

(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2010-526132

(P2010-526132A)

(43) 公表日 平成22年7月29日 (2010.7.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 7 6
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04	4 C 0 8 4
A 6 1 P 3/06 (2006.01)	A 6 1 P 3/06	4 C 0 8 6
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/12	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-507302 (P2010-507302)
 (86) (22) 出願日 平成19年5月7日 (2007.5.7)
 (85) 翻訳文提出日 平成22年1月4日 (2010.1.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2007/002232
 (87) 国際公開番号 W02008/136547
 (87) 国際公開日 平成20年11月13日 (2008.11.13)

(71) 出願人 509306605
 ユニヴァーシティー オブ ウルサン フ
 ァウンデーション フォー インダストリ
 ー コーオペレーション
 大韓民国 ウルサン 680-180 ナ
 ムグ ムゲオードン サン 29
 (74) 代理人 100147485
 弁理士 杉村 憲司
 (74) 代理人 100119530
 弁理士 富田 和幸
 (74) 代理人 100135172
 弁理士 野田 裕子

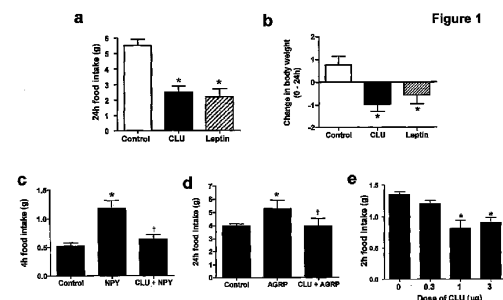
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 クラステリンを利用した体重疾患の予防または処置の方法

(57) 【要約】

【課題】 クラステリンを利用した体重調節障害関連疾患の予防または治療方法を提供する。

【解決手段】 クラステリンは、卓越した食欲抑制効果を表わすので、肥満または肥満関連疾患を治療するか防止するのに有用に使われ、臨床レベル以下の容量のクラステリンをレプチンとともに投与することによって、レプチンの食欲抑制効果を増強させることができる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

治療上有効な量のクラスτεリンを対象体に投与することを含むことを特徴とする対象体における肥満または肥満関連疾患を予防または処置する方法。

【請求項 2】

前記肥満関連疾患は、過食症、内分泌異常、トリグリセリド蓄積症、心臓病、高血圧、脳卒中、2 型糖尿病、耐糖能障害、多嚢胞性卵巣症候群、関節炎、インスリン抵抗性、粥状動脈硬化症、冠動脈疾患、高脂血症、胆嚢疾患、骨関節症、睡眠時無呼吸、非アルコール性脂肪性肝炎及び癌からなる群より選ばれることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記対象体は、哺乳類であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記哺乳類は、齧歯類、豚類、反芻動物及び霊長類からなる群より選ばれることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記霊長類は、ヒトであることを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記クラスτεリンは、製薬上の調製物であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記製薬上の調製物は、錠剤、カプセル剤、注射液、注射用懸濁剤、鼻腔内スプレー、または皮内パッチであることを特徴とする請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記クラスτεリンは、体重 $k g$ 当たり 0.001 ないし $1000 m g$ の一日投与量で投与されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記クラスτεリンは、視床下部内、脳室内、静脈内、腹膜内、経口、経皮または鼻腔内に投与されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記クラスτεリンは、レプチンとの併用で投与されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記クラスτεリンとレプチンは、 $0.01 : 1$ ないし $1 : 0.01$ の重量比で投与されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

対象体における肥満または肥満関連疾患の処置または予防するための薬の製造についてのクラスτεリンの使用。

【請求項 13】

前記肥満関連疾患は、過食症、内分泌異常、トリグリセリド蓄積症、心臓病、高血圧、脳卒中、2 型糖尿病、耐糖能障害、多嚢胞性卵巣症候群、関節炎、インスリン抵抗性、粥状動脈硬化症、冠動脈疾患、高脂血症、胆嚢疾患、骨関節症、睡眠時無呼吸、非アルコール性脂肪性肝炎及び癌からなる群より選ばれることを特徴とする請求項 12 に記載の使用。

【請求項 14】

前記対象体は、哺乳類であることを特徴とする請求項 12 に記載の使用。

【請求項 15】

前記哺乳類は、齧歯類、豚類、反芻動物及び霊長類からなる群より選ばれることを特徴とする請求項 13 に記載の使用。

【請求項 16】

前記霊長類は、ヒトであることを特徴とする請求項 14 に記載の使用。

【請求項 17】

10

20

30

40

50

前記薬は、錠剤、カプセル剤、注射液、注射用懸濁剤、鼻腔内スプレー、または経皮用パッチであることを特徴とする請求項 12 に記載の使用。

【請求項 18】

前記薬は、0.1 ないし 99.5 重量%のクラステリンを含有することを特徴とする請求項 12 に記載の使用。

【請求項 19】

前記薬は、抗肥満薬をさらに含有することを特徴とする請求項 12 に記載の使用。

【請求項 20】

前記抗肥満薬は、レプチンを含有することを特徴とする請求項 19 に記載の使用。

【請求項 21】

前記薬は、クラステリンとレプチンとを 0.01 : 1 ないし 1 : 0.01 の重量比で含有することを特徴とする請求項 20 に記載の使用。

【請求項 22】

クラステリンと製薬上薬許容可能な担体とを含むことを特徴とする対象体における肥満または肥満関連疾患を処置または予防するための薬学組成物。

【請求項 23】

前記肥満関連疾患は、過食症、内分泌異常、トリグリセリド蓄積症、心臓病、高血圧、脳卒中、2 型糖尿病、耐糖能障害、多嚢胞性卵巣症候群、関節炎、インスリン抵抗性、粥状動脈硬化症、冠動脈疾患、高脂血症、胆嚢疾患、骨関節症、睡眠時無呼吸、非アルコール性脂肪性肝炎及び癌からなる群より選ばれていることを特徴とする請求項 22 に記載の薬学組成物。

【請求項 24】

前記対象体は、哺乳類であることを特徴とする請求項 22 に記載の薬学組成物。

【請求項 25】

前記哺乳類は、齧歯類、豚類、反芻動物及び霊長類からなる群より選ばれていることを特徴とする請求項 24 に記載の薬学組成物。

【請求項 26】

前記霊長類は、ヒトであることを特徴とする請求項 25 に記載の薬学組成物。

【請求項 27】

前記薬学組成物は、製薬上の調製物であることを特徴とする請求項 22 に記載の薬学組成物。

【請求項 28】

前記製薬上の調製物は、錠剤、カプセル剤、注射液、注射用懸濁剤、鼻腔内スプレー、または皮内パッチであることを特徴とする請求項 27 に記載の薬学組成物。

【請求項 29】

前記薬学組成物は、0.1 ないし 99.5 重量%のクラステリンを含有していることを特徴とする請求項 22 に記載の薬学組成物。

【請求項 30】

前記薬剤は、
抗肥満薬をさらに含有していることを特徴とする請求項 22 に記載の薬学組成物。

【請求項 31】

前記抗肥満薬は、レプチンを含有していることを特徴とする請求項 30 に記載の薬学組成物。

【請求項 32】

前記薬学組成物は、クラステリンとレプチンとを 0.01 : 1 ないし 1 : 0.01 の重量比で含有していることを特徴とする請求項 31 に記載の薬学組成物。

【請求項 33】

治療上有効な量のクラステリン-エンコーディング遺伝子を対象体に投与することを含むことを特徴とする対象体における肥満または肥満関連疾患を予防または処置する方法。

【請求項 34】

10

20

30

40

50

前記遺伝子は、ウイルス性または非ウイルス性ベクターにおいてクローン化されることを特徴とする請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記ウイルス性ベクターは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルパー依存型アデノウイルス及びレトロウイルスのベクターからなる群より選ばれることを特徴とする請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

クラステリン-エンコーディング遺伝子は、対象体に視床下部内、脳室内または髄腔内の注入によって投与されることを特徴とする請求項 33 に記載の方法。

【請求項 37】

クラステリン発現が下方制御される調節物質を治療上有効な量で対象体に投与することを含むことを特徴とするやせた対象体における食欲減退を処置または予防する方法。

【請求項 38】

前記食欲減退は、癌関連食欲減退、神経性食欲減退または仮性食欲減退であることを特徴とする請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記調節物質は、クラステリン遺伝子発現に対する RNA 干渉を仲介する RNA、クラステリンの転写抑制物質、転写されたクラステリン mRNA の翻訳抑制物質及びクラステリン局在化の抑制物質からなる群より選ばれることを特徴とする請求項 37 に記載の方法。

【請求項 40】

前記 RNA 干渉を仲介する RNA は、アンチセンス RNA、干渉 RNA、短ヘアピン RNA (shRNA) または低分子干渉 RNA (siRNA) であることを特徴とする請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記短ヘアピン RNA は、配列番号 1 のヌクレオチド配列を有した cDNA に相補的であることを特徴とする請求項 40 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、治療上有効な量のクラステリンを対象体に投与することを含む、対象体における肥満または肥満関連疾患を予防または処置する方法、肥満または肥満関連疾患の処置または予防のための薬の製造についてのクラステリンの使用、クラステリン発現を下方制御する治療上有効な量の調節物質を対象体に投与することを含む、やせた対象体における食欲減退を処置または予防する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

肥満は、エネルギー摂取がエネルギー支出を超えるとときに正のエネルギー収支の結果として発生する。

【0003】

正常状態の下で、過剰なエネルギーは脂肪として貯蔵される。末梢からのいくつかの因子、例えば、レプチンおよびインスリンは、このプロセスによって影響を受けることが信じられ、そしてある程度既知である (Schwartz M. W. ら、Nature、404: 661-671、2000)。これらの因子は、食べ物摂取 (摂食、food intake) (およびおそらくエネルギー支出) のプロセスに影響を及ぼすことができ、そしてエネルギー収支を中立に戻す。

【0004】

エネルギー収支を調節することでのこの正常なフィードバックシステムは、肥満およびその関連する疾患を防ぐ保護システムである。しかし、哺乳類はこのフィードバックシステムをたやすく乗り越え、肥満誘導疾病および疾患がもたらされる。肥満誘導疾患は他の恒常性システム、例えば、グルコースまたは脂質の恒常性の不安定化に関係し、結局は、

10

20

30

40

50

減らされた (diminished) インスリン分泌および増加したインスリン抵抗性に関係する耐糖能障害が導かれる (Kopelman P. G.ら、Nature、404: 635-643、2000)。肥満誘導疾患の根底にある正確な機構は十分には理解されていない。

【0005】

レプチンは、主として脂肪細胞によって分泌されるペプチドであり、本能的欲望、特に食欲、エネルギー代謝およびニューロン内分泌機能を調節する (regulates) (Halaas J. L.ら、Science、269: 543-546、1995)。視床下部に作用することによって、レプチンは摂食を減らす、エネルギー支出を刺激し、体脂肪量 (body fat mass) における減少が導かれる。レプチンまたはレプチン受容体の欠乏は、人間および動物における病的肥満および過食症 (hyperphagia) を引き起こす (Montague C. T.ら、Nature、387: 903-908、1997; Clement K.ら、Nature、392: 398-401、1998)。

10

【0006】

しかし、ヒトの肥満の大部分は、高められた血しょう中レプチンレベル (濃度) に関係し、レプチンに対する抵抗性がヒトおよびげっ歯類における肥満の主な原因であると示唆されている (Maffei M.、Nat. Med.、1: 1155-1161、1995; 及び Fredrich R. C.、Nat. Med.、1: 1311-1314、1995)。脳において減らされたレプチンの信号伝達または中枢神経系に対するレプチンの減少した運搬は、肥満の対象体におけるレプチンに対する低減された (reduced) 感受性についての根底にある機構として示唆された (Halaas J. L.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、94: 8878-8883、1997; 及び Banks W.A.、Curr. Pharm. Des.、7: 125-133、2001)。しかし、レプチン抵抗性についての分子機構は大部分が知られていない。

20

【0007】

クラステリン (クラスタリン) (また、アポリポタンパク質 J と称される) は、多様な (various) 組織および体液において幅広く分布する 70~80 kD (キロダルトン) のジスルフィド連結された (disulfide-linked) ヘテロ二量体の (heterodimeric、heterodimeric) タンパク質である。クラステリンは、単一遺伝子によってエンコードされ、その翻訳 (蛋白) 産物は、その α 鎖及び β 鎖を生成させるために内部的に開裂され、それは 5 個のジスルフィド結合によって連結されている (Jones S. E.ら、Int. J. Biochem. Cell Biol.、34: 427-431、2002)。クラステリンは、最終質量の 30% が N 結合型糖質であるように広範囲にわたってグリコシル化 (糖鎖付加) されている。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献 1】Banks W.A.、Curr. Pharm. Des.、7: 125-133、2001

【非特許文献 2】Jones S. E.ら、Int. J. Biochem. Cell Biol.、34: 427-431、2002

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

クラステリンは、1983年に、ラムの精液での分泌された糖タンパク質として初めて記載され、それはインビトロで多様な細胞の凝集 (“クラステリング”) を増強させる (Fritz I. B.ら、Biol. Reprod.、28: 1173-1188、1983)。細胞内クラステリンは、分化、増殖及び細胞死を含む多様な生物学的プロセス中だけでなく、多くの異なるタイプ (種類) のストレス及び細胞傷害性の原因 (cytotoxic insults) によっても上方制御される (Troughakos I. P.ら、Exp. Gerontol.、37: 1175-1187、2002; 及び Choi-Miura N. H.ら、Neurobiol. Aging、17: 717-722、1996)。クラステリンは、脂質輸送、がん細胞残存及びアポトーシス (予定死)、脂質輸送、すい臓 β 細胞の再生及びアルツハイマー病 (Jenne D. E.ら、J. Biol. Chem.、266: 11030-11036、1991; Shannan B.ら、J. Mol. Histol.、37: 183-188、2006; Kim B. M.ら、Diabetologia、49: 311-320、2006; 及び Matsubara E.ら、Biochem. J.、316: 671-679、1996)。しかし、その特定の役割 (群) についてははっきりと説明されていない。またクラステリンは、細胞から分泌され、そして細胞外の

40

50

シャペロンとしての役割を行う (Humpleys D.ら、J. Biol. Chem.、274: 6875-6881、1999)。

【0010】

最近、クラステリンは、レプチン作用を調節する血しょうタンパク質を同定するための取り組みにおいて、レプチン結合タンパク質として識別された (Bajari T. M.ら、FASEB J.、17: 1505-1507、2003)。また、クラステリンは、視床下部、摂餌及びエネルギー恒常性の調節中枢で高度に発現される (Danik M.ら、J. Comp. Neurol.、334: 209-227、1993)。

【0011】

本発明者らは、クラステリンが、視床下部において作用し、そして摂食及び体重を減らして、食欲を減退させる分子であることを見出した。

10

【0012】

(発明の概略) したがって、本発明の目的は、対象体 (個体) で体重 (関連) 疾患を処置 (治療) または予防する方法を提供することである。

【0013】

本発明の他の目的は、対象体において体重関連疾患を処置または予防するための薬剤 (作用剤) を提供することである。

【0014】

本発明のまた他の目的は、前記作用剤を含有する、対象体において体重関連疾患を処置または予防するための製薬上の組成物 (薬学組成物) を提供することである。

20

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明の一側面によれば、治療上有効な量のクラステリンを対象体に投与することを含む、肥満または肥満関連疾患を対象体において処置または予防する方法が提供される。

【0016】

本発明の他の側面によれば、対象体において肥満または肥満関連疾患を処置または予防するための薬の製造についてのクラステリンの使用が提供される。

【0017】

本発明のまた他の側面によれば、クラステリン及び製薬上許容可能な担体を含む、対象体において肥満または肥満関連疾患を処置または予防するための薬学組成物が提供される。

30

【0018】

本発明のさらに他の側面によれば、クラステリン発現が下方制御される治療上有効な量の調節物質を対象体に投与することを含む、やせた対象体における食欲減退を処置または予防する方法が提供される。

【0019】

本発明では、クラステリンがげっ歯類において著しい体重減少を誘発するという事実を最初に証明した。このような体重上のクラステリンの効果は、レプチンの、よく知られた強力な食欲減退ホルモンの効果に匹敵する。クラステリン誘導重量減少は、減らされた摂食及び増やされたエネルギー支出及び酸素消費を介して媒介される。クラステリンペプチド (タンパク質) を外因性に投与する効果と同様に、例では、視床下部及び側脳室へのクラステリン遺伝子治療も摂食量と体重の延長された減少を引き起こす。脳室を介するクラステリン遺伝子療法が、視床下部内遺伝子療法よりも効果的であるということは注目される。したがって、クラステリン遺伝子を脳室のシステム中に配送することは、肥満対象体において別の良好な治療上の選択肢でありうる。

40

【0020】

視床下部におけるクラステリン生産は、摂食とレプチン投与後に増加するが、これは、増加した視床下部性クラステリンが生理的満腹信号であることを指し示す。しかし、食餌誘導肥満の動物モデルにおいて、代謝性変化による視床下部性クラステリン発現における変更は著しく鈍化され、クラステリンの不調な調節 (disordered regulation) が肥満の

50

動物及び人間における過食及びの体重増加に寄与しうることが示唆される。以前に報告されたように (van Dijk G.ら、Endocrinology、146: 547-56、2005)、中枢レプチン抵抗性は7週間高脂肪食餌を供給した肥満マウスにおいて進行する (developed in)。注目に値するように、クラスτεリンは、レプチン抵抗性をもつこれらの肥満動物において摂食を減少させることができる。このような事実から、あるものは中枢レプチン抵抗性がクラスτεリンの上流の生理学的プロセスで起こり、そしてクラスτεリンが、食欲減退及び減量を誘導し、レプチン抵抗性を迂回する抗肥満薬剤として用いることができるという結論を導出することができる。

【0021】

レプチンの発見は、自然の化合物が悪影響を伴わないで減量を引き起こすことができることを見出されたとして希望が高まった。しかし、肥満の人々の大部分は、高レベルの循環レプチンをもち、レプチン抵抗性が指し示される。このように、肥満を処置するためのレプチンの臨床治験は、ほとんどのヒト肥満においてそれほど好結果でなかった (Proietto J.ら、Expert Opin. Investig. Drugs、12: 373-378、2003)。本発明では、クラスτεリンのサブ臨床的 (亜臨床的) な用量の同時投与はレプチン感受性を高める。このようにして、クラスτεリンは、レプチンの作用を高めるためにレプチンと共に用いることができる。

【0022】

クラスτεリンは、脈絡叢、大脳脳室の内膜上皮 (lining epithelium) 及び血液脳関門 (BBB、blood-brain barrier) において高度に発現される (Danik M.ら、J. Comp. Neurol.、334: 209-227、1993)。クラスτεリンは、BBBを通してアミロイドβの輸送に関与することが示されている (Zlocovic B. V.ら、Biochem. Biophys. Res. Commun.、205: 1431-1437、2005)。したがって、クラスτεリンを使ってBBBを通したレプチン輸送を調節することが可能である。

【図面の簡単な説明】

【0023】

本発明の上記及び他の目的及び特長は、以下の本発明の説明から、添付図面と関連して参照することで明らかにされる。図は各々以下のものを示す。

【図1a】クラスτεリンの食欲減退効果を示すグラフである。(a) C57BL/6Jマウスで、クラスτεリン (1μg) 及びレプチン (1μg) を脳室内 (ICV) に投与した時、一晩での迅速な摂食及び体重増加の減少が続く (n=6~7)。* P<0.01 (生理食塩水を投与した対照群と比べる)。

【図1b】図1aと同様である。

【図1c】図1aと同様のグラフであって、(c) クラスτεリン (1μg) の脳室内投与がニューロペプチドY (NPY、2μg) 及びアグーチ関連タンパク質 (Agouti-related protein) (AGRP、3μg) -誘導性過食症をブロック (遮断) した (n=6)。* P<0.05 (対照群と比べる)。* P<0.05 (NPYまたはAGRPの群と比べる)。

【図1d】図1cと同様である。

【図1e】図1aと同様のグラフであって、(e) 摂餌効果に関するクラスτεリンの用量反応性研究 (n=7)。* P<0.05 (対照群と比べる)。データは平均±SEM (標準誤差) である。

【図2a】視床下部及び上衣内膜上皮 (ependymal lining epithelium、ependymal lining epithelium) における増加したクラスτεリン発現が拒食症及び脂肪損失を誘導することを示すグラフである。(a) クラスτεリンエンコーディングアデノウイルス (CLU-Ad、10¹⁰ プラーク形成単位 (p.f.u.) の1μL) を両側性の基底正中の視床下部への注入は、4日間摂食を、及び3日間体重を減少させた (n=5)。オープン円 (○)、緑色蛍光タンパク質 (GFP) をエンコードするアデノウイルス (GFP-Ad) 投与群；満たされた円 (●)、クラスτεリンエンコーディングアデノウイルス (CLU-Ad) 投与群；* P<0.05 (GFP-Ad投与群と比べる)。

【図2b】図2aと同様である。

10

20

30

40

50

【図 2 c】図 2 a と同様のグラフであって、(c) CLU-Ad の視床下部内の注入後 4 日目で、上衣 (Epidydimal、Ependymal) 脂肪重量が減少した (n=5)。* $P < 0.05$ 。

【図 2 d】図 2 a と同様のグラフであって、(d) CLU-Ad の視床下部内の注入後 2 日目の増加したエネルギー支出及び酸素消費である (n=5)。* * $P < 0.05$ 。

【図 2 e】図 2 d と同様である。

【図 2 f】図 2 a と同様のグラフであって、(f) CLU-Ad (10^8 プラーク形成単位の $5 \mu\text{L}$) の両側性の側脳室への注入は、CLU-Ad の視床下部内注入のものに比べて、体重、摂食及び上衣 (epidydimal、ependymal) 脂肪重量における著しい減少を誘導した (n=6)。オープン円 (○)、GFP-Ad；満たされた円 (●)、CLU-Ad；* $P < 0.005$ 。

10

【図 2 g】図 2 f と同様である。

【図 2 h】図 2 f と同様である。

【図 3 a】視床下部における減少したクラスτεリン発現が、摂食及び体重を増加させることを示すグラフである。(a) マウスクラスτεリンに対する短ヘアピン RNA をエンコードするアデノウイルス (CLU-shRNA-Ad、 10^{10} プラーク形成単位の $1 \mu\text{L}$) の両側性の視床下部内注入は、摂食及び体重を増加させた (n=5)。オープン円 (○)、GFP-Ad；満たされた円 (●)、CLU-shRNA-Ad；* $P < 0.05$ (GFP-Ad 投与した対照群と比べる)。

【図 3 b】図 3 a と同様である。

【図 3 c】図 3 a と同様のグラフであって、(c) CLU-shRNA-Ad を注入されたマウスにおける増加した上衣 (epidydimal、ependymal) 脂肪重量である (n=5)。* * $P < 0.05$ (GFP-Ad 投与した対照群と比べる)。データは平均 $\pm$ SEM である。

20

【図 3 d】図 3 a と同様のグラフであって、(d) GFP-Ad または CLU-shRNA-Ad を注入されたマウスにおける視床下部性クラスτεリン発現である。

【図 4 a】正常マウスにおける視床下部性クラスτεリンの変化を示す実験結果である。(a) 視床下部性クラスτεリンタンパク質発現は、摂食を回復させ、次いで 24 時間の絶食後、30 分、1 時間及び 3 時間で増加した (n=5)。* $P < 0.05$ 、* * $P < 0.01$ (24 時間絶食させた群と比べる)。

【図 4 b】図 4 a と同様の結果であって、(b) ICV レプチンの視床下部性クラスτεリン発現上の効果 ($1 \mu\text{g}$) である (n=5~6)。* $P < 0.01$ (生理食塩水投与群と比べる)。

30

【図 5 a】食餌誘導肥満 (diet-induced obesity、DIO) の動物モデルにおける視床下部性クラスτεリン発現の不調な調節及び DIO マウスにおけるクラスτεリンの抗肥満効果を示す実験結果である。(a) 摂食およびレプチンは高脂肪食餌 (HFD、60% 脂肪) において飼育されたマウスで視床下部性クラスτεリン発現を増加させなかった (n=6)。

【図 5 b】図 5 a と同様の結果である。

【図 5 c】図 5 a と同様の結果であって、(c) クラスτεリン及びレプチンの ICV 投与は、HFD を 4 週間供給されたマウスにおいて摂食を低下させた。

【図 5 d】図 5 c と同様の結果であって、(d) レプチンの食欲減退効果は、HFD を 7 週間供給されたマウスにおいて減弱され、中枢レプチン抵抗性がこれらの動物において進行することが示唆された。しかし、クラスτεリンの食欲減退効果は、HFD を 7 週間供給されたマウスにおいて持続した (n=6)。* $P < 0.01$ (生理食塩水投与群と比べる)。

40

【図 6 a】クラスτεリンが、レプチン感受性を摂食及び STAT3 活性化に関して増加させることを示す実験結果である。(a) 極めて低用量でのクラスτεリンとレプチンとの ICV 同時投与は、各々単独では摂食での効果をほとんどもたないが、24 時間の摂食及び体重の有意な減少を誘導した (n=5~6)。* $P < 0.05$ 、* * $P < 0.01$ 、生理食塩水投与群とそれぞれ比べる。

【図 6 b】図 6 a と同様の結果である。

【図 6 c】図 6 a と同様の結果であって、(c) ホスホ (リン酸化された) STAT3 (

50

シグナル伝達物質活性化転写物 3) に対する抗体を用いる免疫組織化学検査である。レプチンは、弓状核 (ARC) 及び視床下部腹内側核 (VMH) のような視床下部核において STAT3 リン酸化 (phosphorylation、phosphorylation) を増加させた。またクラステリンは、視床下部性 ARC、脈絡叢 (choroid plexus、choroid plexus)、及び脳室内膜上皮細胞における STAT3 リン酸化を増加させた。

【図 6 d】図 6 a と同様の結果であって、(d) クラステリンの処置 (1nM) は、一次培養された視床下部性ニューロンにおけるホスホ STAT3 及び SOCS3 (サイトカインシグナル伝達系の抑制物質 3、suppressor of cytokine signaling-3) の発現を増加させた。

【図 6 e】図 6 a と同様の結果であって、(e) レプチン (10nM) 及びクラステリン (0.01 あるいは 0.1nM) をともに処理すれば、STAT3 活性化を誘導したが、レプチンおよびクラステリンのこの小用量は STAT3 の活性化を誘導しない。

【発明を実施するための形態】

【0024】

以下、本発明の 1 種またはそれよりも多くの具現例の詳細を付随する次の記載において説明する。本発明の他の特長、目的、及び利益は、下記の詳細な説明、図面及び特許請求の範囲から明瞭になる。本明細書に言及されるすべての刊行物、特許出願、特許、及びその他の参考文献は、参照することによりそれらの全体が組み込まれる。

【0025】

以下に別に規定しない限り、本出願で用いるすべての技術的及び科学的用語は、この技術における通常の技量の者に普通に理解されるのと同じ意味をもつことが意図され、そして本出願で採用する技術の参照は、この技術において普通に理解されるような技術に言及することが意図され、それには、この技術における熟練者に明らかなそれらの技術上の変形または等価な技術の置き換えが含まれる。以下の用語はこの技術における通常の技量の者によって十分に理解されると信じられるが、以下の定義を、本発明の説明を助けるために示す。

【0026】

本発明は、肥満と食欲減少とを含む体重関連疾患を治療または予防するための新たな作用剤であるクラステリンに関するものである。

【0027】

本出願で用いるように、用語“体重(関連)疾患”は、正常でない(例では、正常値よりも高いまたは低いいずれかの)体重によって特徴付けられる疾患を意味する。例えば、18 未満、または 25 よりも高い肥満度指数 (Body Mass Index、BMI、体質量指数) を有する個体は、正常でない体重をもつ。体重関連疾患の例には、肥満、拒食症、悪液質、過食症、多嚢胞性卵巣病、視床下部症候群、プラダーウィリ症候群、フレリッヒ症候群、GH (成長ホルモン) 欠損対象体 (患者)、ターナー症候群及び他の肥満関連疾患が含まれる。

【0028】

本発明で用いるように、“肥満”は、骨格及び身体的な要求条件を乗り越える体重増加を意味し、これは身体での脂肪組織の過度な蓄積の結果である。“肥満 (obesity)”または“太っている (obese)”の 1 種の非制限的な定量的定義は、理想的な体重より少なくとも約 5 % 超過した対象体であり、これは理想的な体重の少なくとも約 10 %、15 %、20 %、30 % またはそれよりも超過した対象体も含むものである。この際、超過体重の少なくとも一部は、過度な脂肪組織である。本明細書で用いるような、“肥満”または“太っている”のまた他の有用な非制限的な定量的定義は、 25 kg/m^2 またはそれよりも高い体質量指数 (BMI) をもつとして定義される (National Institutes of Health, Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults、1998)。肥満は、多種多様な異なる疾患と関係し、そして関与する (Nishina, P. M. et al., Metab., 43: 554-558、1994; Grundy, S. M. & Barnett, J. P., Dis. Mon., 36: 641-731、1990 参照)。

10

20

30

40

50

【0029】

本明細書で用いるように、語句“肥満関連疾患”は、任意の疾病、疾患及びを／または病気に言及し、その徴候は対象体における過度な脂肪組織と関係する。肥満関連疾患は、この技術において熟練する者（当業者）によく知られている。肥満関連疾患の非制限的な例は、過食症、内分泌異常、トリグリセリド蓄積症、心臓病、高血圧、脳卒中、2型糖尿病、耐糖能障害、多嚢胞性卵巣症候群、関節炎、インスリン抵抗性、粥状（アテローム性）動脈硬化症、冠動脈疾患、高脂血症（例では、コレステロール、トリグリセリド及びリポタンパク質の高められた循環レベル）、胆嚢疾患、骨関節症（炎）、睡眠時無呼吸（症）、非アルコール性脂肪性肝炎、及び癌である。対象体が肥満に関係する疾患に苦しむというためには、必ずしも臨床的に肥えている必要はないことが理解される。これらの対象体及び一般に肥満に関係するこれらの対象体によって患われる疾患は、語句“肥満関連疾患”の範囲内に含まれるよう意図される。

10

【0030】

本明細書で用いるように、“処置する（治療する）”または“処置（治療）”は、疾病、状態、または疾患に対処する目的で受動体（患者）を管理及び手当て（ケア）することに言及する。処置には、徴候または合併症の発生を防ぐための活性な薬剤の管理（投与）が含まれ、徴候または合併症が軽減され、または疾病、状態、または疾患が排除される。

【0031】

本明細書で用いるように、“予防する”または“予防”は、処置薬剤が肥満状態の発生に先立って投与される場合、肥満または肥満関連疾患が起こるのを防ぐことに言及する。また、肥満または肥満関連疾患を既に患うか、または徴候をもつ対象体（患者）において処置が始められる場合、そのような処置は、肥満または肥満関連疾患の進行を予防すると期待される。

20

【0032】

本発明で用いるような“製薬上（薬剤学的に）許容可能な担体”には、採用する投薬量及び濃度で曝露される細胞または哺乳動物に非毒性である製薬上許容可能なキャリアー、賦形剤、または安定化剤が含まれる。薬剤学的に許容可能な担体は、水性pH緩衝液であることが多い。薬剤学的に許容可能な担体の例としては、リン酸、クエン酸及び他の有機酸と、アスコルビン酸を包含する酸化防止剤と、低分子量（約10残基より少ない）ポリペプチドと、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンのようなタンパク質と、ポリビニルピロリドンのような親水性ポリマーと、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリシンのようなアミノ酸と、グルコース、マンノース、またはデキストリンを包含する、単糖類、二糖類、及び他の糖質（炭水化物）と、EDTAのようなキレート試薬と、マンニトールまたはソルビトールのような糖アルコール類と、ナトリウムのような塩形成性対イオンと、及び／またはTWEEN^(R)〔ツイーン（商標）〕、ポリエチレングリコール（PEG）、タウロジヒドロフシジン酸ナトリウム（STDHF）及びPLURONICS^(R)〔プルロニック（商標）〕のような非イオン性界面活性剤とが含まれる。

30

【0033】

本発明は、肥満の危険性がある対象体において、クラスτεリンと、肥満及び肥満関連疾患の流行での減少との相互関係を最初に提供する。

40

【0034】

したがって、本発明は、クラスτεリンを用いて個体で肥満を治療または予防する方法を提供する。若干の具現例として、本発明による方法は、個体にクラスτεリンを投与することによって、個体の肥満を治療または予防することができる。また、そのような治療を必要とする個体で肥満関連疾患を治療または予防する方法を提供する。また、若干の具現例として、本発明の方法は、個体にクラスτεリンを投与することによって、肥満関連疾患を治療または予防することができる。上記具現例で、クラスτεリンは、薬剤学的に許容可能な塩で投与されてよい。そのような薬剤学的に許容可能な塩には、グルコン酸塩、乳酸塩、酢酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩、リン酸塩、マレイン酸塩、ホウ酸塩、硝酸塩、硫酸塩

50

、及び塩酸塩の塩が含まれる。

【0035】

若干の具現例として、肥満関連疾患は、過食症、内分泌系異常、トリグリセリド蓄積症、心臓病、高血圧、脳卒中、2型糖尿病、耐糖能障害、多嚢性卵巣症候群、関節炎、インスリン抵抗性、粥状動脈硬化症、冠状動脈硬化症、高脂血症、胆嚢疾患、骨関節炎、睡眠無呼吸症、非アルコール性脂肪肝炎、及び癌からなる群から選択されうる。

【0036】

また、本発明は、1種またはそれよりも多く（1つ以上）の追加的な活性作用剤とともにクラステリンを適切な比率で投与することによって、哺乳動物で肥満または肥満関連疾患を治療する方法を提供する。1つ以上の追加的な活性作用剤とともに使われるとき、化合物のこのような組合せは、相乗的な組合せが望ましい。相乗効果は、組合せで投与したときのそれらの化合物の効果が単一の薬剤として投与されたときのそれらの化合物の相加効果よりも高い場合に存在する。概して、相乗効果は、化合物の次善、すなわち最適以下の濃度で最も明確である。このようなさらなる活性作用剤は、抗肥満剤、抗糖尿病剤、抗高脂血症剤、抗高血圧剤及び肥満からもたらされるか、または肥満と関係する合併症の処置用の薬剤から選択されうる。好ましくは、このようなさらなる活性作用剤はレプチンである。若干の具現例で、クラステリン及びレプチンを0.01:1から1:0.01までに及ぶ重量比で、好ましくは、0.05:1から1:0.05までで投与することができる。

【0037】

治療方法と関連して、個体は、肥満及び／または肥満関連疾患を予防または治療する必要がある任意の対象体であることができる。例えば、既に肥満した対象体は、対象体の体重を、過度な脂肪組織を減少させるか、または対象体の体重をなお維持し、及び対象体においてさらに著しい脂肪組織の蓄積を防止することによって対象体の体重を減らすために処置されることができる。肥満または肥満に関係した疾患を防ぐために処置された対象体について、例えば、対象体が肥満または肥満に関係する疾患に対して素因となった場合、そのような処置を必要としていえることができる。例えば、対象体が肥満についての遺伝的素因をもつか、またはかつて肥満を患って、再度肥満になる危険性がある場合に、対象体は肥満または肥満に関係する疾患にかかりやすいと考えることができる。

【0038】

対象体は、脊椎動物の種であることができる。本発明の方法は、特に温血脊椎動物の治療において有用である。このように、本発明で請求する主題は、哺乳動物に関するものである。より一層詳しくは、本発明は、人間を包含する霊長類、ならびに絶滅の危機に瀕したことによって重要な哺乳類（シベリアトラのようなもの）、経済的に重要なもの（人間によって消費される農場で育てられる動物）及び／または人間に対して社会的に重要なもの（ペットになっているか、または動物園での動物）、例として、ヒト（人間）以外の肉食動物（ネコ及びイヌのようなもの）、豚類〔ピッグ（ブタ）、ホッグ（雄性ブタ）及びイノシシ〕、反芻動物〔カトル（ウシ）、オックス（雄性ウシ）、ヒツジ、キリン、シカ、ヤギ、バイソン及びラクダのようなもの〕及びウマのような哺乳類の治療を提供する。

【0039】

また、本発明では、制限されないが、飼いならされた豚類（ピッグ及びホッグ）、反芻動物、馬類、家畜類などのようなものを含み、家畜における疾病の治療が提供される。

【0040】

本発明はまた、クラステリン及び薬剤学的に許容可能な担体を含む薬学組成物を、肥満または肥満に関係する疾患の予防または治療のために提供する。薬学組成物のうち、クラステリン含量は0.1から99.5重量%までであり、より一層好ましくは0.5から90重量%まででありうる。追加的な調剤物及び用量調製物の技術（dose preparation techniques）は、この技術において記述されている（米国特許第5,326,902号、米国特許第5,234,933号、及びPCT国際公開WO 93/25521号に記載されているものを参照）。

【0041】

治療上の適用のために、本発明による治療の有効量の薬学組成物を個体に投与する。“治療上有効な量”または“有効量”は、制限されないが、体重または摂食における減少、及びエネルギー支出の増加のような、測定可能な生物学的反応を生成するのに十分な治療用組成物の量である。

【0042】

さらに、薬学組成物は、単独で、または他の治療（例では、食餌療法及び運動）及び／または治療用物質と組み合わせて投与することができる。

【0043】

例として、薬学組成物は、クラスτεリンを1種以上の追加的な活性作用剤と適した比率で組み合わせて含む。このようなさらなる活性作用剤は、抗肥満剤、抗糖尿剤、高脂血症治療剤、高血圧治療剤、及び肥満からもたらされるか、または肥満と関係する合併症の治療のための薬剤から選択されうる。好ましくは、このようなあらゆる活性作用剤は、レプチンであり、そしてその薬学組成物は、クラスτεリン及びレプチンを、重量比で0.01:1から1:0.01までに及ぶ、好ましくは0.05:1から1:0.05までで含んでよい。

【0044】

上述したような目的のために、クラスτεリンまたはそれを含む薬学組成物は通常、鼻腔内または非経口の投与によって全身的にまたは局所的に投与することができる。投与の経路には、制限されないが、視床下部内、脳室内、髄腔内（intrathecal、くも膜下腔内、硬膜内）、経口的、口腔内、経皮的、頰側の、肺性の、皮下的、筋肉内、皮内的、結腸内、眼球内（intraocular、intraocular）、静脈内、または腸管内の投与が含まれうる。薬学組成物は、許容可能な薬局実務に基づく投与経路に従って調剤される（Fingira、The Pharmacological Basis of Therapeutics、Ch. 1、p. 1、1975; Remington's Pharmaceutical Sciences、18 ed.、Mack Publishing Co、Easton、PA、1990において）。このようにして、調剤物は、錠剤、丸薬、粉体、サシェ（小袋、香り袋）、エリキシル剤、懸濁物、乳剤（エマルジョン）、溶液、シロップ、エアロゾル、軟質及び硬質ゼラチンカプセル、滅菌注射溶液、滅菌包装粉末などの形態が可能である。本発明による組成物は、患者への投与後に活性な原材料の急速な、持続的な、または遅延性の放出を提供するように、この技術においてよく知られた手法のいずれかを採用することによって調剤しうる。

【0045】

好ましくは、本発明の組成物は、鼻腔内の形態（例では、鼻腔内噴霧）において、適した鼻腔内ビークル（媒介物）の局所的使用を介し、または経皮的な経路を介して、経皮的な貼付剤（皮膚パッチ）を用いて、脳脊髄液（CSF、中枢神経系流体）中に投与することができる。経皮配送システムの形態において投与されるとき、投薬量の管理は、もちろん投薬量計画を通じて断続的よりはむしろ連続的である。

【0046】

多様な組成物及び投与形態が提供され、そしてこの技術において一般に知られている。投与のための他の組成物には、活性な物質（群）の1種以上を含み、そして既知の方法によって調製することができる外用のための液体、及び経皮性の塗布剤（軟膏など）、坐剤、及び腔坐剤が含まれる。

【0047】

本発明の薬学組成物は、標準的な、よく知られた非毒性の生理学的に許容可能な担体、アジュバント（補助剤）、及びビークルを含有する投薬量単位調剤物において、典型的に非経口で投与される。本発明で用いるように、用語“非経口”には、制限されないが、静脈内、筋肉内、動脈内の注射、または注入（インフュージョン）の技術が含まれる。注射可能な調剤物、例では、滅菌した注射可能な水性または油性の懸濁物は、適切な分散剤または湿潤剤及び懸濁化剤を用いて、この技術において既知の方法に従って調剤される。滅菌した注射可能な調剤物はまた、非毒性の非経口的に許容可能な希釈剤または溶媒、例えば、1, 3-ブタンジオールにおいて溶液として、滅菌した注射可能な溶液または懸濁物であることができる。

【0048】

採用することができる許容可能な担体及び溶媒の中には、水、リンゲル液、及び等張の塩化ナトリウム溶液がある。加えて、滅菌した、固定（不揮発性）油は、溶媒または懸濁化媒体として慣習的に採用される。このような目的で、任意の刺激が少ない固定油を採用することができ、それには合成のモノまたはジグリセリドが含まれる。加えて、オレイン酸のような脂肪酸を注射可能な溶液または懸濁物の調剤物において用いる。

【0049】

代表的で、非制限的な担体には、リン酸塩、乳酸塩、トリスなどを用いて緩衝化された中性生理食塩水溶液が含まれる。もちろん、担体及び治療上の組成物（群）を受け取る個体において何らかの都合の悪い反応を引き起こさないように、望ましくない汚染物質を本質的にフリー（含まないように）にするのに十分なように担体が精製される。

10

【0050】

薬学組成物においてクラステリンの実際の投薬量レベルは、特定個体に対する望ましい治療反応を達成するのに効果的な活性化化合物（群）の量を投与するように多様化させることができる。選定された投薬量レベルは多種多様な因子に基づき、これらには、制限されないが、薬学組成物の活性、調剤、投与の経路、他の薬物または治療との併用、及び治療される対象体の身体的状態及び以前の病歴が含まれる。若干の具現例で、最小用量が投与され、そしてその用量は、用量制限毒性の不存在において段階的に増加される。治療的に有効な用量の決定及び調整、ならびにこのような調整をいつどのようにするかに関する評価は、医学のこの技術における通常の技量の者によく知られている。

20

【0051】

一般的な指針として、指示された効果のために用いるとき、活性な原材料の一日の経口投薬量は、体重1 kg 当たり約0.001から1,000 mg までに及び、好ましくは体重1 kg 当たり1日当たり約0.01から100 mg までである。

【0052】

静脈内では、活性な原材料の毎日投薬量は、一定の速度での注入の間、毎分体重1 kg 当たり0.001 ng から100.0 ng までに及ぶことがあり得る。このように一定の静脈内注入は、好ましくは、毎分体重1 kg 当たり0.01 ng から50 ng までの速度、最も好ましくは、毎分体重1 kg 当たり0.1 ng から10.0 ng までで投与することができる。本発明の組成物は、単一での一日用量において投与しうるか、または一日総投薬量を一日に2回、3回、または4回の分割量で投与されうる。本発明の組成物はまた、所望のように、数日／数週間／数ヶ月の期間にわたり薬物を徐々に放出させることができるデポー（depot）調剤物によって投与されうる。

30

【0053】

本発明の一側面は、クラステリンをエンコード（暗号化）する遺伝子が備わるウイルスベクターを対象体に対して配送することを含む、対象体において肥満または肥満関連疾患を処置する方法に関するものである。

【0054】

異種クラステリン遺伝子は、ベクターまたは他の配送ビークルを用いて対象体に配送することができる。DNA 配送ビークルとしては、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルパー依存型アデノウイルス、及びレトロウイルスベクターのようなウイルスベクターを含むことができる。例えば、Chenら、Gene Ther., 1: 292-299 (1994) ; Coutureら、Hum. Gene Ther., 5: 667-277 (1994) ; 及びEiverhandら、Gene Ther., 2: 36-343 (1995) 参照。また適切である非ウイルス性ベクターとしては、DNA 脂質複合体、例えば、アシアロ糖タンパク質媒介配送システムのような、リボソーム媒介またはリガンド／ポリマーリシン接合体が含まれる。例えば、Felgnerら、J. Biol. Chem. 269: 2550-2561 (1994) ; Derossiら、Restor. Neurol. Neuros., 8: 7-10 (1995) ; 及びAbcallahら、Biol. Cell 85: 1-7 (1995) 参照。

40

【0055】

ウイルス性ベクターが配送ビークルとして選定される場合、それは、遺伝子が永久的に

50

発現されるように、宿主ゲノム中に組み込むことが可能なものであり得るが、これは必須要件ではない。ベクターが宿主ゲノム中に組み込まれない場合において、遺伝子の発現は永久的であるよりは一過性（一時的）である。

【0056】

ベクターは、一般的に視床下部内、脳室内または髄腔内の注入によって宿主に投与されるが、また、静脈内、筋肉内、腹腔内、経口、皮下または配送の他の形態でもよい。適切な力価は、選定された特定のベクター、宿主、用いられたプロモーターの強度及び治療される疾病の重症度のような、多数の要因に依存する。マウスについて、アデノウイルスベクターは、好ましくは、体重 g 当たり約 1.0×10^6 から 1.0×10^{10} までのプラーク（溶菌）形成単位（plaque forming unit、p.f.u.）（PFU）の用量範囲での注入として投与される。また、さらにより一層高い量がまた有用であり、そして 10^{12} 粒子まで用いることができる。

10

【0057】

所望の効果が一時的なものというよりもむしろ永続的なものである場合、ヘルパー依存性ウイルスベクターが利用されるのが好ましい。

これらのベクターとともに用いるのに適切であるプロモーターとしては、Moloney（モロニー）レトロウイルスLTR、CMVのプロモーター及びマウスアルブミンプロモーターが含まれる。複製効能がない（Replication competent free）ウイルスを生産し、そしてエキソビボ（生体外、ex vivo）で自家由来細胞の形質導入によって、その後のインビボ（生体内、in vivo）での注入によって、動物または人間に直接注入することができ、それは、Zatloukalら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、91: 5148-5152（1994）において記述されたようなものである。

20

【0058】

クラステリンコーディング（コード）配列はまた、in vivoまたはex vivoでクラステリンの発現用プラスミド中に挿入することができる。in vivo治療のために、コーディング配列を組織に直接注入することによってか、または静脈内注入することによって配送することができる。こういう風に用いるための適切なプロモーターとしては、CMVのような内因性及び異種プロモーターが含まれる。コーディング配列は、コーディング配列を安定化して、細胞中でのそのコーディング配列の形質導入を促進し、及び／またはターゲティング（標的）を提供することができる緩衝剤を含む調剤物において注入することができ、それは、Zhuら、Science、261: 209-211（1993）に記述されるようなものである。

30

【0059】

遺伝子治療目的のために、ウイルスまたは非ウイルスベクターのうち何れか一つによる配送の際のクラステリンコーディング配列のin vivoの発現は、調節された遺伝子発現プロモーターの使用によって、最大の効能及び安定性のために調節することができ、それは、Gossenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89: 5547-5551（1992）において記述されたようなものである。例えば、クラステリンコーディング配列は、テトラサイクリン反応性プロモーターによって調節することができる。これらのプロモーターは、調節物質分子を伴う処置によって正の、または負の様式において調節することができる。

40

【0060】

クラステリンコーディング配列の非ウイルス性の配送のために、その配列を、高レベル発現のための慣習的な対照群（コントロール）配列を含む慣習的なベクター中に挿入し、そしてその後、ポリマーDNA結合陽イオン様のポリリシン、プロタミン、及びアルブミンのような合成遺伝子導入分子とともにインキュベートすることができ、このような合成遺伝子伝達分子は、アシアロオロソムコイドで、Wu & Wu、J.Biol.Chem.、262:4429-4432（1987）に記載のようなもの、インスリン（インシュリン）で、Huckedら、Biochem. Pharmacol.、40: 253-263（1990）に記載のようなもの、ガラクトースで、Plankら、Bioconjugate Chem.、3: 533-539（1992）に記載のようなもの、ラクトースで、Midouxら、Nucleic Acids Res.、21: 871-878（1993）に記載のようなもの、またはトランスフェリンで、W

50

agnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、87: 3410-3414 (1990) に記載のようなものの細胞標的リガンドに連結される。

【0061】

他の配送システムには、多種多様な組織—特異的な、または普遍的に活性なプロモーターの調節下で、クラステリン遺伝子を含むDNAをカプセル化するために、リボソームの使用が含まれ、それは、Nabelら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90: 11307-11311 (1993)、及びPhilipら、Mol. Cell Biol.、14: 2411-2418 (1994) に記載されるようなものである。また、使用に適切な非ウイルス性の配送としては、微粒子銃の取り組み（バイオリスティクスアプローチ）のような機械的配送システムが含まれ、それは、Woffendinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、91: 11581-11585 (1994) に記載のようなものである。また、クラステリンコーディング配列は、光重合ヒドロゲル物質の堆積を通じて配送することもできる。クラステリンコーディング遺伝子の配送のために用いることができる遺伝子配送のための他の慣習的な方法には、例えば、ハンドヘルドの（携帯用）遺伝子導入パーティクルガンの使用で、米国特許第（USP No.）5,149,655号に記述されたようなもの、導入された遺伝子を活性化するための電離放射線（イオン化放射線）の使用で、USP No. 5,206,152、及びPCT公開第W092/11033号に記述されたようなものが含まれる。

【0062】

本発明はさらに、やせた対象体における食欲減退を処置または予防する方法を提供し、それは、クラステリン発現が効果的に下方制御（下向き調節）される調節物質（調節剤）を治療上有効な量で対象体に投与することを含む。

【0063】

食欲減退（食欲不振）は、癌関連食欲不振、神経性食欲不振、仮性食欲不振などを含む。

【0064】

代表的な調節物質の例としては、クラステリン遺伝子発現、その発現ベクターに対するRNA干渉を媒介することが可能なアンチセンスRNA、干渉RNA、短ヘアピンRNA（shRNA）、及び低分子干渉RNA（siRNA）で、そのmRNAレベルでクラステリン発現を下向き調節することができるものと、クラステリンの転写抑制物質（インヒビター）と、転写されたクラステリンmRNAの翻訳抑制物質と、クラステリン局在化の抑制物質とが含まれる。これらのうち、siRNAまたはshRNA及びその発現ベクターは好ましく、それは、少量で適用するときでさえも、特異的に、そして強力（有効）にクラステリン遺伝子発現を下向き調節することができるからである。より一層詳しくは、その調節物質は、shRNA及びその発現ベクター、配列番号1の核酸配列をもつ前記shRNAのcDNAである。

【0065】

siRNAまたはshRNAは、前述したように、対象体への異種クラステリン遺伝子の配送のために、ウイルスまたは非ウイルスのベクターまたは他の配送ビークルを用いて個体に対し配送されうる。

【0066】

さらに、クラステリン発現の調節物質は、薬学組成物または調剤物に調剤され、そして個体に、クラステリンに関連して、前述したように、多様な経路を介して投与されうる。

【実施例】

【0067】

次の例は、本発明をその範囲を制限することなく、さらに例証するためのものである。

【0068】

さらに、固体混合物において固体、液体中で液体、及び液体中で固体に関して、下記に与えるパーセンテージ（%）は、それぞれ重量／重量、容量／容量及び重量／容量を根拠にしたものであり、そしてすべての反応は、他に特別に指示されない限り、室温で遂行された。

参考例

【0069】

<動物>

成熟した雄C57BL/6JマウスとSprague-Dawleyラットは、大韓実験動物社（ソウル、韓国）から購入し、Lepr^oマウスは、日本SLC社（Shizuoka Ken、日本）から購入した。特別な言及がない限り、動物は標準食餌（三養社、ソウル、韓国）を自由に摂取した。それらは、調節された温度（24℃）と12時間明暗周期（午前6時から午後6時まで明条件）下で飼育された。すべての実験は、峨山生命科学研究動物実験倫理委員会に承認を受けて進行した。

【0070】

<統計分析>

データは、平均±標準誤差平均で表示した。統計分析は、SPSS-PC12（シカゴ、イリノイ）を使って行った。グループ間の統計的有意性は一元配置分散分析（ANOVA）後、事後LSD検定（Post-hoc LSD test）あるいは独立標本t-検定（unpaired Student's t test）を使って分析した。CLU-AdまたはCLU-shRNA実験結果は、反復一元配置分散分析を使って分析した。2方向ANOVAをCLU-RNAi-Ad発現マウスにおけるICVレプチンの調査のために用いた。有意性は、P値が0.05未満である時と定義した。

実施例1：クラステリンは拒食症及び体重減少を引き起こした

【0071】

クラステリンは、2つのイソ型、長分泌型（long secretory）（70-80kD）と短核型（short nuclear）（～45kD）とがある。組換えヒト分泌型クラステリン（アジポゼン、ソウル、韓国）で、ジスルフィド結合し、そしてグリコシル化したもので、ヒトの血漿クラステリンと類似したものを本研究において用いた。クラステリンの摂食及び体重に及ぼす効果を研究するために、C57BL/6Jマウス（各実験群についてn=6）の第3脳室（カニューラ挿入の配位：ブレグマに対して尾側1.8mm及び矢状静脈洞に対し腹側5.0mm）に26ゲージ永久カニューラ（Plastics One Inc., Roanoke, VA）を定位的（stereotaxic, stereotaxic）手術法を用いて挿入した。1週間の回復期後、生理食塩水、クラステリンまたはレプチンを、永久的なカニューラを通じてマウスに注射し、次いで一晩切食した。ペプチドは、0.9%生理食塩水に溶解して、2µLの容量で脳室内（ICV）に投与した。

【0072】

図1aに示すように、分泌性クラステリンのICV投与（1µg）は、やせたC57BL/6Jマウスで60%まで切食誘導摂餌を減少させた。クラステリンの食欲減少効果は、同一量のレプチン（R&D system, Minneapolis, MN）と同じように強力であった。クラステリン及びレプチンの双方は、24h（時間）の注射後の間、体重増加を有意に減少させた（図1b）。クラステリン（1µg）はまた、ICVとともに同時に投与したとき、神経ペプチドY（NPY、2µg）及びアグーチ関連タンパク質（AGRP、3µg）の投与によって誘導された過食症を減少させた（図1c及びd）。用量反応性研究は、1µgの用量でのクラステリンが摂食における最も高い減少を誘導することを明らかにした（図1e）。より一層高い用量のクラステリンは、摂食におけるさらなる減少を生成しなかった。クラステリンの反復されたICV注入（1µg/日）は、摂食を減少させ、そして処理3日目の後、体重増加を防止した。

実施例2：クラステリン遺伝子治療が摂食及び体重を減少させた

【0073】

摂食及び体重に対するクラステリン遺伝子の効果をさらに調査するために、本発明者、本出願人は、全長分泌性クラステリンをエンコードするアデノウイルスを発生させた。全長ラットクラステリンをエンコードするcDNA（高麗大学校ミンボンホン博士から提供される、GenBank Accession No.:BC061534）をpAdTrack-CMVシャトルベクター（Stratagene, La Jolla, CA）のEcoRI/XhoI部位に挿入した。このようにして、得られたベクターを次いで、組換えアデノウイルスプラスミドを生産するために、AdEasyアデノウイルスベクターを含有するBJ5138細胞（慶北大学イインギョ博

10

20

30

40

50

士から提供される)中に電気穿孔処理した。組換え体を、HEK-293細胞において増幅し、そしてCsCl (Sigma) 勾配遠心分離を用いて分離し、精製した。調製物を集めて脱塩し、そしてAdeno-X Rapid titer (BD Bioscience、San Jose、CA)を使って製造者の指示に従い、アデノウイルスの力価を定めた。

【0074】

視床下部性クラスτεリン発現を増加させるために、クラスτεリン発現アデノウイルス (CLU-Ad) の 1×10^{10} p. f. u を C57BL/6J マウス (n=5) の両側の基底正中の視床下部 (iMBH) ($1 \mu\text{L}$ の各側、注入の配位: プレグマに対し尾側1.8mm、矢状静脈洞に対し腹側5.8mm及び側方0.2mm) に注入ポンプ (Harvard Apparatus) を使って各側につき $1 \mu\text{L}$ / 5 分の速度で微量注入した。対照群には、緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現するアデノウイルス (GFP-Ad) の 1×10^{10} p. f. u を C57BL/6J マウス (n=5) に対し両側の基底正中の視床下部に注射した。アデノウイルスの正式な注入を、研究の終わりに、マウスの視床下部領域における GFP 発現を試験することによって確認した。4 日間毎日早期の明相 (light phase) (午前 9-10 時) に摂食と体重とを監視した。アデノウイルス注入の 4 日目にマウスを犠牲にし、上衣 (epididymal、ependymal) 脂肪体を収集し、加重した (weighted)。

10

【0075】

視床下部でクラスτεリン遺伝子治療は、体重の有意的な減少 (図2a) と注射 4 日後、腹部脂肪量の有意的な減少 (図2c) とを誘発した。CLU-Ad を提供されたマウスでは、摂食が 3 日間減少した (図2b)。

20

【0076】

アデノウイルスの注入の 2 日目に、本発明者らは、Oxymax [オキシマックス (間接熱量測定器)、Columbus Instruments、Columbus、OH] を使って酸素消費 (VO_2)、エネルギー支出 (EE) 及び呼吸商 (RQ) を測定した。図 2 d 及び e に示すように、酸素及びエネルギー消費は、GFP-Ad を注射した対照群と比べて、CLU-Ad を注射したマウスで増加した。エネルギー代謝におけるこれらの変化は、それらのマウスにおいて減少した体脂肪量をもたらす。

【0077】

一方、GFP-Ad または CLU-Ad (2.5×10^8 の p. f. u) をまた、C57BL/6J マウス (n=6) の両側の側脳室 (iLV) (各側 $2.5 \mu\text{L}$ 、注入の配位: プレグマに対し尾側0.28mm、矢状静脈洞に対し腹側2mm及び側方1mm) 中に投与し (n=6)、摂食、体重及び腹部脂肪量における変化を上述したように定めた。

30

【0078】

図 2 f、g 及び h に示すように、脳室へのクラスτεリン遺伝子治療は、視床下部へのクラスτεリン遺伝子治療と比べて、視床下部投与のために用いるアデノウイルスの用量の 40 分の 1 だけを採用したものであるが、摂食及び体重におけるより一層大きな減少を引き起こした。

実施例 3: クラスτεリン RNAi 遺伝子治療は摂食及び体重を増加させた

【0079】

視床下部において減少されたクラスτεリン発現の効果を試験するために、マウスクラスτεリン発現を抑制する sh [small inhibitory (小抑制性)] RNA を発現するアデノウイルス (CLU-shRNA-Ad) を、実施例 2 において記載するような同じ方法を用いて生じさせ、ただしそこでは、クラスτεリン cDNA を、マウスクラスτεリンに対する短ヘアピン RNA (shRNA) のための cDNA で置き換えた。shRNA は、RNA 干渉を介して遺伝子発現を停止させる (silence) のに用いることができる密なヘアピンターン (tight hairpin turn) を作る RNA の配列である (McIntyre G. ら、BMC Biotechnol.6:1、2006) である。マウスクラスτεリン shRNA のための cDNA は、5' - C A T A G A A C T T C A T G C A G G T A T (アンチセンス) T T C A A G A G A (ヘアピン) A T A C C T G C A T G A A G T T C T A (センス) T T T T T T C C A A - 3' (配列番号1) のヌクレオチド配列をもち、そしてネズミクラスτεリン配列のヌクレオチド 444~46

40

50

2 を標的に設計される (GenBankAccession No.:NM_013492)。

in vivo 研究前に、C L U - s h R N A - A d の処置が T M 3 マウス L e y d i g 細胞 (DR. Chan-Soo Shin, Seoul National Universityからのもの) においてクラステリン発現をノックダウンしたことを確認した。

【0080】

C 5 7 B L / 6 J マウス (n=10) の両側の基底正中の視床下部における C L U - s h R N A - A d (各側 1×10^{10} p.f.u) の注入を、実施例 2 と同じ方法で実行した。C L U - s h R N A - A d の注射は、摂食、体重及び E F W (Epididymal Fat Weight) を有意に減少させた (図 3a、b 及び c)。

【0081】

C L U - s h R N A - A d の注射が、視床下部性クラステリン発現を減少させることができるかどうかを確認するために、アデノウイルスを注射後、2 日目に若干のマウスを犠牲した。視床下部を以前に記述されたように収集し (Namkoong C. ら、Diabetes、54:63-8、2005)、視床下部性クラステリン発現を定め、そしてアッセイするまで -80°C で貯蔵した。視床下部を $200\text{ }\mu\text{L}$ の抽出緩衝剤 [20mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA、140mM NaCl、1% NP40、1mM Na_3VO_4 、1mM PMSF、50mM NaF、 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ のアプロチニン] によって溶解し、視床下部性溶解物を取得した、各々の視床下部性溶解物 ($30\text{ }\mu\text{g}$ タンパク質) を、クラステリン β 鎖 (Santa Cruz) に対する抗体を使って免疫ブロッティングを行い、クラステリン発現を定めた。図 3 d に示すように、C L U - s h R N A - A d の視床下部内注射は、視床下部性クラステリン発現を有意に減少させた。

【0082】

このようにして、クラステリン発現の抑制が摂食及び体重を増加させることができるのが実証された。

実施例 4：視床下部性クラステリンは代謝信号によって調節される

【0083】

クラステリンがエネルギー恒常性の視床下部性調節において役割を演ずる場合、視床下部性クラステリン発現は摂餌状態によって影響を及ぼされることがある。このように、変動した代謝状態における視床下部性クラステリン発現は次のように試験された。

摂餌状態に従う視床下部性クラステリン発現における変化を調査するため、S p r a g u e - D a w l e y ラットで、24 時間絶食状態のもの (n=5)、1 時間再摂餌した状態にして次いで 24 時間絶食のもの (n=5)、及び 3 時間再摂餌した状態にして次いで 24 時間絶食のもの (n=5) から視床下部を収集した。視床下部性クラステリン発現を、実施例 3 に記載したように、クラステリンの免疫ブロッティングを用いて定めた。図 4 a に示すように、食餌の回復、次いで 24 時間の絶食は、視床下部におけるクラステリンレベルを増加させた。

【0084】

レプチンで、強力な食欲抑制ホルモンの血漿レベルが摂食によって増やされるので、そして、視床下部性クラステリンの発現におけるレプチンの効果も調査した。上のように、1 時間とそれに次ぐレプチンの I C V 投与 ($1\text{ }\mu\text{g}$)、C 5 7 B L / 6 J マウス (n=5) の視床下部を収集し、そしてクラステリン免疫ブロッティングを行った (n=5)。図 4 b に示すように、レプチン処置は視床下部でのクラステリン発現を有意に増加させた。

実施例 5：肥満動物でのクラステリンの変化及び効果

【0085】

食餌誘導性肥満 (DIO) の動物モデルにおける視床下部性クラステリン発現を調査するため、C 5 7 B L / 6 J マウス (各実験群について n=6) に高脂肪食餌 (HFD、脂肪 60%、Research Diet, Inc., New Brunswick, NJ) または低脂肪食餌 (LFD、10% 脂肪) の何れかを 8 週間供給した。

各群のマウスを 24 時間絶食及び 1 時間再摂餌した状態において H F D 処置の終わりに視床下部を収集し、そしてクラステリン免疫ブロッティングを、実施例 4 において記載したようにして用いて、視床下部のクラステリン発現を定めた。

【0086】

絶食状態で、HFD－摂餌肥満マウスにおける視床下部性クラスτεリン発現は、LFD－摂餌マウスにおけるものと有意に差がなかった（図5a）。しかし、視床下部性クラスτεリンにおける摂餌誘導性変化は、HFD－摂餌マウスにおいて有意に鈍化された（図5a）。同様に、レプチンは、HFD－摂餌マウスにおける視床下部性クラスτεリン発現での変化を誘導しなかった（図5b）。これらの要因による視床下部性クラスτεリン発現が増加しなかったことは、肥満の進展に寄与することがある肥満マウスでの満腹の生成を妨げることがある。

【0087】

DIOマウスにおけるレプチン及びクラスτεリンの効果を調査するために、本発明者らは、マウスにHFD処置中、2、4、6及び7週にて、生理食塩水、レプチン（1μg）及びクラスτεリン（1μg）のICVを注入した（各実験群についてn=6）。

【0088】

レプチン及びクラスτεリンのICV投与は、HFDの初期4週期間HFDで摂餌したマウスにおいて食欲減退を誘導した（図5c）。しかし、レプチンの食欲減退効果は、7週のHFD処置を伴うマウスにおいて重要でなくなり、これは、DIOマウスが中枢性レプチン抵抗性をもつことを示唆した。反対に、クラスτεリンのICV投与は、これらのマウスにおいて7週間HFDで摂餌したマウスにおいてさえ摂餌の抑制を引き起こした（図5d）。

実施例6：クラスτεリンはレプチン感受性を増加させる

【0089】

レプチン及びクラスτεリン間の摂餌調節における相互作用を調査するために、レプチンとクラスτεリンとを、単独または一緒に、C57BL/6JマウスにICV投与し、次いで24時間絶食させた（各実験群についてn=5）。レプチン及びクラスτεリンそれぞれ0.1μgは、単独では食欲減退及び体重減少を誘発することがないが、マウスに投与された。

【0090】

図6a及びbに示すように、クラスτεリン及びレプチンの効果的用量以下の用量での同時投与は、摂食及び体重増加において、有意な減少を誘導した（図6a及びb）。このデータは、クラスτεリン治療が、レプチンとともに投与されるとき、レプチン感受性を増加させることができることを示唆する。

【0091】

次に、レプチン及びクラスτεリンが摂食を調節するように作用することでのシグナル経路を試験した。以前の研究は、レプチンが、リン酸化STAT3、STAT3活性化のためのマーカーの発現を、いくつかの視床下部核において増加させることを示した（Hou L.ら、Endocrinology、145: 2516-2523、2004）。レプチン及びクラスτεリンのシグナル経路（信号伝達系）を比較するため、マウスをレプチン（1μg）とクラスτεリン（1μg）とでICV投与した。ICV注射後30分で、麻酔下でペリスタ（蠕動）ポンプを用い心臓を通して10%ホルマリンで15分間かん流させた。視床下部におけるSTAT3のリン酸化を確かめるため、ホスホY⁷⁰⁵-STAT3（Cell Signaling、Beverly、MA）に対する抗体を用いる免疫組織化学を、以前に記述されたように実行した（Hou L.ら、Endocrinology、145: 2516-2523、2004）。

【0092】

以前の報告と同様に、レプチンは、弓状核（ARC）及び腹内側核（VMN）を含む多重視床下部核でのホスホ-STAT3の発現を増加させた（図6c）。クラスτεリンはまた、ARC（図6c）、レトロキアズマ（retrochiasmatic、後側交差）核及び前乳頭（premammary、premamillary）核でのSTAT3活性化を誘導するが、VMH、背内側（dorsomedial）核及び傍室核では誘導しなかった。

【0093】

視床下部ニューロンにおけるクラスτεリンの効果をさらに次のように確認した。胎仔ラ

10

20

30

40

50

ット視床下部を、胎生期の19～20日に収集して、以前に記述されたように一次培養した (Canick J. A.ら、Brain Res.、372:277-282、1986)。細胞を5 μ g/mLのインスリン、100 μ g/mLの鉄フリーのヒトトランスフェリン、100 μ Mプトレシン、30 nM亜セレン酸ナトリウム、及び20 nMプロゲステロンを補ったニューロ基本培地 (neurobasal medium、Invitrogen、Carlsbad、CA) において7～8日間培養することによって分化を誘導した。細胞を、クラステリン及び／またはレプチンで、表示された時間、次いで2時間の血清飢餓で処置した。

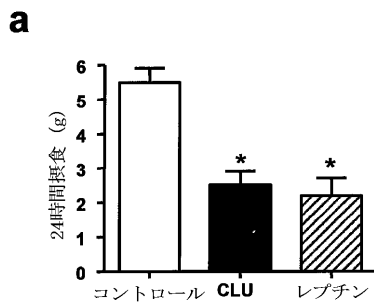
【0094】

培養された視床下部性神経において、クラステリン (10nM) は、ホスホー S T A T 3 及びサイトカインシグナル伝達 (S O C S) - 3 のサプレッサー (抑制剤) (図6d) の発現を処理の15分、30分及び60分で増加させた。i n v i v o の検証 (図6a、及びb) と同様に、それぞれ単独では S T A T 3 活性化を誘発することができないより一層低い用量でのクラステリン (0.01及び0.1nM) 及びレプチン (10nM) での同時処理は、S T A T 3 の意味あるさらなる活性化を誘導した (図6e)。これらのデータは、クラステリンが、レプチンシグナル経路を増大させることを指し示す。

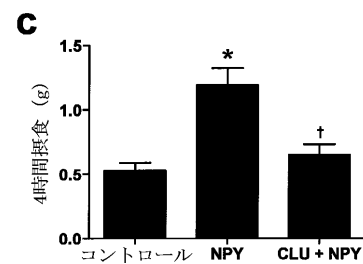
【0095】

本発明は、上記特定の具現例について説明されるが、この技術における熟練者によって多様な修飾及び変形が、本発明に対して行われ、それらはまた、添付する請求の範囲によって定義されるような本発明の範囲内に入ることを理解すべきである。

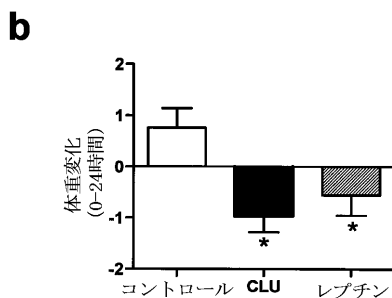
【図1a】



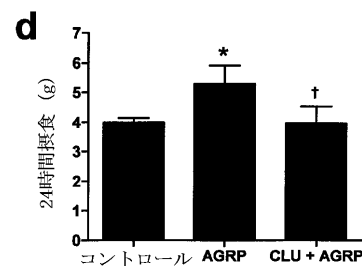
【図1c】



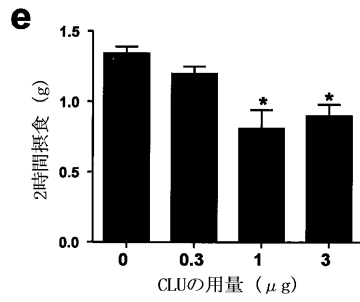
【図1b】



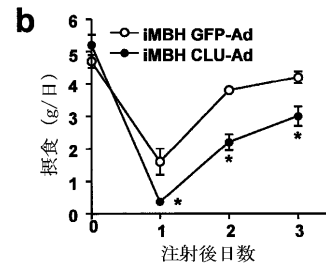
【図1d】



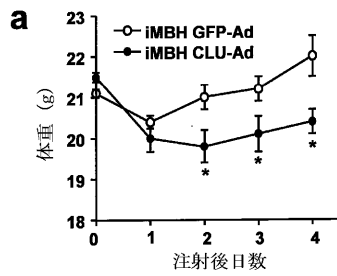
【図 1 e】



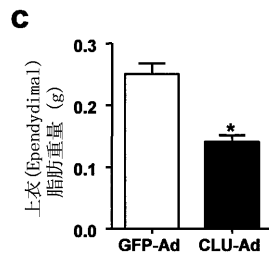
【図 2 b】



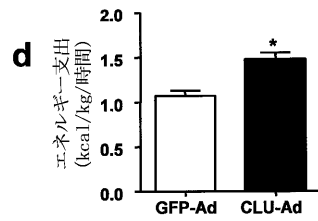
【図 2 a】



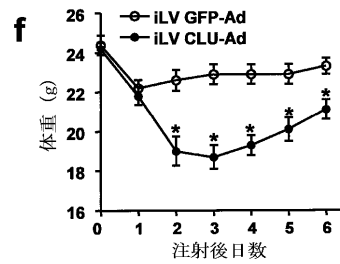
【図 2 c】



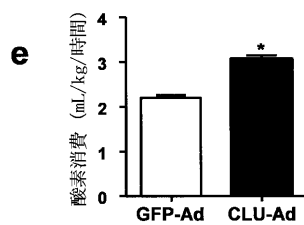
【図 2 d】



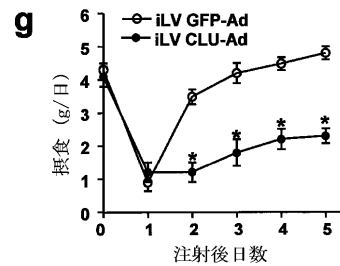
【図 2 f】



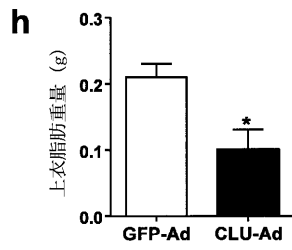
【図 2 e】



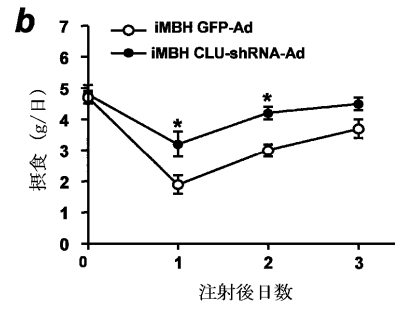
【図 2 g】



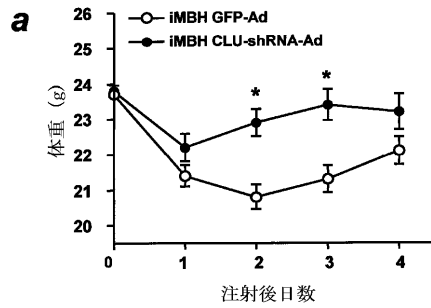
【図 2 h】



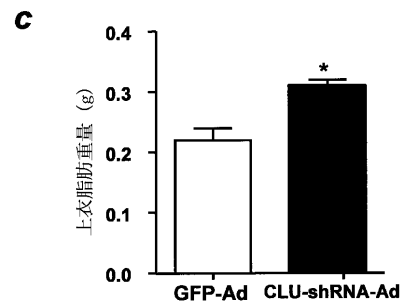
【図 3 b】



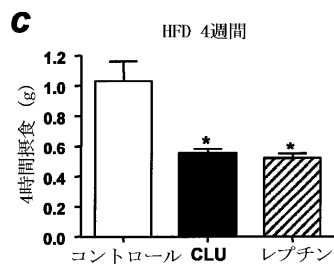
【図 3 a】



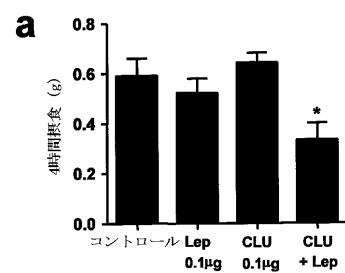
【図 3 c】



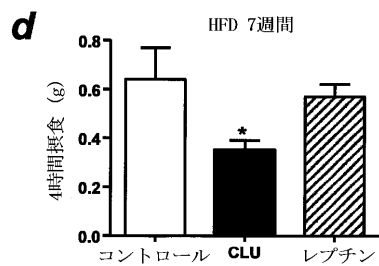
【図 5 c】



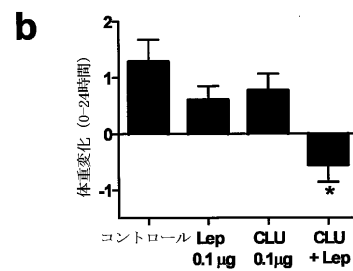
【図 6 a】



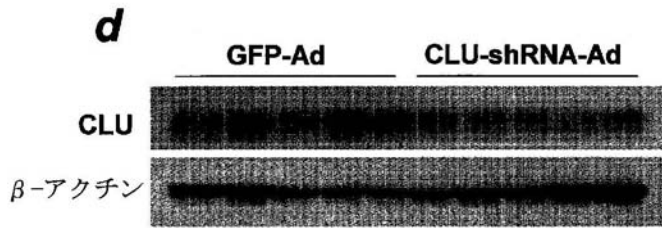
【図 5 d】



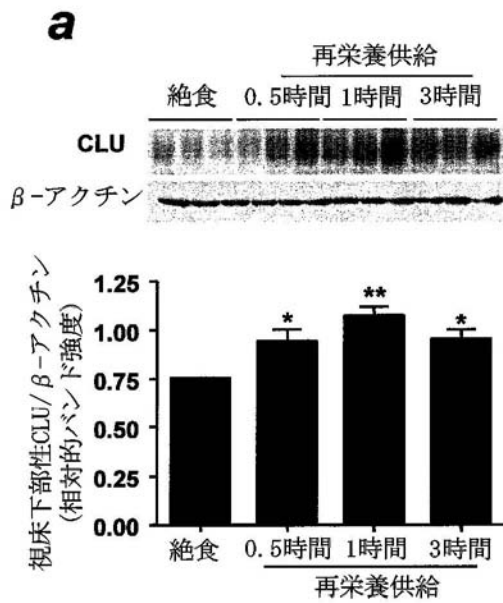
【図 6 b】



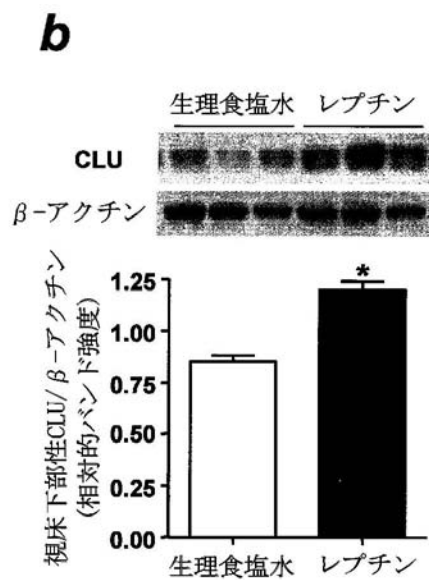
【図 3 d】



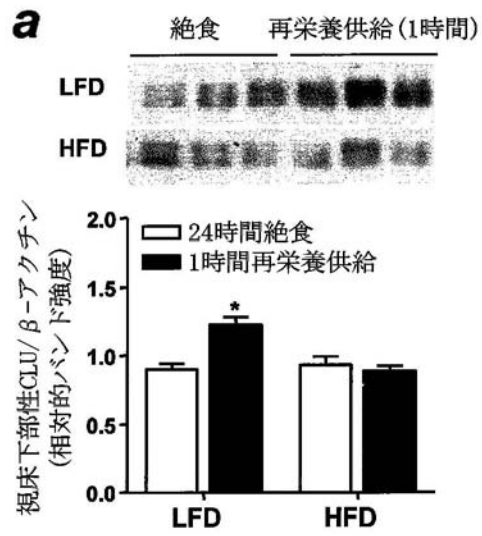
【図 4 a】



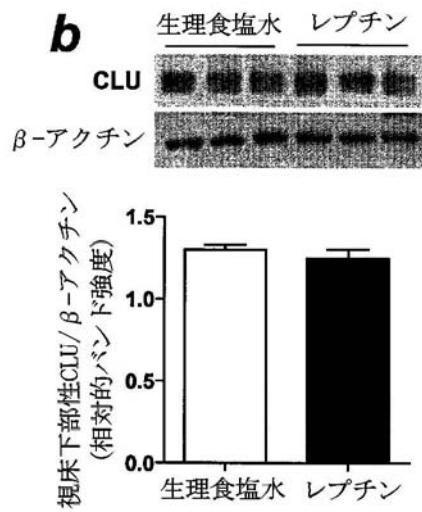
【図 4 b】



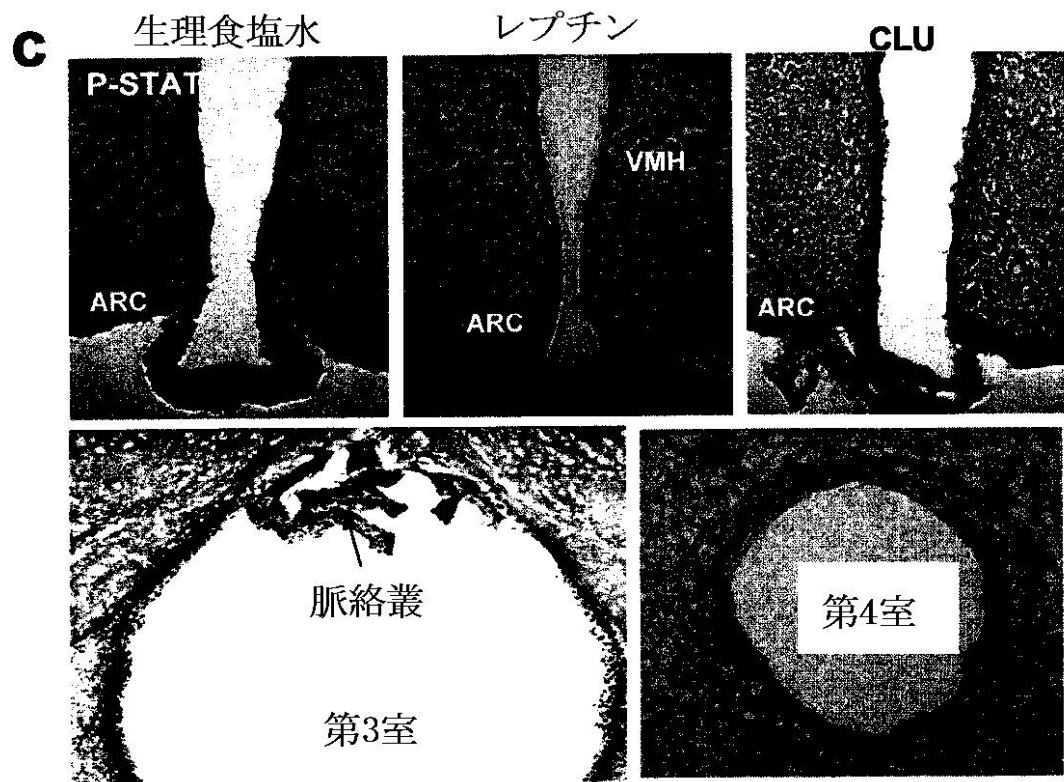
【図 5 a】



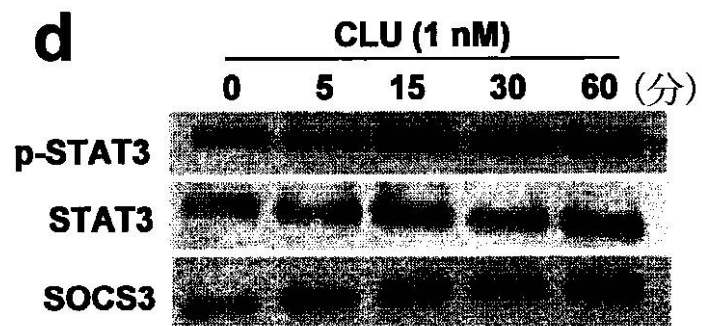
【図 5 b】



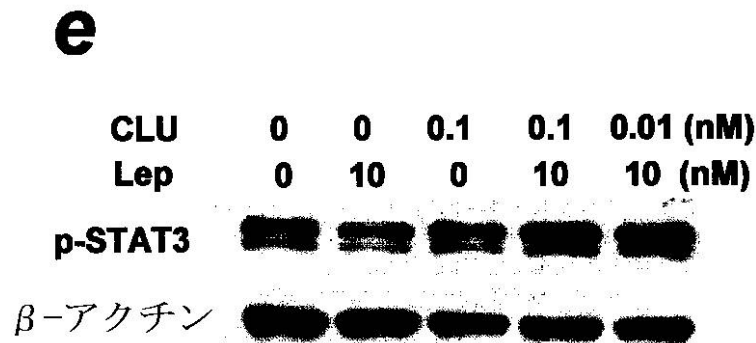
【図 6 c】



【図 6 d】



【図 6 e】



【配列表】

2010526132000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成22年1月5日(2010.1.5)

【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】

クラスτεリン、およびクラスτεリンとレプチンのようなクラスτεリン活性化物質との組合せから選ばれる 1 種またはそれよりも多くの物質と製薬上許容可能な担体とを含むことを特徴とする、対象体における肥満または肥満関連疾患を処置または予防するための薬学組成物。

【請求項 2】

前記肥満関連疾患は、過食症、内分泌異常、トリグリセリド蓄積症、心臓病、高血圧、脳卒中、2 型糖尿病、耐糖能障害、多嚢胞性卵巣症候群、関節炎、インスリン抵抗性、粥状動脈硬化症、冠動脈疾患、高脂血症、胆嚢疾患、骨関節症、睡眠時無呼吸、非アルコール性脂肪性肝炎及び癌からなる群より選ばれていることを特徴とする請求項 1 に記載の薬学組成物。

【請求項 3】

前記対象体は哺乳類であることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の薬学組成物。

【請求項 4】

前記哺乳類は、齧歯類、豚類、反芻動物及び霊長類からなる群より選ばれることを特徴とする請求項 3 に記載の薬学組成物。

【請求項 5】

前記霊長類はヒトであることを特徴とする請求項 4 に記載の薬学組成物。

【請求項 6】

前記薬学組成物は製薬上の調製物であることを特徴とする請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の薬学組成物。

【請求項 7】

前記製薬上の調製物は、錠剤、カプセル剤、注射液、注射用懸濁剤、鼻腔内スプレー、または経皮用パッチであることを特徴とする請求項 6 に記載の薬学組成物。

【請求項 8】

前記薬学組成物は、0.1 ないし 99.5 重量%のクラスτεリンを含有していることを

特徴とする請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の薬学組成物。

【請求項 9】

前記薬学組成物は抗肥満薬をさらに含有していることを特徴とする請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の薬学組成物。

【請求項 10】

前記抗肥満薬にはレプチンが包含されることを特徴とする請求項 9 に記載の薬学組成物。

【請求項 11】

前記薬学組成物は、クラスτεリンとレプチンとを 0.01 : 1 ないし 1 : 0.01 の重量比で含有していることを特徴とする請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の薬学組成物。

【請求項 12】

クラスτεリン-エンコーディング遺伝子を含むことを特徴とする対象体における肥満または肥満関連疾患を予防または処置するための遺伝子療法剤。

【請求項 13】

前記遺伝子は、ウイルス性または非ウイルス性ベクターにおいてクローン化されていることを特徴とする請求項 12 に記載の遺伝子療法剤。

【請求項 14】

前記ウイルス性ベクターは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルパー依存型アデノウイルス及びレトロウイルスのベクターからなる群より選ばれることを特徴とする請求項 13 に記載の遺伝子療法剤。

【請求項 15】

クラスτεリン-エンコーディング遺伝子は、対象体の静脈内、視床下部内、脳室内または髄腔内への注入によって投与されるように組み込まれていることを特徴とする請求項 12～14 のいずれか 1 項に記載の遺伝子療法剤。

【請求項 16】

クラスτεリン発現が下方制御される調節物質を含むことを特徴とする対象体における食欲減退を処置または予防するための調節剤。

【請求項 17】

前記食欲減退は、癌関連食欲減退、神経性食欲減退または仮性食欲減退であることを特徴とする請求項 16 に記載の調節剤。

【請求項 18】

前記調節物質は、クラスτεリン遺伝子発現に対する RNA 干渉を仲介する RNA、クラスτεリンの転写抑制物質、転写されたクラスτεリン mRNA の翻訳抑制物質及びクラスτεリン局在化の抑制物質からなる群より選ばれることを特徴とする請求項 16 または 17 に記載の調節剤。

【請求項 19】

前記 RNA 干渉を仲介する RNA は、アンチセンス RNA、干渉 RNA、短ヘアピン RNA (shRNA) または低分子干渉 RNA (siRNA) であることを特徴とする請求項 18 に記載の調節剤。

【請求項 20】

前記短ヘアピン RNA は、配列番号 1 のヌクレオチド配列を有した cDNA に相補的であることを特徴とする請求項 19 に記載の調節剤。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2007/002232
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>A61K 38/16(2006.01)i, A61P 3/04(2006.01)i</i>		
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 8 A61K, C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubMed (Key words; clusterin, obesity, leptin)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BAJARI, T.M. et al., 'A model for modulation of leptin activity by association with clusterin.' The FASEB Journal, Aug. 2003, Vol.17, No.11, pages 1505-1507. See abstract and Figures 4-6.	12 - 32
A	LAPING, N.J. et al., 'The Age-Related Increase in Renal Clusterin mRNA is Accelerated in Obese Zucker Rats.' J. Am. Soc. Nephrol., 1998, Vol.9, pages 38-45. See abstract and Figures 2-4.	12 - 32
A	WO 2004/092379 A2 (THE UNIV. BRITISH COLUMBIA) 28 Oct. 2004 See abstract and Exmaple	12 - 32
☐ 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 application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of 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 01 FEBRUARY 2008 (01.02.2008)		Date of mailing of the international search report 01 FEBRUARY 2008 (01.02.2008)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 920 Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer KIM, KYOUNG MI Telephone No. 82-42-481-8161 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2007/002232

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, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material

- ☒ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material

- ☒ on paper
☒ in electronic form

c. time of filing/furnishing

- ☒ contained in the international application as filed
☒ filed together with the international application in electronic form
☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes 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/KR2007/002232

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.: 1 - 11, 33 - 41
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1-11,33-41 pertain to methods for treatment of the human or animal body by therapy, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
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:

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 fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.:

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.

Information on patent family members

PCT/KR2007/002232

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16
A 6 1 K	9/20 (2006.01)	A 6 1 K	9/20
A 6 1 K	9/48 (2006.01)	A 6 1 K	9/48
A 6 1 K	9/08 (2006.01)	A 6 1 K	9/08
A 6 1 K	9/12 (2006.01)	A 6 1 K	9/12
A 6 1 K	9/70 (2006.01)	A 6 1 K	9/70 4 O 1
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 2 1
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	31/7088 (2006.01)	A 6 1 K	31/7088

(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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, 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, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 キム ミンソン
大韓民国 ソウル 1 3 8-7 8 8 ソンパーク オリユードン 3 0 1-1 5 0 2 オリンピック
ク アパートメント

(72)発明者 ナムグン チョル
大韓民国 ソウル 1 4 3-1 9 0 クァンジンク チャヤンードン 6 3 9-3 6

(72)発明者 チャン ピルーグム
大韓民国 キュンキード 4 6 4-7 1 8 クァンジューシ サンリョンードン 2 0 2-5 0 4
ヒヨンダイアパートメント 第2

F ターム (参考) 4C076 AA11 AA24 AA36 AA53 BB01 BB13 BB25 BB31
4C084 AA01 AA02 AA13 BA44 MA02 MA13 MA16 MA35 MA37 MA52
MA59 MA63 MA66 NA05 NA14 ZA362 ZA402 ZA452 ZA701 ZA702
ZA752 ZA962 ZC332 ZC352
4C086 AA01 EA16 MA02 MA04 MA13 MA16 MA35 MA37 MA52 MA59
MA63 MA66 NA05 NA14 ZA36 ZA40 ZA45 ZA70 ZA75 ZA96
ZC33 ZC35 ZC75