよびシトシン、6-アゾウラシル、シトシンおよびチミン、5-ウラシル（シュドウラシル）、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシルおよび他の8-置換アデニンおよびグアニン、5-ハロ、特に5-ブロモ、5-トリフルオロメチルおよび他の5-置換ウラシルおよびシトシン、7-メチルグアニンおよび7-メチルアデニン、8-アザグアニンおよび8-アザアデニン、7-デアザグアニンおよび7-デアザアデニンおよび3-デアザグアニンおよび3-デアザアデニンなどの他の合成および天然塩基が挙げられる。さらなる塩基としては、米国特許第3,687,808号公報において開示されるもの、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990において開示されるもの、Englisch et al, Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30,613により開示されるもの、およびSanghvi, Y. S., Chapter 15, Antisense Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993により開示されるものが挙げられる。

【0057】

本発明の組換え薬剤またはオリゴヌクレオチド薬剤は、下に記載される任意の好適な投与様式を使用して対象に投与することができる（すなわち、イン・ビボ遺伝子療法）。あるいは、適当な遺伝子送達ビヒクル／方法（トランスフェクション、形質導入など）および適当な発現系を使用して好適な細胞に核酸構築物を導入することができる。改変された細胞は続いて培養により増殖させ、個体に戻される（すなわち、エクス・ビボ遺伝子療法）。好適な構築物の例としては、限定されるものではないが、pcDNA3、[rho]pcDNA3.1(+/-)、pGL3、PzeoSV2(+/-)、pDisplay、pEF/myc/cyto、pCMV/myc/cyto（これらはそれぞれインビトロジェン社(www.invitrogen.com)から市販されている）が挙げられる。レトロウイルスベクターおよびパッケージングシステムの例にはクロンテック社, San Diego, Califによって販売されるものがあり、これらには、マルチクローニングサイトへのクローニングを可能にし導入遺伝子の転写がCMVプロモーターから命令される、Retr-XベクターpLNCXおよびpLXSNが含まれる。導入遺伝子が5'LTRプロモーターから転写されるpBabeなどのMo-MuLVに由来するベクターもまた含まれる。

【0058】

本発明の核酸薬剤は、非機能的タンパク質の形成をもたらす周知の「遺伝子ノックイン戦略」を用いて対象に導入することができることは理解される〔例えば、Matsuda et al, Methods Mol Biol. 2004; 259:379-90を参照〕。

【0059】

本発明の特定の実施形態において、前記走化性因子阻害剤はサイトカイン阻害剤である。さらに特定の実施形態では、前記阻害剤は炎症性または炎症誘発性サイトカイン阻害剤である。

【0060】

原則として、具体的なサイトカイン阻害薬は、同じ受容体と結合し本物のサイトカインとの結合する受容体に対して競合するアンタゴニストでありうる。本発明によるサイトカイン阻害剤のもう1つのクラスは特異的な可溶性結合タンパク質を含んでなる。これらの結合タンパク質はそれら自体はサイトカイン受容体と結合しない。しかしながら、それら

はサイトカインを複合体にすることにより本物のサイトカインがその受容体と相互作用するのを妨げる。もう1つの実施形態において、前記サイトカイン結合阻害剤は、膜結合受容体のタンパク質分解切断によるかまたは選択的スプライシングを受けた受容体RNAの翻訳により生成される可溶性受容体変異体である。これらの可溶性サイトカイン受容体の多くは、膜結合型受容体において通常見られる膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを欠いている。一般に、サイトカイン結合タンパク質はそれぞれのサイトカインに対して極めて高い親和性を示し、それはサイトカイン特異的抗体の親和性より100～1000倍優れている。それゆえ、例えば、一部のサイトカインの自己分泌活性を遮断するために使用しうるこれらのタンパク質は有益な薬物でありうる。加えて、これらの生理学的阻害剤は、他の細胞との相互作用を可能にすると思われる構造（例えば、抗体のFc部分など）を含まない。そのため、それらは免疫系によって認識されないはずである。

10

【0061】

もう1つの特定の実施形態において、前記サイトカイン阻害剤は、サイトカイン作用の阻害剤であり、サイトカインのそれらそれぞれの受容体との結合に干渉しない非特異的結合タンパク質である。いくつかのサイトカインと非特異的に結合する能力のある1つのタンパク質は、アルファ-2-マクログロブリンである。本発明によるサイトカイン作用にも干渉する薬物の例示的な限定されない例は、例えば、CSA、シクロスポリンA、ペントキシフィリンである。

【0062】

本発明のさらに特定の実施形態において、前記サイトカインは炎症性サイトカインである。

20

【0063】

当業者は、炎症性または炎症誘発性サイトカインによって意味されることを十分に理解している。しかしながら、この開示のために、表現「炎症性または炎症誘発性サイトカイン」が、以下の具体的な作用機構の1以上を有するサイトカインファミリーの任意の物質に関するということをさらに明確にしてもよい：1) 血管透過性の増大、2) 白血球の誘引（ロイコタキシアまたはケモタキシア）、3) マクロファージの活性化、および4) 創傷治癒部位へのマクロファージの動員。これらの効果は、下に開示されるアッセイを用いて各々の物質について評価しうる。

【0064】

よって、本明細書において用いられる場合、「炎症誘発性サイトカインを阻害する物質」は、例えば、下に開示されるものなどの、アッセイにおいて4つの記載した効果の1以上を遮断しうる物質に関する。しかしながら、種間の差異から、実験的設定の研究結果をヒトの状況へと換えることもできる。例えば、ある特定種の特異的サイトカインに対して特異性を有するモノクローナル抗体が、その特定種において下に開示される3つの方法の1つによりサイトカインの作用を阻害する場合には、ヒト型サイトカインに対して特異性を有するモノクローナル抗体はヒトの状況においてこのサイトカインを阻害すると仮定しうる。

30

【0065】

1) 血管透過性の増大についてのアッセイ：ゴールデンハムスター、体重65～100g、に麻酔する。高分子管外漏出の蛍光生体顕微鏡観察のために0.3mlのFITC-デキストラン（mw 150,000、25mg/ml、シグマ社、St Louis, USA）を大腿静脈に注射する。温度および湿度は37℃の生理食塩水の灌水により制御する。およそ0.02mlの好適な濃度の試験物質を、細い注射針（直径0.4mm）を使用して2層の頬袋の間に注射する。生理食塩水と頬袋内の試験物質とが通じる危険性をなくすのに十分に他の注射部位から離れたところで頬袋の隣接部分において同量の生理食塩水を実行する。微小血管反応を、蛍光顕微鏡技術を用いて様々な倍率で60分間調査する。本発明によって定義される炎症誘発性サイトカインは、蛍光高分子FITC-デキストランの漏出を誘導する。生理食塩水を注射した部位では同じような漏出は観察されないはずである。

40

50

【0066】

2) ロイコタキシアまたはケモタキシアについてのアッセイ：ブタ、体重25～30 kg、に麻酔する。1 mlの十分な濃度の試験物質を含有する液体を、その自然形態で局所的に好適な濃度で、徐放調製物でまたは浸透圧ミニポンプによる連続投与により、特別に設計されたチタンチャンバーで入れる。そのチャンバーは高さ5 mmであり直径15 mmを有する。そのチャンバーを、同量の生理食塩水に関する1つのチャンバーと一緒に、それぞれのチャンバーが通じることがないように、別々の切開により腰部の皮下に設置する。7日後、最初の処置と同じようにブタに再び麻酔する。チャンバーを回収し、チャンバーの内容物と1 mlのハックス平衡塩液(Life Technologies, Paisley, Scotland)とを試験管に入れる。細胞が残留しているため、この懸濁液から、100 μ lを用いてチャンバーを洗い流す。この手順を5回繰り返す。次いで、試験管を15秒間振盪する。合計25 μ lの懸濁液および25 μ lのチュルク染色培地(Sigma, St Louis, USA)を混合しビュルケルチャンバーに入れる。光学顕微鏡を使用して各チャンバーの白血球総数を決定する。その際、本発明により定義される炎症誘発性サイトカインに関するチャンバーは、生理食塩水だけのチャンバーよりも有意に多い白血球を含む。

10

【0067】

3) マクロファージの活性化についてのアッセイ：マクロファージ細胞株を購入し、製造業者の説明書に従って培養する。細胞をマルチプルウェル培養プレートで培養する。試験物質を様々な濃度で培養物ウェルに加える。6～72時間のインキュベーション後、アッセイのためにアリコートの培養培地(25～50 μ l)を用いる。TNFおよびIL-8および酸化窒素(NO)のアッセイを市販のアッセイを使用して実施し、それらの結果を、試験物質を添加していない培養培地のアッセイと比較する。本発明により定義される炎症誘発性サイトカインは、培養培地においてTNF、IL-8またはNOの1以上について、試験物質を添加していない培養培地と比べて有意に高いレベルを誘導する。

20

【0068】

4) 創傷治癒部位へのマクロファージの動員についてのアッセイ：ラットに麻酔し、背部の皮膚をそぐ。皮膚および下層にある筋肉を3 cm正中切開する。試験物質は、その自然形態で局所的に好適な濃度で、徐放調製物でまたは浸透圧ミニポンプによる連続投与により適用する。対照実験では、生理食塩水を同じ量および投与で実施する。皮膚を縫合する。1～4週間後、ラットに再び麻酔し、皮膚および筋肉の創傷治癒領域を摘出し、免疫組織化学のために処理する。マクロファージ特異的CD分子(例えば、CDw17、CD23、CD25、CD26、CD64、CD68、CD69、CD71、CD74、CD80、CD88、CD91およびCD105)に対する市販の抗体を用いて治癒組織中のマクロファージの存在を視覚化する。その際、マクロファージの数が、試験物質に曝した場合の治癒組織において、生理食塩水対照に曝した組織よりも有意に多いことが分かる。

30

【0069】

本発明により定義される炎症誘発性サイトカインの阻害剤は、上記の4つのアッセイの1以上において炎症誘発性サイトカインの効果(すなわち、血管透過性の増大、ロイコタキシアおよびマクロファージの活性化または動員)を低減し、かつ／または例えば、下に開示されるもののようなマクロファージの動員の阻害についてのアッセイにおいてマクロファージの動員に対して阻害効果を有する。

40

【0070】

5) 創傷治癒部位へのマクロファージ動員の阻害についてのアッセイ：ラットに麻酔し、背部の皮膚をそぐ。皮膚および下層にある筋肉を3 cm正中切開する。皮膚を縫合する。動物は、好適な濃度および投与形のサイトカイン阻害剤により処置を受ける。対照動物は処置を受けない。1～4週間後、ラットに再び麻酔し、皮膚および筋肉の創傷治癒領域を摘出し、免疫組織化学のために処理する。マクロファージ特異的CD分子(例えば、CDw17、CD23、CD25、CD26、CD64、CD68、CD69、CD71、CD74、CD80、CD88、CD91およびCD105)に対する市販の抗体を用いて治癒組織中のマクロファージの存在を視覚化する。その際、マクロファージの数が、サ

50

イトカイン阻害剤での処置後の治癒組織において、対照動物よりも有意に少ないことが分かる。

【0071】

本発明の一層さらなる特定の実施形態において、前記炎症性サイトカインは、IL-1、TNF- α 、IL-6、IFN- α 、IFN- γ 、IL-11、TGF- β 、LIF、IL-8、PF-4、MIP-1a/b、MCP-1、MCP-2、MCP-3、Rantes、IL-12、およびリンホタクチンからなる群から選択される。好ましい実施形態では、前記サイトカインはTNF- α である。本発明のもう1つの好ましい実施形態では、前記サイトカインはMCP-1である。

【0072】

本発明により使用しうる炎症誘発性サイトカインの阻害剤は、当技術の現状においていくつもの異なる種類のものが知られている：

・特異的TNF遮断物質の例示的な限定されない例は、モノクローナル抗体、例えば、インフリキシマブ、CDP-571 (Humicader (商標))、D2E7、およびCDP-870など、可溶性サイトカイン受容体、例えば、エタネルセプト、レネルセプト、ペグ化TNF受容体I型、TBP-1、TNF受容体アンタゴニストなど、アンチセンスオリゴヌクレオチド、例えば、ISIS-104838など、非特異的TNF遮断物質、例えば：

・MMP阻害剤 (すなわち、マトリックスメタロプロテイナーゼ阻害剤、またはTACE阻害剤、すなわち、TNF- α 変換酵素阻害剤)、例えば、テトラサイクリン、例えば、ドキシサイクリン、ライムサイクリン、オキシテトラサイクリン、テトラサイクリン、ミノサイクリンおよび合成テトラサイクリン誘導体、例えば、CMTなど、すなわち、化学的に修飾されたテトラサイクリン、プリノマスタット (AG3340)、パチマスタット、マリマスタット、KB-R7785、TIMP-1、TIMP-2、adTIMP-1 (TIMP-1のアデノウイルス送達)、adTIMP-2 (TIMP-2のアデノウイルス送達) など

・キノロン、例えば、ノルフロキサシン、レボフロキサシン、エノキサシン、スパルフロキサシン、テマフロキサシン、モキシフロキサシン、ガチフロキサシン、ゲミフロキサシン、グレパフロキサシン、トロバフロキサシン、オフロキサシン、シプロフロキサシン、ペフロキサシン、ロメフロキサシンおよびテマフロキサシン

・サリドマイド誘導体、例えば、SelCID (すなわち、選択的サイトカイン阻害剤)、CC-1088、CDC-501、CDC-801、およびリノミド

・ラザロイド、例えば、非グルココルチコイド21-アミノステロイド、例えば、U-74389G (16-デスメチルチリラザド) およびU-74500など

・プロスタグランジン；イロprost (プロスタサイクリン)

・シクロスポリン

・ペントキシフィリン誘導体

・ヒドロキサム酸誘導体

・ナフトピラン (Naphopyrans)

・ホスホジエステラーゼI、II、III、IV、およびV-阻害剤、例えば、CC-1088、Ro-20-1724、ロリプラム、アムリノン、ピモベンダン、ベスナリノン、SB-207499 (Ariflo (商標))

・メラノコルチンアゴニスト、例えば、HP-228

などである。

【0073】

本発明により使用することができる、他のTNF遮断物質の例示的な限定されない例としては、ラクトフェリン、および米国特許第7,253,143 B1号公報において開示されるものなどのラクトフェリン由来のペプチド、CT3、ITF-2357、PD-168787、CLX-1100、M-PGA、NCS-700、PMS-601、RDP-58、TNF-484A、PCM-4、CBP-1011、SR-31747、AG

10

20

30

40

50

T-1、ソリマスタット、CH-3697、NR58-3.14.3、RIP-3、Sch-23863、SH-636などが挙げられる。

【0074】

本明細書においてここにおよび以下の請求項欄に用いられるように、「処置」および「処置すること」とは、疾患の有害な影響を予防すること、治癒すること、回復に向かわせること、減弱すること、緩和すること、最小限に抑えること、抑制することまたは停止することを意味する。よって、本発明の文脈において「処置」は、疾患の症状を回復に向かわせるために、肥満症または肥満症関連状態もしくは障害を処置すること、より詳細には、前記疾患の発症を予防すること、ならびに前記疾患または1以上のその症状を管理することおよび／または改善することを含んでなる。本発明の好ましい実施形態では、「処置」とは、所望の治療効果を得るために本発明の阻害剤の治療上有効な量を投与することを意味する。

10

【0075】

よって、本明細書において用いられる「処置」は、哺乳類、特にヒトの疾患または状態のいかなる処置をも包含し、それには：(a) 疾患または状態の素因がある可能性があるがまだ疾患または状態を有すると診断されていない対象において疾患または状態の発生を予防すること；(b) 疾患または状態を阻害すること、すなわちその発症を止めること；あるいは(c) 疾患または状態を除去すること、すなわち、疾患若しくは状態の退行または疾患若しくは状態の1以上の症状の改善を引き起こすことが含まれる。前記方法により治療される対象の集団には、望ましくない状態または疾患に罹患している対象だけでなく、その状態または疾患を発症する危険性がある対象も含まれる。

20

【0076】

本明細書において用いられるように、前記「肥満症関連障害」とは、食べ過ぎ、過食、過食症、糖尿病、血漿インスリン濃度の上昇、インスリン抵抗性、メタボリック症候群、脂質代謝異常、高脂血症、脂肪栄養症、骨関節症、変形性関節症、腰痛症、月経異常、閉塞性睡眠時無呼吸、胆石症、胆石、非アルコール性脂肪性肝炎、心疾患、心調律動の異常および異常な心臓不整脈、心筋梗塞、鬱血性心不全、冠動脈性心疾患、冠動脈疾患、狭心症、高血圧症、突然死、脳卒中、脳梗塞、脳血栓症、一過性脳虚血発作、多嚢胞性卵巣疾患、頭蓋咽頭腫、ピックウィック症候群、脂肪肝、プラダーウィリ症候群、フレリッヒ症候群、GH欠乏症、正常変異型低身長、ターナー症候群、小児急性リンパ芽球性白血病、不妊症、男性の性腺機能低下症、女性の多毛症、胃腸運動障害、呼吸器障害、心血管障害、炎症、動脈硬化症、高コレステロール血症、高尿酸血症、腰痛、胆嚢疾患、痛風、子宮内膜癌、乳癌、前立腺癌、結腸癌または腎臓癌などの障害を意味する。

30

【0077】

前記活性薬剤、すなわち、前記阻害剤、は、単独で投与することができるが、有効成分として本発明による阻害剤の有効量を含んでなる、医薬処方物または組成物の一部として与えることが好ましい。本発明の文脈における医薬処方物または組成物は、前記活性薬剤(群)の、合わせてまたは別個での、薬学上許容される担体ならびに他の添加剤との組合せを意味するよう意図されている。

【0078】

本発明の文脈における「薬学上許容される担体(単数)」とは、毒性のない不活性材料のいずれか1つを指し、それらは本発明の化合物と反応せずかつ希釈剤若しくは担体としてまたは処方物に形態またはコンシステンシーを与えるために処方物に加えることができる。前記担体は、薬物の安定性を向上させるため、クリアランス速度を遅くするため、徐放性を与えるため、望ましくない副作用を低減するためなどで、有効成分の標的組織への送達または浸透を向上させる効果を有することもある。前記担体は、食用フレーバーを添加した処方物を提供するために、処方物を安定させる物質であってもよい(例えば、防腐剤)。担体、安定化剤およびアジュバントの例については、E. W. Martin, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, MacK Pub Co (June, 1990)を参照。

40

【0079】

50

加えて、前記活性材料はまた、所望の作用を損なわない他の活性材料と、あるいは所望の作用を補うか、または別の作用を有する材料と混合することもできる。前記化合物、すなわち、前記阻害剤、は、前記組成物中の単独の薬学上有効な成分として処方してよいし、または例えば、肥満症または肥満症関連状態の処置において有用である他の薬剤のような他の有効成分と組み合わせてもよい。

【0080】

本発明による肥満症の処置において有用である前記薬剤の例としては、インスリン抵抗性改善薬、インスリンまたはインスリン模倣薬、スルホニル尿素、 α -グルコシダーゼ阻害剤、コレステロール降下薬、PPAR δ アゴニスト、カンナビノイド(CB)受容体リガンド、抗肥満セロトニン作動薬、アドレナリン受容体アゴニスト、腓リパーゼ阻害剤、アポリポタンパク質-B分泌/ミクロソームトリグリセリド転移タンパク質(a po-B/MT P)阻害剤、メラニン凝集ホルモン(MCH)受容体アンタゴニスト、ニューロペプチドY(NPY)アンタゴニスト、ペプチドYY(PYY)アゴニスト、オレキシンアンタゴニスト、グルカゴン様ペプチド(GLP)-Iアゴニスト、メラノコルチン(MC)アゴニスト、グレリン受容体アンタゴニスト、レプチンアゴニスト、コレシストキニン(CCK)アゴニスト、繊毛様神経栄養因子(CNTF)、成長ホルモン(GH)分泌促進薬、成長ホルモン分泌促進薬受容体モジュレーター、ジペプチジルペプチダーゼIV(DP-IVまたはDP P-IV)阻害剤、ヒスタミン受容体-3(H3)アンタゴニスト/逆アゴニスト、5-ヒドロキシトリプタミン(5HT)アゴニスト、セロトニン輸送またはセロトニン再取り込み阻害剤、ドーパミンアゴニスト、ノルエピネフリン(NE)輸送阻害剤、ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ(DAG)阻害剤、グルコース輸送体阻害剤、11 β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ-1阻害剤、コレステロールエステル転送タンパク質(CEPT)阻害剤、スクアレンシンターゼ阻害剤、例えば、ラパキスタットなどが挙げられる。

【0081】

本発明の組成物は、個々の患者の臨床症状、投与の部位および方法、投与スケジュール、患者の年齢、性別、体重および医師には公知の他の因子を考慮し、適正な医療行為に従って投与され服用される。担体の選択は、特定の有効成分、ならびに前記組成物を投与するために用いる特定の方法によってある程度決まる。従って、本発明の好適な医薬組成物には様々な種類のものがある。

【0082】

特定の場合において、前記阻害剤は、走化性因子遺伝子のプロモーター領域を認識しそれとハイブリダイズし、それによって遺伝子発現を阻害するオリゴヌクレオチドである。この場合、前記オリゴヌクレオチドは任意の好適な方法を用いて送達しうる。いくつかの実施形態では、裸のDNAが投与される。他の実施形態では、対象への核酸の送達のためにリポフェクションが利用される。一層さらなる実施形態において、オリゴヌクレオチドは、例えば、米国特許第6,169,177号公報において記載されているように、送達のためにホスホチオエートで修飾される。いくつかの実施形態では、送達のための核酸は、それらの取り込みを助けるために圧縮される(例えば、米国特許第6,008,366号公報、同第6,383,811号公報を参照)。いくつかの実施形態では、圧縮された核酸は、特定の細胞種(例えば、脂肪細胞)に向けられる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、それらの送達を助けるために他の化合物とコンジュゲートされる。例えば、いくつかの実施形態では、核酸は、送達を助けるためにポリエチレングリコールとコンジュゲートされる。さらに他の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、装填可能な薬物ナノ担体(PharmaIn)である保護されたグラフトコポリマーとコンジュゲートされる。一層さらなる実施形態では、細胞へのオリゴヌクレオチドの輸送は、ビタミンとのコンジュゲーションにより促進される。他の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ナノ粒子(例えば、ナノメドファーマシューティカルズ社(NanoMed Pharmaceuticals); Kalamazoo, Mich.)とコンジュゲートされる。他の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、送達を助けるために脂質(例えば、リボソームまたはミセル)中に封入される。一層さらなる実施

形態では、オリゴヌクレオチドは、送達を助けるためにさらなるポリマーと複合体形成される。

【0083】

医薬組成物または医薬は、様々な種類の経路によって、例えば、経口的に、非経口的に、腹膜内に、静脈内に、動脈内に、経皮的に、舌下に、筋肉内に、直腸に、経頬的に、鼻腔内に、リポソームによる、吸入による、腔に、眼内に、局所送達による（例えば、カテーテルまたはステントによる、皮下に、脂肪内に、関節内に、またはくも膜下腔内になど、投与しうるしまたは併用投与しうる。前記組成物はまた、徐放投与形でも投与しうるしまたは併用投与しうる。当業者に公知の投与形は、本発明の化合物の送達に好適である。

【0084】

本発明による阻害剤の治療上有効な量を含む組成物が提供される。組成物を調製するために、本発明の阻害剤の1種以上を好適な薬学上許容される担体と混合する。前記化合物（群）の混合または添加により、得られる混合物は溶液、懸濁液、エマルジョンなどとなることができる。リポソーム懸濁液も薬学上許容される担体として好適でありうる。これらは当業者に公知の方法によって調製しうる。得られる混合物の形態は、意図された投与様式および選択する担体またはビヒクルへの化合物の溶解度を含む、複数の因子によって決まる。有効濃度は、治療する疾患、障害、または状態の少なくとも1つの症状を軽減するまたは改善するのに十分なものであり、実験的に決定しうる。

【0085】

前記組成物または調製物における活性物質の量または濃度は、指示された範囲の好適な用量が得られるようなものである。前記組成物は、好ましくは、単位投与形で処方される。「単位投与形」とは、ヒト対象および他の哺乳類に対する単位用量として好適な物理的に分離した単位を意味し、各単位は、所望の治療効果をもたらすように算出された所定量の活性材料を好適な医薬賦形剤とともに含有する。

【0086】

加えて、前記活性材料はまた、所望の作用を損なわない他の活性材料と、あるいは所望の作用を補うか、または別の作用を有する材料と混合することもできる。前記化合物、すなわち、前記阻害剤、は、前記組成物中の単独の薬学上有効な成分として処方してよいしまたは他の有効成分と組み合わせてもよい。

【0087】

前記化合物が通常十分な溶解度を示さない場合には、可溶化するための方法を用いてよい。かかる方法は公知であり、限定されるものではないが、ジメチルスルホキシド（DM SO）などの補助溶媒の使用、Tween、RTM、などの界面活性剤の使用、および重炭酸ナトリウム水溶液への溶解が挙げられる。前記化合物の誘導体、例えば、塩またはプロドラッグなどもまた、有効な医薬組成物の処方において使用してよい。

【0088】

本発明の阻害剤は、体内からの急速な排出からそれらを保護する担体（例えば、徐放性処方物またはコーティング剤など）とともに調製しうる。かかる担体には、制御放出処方物（例えば、限定されるものではないが、マイクロカプセル送達システムなど）が含まれる。前記活性化合物は、治療する対象に対して望ましくない副作用なしに治療上有効な効果を与えるのに十分な量で薬学上許容される担体中に含まれる。かかる担体としては、制御放出処方物（例えば、限定されるものではないが、インプラントおよびマイクロカプセル送達システムなど）および生分解性、生体適合性ポリマー（例えば、コラーゲン、エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、ポリオルトエステル、ポリ乳酸など）が挙げられる。かかる処方物の調製のための方法は当業者には公知である。

【0089】

本発明の組成物はまた、ナノ結晶分散処方物でも送達しうる。かかる処方物の調製は、例えば、米国特許第5,145,684号公報において記載されている。ナノ結晶処方物は、典型的には、生物学的利用性がより高い薬物化合物を提供する。

【0090】

本発明の阻害剤および組成物は、複数回または1回用量用の容器中に封入することができる。封入された化合物および組成物は、例えば、使用するために組み合わせることができる成分部分を含むキットで提供することができる。例えば、凍結乾燥形態の治療化合物と好適な希釈剤は、使用前に組み合わせるために別個の成分として提供してよい。キットは、共投与のために本発明による阻害剤と第2の治療薬を含んでよい。本発明の阻害剤と第2の治療薬は、別個の成分部分として提供してよい。キットは、複数の容器を含んでよく、各容器は、単位用量の本発明の阻害剤を1以上収容する。容器は、限定されるものではないが、経口投与用の錠剤、ゲルカプセル剤、持続放出カプセル剤など；非経口投与用のデポー製剤、薬剤充填済み注射器、アンプル、バイアルなど；および局所投与用のパッチ、医療用パッド、クリームなどを含む所望の投与様式に適していることが好ましい。

10

【0091】

本発明の阻害剤は、所望の効果、好ましい実施形態では、抗肥満効果を得るのに十分な量で投与される。分かるように、前記化合物の量は、疾患の重篤度、意図された治療計画および所望の治療用量によって決まる。所望の効果を得るのに有効な量は、当技術分野で公知の考慮事項により決定される。よって、有効な量または濃度は、前記化合物の体内での分布プロフィールを含む様々な因子、様々な薬理学的パラメーター（体内での半減期など）、望ましくない副作用、もしあれば、治療する対象の年齢および性別などの因子、などによって決まることが分かる。治療上有効な量または濃度は、治療する障害について既知のイン・ビトロモデル系およびイン・ビボモデル系において前記化合物を試験することにより実験的に決定してよい。有効な量は、典型的には、有効な用量範囲、最大耐性用量および最適用量を見つける目的を有する臨床研究において検証される。かかる臨床研究の実施方法は、臨床開発分野に熟知している人には周知である。

20

【0092】

また、動物において有効であることが分かっている量に基づいて量を決定することもある。ラットに投与された $X \text{ mg/Kg}$ という量が、当技術分野で周知の考えられる変換式の1つを用いて別の種（特にヒト）における等価な量に変換することができることは周知である。薬物組成物中の活性化合物の濃度は、活性化合物の吸収、不活性化、および排泄速度、投与計画、および投与量、ならびに当業者には公知の他の因子によって決まる。

【0093】

前記阻害剤は一度で投与してよく、または複数のより少ない用量に分割して時間間隔において投与してもよい。正確な用量および処置期間は処置する疾患の関数であり、公知の試験プロトコルを用いてまたはイン・ビボまたはイン・ビトロ試験データからの推定により実験的に決定しうることは分かる。濃度および用量の値も緩和する状態の重篤度によって変動しうることに留意すべきである。任意の特定の対象に対して、個々の必要性および前記組成物の投与の投与者または投与管理者の専門的な判断に従って特定の投与計画を経時的に調整する必要があること、および本明細書において示される濃度範囲は例示でしかなく特許請求された組成物の範囲または実施を制限するものではないということもさらに分かるであろう。

30

【0094】

経口投与が望まれる場合には、前記阻害剤を、胃の酸性環境からそれらを保護する組成物で提供する必要がある。例えば、組成物は、胃内でその完全性を維持し腸内で活性化合物を放出する腸溶コーティング剤に処方することができる。組成物はまた、制酸薬または他のかかる成分と組み合わせても処方しうる。経口用組成物は、一般的には、不活性希釈剤または食用担体を含み、錠剤に圧縮されうるかまたはゼラチンカプセル中に封入されうる。治療的経口投与のために、活性化合物または化合物群は、賦形剤とともに組み合わせ、錠剤、カプセル剤、またはトローチ剤の形で使用することができる。薬学上適合する結合剤およびアジュバント材料は、組成物の一部として含めることができる。

40

【0095】

錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などは、類似の性質を有する次の成分または化合物のいずれかを含むことができる：結合剤、例えば、限定されるものではないが、トラガ

50

カントガム、アラビアガム、コーンスターチ、またはゼラチンなど；賦形剤、例えば、微晶質セルロース、デンプン、またはラクトースなど；崩壊剤、例えば、限定されるものではないが、アルギン酸およびコーンスターチなど；滑沢剤、例えば、限定されるものではないが、ステアリン酸マグネシウムなど；ギルダント、例えば、限定されるものではないが、コロイド状二酸化ケイ素など；甘味剤、例えば、スクロースまたはサッカリンなど；および香味剤、例えば、ペパーミント、サリチル酸メチル、または果実香味料など。

【0096】

用量単位形がカプセル剤である場合、それは上記の種類の材料の他に脂肪油などの液体担体を含むことができる。加えて、用量単位形は、用量単位の物理的形状を改変する様々な他の材料、例えば、糖衣および他の腸溶性薬剤を含むことができる。前記化合物はまた、エリキシル剤、懸濁液、シロップ剤、カシェ剤、チューインガム剤などの成分としても投与することができる。シロップ剤は、活性化合物の他に、甘味剤としてのスクロースおよびある特定の防腐剤、色素および着色剤、および着香剤を含んでよい。

10

【0097】

前記活性材料はまた、所望の作用を損なわない前記疾患の処置のための他の活性材料と、または所望の作用を補う材料と混合することもできる。よって、本発明の特定の実施形態において、前記医薬は、前記疾患の処置において同時に、別個にまたは逐次的に使用するために、前記疾患の処置のための別の化合物をさらに含んでなる。

【0098】

本発明の好ましい実施形態では、前記他の活性材料または化合物は肥満症を処置するために使用される他の薬物である。かかる併用処置では、前記他の薬物および本発明の化合物は、各薬物の服薬スケジュールに応じて、同時にまたは異なる時点で患者に与えてよい。

20

【0099】

非経口的、皮内、皮下、または局所適用のために使用される溶液または懸濁液は、次の成分のいずれかを含むことができる：滅菌希釈剤、例えば、注射水、生理食塩水溶液、固定油、天然に存在する植物油（例えば、胡麻油、ヤシ油、落花生油、綿実油など）、または合成脂肪ビヒクル（例えば、オレイン酸エチルなど）、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の合成溶剤など；抗菌薬、例えば、ベンジルアルコールおよびメチルパラベンなど；酸化防止剤、例えば、アスコルビン酸および重亜硫酸ナトリウムなど；キレート化剤、例えば、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）など；バッファー、例えば、アセテート、シトレート、およびホスフェートなど；および張性調整のための薬剤、例えば、塩化ナトリウムおよびデキストロースなど。非経口用調製物は、ガラス、プラスチック、または他の好適な材料で作られたアンプル、使い捨てのシリンジ、または複数回用量用バイアル中に封入することができる。バッファー、防腐剤、酸化防止剤などは必要に応じて組み込むことができる。

30

【0100】

静脈内に投与する場合、好適な担体としては、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、および増粘剤および可溶化剤（例えば、グルコース、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、およびその混合物など）を含有する溶液が挙げられる。組織標的化リポソームを含むリポソーム懸濁液も薬学上許容される担体として好適でありうる。これらは、例えば、米国特許第4,522,811号公報に記載されているように、公知の方法によって調製しうる。

40

【0101】

本発明の化合物は、鼻腔内に投与することができる。この経路により与える場合、適当な投与形は、当業者には公知であるように、鼻腔用スプレーまたは乾燥粉末である。

【0102】

本発明の化合物は、くも膜下腔内に投与することができる。この経路により与える場合、適当な投与形は、当業者には公知であるように、非経口投与形でありうる。本発明の化合物は、局所投与することができる。この経路により与える場合、適当な投与形は、クリ

50

ーム、軟膏、またはパッチである。本発明の化合物は、当業者には公知であるように、坐剤により直腸に投与することができる。本発明の化合物は、当業者には公知であるように、インプラントにより投与することができる。本発明の化合物をインプラントにより投与する場合、治療上有効な量はデポー剤投与について上に記載した量である。

【0103】

前記治療化合物を投与するための投与経路または投与形に新規なところはない。特定の治療化合物と、所望の投与形を考えれば、当業者はその治療化合物に適当な投与形の調製方法が分かるであろう。

【0104】

上述のとおり、本発明者らは、ob／obマウスのいくつかの固形組織において常在間葉系前駆体（MP）または幹細胞（MSC）が存在しないことを示した。さらに、本発明は、この減少が常在器官（筋肉、肺および／または心臓）由来の前記細胞の脂肪組織への遊走によるものであることを示している。

【0105】

近年に至って、MSCには、組織修復および再生における役割が次第に与えられた。種々の組織損傷モデルにおいて、MSCは、少なくとも、2つの証明された機構を通じて損傷した組織の回復を向上させる：抗炎症活性を有する可溶性因子を放出することによる機構および局所再生プロセスを促進し強化することによる機構。よって、走化性因子阻害剤は、前記幹細胞の脂肪組織への遊走を阻害することができるため、前記阻害剤は筋肉、肺、心臓、皮膚、腎臓などのような器官において修復機構を向上させることができる有益な治療的アプローチである。

【0106】

従って、もう1つの態様において、本発明は、組織変性状態の処置のための医薬としての使用のための走化性因子阻害剤であって、前記阻害剤が幹細胞の脂肪組織への遊走を阻害する、走化性因子阻害剤に関する。

【0107】

本明細書において用いられる「組織変性状態」とは、病的状態を示す組織を意味する。よって、本発明によれば、前記阻害剤は、前記組織における幹細胞の増殖、再生および／または生着を増大させるための医薬として使用することができる。

【0108】

本発明の特定の実施形態において、前記組織変性状態は肥満症依存性組織変性である。本発明の著者らは、ob／obの筋肉および肺が肉眼的にはそれらのWT対応物よりもずっと薄いことを観察した。よって、本明細書において用いられる「肥満症依存性組織変性」とは、非肥満対象の場合と比べたときに、肥満対象において起こる固形組織の変性の増大を意味する。

【0109】

本発明の特定の実施形態において、前記肥満症依存性組織変性状態は骨格筋変性、心臓組織変性、骨組織変性、神経組織変性、肺変性、肝臓変性、腎臓変性または同時の2つ以上の前記組織変性状態である。

【0110】

本発明の特定の実施形態において、前記幹細胞は内因性幹細胞または移植された幹細胞である。特定の場合において、前記細胞は自己幹細胞である。もう1つの実施形態では、前記細胞は同種異系幹細胞である。移植された細胞は自己細胞、すなわち、ある個体から採取され同じ個体に戻された幹細胞であることが好ましい。もう1つの特定の実施形態では、前記幹細胞は間葉系幹細胞である。

【0111】

特定の実施形態において、前記走化性因子阻害剤は、上述のとおり、サイトカイン阻害剤である。さらに特定の実施形態では、前記サイトカインは炎症性サイトカインまたは炎症誘発性サイトカインである。一層さらなる特定の実施形態では、前記炎症性サイトカインは、IL-1、TNF-アルファ、IL-6、IFN-アルファ、IFN-ガンマ、I

10

20

30

40

50

L-11、TGF-β、LIF、IL-8、PF-4、MIP-1a/b、MCP-1、MCP-2、MCP-3、Rantes、IL-12、およびリンホタクチンからなる群から選択される。好ましい実施形態では、前記サイトカインはTNFαである。もう1つの好ましい実施形態では、前記サイトカインはMCP-1である。

【0112】

本発明の特定の実施形態において、前記阻害剤は、上述のとおり、抗体、アンタゴニスト、可溶性結合タンパク質、可溶性受容体変異体、非機能的誘導体、アンチセンスポリヌクレオチド、RNA干渉オリゴヌクレオチド、DNAザイム、リボザイム、三重鎖形成オリゴヌクロチド(TFO)、および化学的または生物学的化合物からなる群から選択される化合物である。

10

【0113】

もう1つの態様において、本発明は、肥満症の処置のためおよび／または組織変性状態の処置のための化合物の同定のためのイン・ビトロの方法であって、

i) 幹細胞の集団を、それらを走化性因子に向かって遊走させる条件で培養すること；

ii) 工程i) による細胞集団を試験化合物と接触させること；および

iii) 前記細胞集団の遊走能力を評価すること；

を含んでなる方法

{ここで、前記化合物が前記幹細胞の遊走を阻害する能力のある場合には、前記試験化合物が肥満症および／または組織変性状態の処置のための医薬として使用されうることを示す}

20

に関する。

【0114】

イン・ビトロで細胞集団の遊走能力を評価するための方法は当技術分野で周知である。前記方法の例示的な限定されない例としては、本発明に添付の実施例において記載されるものが挙げられる。加えて、細胞運動それ自体をモニタリングすることによって細胞遊走のアッセイを行ってよい。あるいはまたは加えて、細胞遊走と関連していることが知られている分子的または構造的(例えば、偽足形成)決定要因をアッセイしてもよい。本発明に従って使用してよい他の細胞遊走アッセイは、低速度撮影動画に基づく生細胞データを含み、個別細胞または細胞集団における動的現象(Dai et al, 2005, Exp Cell Res 311, 272-80)、平面上でのファゴキネティックトラック(phagokinetic track)(PKT)形成(Kawa et al., 1997, FEBS Lett 420, 196-200; Lin et al., 2005, Mol Cancer 4, 21; Scott et al., 2000, Anal Biochem 287, 343-4)の定量に最も有益でありうる。

30

【0115】

本発明の特定の実施形態において、前記走化性因子はサイトカインである。さらに特定の実施形態では、前記サイトカインは炎症性サイトカインである。さらに特定の実施形態では、前記炎症性サイトカインは、IL-1、TNFα、IL-6、IFNα、IFNγ、IL-11、TGF-β、LIF、IL-8、PF-4、MIP-1a/b、MCP-1、MCP-2、MCP-3、Rantes、IL-12、およびリンホタクチンからなる群から選択される。

【0116】

特定の実施形態において、前記幹細胞は間葉系幹細胞である。

40

【0117】

本発明の特定の実施形態において、前記組織変性状態は肥満症依存性組織変性である。

【0118】

もう1つの態様において、本発明は、肥満症の処置のためおよび／または組織変性状態の処置のための化合物のイン・ビボでの同定のための方法であって、

i) 試験化合物を非ヒト動物に投与すること(ここで、前記動物は対照動物と比べて幹細胞の脂肪組織への遊走を増大させていることを特徴とする)；および

ii) 前記動物における前記細胞集団の分布を評価すること；

を含んでなる方法

50

{ここで、前記化合物が前記幹細胞の脂肪組織への遊走を阻害する能力のある場合には、前記試験化合物が肥満症および／または組織変性状態の治療のための医薬として使用されうることを示す}

に関する。

【0119】

前記試験化合物の投与は、例えば、経口投与、経皮投与、静脈内投与、注入投与、筋肉内投与などを含む、任意の好適な経路によって行うことができる。

【0120】

本発明によれば、前記非ヒト動物は、対照動物と比べて幹細胞の脂肪組織への遊走を増大させていることを特徴とする。特定の実施形態において、前記動物は肥満動物である。本発明のもう1つの特定の実施形態では、前記非ヒト動物は遺伝子改変動物である。より詳細には、対照動物と比べて幹細胞の脂肪組織への遊走速度の上昇を示す前記遺伝子改変動物は、レプチン欠損動物である。好ましい実施形態では、前記動物はレプチンノックアウト動物（ob／ob）である。よって、前記対照動物は、幹細胞（内因性幹細胞または移植された幹細胞のいずれか）が前記動物における大部分の成体組織に分布するまたは拡散している動物である（脂肪組織が好ましいものではない）。

【0121】

本発明の特定の実施形態において前記非ヒト哺乳類は齧歯類である。好ましい実施形態では、前記動物はマウスである。

【0122】

前記動物における前記内因性幹細胞または移植された幹細胞の遊走能力を評価する方法は当技術の現状において周知であり、本書にも記載している（実施例参照1）。特定の場合において、雄の幹細胞を雌の動物に投与することができ、逆の場合も同じであり、その分布は解析することができる。ある特定の組織への、特に脂肪組織への幹細胞の前記遊走能力を評価する他の例示的な限定されない方法は、磁気共鳴画像法（MRI）であり、これにより移植後の幹細胞のイン・ビボでのモニタリングが可能である。もう1つの特定の場合において、前記移植幹細胞は、標識または選択マーカを用いて遊走能力をイン・ビボで容易に評価することができる細胞である。この意味において、前記移植幹細胞は選択マーカを発現する遺伝子改変幹細胞でありうる。通常、移入方法は、選択マーカの細胞への移入を含む。さらに、細胞を選択下に置いて移入遺伝子を取り込み発現している細胞を単離する。そして、それらの前駆細胞を動物に送達しそれらの遊走能力および分布を解析する。この実施形態では、所望の遺伝子は、得られた組換え細胞のイン・ビボの投与前に前駆細胞内に導入される。かかる導入は、当技術分野で公知の任意の方法によって実施することができ、限定されるものではないが、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、前記遺伝子配列を含有するウイルスベクターまたはバクテリオファージベクターでの感染、細胞融合、染色体媒介による遺伝子導入、マイクロセル媒介による遺伝子導入、スフェロプラスト融合などが挙げられる。外来遺伝子の細胞への導入については多数の技術が当技術分野で公知であり、そのような技術は、レシピエント細胞の必要な生理学的機能に支障をきたさない場合に限り、本発明に従って使用しうる。

【0123】

本発明によれば、幹細胞の脂肪組織への遊走を増大させていることを特徴とする前記動物は、試験化合物（群）で処置することができ、薬物処置の結果としての幹細胞の分布、数または他の特性のあらゆる変化は、未処置および／または陽性対照と比較してモニタリングされ、この場合、陽性対照は、典型的には、例えば、TNFアルファ抗体などの既知阻害化合物で処置された動物である。

【0124】

本発明の特定の実施形態において、前記方法は、薬物（試験化合物）処置前に、すなわち、工程i）の前に、前記幹細胞の脂肪組織への遊走を誘導する、走化性因子の投与を含んでなる。特定の実施形態では、前記走化性因子は、サイトカイン、より詳細には、炎症

誘発性サイトカイン、さらに詳細には、TNF- α またはMCP-1である。

【0125】

特定の実施形態では、前記幹細胞は間葉系幹細胞である。

【0126】

このモデルにおいて得られた結果は、その後、追跡薬物動態研究、毒物学的研究、生化学的研究および免疫学的研究、最後にヒト臨床研究により実証することができる。

【0127】

もう1つの態様において、本発明は、組織変性状態の処置のための化合物の同定のための非ヒト動物の使用であって、ここで、前記動物が対照動物と比べて幹細胞の脂肪組織への遊走を増大させていることを特徴とする、使用に関する。特定の実施形態では、前記幹細胞は間葉系幹細胞である。

10

【0128】

本発明のもう1つの特定の実施形態において、本発明の方法による前記非ヒト動物は遺伝子改変動物である。より詳細には、対照動物と比べて幹細胞の脂肪組織への遊走速度の上昇を示す前記遺伝子改変動物は、レプチン欠損動物である。好ましい実施形態では、前記動物はレプチンノックアウト動物 (ob/ob) である。

【0129】

本発明の特定の実施形態において、前記非ヒト哺乳類は齧歯類である。好ましい実施形態では、前記動物はマウスである。

【0130】

本発明を例示的に記載してきたが、用いた用語は、本質的に限定の文言ではなく説明の文言として意図されていると理解すべきである。上記の教示に照らして、本発明の多くの変更および変形が可能であることは明らかである。従って、本発明は、添付の請求項の範囲内において、下に具体的に記載した以外の方法で実施しうると理解すべきである。

20

【0131】

次の実施例は、単に例示として記載しており、本発明の範囲の限定と解釈してはならない。

【実施例】

【0132】

材料および方法

マウス. C57BL/6マウスおよびob/obマウスをチャールズアンドリバー社から入手し、飼育し、国立衛生研究所動物実験委員会(the National Institutes of Health Animal Care and Use Committee)に従って使用した。

30

【0133】

細胞の単離および増殖条件. 3つの記載した単離方法を使用した。簡潔には：

1. 種々の組織の酵素消化 (コラゲナーゼ-ディスパーゼ混合物) (30分間 37°C)、続いての遠心分離および上澄み液の収集。細胞をDMEM+10%FBS (ウシ胎児血清) 中に再播種し、クローンを増殖させ、形態学により選択した(Goodell M.A. et al (2001) Ann. N. Y. Acad. Sci.; 938:208-220)。

2. 機械的分解：小組織片を、ピンセットとスクレーパー(scrapels)を使用して分解し、その後、培地とともに濾過し、集めた細胞をプレート上に播種した(Yu X, et al (2008) Mol Reprod Dev. Sep;75(9):1426-32)。

40

3. 外植法：小組織片の収集およびゼラチン被覆プレート上へのそれらの播種。外植片からの円形の細胞を集め、クローンを作り、増殖させ、間葉系前駆体を得た(Minasi, MG., et al. (2002) Development. 129, 2773-2783)。得られたクローン細胞をゼラチンで被覆したプレートにおいてDMEM+10%FBS+glut+penn/strep中で増殖させた。細胞は、表面マーカーおよび核型により特徴を示した (データ省略)。

【0134】

注射. 5×10^5 MSCを、0.03 μ m注射針を使用して尾静脈中または筋繊維中に注射した。6時間後または2ヵ月後に筋肉、心臓、肝臓および脂肪塊の組織片を集め、T

50

r i z o l 試薬によりRNAを抽出し、マウスイプシロン染色体に対するRT-PCRを次のプライマーを使用して行った：

Y1、fw 5'-GAT GGT GCC TCA TGG AAT CT

Y1、Rw 5'-AAA TAT GCC AAG AAGG AGA GCC

条件：95℃で4分の初期変性。その後のサイクルは、94℃で45秒間、60℃で45秒間および72℃で45秒間とし、それを30サイクルまたは35サイクル繰り返し、続いて72℃で10分の最終伸長を行った。同じ組織片をOCTで包埋し凍結し、免疫組織学解析を行って、注射した細胞の位置を特定した。

【0135】

統計解析. スチューデントt検定を用いてP値を算出した。グラフのエラーバーはs.e.m.（標準誤差）を表している。

10

【0136】

フローサイトメトリー解析. WT C57マウスから単離した間葉系前駆体をフローサイトメトリーにより解析した。前記細胞の間葉系起源を調べるために、次の抗体を使用した：Scα-1（ファーミンゲン社）、CD31（IDラボ社）、CD34（BDバイオサイエンシズ社）、CD44（BDバイオサイエンシズ社）、CD45（BDバイオサイエンシズ社）。

【0137】

トランスウェル解析. 脂肪細胞またはマクロファージをp24ウェルプレート上で2日間増殖させた。サイトカイン（10～50ng/ml）を含有しまたは含有せず、かつ対応する抗体（10μg/ml mAb）を含有しまたは含有しない培地をそのプレートに加えた。同時に、8-μmトランスウェルフィルター（コーニング社）を1%ゼラチンで被覆し、そのプレート上に置いた。同時に、8-μmトランスウェルフィルター（コーニング社）を1%ゼラチンで被覆し、そのプレート上に置いた。次いで、10⁴間葉系幹細胞を、トランスウェルチャンバーの上側の2%血清含有DMEM中に播種した。移行の6時間後、フィルターの下側の遊走細胞を、4%パラホルムアルデヒド中に固定し、トロウジンブルーで染色し、倒立顕微鏡を使用して計数した（20×の倍率でのトランスウェル膜の下面の5ヶ所の無作為の視野）。結果は、遊走した細胞を投入細胞の総数に対する割合として示している。

20

【0138】

30

結果

手術後、Wtマウスまたはob/obマウス（レプチンKO）外植片（筋肉、心臓、肺および脂肪塊由来）を採取した。効率が最大であるものを選択する前の外植片処理について3つの異なる単離プロトコール（方法参照）を評価した（表1参照）。

【表1】

表1. 様々な技術で単離したMSCの数

数 クローン/外植	脂肪	筋肉	心臓	肺	脂肪	筋肉	心臓	肺
酵素	0	0	0	0	0	0	0	0
機械	12±3	7±2	0	5±1	0	0	0	0
外植法	17±4	11±3	5±2	9±3	1±1	0	0	2±1
	WT				ob/ob			

40

【0139】

簡潔には、外植片をPBSで清浄し、小片に切り、ゼラチンタイプIプレート上に播種した。7～10日後に、外植片から円形の明るい細胞が生じ、これらの細胞を集め、ゼラチン被覆プレートにおいて種々の培地中で増殖させた。WTマウスからの間葉系前駆体お

50

よびそのクローンの単離は容易であった（異なる方法でも C 5 7 W T マウスの脂肪組織または筋肉組織由来の 5 つの異なるクローンは得られた）。

【0140】

しかしながら、表 1 に示されるように、o b / o b マウス由来の外植片からは間葉系前駆体が全く得られなかった。o b / o b 脂肪組織の外植片だけでなく他の組織の外植片（骨格筋、心臓および肺）でもこのようであった。8 匹の異なる o b / o b マウスの試験に関しては、脂肪肥満組織からたった 1 つのクローンが得られただけで、他の組織からは得られなかった。興味深いことに、o b / o b の筋肉および肺は肉眼的にもそれらの W T 対応物よりもずっと薄かった。

【0141】

W T C 5 7 マウスから単離された間葉系前駆体は、培養培地中に D M E M + 1 0 % F B S が存在するだけで速い増殖速度で増殖することができる。これらの細胞をフローサイトメトリーにより解析し、これらは S c a - 1 + 、C D 3 1 + 、C D 3 4 + C D 4 4 + 、C D 4 5 - であった（データ省略）。

【0142】

o b / o b マウスにおいて間葉系前駆体が存在しないことは、少なくとも 2 通りに説明することができた。どちらも理由は分からないが、肥満マウスは組織間葉系前駆体の広範囲にわたる不在を示しておりまたは、o b / o b マウスでは、遠隔臓器（筋肉、肺など）から脂肪組織への間葉系幹細胞の一般遊走が起こり、続いて成熟した脂肪細胞へのそれらの分化が起こる。後者のことを調査するために、W T C 5 7 雄由来の間葉系前駆体注入物を W T または O b 雌の尾静脈中に注射した。図 1 に示されるように、対照マウスでは 6 時間後に種々の組織周囲で注射細胞の割合が検出できた。驚くべきことに、肥満マウスでは、前駆体の多くが脂肪を含む腹部腫瘤において見られた。細胞を筋肉内注射した場合には、注射の 6 時間後、どちらのマウスでもそれらの細胞の多くは筋肉周囲に残留していたが、この場合も、O b マウスの脂肪塊中にいくらかの前駆体を見ることができた。

【0143】

注射の 2 ヶ月後にこれらのマウスの追跡解析を行った。C 5 7 雌マウスの脂肪塊では雄細胞は検出されなかった。加えて、筋肉組織内では、特に筋肉内注射群においては雄細胞はいくらか検出された。しかしながら、雌肥満マウスでは、静脈内注射の場合も筋肉内注射の場合も 2 ヶ月後に雄細胞は脂肪塊中にさらに豊富に存在した。さらに、これらの細胞は、起源の組織（脂肪、筋肉または肺）と関係なく、成熟した脂肪細胞への完全な分化を受け、脂肪塊の全体に貢献した。

【0144】

これらの細胞の遊走機構を理解するために、イン・ビトロでのそれらの遊走特性を研究した。トランスウェルアッセイでは、間葉系前駆体を、脂肪細胞培養物またはマクロファージ培養物の馴化培地により誘引した。加えて、いくつかのサイトカインの遊走誘導能力を解析した。M C P - 1 および T N F - α は、イン・ビトロでの間葉系前駆体の遊走の最も優れた誘導因子であった。

【0145】

トランスウェルアッセイでは、阻害抗体（抗 T N F - α モノクローナル抗体、エンドジェン(Endogen)社, Woburn, MA) により T N F - α の活性を遮断することで、フィルターを超えて遊走した前駆体の数は大幅に減少した（図 2）。イン・ビボで遮断薬として抗 T N F - α 抗体を使用する実験によりイン・ビトロでの観察結果を確認した。実際、T N F 活性を全身的に阻害した後、間葉系前駆体は脂肪を含む腹部へ遊走しなかった。加えて、脂肪塊周囲の血管数の減少が観察された。

【0146】

他の動物肥満症モデルだけでなくヒト患者においても確認されたならば、要するに、これらの実験により、炎症性サイトカイン、例えば、T N F などの活性を制御することが、肥満患者において観察される脂肪過形成を減少させるためのアプローチでありうるということが示唆される。記載したここでの結果にはさらなる意味がある。アンチアジポタキシス処置

10

20

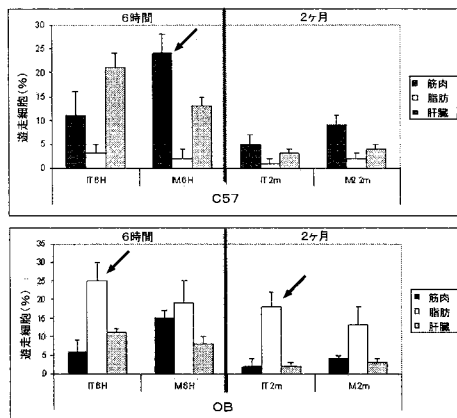
30

40

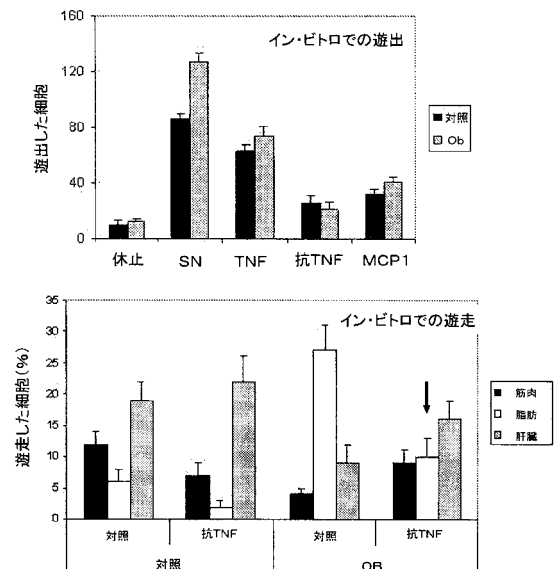
50

(anti-adipotaxis treatment)により間葉系幹細胞遊走を阻害することは、これらの患者におけるいかなる再生治療的アプローチにおいてもさらに有用でありうる。

【図 1】



【図 2】



【配列表】

2012506406000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成23年6月23日(2011.6.23)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

走化性因子阻害剤を含んでなる、肥満症の処置に用いるための医薬組成物。

【請求項2】

前記走化性因子阻害剤が幹細胞の脂肪組織への遊走を阻害する、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

前記幹細胞が内因性幹細胞または移植された幹細胞である、請求項2に記載の医薬組成物。

【請求項4】

前記幹細胞が間葉系幹細胞である、請求項2または3に記載の医薬組成物。

【請求項5】

前記走化性因子阻害剤がサイトカイン阻害剤である、請求項1～4のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項6】

前記サイトカインが炎症性サイトカインである、請求項5に記載の医薬組成物。

【請求項7】

前記炎症性サイトカインが、IL-1、TNF-α、IL-6、IFN-α、IFN-γ、IL-11、TGF-β、LIF、IL-8、PF-4、MIP-1α/β、MCP-1、MCP-2、MCP-3、Rantes、IL-12、およびリンホタクチンからなる群から選択される、請求項6に記載の医薬組成物。

【請求項8】

前記サイトカインがTNF-αである、請求項7に記載の医薬組成物。

【請求項9】

前記サイトカインがMCP-1である、請求項7に記載の医薬組成物。

【請求項10】

前記阻害剤が、抗体、アンタゴニスト、可溶性結合タンパク質、可溶性受容体変異体、非機能的誘導体、アンチセンスポリヌクレオチド、RNA干渉オリゴヌクレオチド、DNAザイム、リボザイム、三重鎖形成オリゴヌクレオチド(TFO)、および化学的または生物学的化合物からなる群から選択される化合物である、請求項1～9のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項11】

走化性因子阻害剤を含んでなる、組織変性状態の処置に用いるための医薬組成物であって、前記走化性因子阻害剤が幹細胞の脂肪組織への遊走を阻害する、医薬組成物。

【請求項12】

前記組織変性状態が肥満症依存性組織変性である、請求項11に記載の医薬組成物。

【請求項13】

前記組織変性状態が骨格筋変性、心臓組織変性、骨組織変性、神経組織変性、肺変性、肝臓変性、腎臓変性または同時の2つ以上の前記組織変性状態である、請求項11または12に記載の医薬組成物。

【請求項14】

前記幹細胞が内因性幹細胞または移植された幹細胞である、請求項 11～13 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

前記幹細胞が間葉系幹細胞である、請求項 11～14 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

前記走化性因子阻害剤がサイトカイン阻害剤である、請求項 11～15 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

前記サイトカインが炎症性サイトカインである、請求項 16 に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

前記炎症性サイトカインが、IL-1、TNF-α、IL-6、IFN-α、IFN-γ、IL-11、TGF-β、LIF、IL-8、PF-4、MIP-1a/b、MCP-1、MCP-2、MCP-3、Rantes、IL-12、およびリンホタクチンからなる群から選択される、請求項 17 に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

前記サイトカインが TNF-α である、請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

前記サイトカインが MCP-1 である、請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

前記阻害剤が、抗体、アンタゴニスト、可溶性結合タンパク質、可溶性受容体変異体、非機能的誘導体、アンチセンスポリヌクレオチド、RNA 干渉オリゴヌクレオチド、DNA ザイム、リボザイム、三重鎖形成オリゴヌクレオチド (TFO)、および化学的または生物学的化合物からなる群から選択される化合物である、請求項 11～20 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 22】

肥満症の処置のためおよび／または組織変性状態の処置のための化合物の同定のためのイン・ビトロの方法であって、

i) 幹細胞の集団を、それらを走化性因子に向かって遊走させる条件で培養すること；

ii) 工程 i) による細胞集団を試験化合物と接触させること；および

iii) 前記細胞集団の遊走能力を評価すること；

を含んでなる方法

{ここで、前記化合物が前記幹細胞の遊走を阻害する能力のある場合には、前記試験化合物が肥満症および／または組織変性状態の処置のための医薬として使用されうること示す}。

【請求項 23】

前記走化性因子がサイトカインである、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記サイトカインが炎症性サイトカインである、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記炎症性サイトカインが、IL-1、TNF-α、IL-6、IFN-α、IFN-γ、IL-11、TGF-β、LIF、IL-8、PF-4、MIP-1a/b、MCP-1、MCP-2、MCP-3、Rantes、IL-12、およびリンホタクチンからなる群から選択される、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記幹細胞が間葉系幹細胞である、請求項 22～25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

前記組織変性状態が肥満症依存性組織変性である、請求項 22～26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

肥満症の処置のためおよび／または組織変性状態の処置のための化合物のイン・ビボでの同定のための方法であって、

i) 試験化合物を非ヒト動物に投与すること（ここで、前記動物は対照動物と比べて幹細胞の脂肪組織への遊走を増大させていることを特徴とする）；および

i i) 前記動物における前記細胞集団の分布を評価すること；
を含んでなる方法。

{ここで、前記化合物が前記幹細胞の脂肪組織への遊走を阻害する能力のある場合には、前記試験化合物が肥満症および／または組織変性状態の処置のための医薬として使用されうること示す}。

【請求項 29】

前記非ヒト動物が遺伝子改変動物である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記幹細胞が間葉系幹細胞である、請求項 28 または 29 に記載の方法。

【請求項 31】

組織変性状態の処置のための化合物の同定のための非ヒト動物の使用であって、前記動物が対照動物と比べて幹細胞の脂肪組織への遊走を増大させていることを特徴とする、使用。

【請求項 32】

前記非ヒト動物が遺伝子改変動物である、請求項 31 に記載の使用。

【請求項 33】

前記幹細胞が間葉系幹細胞である、請求項 31 または 32 に記載の使用。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/063985

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/00

ADD. A61P3/04

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)

A61K

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, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2005/075293 A1 (NAG BISHWAJIT [US] ET AL NAG BISHWAJIT [US] ET AL) 7 April 2005 (2005-04-07) cf. abstract, sections [0002] to [0005] on page 1, in combination with example 17 on page 24, claims 26-28*	1-10
X	DATABASE WPI Week 200762 Thomson Scientific, London, GB; AN 2007-655821 XP002575812 & JP 2007 176814 A (NIMURA Y) 12 July 2007 (2007-07-12) abstract	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier 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

30 March 2010

Date of mailing of the international search report

21/06/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stoltner, Anton

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2009/063985

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. (means)

☒

on paper

☒

in electronic form

b. (time)

☒

in the international application as filed

☒

together with the international application in electronic form

☐

subsequently to this Authority for the purpose of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2009/063985

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-10

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2009/063985

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-10

A chemoattractant inhibitor for use as a medicament for the treatment of obesity, wherein said chemoattractant inhibitor is a cytokine inhibitor.

2. claims: 11-21(partially)

Chemoattractant inhibitor for use as a medicament for the treatment of a tissue degenerative condition, wherein said chemoattractant is a cytokine inhibitor and wherein said tissue degenerative condition is skeletal muscle degeneration.

3. claims: 11-21(partially)

Chemoattractant inhibitor for use as a medicament for the treatment of a tissue degenerative condition, wherein said chemoattractant is a cytokine inhibitor and wherein said tissue degenerative condition is cardiac tissue degeneration.

4. claims: 11-21(partially)

Chemoattractant inhibitor for use as a medicament for the treatment of a tissue degenerative condition, wherein said chemoattractant is a cytokine inhibitor and wherein said tissue degenerative condition is bone tissue degeneration.

5. claims: 11-21(partially)

Chemoattractant inhibitor for use as a medicament for the treatment of a tissue degenerative condition, wherein said chemoattractant is a cytokine inhibitor and wherein said tissue degenerative condition is neural tissue degeneration.

6. claims: 11-21(partially)

Chemoattractant inhibitor for use as a medicament for the treatment of a tissue degenerative condition, wherein said chemoattractant is a cytokine inhibitor and wherein said tissue degenerative condition is lung degeneration tissue degeneration.

7. claims: 11-21(partially)

International Application No. PCT/EP2009/063985

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Chemoattractant inhibitor for use as a medicament for the treatment of a tissue degenerative condition, wherein said chemoattractant is a cytokine inhibitor and wherein said tissue degenerative condition is liver degeneration tissue degeneration.

8. claims: 11-21(partially)

Chemoattractant inhibitor for use as a medicament for the treatment of a tissue degenerative condition, wherein said chemoattractant is a cytokine inhibitor and wherein said tissue degenerative condition is kidney degeneration degeneration.

9. claims: 11-21(partially)

Chemoattractant inhibitor for use as a medicament for the treatment of a tissue degenerative condition, wherein said chemoattractant is a cytokine inhibitor and wherein said tissue degenerative condition is more than one of said tissue degenerative conditions.

10. claims: 22-30(partially)

An in-vitro/in-vivo method for the identification of compounds for the treatment of obesity comprising:
i) culturing a population of stem cells in conditions allowing them to migrate toward a chemoattractant;
ii) bringing into contact a cell population according to step i) with a test compound; and
III) evaluating the migration capacity of said cell population;

11. claims: 22-30(partially)

An in-vitro/in-vivo method for the identification of compounds for the treatment of a tissue degenerative condition comprising:
i) culturing a population of stem cells in conditions allowing them to migrate toward a chemoattractant;
ii) bringing into contact a cell population according to step i) with a test compound; and
III) evaluating the migration capacity of said cell population;

12. claims: 30-33

International Application No. PCT/EP2009 /063985

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

Use of a non-human animal for the identification of compounds for the treatment of a tissue degenerative condition, wherein said animal is characterized by an enhanced migration of stem cells to the adipose tissue when compared with a control animal.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/063985

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2005075293	A1	07-04-2005	US 2007037863 A1	15-02-2007
			WO 2005034981 A1	21-04-2005
JP 2007176814	A	12-07-2007	NONE	

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100111730

弁理士 伊藤 武泰

(72)発明者 ベアトリス、ゴンザレス、ガルベス

スペイン国マドリッド、トレス、カントス、パルケ、シエンティフィコ、デ、マドリッド、ペテエメ、サンティアゴ、グリソリア、2

(72)発明者 フアン、カルロス、ロドリゲス、シマデビリャ

スペイン国マドリッド、トレス、カントス、パルケ、シエンティフィコ、デ、マドリッド、ペテエメ、サンティアゴ、グリソリア、2

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA03 AA17 NA14 ZA701 ZB212 ZC412

4C085 AA14 BB17 CC23