

(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2019-515654
(P2019-515654A)

(43) 公表日 令和1年6月13日(2019.6.13)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/6851 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6851 Z N A Z	2 G 0 4 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	4 C 0 8 4
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04	4 C 0 8 6
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 51 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-548758 (P2018-548758)
 (86) (22) 出願日 平成29年3月15日 (2017. 3. 15)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年11月13日 (2018. 11. 13)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/022584
 (87) 国際公開番号 WO2017/161043
 (87) 国際公開日 平成29年9月21日 (2017. 9. 21)
 (31) 優先権主張番号 62/309, 311
 (32) 優先日 平成28年3月16日 (2016. 3. 16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 508101797
 ザ ジェイ. デヴィッド グラッドストーン インスティテューツ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンフランシスコ オウンズ ストリート 1 6 5 0
 (74) 代理人 100114557
 弁理士 河野 英仁
 (74) 代理人 100078868
 弁理士 河野 登夫
 (72) 発明者 ファン, ヤドン
 アメリカ合衆国 9 4 1 2 2 カリフォルニア州, サン フランシスコ, トウエンティース アベニュー 1 7 1 8

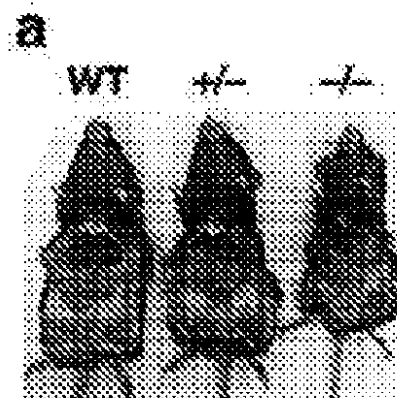
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肥満及び／又は糖尿病を処置するための方法及び組成物、並びに候補処置薬剤を識別するための方法及び組成物

(57) 【要約】

【解決手段】 肥満及び／又は糖尿病を処置するための候補薬剤を識別するための方法及び組成物を提供する。このような方法は、例えば哺乳類細胞又は細胞集団を試験薬と接触させること、及び哺乳類細胞又は細胞集団の細胞のClpPの発現レベル及び／又は活性レベルを測定することを有する。更に、個体（例えば肥満した個体及び／又は糖尿病を患う個体）を処置するための方法及び組成物を提供する。処置するための方法は、（例えば体重増加を防ぐ又は低下させるため、インスリン感受性を高めるため、及び／又は耐糖能を高めるために）ClpPの阻害剤を個体に投与することを有する。

Fig. 1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

肥満及び／又は糖尿病を処置するための候補薬剤を識別する方法であって、

(a) 哺乳類細胞を試験薬と接触させて、

(b) 接触させた後、基準値に対する哺乳類細胞のClpPの発現レベル及び／又は活性レベルを測定し、

(c) 前記試験薬が前記基準値に対して前記発現レベル及び／又は前記活性レベルを低下させたと判断し、

(d) 前記試験薬を肥満及び／又は糖尿病を処置するための候補薬剤として識別することを特徴とする方法。

10

【請求項 2】

前記哺乳類細胞はマウスの細胞であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記哺乳類細胞はヒトの細胞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】

前記哺乳類細胞はインビトロにあることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記哺乳類細胞はエクスピボにあることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記哺乳類細胞はインビボにあることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記哺乳類細胞は肝実質細胞であることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

接触させる際に、前記試験薬をマウスに投与することを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

【請求項 9】

前記基準値を得るためにステップ(a) で接触させる前に前記マウスのClpPの発現レベル及び／又は活性レベルを測定することを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

30

【請求項 10】

ステップ(d) の後、識別された前記候補薬剤を、肥満及び／又は糖尿病を患う個体に投与することを特徴とする請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記個体はマウス、非ヒト霊長類又はヒトであることを特徴とする請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

識別された前記候補薬剤を前記個体に投与した後、インスリン感受性、血糖レベル、耐糖能、体脂肪量、脂肪組織の量、白色脂肪組織の量、体脂肪率、体重、内臓脂肪の脂肪細胞サイズ、血漿レプチンレベル、成長ホルモンレベル、基礎エネルギー消費量、筋肉及び／又は繊維芽細胞のリン酸化AKT (p-AKT) レベル、除脂肪率、肝実質細胞のミトコンドリアの数、肝実質細胞のミトコンドリアの質量、肝実質細胞のミトコンドリアの形態、繊維芽細胞の呼吸容量、繊維芽細胞の最大酸素消費速度(OCR) 及びH₂O₂による細胞毒性に対する繊維芽細胞耐性から選択された前記個体の一又は複数の特徴を測定することを特徴とする請求項 10 又は 11 に記載の方法。

40

【請求項 13】

前記試験薬は小分子又はポリペプチドであることを特徴とする請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 14】

定量RT-PCR、マイクロアレイ又はRNA シーケンシングを使用して、RNA 発現レベルであるClpPの発現レベルを測定することを特徴とする請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

タンパク質の発現レベルであるClpPの発現レベルを測定し、測定する際に、抗ClpP抗体、質量分析及び / 又は酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) を使用してClpPタンパク質を検出することを特徴とする請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

TNF 受容体関連タンパク質 1 (TRAP1)、熱ショックタンパク質ファミリー-A (Hsp70) メンバー 9 (Grp75)、ロイシンリッチペントリコペプチドリピート含有 (LRPPRC)、カゼイン分解性ミトコンドリアマトリックスペプチダーゼシャペロンサブユニット (ClpX)、オルニチンアミノトランスフェラーゼ (OAT) 及びlon ペプチダーゼ 1 (LonP1) から選択された一又は複数のタンパク質の量の増加を測定することにより、ClpPの活性レベルの低下を測定することを特徴とする請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 17】

複数の試験薬をスクリーニングして、肥満及び / 又は糖尿病を処置するための一又は複数の候補薬剤を識別することを特徴とする請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

肥満及び / 又は糖尿病の個体を処置する方法であって、
個体の脂肪組織の量を減らす、個体の体重増加を防止する若しくは低下させる、個体のインスリン感受性を高める、及び / 又は個体の耐糖能を高めるのに有効な量でClpPの阻害剤を前記個体に投与することを特徴とする方法。

20

【請求項 19】

ClpPの前記阻害剤は、ClpPの発現を特異的に低下させるRNAi剤又は遺伝子編集剤であることを特徴とする請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

ClpP発現の低下が実質的に肝臓特異的であるように、ClpPの前記阻害剤を投与し、投与される量は、個体のインスリン感受性を高めるのに有効な量であることを特徴とする請求項 18 又は 19 に記載の方法。

30

【請求項 21】

ClpPの前記阻害剤は小分子であることを特徴とする請求項 18 に記載の方法。

【請求項 22】

前記小分子は -ラクトンであることを特徴とする請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

-ラクトンは、(3RS,4RS)-3-(non-8-en-1-yl)-4-(2-(ピリジン-3-yl)エチル)オキセタン-2-one、又はその薬学的に許容される塩であることを特徴とする請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

ClpPの前記阻害剤を前記個体の肝臓に直接送達し、投与される量は、個体のインスリン感受性を高めるのに有効な量であることを特徴とする請求項 18 ~ 23 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 25】

投与する際に局所注射することを特徴とする請求項 18 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記個体のインスリン感受性を測定することを特徴とする請求項 18 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の概要】

50

【発明が解決しようとする課題】

【0001】

哺乳類ClpXPは、ATPがタンパク質基質をアンフォールドして加水分解することを必要とするミトコンドリアマトリックスプロテアーゼ複合体である。ClpXP複合体は触媒サブユニット(ClpP)及び調節サブユニット(ClpX)を含んでいる。大腸菌ClpP同族体は、加水分解性活性部位が内側に隔離されているパレル状の複合体を形成する一方、大腸菌ClpX同族体は、パレルの各端部に付着して基質の認識及びアンフォールディングに關与する六量体環を形成する。原核生物のClpXPプロテアーゼは、タンパク質の品質制御のために損傷したポリペプチド又は不必要なポリペプチドの分解を促進する。大腸菌ClpPのように、ヒトClpPはClpXが存在する状態でチャンバのような構造を更に形成する。エネルギー恒常性及び代謝調節に重要な役割を果たす哺乳類細胞の主なエネルギー発生器であるミトコンドリアのClpPの生理機能は、大部分が知られていない。

10

【0002】

肥満、糖尿病のような、エネルギー恒常性及び代謝調節に關連する疾患を処置するための候補薬剤を識別するための方法及び組成物の必要性が本技術分野には存在する。例えば、インスリン感受性を高める、体重増加を防ぐ及び/又は低減させる、脂肪組織、例えば白色脂肪組織を防ぐ及び/又は減らすなどのための候補薬剤を識別するための方法及び組成物の必要性が本技術分野には存在する。(例えば、インスリン感受性を高める、体重増加を防ぐ及び/又は減らす、脂肪組織、例えば白色脂肪組織を防ぐ及び/又は減らすことなどにより)肥満及び/又は糖尿病を処置するための方法及び組成物の必要性が本技術分野には更に存在する。

20

【課題を解決するための手段】

【0003】

肥満及び/又は糖尿病を処置するための候補薬剤(例えば、個体の脂肪組織の量を減らす、個体の体重増加を防ぐ又は減らす、個体のインスリン感受性を高める、及び/又は個体の耐糖能を高めるための候補薬剤)を識別するための方法及び組成物を提供する。本開示のある実施形態では、このような方法は、(a)哺乳類細胞又は細胞集団(例えば、齧歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、非ヒト霊長類細胞、サル細胞、ヒト細胞又はこれらの細胞集団)を試験薬と接触させること、及び(b)哺乳類細胞(試験薬と接する細胞)又は試験薬と接する細胞集団の細胞のClpPの発現レベル(例えばタンパク質及び/若しくはmRNA)並びに/又は活性レベルを測定することを有する。その後、試験薬がClpPの発現及び/又は活性を低下させたか否かを判断する。ClpPの発現(例えばタンパク質及び/若しくはmRNA)並びに/又は活性を低下させる試験薬は、処置のための候補薬剤と識別され得る。従って、化合物が、細胞又は細胞集団と(例えばインビトロ、エクスピボ又はインピボで)接する前に「試験薬」とみなされ、化合物(試験薬)が(例えばClpPタンパク質及び/又はClpPコードmRNAのレベルを測定することにより示され得るように)ClpPの発現及び/又は活性を低下させる場合、この化合物は、「候補薬剤」(例えば肥満及び/又は糖尿病を処置するための候補薬剤のような処置のための候補薬剤)とみなされる。従って、場合によっては、本方法は、(c)試験薬がClpPの発現の低下(例えばClpP発現の低下は、試験薬が処置のための候補薬剤であることを示す)及び/又は活性の低下を招いたか否かを判断するステップを更に有する。場合によっては、本方法は、(ステップc)(例えば基準値に対して、例えば試験薬と接触させる前のClpPの発現レベル及び/又は活性レベル、ClpP発現を低下させないことが知られている対照薬剤と接触させた後のClpPの発現レベル及び/又は活性レベルなどに対して)試験薬がClpPの発現レベル及び/又は活性レベルを低下させたと判断して、試験薬を肥満及び/又は糖尿病を処置するための候補薬剤として識別すること、或いは(ステップd)試験薬が(例えば基準値に対して)ClpPの発現レベル及び/又は活性レベルを低下させなかったと判断することのいずれかを有する。

30

40

【0004】

場合によっては、試験薬は小分子又はポリペプチドである。場合によっては、(ClpPの)発現レベルはRNA発現レベルであり、測定する際に、例えば定量RT-PCR、マイクロアレ

50

イ又はRNA シーケンシングを使用する。場合によっては、(C1pPの)発現レベルはタンパク質発現レベルであり、測定する際に、(例えば、抗C1pP抗体、質量分析及び/又は酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)を使用して)C1pPタンパク質を検出する。場合によっては、本方法は、複数の試験薬をスクリーニングして、肥満及び/又は糖尿病を処置するための一又は複数の候補薬剤を識別することを有する。

【0005】

場合によっては、哺乳類細胞(試験薬と接触させる標的細胞)は肝細胞(肝実質細胞)である。場合によっては、インビトロで接触させる(例えば、哺乳類細胞はインビトロにある)。場合によっては、エクスピボで接触させる(例えば、哺乳類細胞はエクスピボにある)。場合によっては、インビボで接触させる(例えば、哺乳類細胞はインビボにある)。場合によっては、接触させる際に、試験薬をマウスに投与する。場合によっては、本方法は、基準値を得るためにステップ(a)で接触させる前にマウスのC1pPの発現レベル及び/又は活性レベルを測定するステップを有する。場合によっては、本方法は、試験薬が肥満及び/又は糖尿病を処置するための候補薬剤であるという報告書を作成するステップを有する。

10

【0006】

場合によっては、本方法は、試験薬が処置のための候補薬剤であると判断した後、(例えば、処置として、又は候補薬剤が所望の成果をもたらすか否かを試験する手段として)肥満及び/又は糖尿病を患う個体に識別された候補薬剤を投与するステップを有する。場合によっては、個体はマウス、非ヒト霊長類又はヒトである。場合によっては、本方法は、識別された候補薬剤を個体に投与した後、インスリン感受性、血糖レベル、耐糖能、体脂肪量、脂肪組織の量、白色脂肪組織の量、体脂肪率、体重、内臓脂肪の脂肪細胞サイズ、血漿レプチンレベル、成長ホルモンレベル、基礎エネルギー消費量、筋肉及び/又は繊維芽細胞のリン酸化AKT(p-AKT)レベル、除脂肪率、肝実質細胞のミトコンドリアの数、肝実質細胞のミトコンドリアの質量、肝実質細胞のミトコンドリアの形態、繊維芽細胞の呼吸容量、繊維芽細胞の最大酸素消費速度(OCR)及びH₂O₂による細胞毒性に対する繊維芽細胞耐性から選択された個体の一又は複数の特徴を測定することを有する。

20

【0007】

更に、個体(例えば肥満した個体及び/若しくは糖尿病を患う個体、又は肥満及び/若しくは糖尿病を患うと診断された個体)を処置するための方法及び組成物を提供する。処置するための方法は、個体の脂肪組織の量を減らす、個体の体重増加を防ぐ若しくは減らす、個体のインスリン感受性を高める、及び/又は個体の耐糖能を高めるのに有効な量でC1pPの阻害剤(例えばC1pPタンパク質の量及び/又は活性を減らす薬剤)を個体に投与することを有する。場合によっては、C1pPの阻害剤は小分子であり、例えば本明細書に記載されているあらゆる小分子C1pP阻害剤、例えば本明細書に記載されているあらゆる -ラクトン分子のような -ラクトンである。場合によっては、小分子は(3RS,4RS)-3-(non-8-en-1-yl)-4-(2-(ピリジン-3-yl)エチル)オキセタン-2-oneである。場合によっては、C1pPの阻害剤は、C1pPを標的とする(例えば、C1pPタンパク質の発現レベルを特異的に下げる)RNAi剤又は遺伝子編集剤である。場合によっては、C1pPの阻害剤は、C1pP発現の低下が実質的に肝臓特異的であるように投与され、投与される量は、個体のインスリン感受性を高めるのに有効な量である。場合によっては、C1pPの阻害剤は個体の肝臓に直接運ばれ、投与される量は、個体のインスリン感受性を高めるのに有効な量である。場合によっては、投与する際に局所注射する。場合によっては、この処置するための方法は、個体のインスリン感受性を測定するステップを有する。

30

40

【図面の簡単な説明】

【0008】

本発明は、添付図面と共に読むと、以下の詳細な説明から最もよく理解される。一般的な慣行に従って、図面の様々な特徴が正確な縮尺ではないことが強調される。対照的に、様々な特徴の寸法は、明瞭化のために任意に拡大又は縮小されている。以下の図が図面に含まれている。

50

【0009】

【図1】図1(パネルa~m)は、C1pP^{-/-}マウスが体脂肪を減らして高脂肪食による肥満に対する耐性を有したことを表すデータを示す図である。図1(パネルa)は、C1pP^{-/-}マウスがより小型で体脂肪がより低いことを表す画像を示す図である。図1(パネルb)は、C1pP^{-/-}マウスの体重が野生型(WT)同腹子及びC1pP^{+/-}同腹子の体重より低い(WTメスに関してn=9、C1pP^{+/-}メスに関してn=10、C1pP^{-/-}メスに関してn=13、WTオスに関してn=13、C1pP^{+/-}オスに関してn=13、C1pP^{-/-}オスに関してn=10)ことを表すグラフである。図1(パネルc)は、新生C1pP^{-/-}の幼体(生後1日目)がWTの幼体及びC1pP^{+/-}の幼体と同様の体重を有した(WTに関してn=5、C1pP^{+/-}に関してn=7、C1pP^{-/-}に関してn=6)ことを表すグラフである。図1(パネルd)及び図1(パネルe)は、5ヶ月のオスのマウス(n=7)の体脂肪量及び脂肪含有率を表すグラフである。図1(パネルf)及び図1(パネルg)は、5ヶ月のオスのマウス(n=7)の除脂肪量及び除脂肪含有率を表すグラフである。図1(パネルh)及び図1(パネルi)は、8ヶ月のオスのマウス(WT及びC1pP^{+/-}に関してn=7、C1pP^{-/-}に関してn=4)の褐色脂肪組織の量及び含有率を表すデータを示す。図1(パネルj)は、高脂肪食(HFD)の8ヶ月のオスのマウス(WT及びC1pP^{+/-}に関してn=8、C1pP^{-/-}に関してn=7)の体重増加量を示すグラフである。図1(パネルk)及び図1(パネルl)は、40日間のHFD後の8ヶ月のオスのマウス(WTに関してn=8、C1pP^{+/-}及びC1pP^{-/-}に関してn=7)の体脂肪量及び脂肪含有率のグラフである。図1(パネルm)は、WTマウス、C1pP^{+/-}マウス及びC1pP^{-/-}マウスの脂肪細胞サイズ分布のヒストグラムを示す。データは平均±SDである。*P<0.05、**P<0.01、***P<0.005対WT。

10

20

【図2】図2(パネルa~i)は、C1pP^{-/-}マウスが全身のエネルギー消費量を変えたことを表すデータを示す図である。図2(パネルa)及び図2(パネルb)は、7~8ヶ月のオスのマウス(WT及びC1pP^{-/-}に関してn=12、C1pP^{+/-}に関してn=15)の食料摂取量を表すグラフである。図2(パネルc)は、絶食-再摂食実験のタイムラインを示す図である。図2(パネルd)及び図2(パネルe)は、24時間の絶食後の7~8ヶ月のオスのマウス(WT及びC1pP^{-/-}に関してn=14、C1pP^{+/-}に関してn=15)の体重減少を表すグラフである。図2(パネルf)は、0~8時間又は8~24時間の再摂食期間中の7~8ヶ月のオスのマウス(WT及びC1pP^{-/-}に関してn=3、C1pP^{+/-}に関してn=4)の食料摂取量を表すグラフである。図2(パネルg)は、再摂食の8時間又は24時間後の7~8ヶ月のオスのマウス(WT及びC1pP^{-/-}に関してn=14、C1pP^{+/-}に関してn=15)の体重増加率を示すグラフである。図2(パネルh)及び図2(パネルi)は、16時間の絶食後又は自由摂食中の8ヶ月のオスのマウス(WT及びC1pP^{+/-}に関してn=13、C1pP^{-/-}に関してn=14)の体温を表すグラフである。データは平均±SDである。*P<0.05、**P<0.01、***P<0.005対WT。

30

【図3】図3(パネルa~o)は、C1pP^{-/-}マウスがインスリン感受性を高めたことを表すデータを示す図である。図3(パネルa~c)は、食事制限中の8ヶ月のオスのマウス(グループ毎にn=8)の血糖レベル及び血漿インスリンレベルを示すグラフである。図3(パネルd)及び図3(パネルe)は、高脂肪食の8ヶ月のオスのマウス(グループ毎にn=5)の血糖レベル及び血漿インスリンレベルを示すグラフである。図3(パネルf)は、6~10ヶ月のオスのマウス(グループ毎にn=9)の耐糖能曲線を示すグラフである。図3(パネルg)は、グルコースチャレンジ後の6~10ヶ月のオスのマウス(グループ毎にn=5)の血漿インスリンレベルを示すグラフである。図3(パネルh)は、12ヶ月のオスのマウス(グループ毎にn=7)のインスリン耐性曲線を示すグラフである。図3(パネルi)は、14ヶ月のオスのマウス(WT及びC1pP^{-/-}に関してn=5、C1pP^{+/-}に関してn=7)のピルビン酸塩耐性曲線を示すグラフである。図3(パネルj)及び図3(パネルk)は、WTマウス、C1pP^{+/-}マウス又はC1pP^{-/-}マウスからのマウス繊維芽細胞のpAKT免疫プロットの代表的な画像(j)及び定量化(k)を示す図である。図3(パネルl)は、10ヶ月のオスのマウス(グループ毎にn=3)の腓腹筋のpAKTレベルを示すグラフである。図3(パネルm)は、IGF処置後のマウス(グループ毎の用量当たりn=6)の

40

50

繊維芽細胞のpAKTレベルを示すグラフである。図3(パネルn)は、4時間の絶食後の様々なC1pP遺伝子型を有する3~7ヶ月のdb/dbマウス(WTに関してn=8、C1pP^{+/-}に関してn=7、C1pP^{-/-}に関してn=6)の血糖レベルを示すグラフである。図3(パネルo)は、様々なC1pP遺伝子型を有する3~7ヶ月のdb/dbマウス(WTに関してn=8、C1pP^{+/-}に関してn=7、C1pP^{-/-}に関してn=6)の耐糖能曲線を示す図である。データは平均±SDである。*P<0.05、**P<0.01、***P<0.005対WT。

【図4】図4(パネルa~l)は、C1pP^{-/-}マウスがミトコンドリアのシャペロンレベルを高めたことを表すデータを示す図である。図4(パネルa~h)は、マウス(グループ毎にn=3)の様々な器官からの溶解物のTRAP1、Grp75、LRPPRC及びC1pXの代表的なウェスタンブロット及び定量化を示す図である。図4(パネルi)及び図4(パネルj)は、WTマウス又はC1pP^{-/-}マウスの繊維芽細胞の溶解物のC1pX、TRAP1、LRPPRC及びOATの代表的なウェスタンブロット(i)及び定量化(j)を示す図である。図4(パネルk)及び図4(パネルl)は、空のベクタ(対照)又はマウスC1pP cDNA構築体でトランスフェクトされたC1pP^{-/-}繊維芽細胞のC1pX、TRAP1、LRPPRC及びOATの代表的なウェスタンブロット(k)及び定量化(l)を示す図である。データは平均±SDである。*P<0.05、**P<0.01、***P<0.005対WT。

【図5】図5(パネルa~j)は、C1pP^{-/-}マウスがミトコンドリアの数を増やして、ミトコンドリアの機能を高めて、抗酸化ストレス能力を高めたことを表すデータを示す図である。図5(パネルa)は、WTマウス及びC1pP^{-/-}マウスの肝実質細胞のミトコンドリアの代表的な電子顕微鏡画像を示す図である。スケールバーは2µmである。図5(パネルb)及び図5(パネルc)は、C1pP^{-/-}マウスの肝実質細胞で増加したミトコンドリアの数(b)及び(ミトコンドリアの面積によって測定された)量(c)を示すグラフである。ミトコンドリアの数は、x13,600の倍率でランダムなフィールド毎に計算された(WTに関してn=17、C1pP^{-/-}に関してn=12)。フィールド当たりの総ミトコンドリア面積は、Image Jによってx13,600の倍率で測定された(WTに関してn=17、C1pP^{-/-}に関してn=12)。図5(パネルd)は、基本条件及び脱共役条件下のC1pP^{-/-}マウス及びWTマウス(グループ毎にn=12)からの繊維芽細胞の酸素消費速度(OCR)曲線を示す図である。図5(パネルe)は、C1pP^{-/-}マウスからの繊維芽細胞がWTマウスからの繊維芽細胞と比較してH₂O₂による細胞死に対して耐性があった(グループ毎にn=8)ことを示すグラフである。図5(パネルf)は、マウスのC1pPの過剰発現がC1pP^{-/-}繊維芽細胞の呼吸容量を減少させたことを示すグラフである(グループ毎にn=12)。図5(パネルg)は、マウスのC1pPの過剰発現がC1pP^{-/-}繊維芽細胞のH₂O₂耐性を消失させたことを示すグラフである(グループ毎にn=8)。図5(パネルh)及び図5(パネルi)は、TRAP1又はGrp75のレンチウイルスshRNA媒介のノックダウンがH₂O₂細胞毒性に対するC1pP^{-/-}繊維芽細胞の耐性を低下させたことを示すグラフである(グループ毎にn=8)。図5(パネルj)は、C1pP^{-/-}繊維芽細胞の最大呼吸容量に対する様々なミトコンドリアタンパク質のレンチウイルスshRNA媒介のノックダウンの影響を示すグラフである(グループ毎にn=9)。データは平均±SDである。*P<0.01、**P<0.01、***P<0.005対WT(b~e)又はC1pP^{-/-}(f~j)。

【図6】図6(パネルa~i)は、肝臓のC1pPのAAV-Cre-媒介のノックダウンがC1pP-cKOマウスのインスリン感受性を高めたことを表すデータを示す図である。3~5ヶ月のC1pP-cKOマウスに尾静脈を介してAAV-CMV-Cre(Creグループ、n=11)又は対照AAV(Conグループ、n=10)を5×10⁹gc/グラムの用量で注射した。図6(パネルa)は、AAVが注射された対照マウスと比較してAAV-Creが注射されたC1pP-cKOマウスの肝臓のC1pPの著しい減少を示すC1pP免疫染色の画像を示す図である。スケールバーは50µmである。図6(パネルb~d)は、AAV注射前及びAAV注射の3週間後のC1pP-cKOマウスの体重(パネルb及びc)を示すグラフである。AAV-Creが注射されたマウスの体重増加はAAVが注射された対照マウスの体重増加より著しく低かった(パネルd)。図6(パネルe)は、AAV注射前及びAAV注射の3週間後のC1pP-cKOマウスの血漿インスリンレベルを示すグラフである。図6(パネルf)は、AAV注射前及びAAV注射の3週間後のC1pP-cKOマウスの

10

20

30

40

50

血糖レベルを示すグラフである。図6(パネルg)は、AAV注射の4週間後のC1pP-cKOマウスの耐糖能曲線を示す図である。図6(パネルh)は、AAV-Cre又は対照AAVが注射されてHFDが2週間与えられたC1pP-cKOマウスの耐糖能曲線を示す図である。図6(パネルi)は、HFDがマウスにAAV注射の6週間後に与えられた後に集められたデータを示すグラフである。体重増加の差がHFDを2週間又は4週間与えた後に検出されなかった。データは平均±SDである。*P<0.01、***P<0.005対対照。

【図7】図7(パネルa~i)は、C1pP^{-/-}マウスの生成を表すデータを示す図である。図7(パネルa)は、C1pP^{-/-}マウスを生成するために使用されるジーントラップ法を示す概略図である。図7(パネルb~i)は、肝臓、脂肪組織、筋肉及び脳の溶解物のC1pPタンパク質レベルのウェスタンブロット及び定量化を示す図である。データは平均±SDである。***P<0.005対WT。

10

【図8】図8(パネルa~b)は、C1pP^{-/-}マウスが肝臓及び筋肉の正常な組織構造を有することを表すデータを示す図である。図8(パネルa)及び図8(パネルb)は、WTマウス、C1pP^{+/-}マウス及びC1pP^{-/-}マウスの肝臓(a)及び腓腹筋(b)の代表的なH&Eで染色された画像を示す図である。スケールバーは50µmである。

【図9】図9(パネルa~j)は、C1pP^{-/-}マウスが正常な神経学的プロファイルを有することを表すデータを示す図である。図9(パネルa~e)は、8ヶ月のオスのマウス(グループ毎にn=8)の握力試験、傾斜試験、テールサスペンション試験及びロータロッド試験を行うことにより集められたデータを示すグラフである。図9(パネルf)は、8~9ヶ月のオスのマウス(グループ毎にn=8)で行われた高架式十字迷路試験から得られた結果を示すグラフである。図9(パネルg~j)は、8~9ヶ月のオス及びメスのマウス(グループ毎にn=8)で行われたモリス水迷路試験から得られた結果を示すグラフである(- - WT、- - C1pP^{+/-}、- - C1pP^{-/-})。H, 隠し試験; V, 可視試験。データは平均±SEMである。

20

【図10】図10(パネルa~d)は、C1pP^{-/-}マウスの脂肪細胞がより小さいことを表すデータを示す図である。図10(パネルa~d)は、WTマウス、C1pP^{+/-}マウス及びC1pP^{-/-}マウスからのH&Eで染色された脂肪組織の代表的な画像を示す図である。

【図11】図11(パネルa~b)は、C1pP^{-/-}マウスが褐色脂肪組織及び膵臓の正常な組織構造を有することを表すデータを示す図である。図11(パネルa)及び図11(パネルb)は、WTマウス、C1pP^{+/-}マウス及びC1pP^{-/-}マウスの褐色脂肪組織(a)及び膵臓(b)の代表的なH&Eで染色された画像を示す図である。スケールバーは100µmである。

30

【図12】図12(パネルa~d)は、C1pP^{-/-}マウスが高脂肪食(HFD)による肥満に対して耐性があることを表すデータを示す図である。図12(パネルa)及び図12(パネルb)は、10日間及び20日間のHFD後の8ヶ月のオスのマウス(WT及びC1pP^{+/-}に関してn=8、C1pP^{-/-}に関してn=7)の体重増加を示すグラフである。図12(パネルc)及び図12(パネルd)は、40日間のHFD後の8ヶ月のオスのマウス(WTに関してn=6、C1pP^{+/-}及びC1pP^{-/-}に関してn=7)の除脂肪体重を示すグラフである。データは平均±SDである。**P<0.01、***P<0.005対WT。

【図13】図13(パネルa~b)は、C1pP^{-/-}マウスが正常な自発運動活性を有することを表すデータを示す図である。図13(パネルa)及び図13(パネルb)は、オープンフィールド試験中の8~10ヶ月のオスのマウス(WTに関してn=10、C1pP^{+/-}及びC1pP^{-/-}に関してn=12)の総移動距離、及び中心と総移動距離との比率を示すグラフである。データは平均±SEMである。

40

【図14】図14(パネルa~c)は、db/dbマウスの肥満及びインスリン抵抗性に対するC1pPのノックアウトの影響に関連するデータを示す図である。図14(パネルa)は、様々なC1pP遺伝子型を有する4~8ヶ月のdb/dbマウス(WTに関してn=10、C1pP^{+/-}に関してn=17、C1pP^{-/-}に関してn=8)の体重を示すグラフである。図14(パネルb)及び図14(パネルc)は、16時間の絶食後の様々なC1pP遺伝子型を有する3~7ヶ月のdb/dbマウス(WTに関してn=8、C1pP^{+/-}に関してn=7、C1pP^{-/-}に関してn=6)の血糖レベル及び血漿インスリンレベルを示すグラフである。データは平均±SDである。*P<0.0

50

5 対WT。

【図15】図15(パネルa~c)は、様々な器官での相対的な二次元蛍光ディフレーションゲル電気泳動(2D-DIGE)からの代表的な画像を示す図である。図15(パネルa)は、WT肝臓対ClpP^{-/-}肝臓又はWT肝臓対ClpP^{+/-}肝臓の2D-DIGEプロファイルの画像を示す図である。図15(パネルb)は、WT筋肉対ClpP^{-/-}筋肉又はWT筋肉対ClpP^{+/-}筋肉の2D-DIGEプロファイルの画像を示す図である。図15(パネルc)は、WT海馬対ClpP^{-/-}海馬又はWT海馬対ClpP^{+/-}海馬の2D-DIGEプロファイルの画像を示す図である。緑, WT; 赤, ClpP^{-/-}又はClpP^{+/-}。

【図16】図16(パネルa~b)は、ClpPの欠如により、様々な器官の多くのミトコンドリアタンパク質のレベルが増加することを表すデータを示す図である。図16(パネルa)及び図16(パネルb)は、様々な器官の溶解物のOAT、LonP、SDH2、ATP6V1A、VDAC、Hsp60、CPS1、Hsp70、Grp78及びHsp60のウェスタンプロット及び定量化を示す図である。データは平均±SDである。*P<0.05、**P<0.01、***P<0.005対WT。

【図17】図17(パネルa~d)は、ClpPをノックアウトすることにより、マウスの肝実質細胞のミトコンドリアの数及び形態が変わったことを表すデータを示す図である。図17(パネルa)及び図17(パネルb)は、WTマウス(パネルa)及びClpP^{-/-}マウス(パネルb)の肝実質細胞のミトコンドリアの代表的な電子顕微鏡画像を示す図である。スケールバーは2µmである。図17(パネルc)は、WTマウス及びClpP^{-/-}マウスの肝実質細胞のミトコンドリアのサイズ分布のヒストグラムを示す図である(WTに関してn=507、ClpP^{-/-}に関してn=529)。図17(パネルd)は、WTマウス及びClpP^{-/-}マウスの肝実質細胞のミトコンドリアの丸さ分配のヒストグラムを示す図である(WTに関してn=507、ClpP^{-/-}に関してn=529)。丸さは、 $4 \times (\text{面積}) / (\pi \times (\text{主軸})^2)$ として定義され、Image Jによってx13,600の倍率で測定された。

【図18】図18(パネルa~f)は、ClpP^{-/-}繊維芽細胞のClpP標的タンパク質のノックダウンと細胞生存率分析とに関連するデータを示す図である。図18(パネルa~d)は、様々なレンチウイルスshRNAによって48時間、処置されたClpP^{-/-}繊維芽細胞のLRPPRCタンパク質レベル、TRAP1タンパク質レベル、Grp75タンパク質レベル及びClpXタンパク質レベルの代表的なウェスタンプロット及び定量化を示す図である。図18(パネルe)は、LRPPRCレンチウイルスshRNAで処置されたClpP^{-/-}繊維芽細胞のH₂O₂処置に応じた細胞生存率を示すグラフである(グループ毎にn=8)(- ClpP^{-/-}、- ClpP^{-/-}+LRPPRC-shRNA)。図18(パネルf)は、ClpXレンチウイルスshRNAで処置されたClpP^{-/-}繊維芽細胞のH₂O₂処置に応じた細胞生存率を示すグラフである(グループ毎にn=8)(- ClpP^{-/-}、- ClpP^{-/-}+ClpX-shRNA)。データは平均±SDである。**P<0.01、***P<0.005対ClpP^{-/-}。

【図19】図19(パネルa~f)は、ClpPの脂肪細胞特異的なノックアウトがマウスの体重、血糖レベル及びインスリン感受性に影響を及ぼさなかったことを表すデータを示す図である。図19(パネルa~b)は、脂肪細胞特異的ClpP-cKOマウスの脂肪組織のClpPレベルのウェスタンプロットを示す図及びそのデータのグラフである。図19(パネルc)は、対照(非Cre同腹子)と比較した5~10ヶ月の脂肪細胞特異的ClpP-cKOマウスの体重を示すグラフである(非Creに関してn=30、Ad-Creに関してn=24)。図19(パネルd)は、対照(非Cre同腹子)と比較した5~10ヶ月の脂肪細胞特異的ClpP-cKOマウスの血糖レベルを示すグラフである(非Creに関してn=30、Ad-Creに関してn=24)。図19(パネルe)は、対照(非Cre同腹子)と比較した3~6ヶ月の脂肪細胞特異的ClpP-cKOマウスの耐糖能曲線を示すグラフである(非Creに関してn=13、Ad-Creに関してn=11)(- 非Cre、- Ad-Cre)。図19(パネルf)は、HFDに応じた9~12ヶ月の脂肪細胞特異的ClpP-cKOマウスの体重増加を示すグラフである(非Creに関してn=9、Ad-Creに関してn=11)。図19(パネルg)は、HFDを4週間与えた後の9~12ヶ月の脂肪細胞特異的ClpP-cKOマウスの耐糖能曲線を示すグラフである(非Creに関してn=9、Ad-Creに関してn=11)。***P<0.005対非Cre。

【図20-1】ClpP-KO組織で差次的に発現したタンパク質を示す表である。

【図20-2】C1pP-KO 組織で差次的に発現したタンパク質を示す表である。

【図20-3】C1pP-KO 組織で差次的に発現したタンパク質を示す表である。

【図21】C1pXP の可能性のある基質を示す表である。

【図22】可能性のあるC1pXP 基質の発現がマイクロアレイ分析によって決定されるように転写レベルで上方制御されなかったことを示す表である。

【図23】小分子C1pP阻害剤のA2-32-01、AV167 及びAV179 で処置した後のC1pP基質のウェスタンブロット解析結果を示す図である。

【図24】小分子C1pP阻害剤のA2-32-01、AV167 及びAV179 で処置した後の（GAPDH に正規化された）C1pP基質のタンパク質レベルを示すグラフである。

【図25】小分子C1pP阻害剤のA2-32-01、AV167 及びAV179 で処置した後の（アクチンに正規化された）C1pP基質のタンパク質レベルを示すグラフである。

【図26】A2-32-01で処置した後のC1pP基質のmRNAレベルを示すグラフである。

【図27】実施例9 及び実施例10のインビボ研究計画の概要を示す図である。

【図28】実施例9 からのインビボ12-32-01処置の最初の2日間からの体重データを示すグラフである。

【図29】高脂肪食（HFD）による肥満及び糖尿病のマウスモデルにC1pP阻害剤をインビボ投与した後の糖負荷試験の結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0010】

肥満及び/又は糖尿病を処置するための候補薬剤を識別するための方法及び組成物を提供する。ある実施形態では、このような方法は、(a) 哺乳類細胞又は細胞集団を試験薬と接触させること、及び(b) 哺乳類細胞（試験薬と接する細胞）又は試験薬と接する細胞集団の細胞のC1pPの発現レベル（例えばタンパク質及び/若しくはmRNA）並びに/又は活性レベルを測定することを有する。化合物（試験薬）が（例えばC1pPタンパク質及び/又はC1pPコードmRNAのレベルを測定することにより示され得るように）C1pP発現及び/又は活性レベルを低下させる場合、この化合物は、「候補薬剤」（例えば処置のための候補薬剤）とみなされる。更に、個体（例えば肥満した個体及び/又は糖尿病を患う個体、又はこのように診断された個体）を処置するための方法及び組成物を提供する。処置するための方法は、（例えば体重増加を防ぐ若しくは低下させるため、インスリン感受性を高めるため、及び/又は耐糖能を高めるために）C1pPの阻害剤（例えばC1pPを標的とするRNAi剤又は遺伝子編集剤）を個体に投与することを有する。

【0011】

本方法及び本組成物を説明する前に、本発明は、言うまでも無くそれ自体が変わり得るように、説明された特定の方法又は組成物に限定されないことを理解すべきである。また本明細書で使用されている用語は特定の実施形態を説明するためにのみ使用されており、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ制限されるので、用語に制限する意図はないと理解されるべきである。

【0012】

ある範囲の値が与えられる場合、その範囲の上限及び下限の間の、文脈が別段に明示しない限りは下限の単位の10分の1までの各介在値が更に具体的に開示されていることを理解されたい。記載された範囲内の任意の記載された値又は介在する値とその記載された範囲内の任意の他の記載された値又は介在する値との間のより小さい範囲が夫々本発明に包含される。これらのより小さい範囲の上限及び下限は、より小さい範囲内に独立して含まれてもよく、又は除外されてよく、上限及び下限の一方又は両方がより小さい範囲内に含まれているか又はいずれも含まれていない各範囲は、記載された範囲内の任意の具体的に除外された限度を条件として本発明に更に包含される。記載範囲が限度の一方又は両方を含む場合、その含まれる限度の一方又は両方を除外する範囲も本発明に含まれる。

【0013】

特に定義されていない限り、本明細書で使用されている全ての技術的用語及び科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって共通して理解されているものと同じ意味

10

20

30

40

50

を有する。本明細書に記載のものと同様又は同等である全ての方法及び材料を、本発明の実施又は試験に使用することができるが、ある可能性のある好ましい方法及び材料を本明細書に記載している。本明細書に述べられている全ての刊行物は、引用されている刊行物に関連して本方法及び/又は本材料を開示して記載すべく参照によって本明細書に組み込まれている。本開示が、矛盾が存在する程度まで組み込まれた刊行物のあらゆる開示に優先することを理解されたい。

【0014】

当業者が本開示を読むと明らかであるように、本明細書に説明され例示された個々の実施形態は夫々、別々の構成要素及び特徴を有しており、別々の構成要素及び特徴は、本発明の範囲又は趣旨から逸脱することなく、他の複数の実施形態のいずれかの特徴から容易に分離されてもよく、又はいずれかの特徴と容易に組み合わせられてもよい。全ての記載された方法は、記載された事象の順序で、又は論理的に可能な任意の他の順序で実行され得る。

10

【0015】

単数形の「1つの(a)」、「1つの(an)」及び「その(the)」が、本明細書及び添付の特許請求の範囲で用いられている場合、文脈が別段に明示しない限り、複数の指示対象を含むことを留意しなければならない。従って、例えば、「細胞」への言及はこのような複数の細胞を含んでおり、「ペプチド」への言及は、一又は複数のペプチド及びこの均等物、例えば当業者に公知のポリペプチドなどへの言及を含んでいる。

【0016】

本明細書に記載されている刊行物は、本出願の出願日に先立ってその開示のためだけに提供されている。本明細書では、本発明がそのような刊行物に先行する権限がないことを認めるものであると解釈されるべきではない。更に、提供される刊行物の日付は、実際の公開日とは異なる場合があり、個別に確認する必要があるかもしれない。

20

【0017】

C1pPタンパク質

哺乳類C1pXPは、触媒サブユニット(C1pPタンパク質)及び調節サブユニット(C1pXTタンパク質)を有するタンパク質複合体(プロテアーゼ)である。本明細書に記載されているように、C1pPタンパク質が哺乳類細胞のミトコンドリアの機能に重要な生物学的役割を果たし、C1pPの発現/機能を変えることにより広範な生理学的結果をもたらされることが発見された。

30

【0018】

野生型のマウス及びヒトのC1pPタンパク質アミノ酸配列(及びこれらのコードmRNA)が以下に記述されている。

【0019】

野生型ヒトC1pP(NP_006003.1)

*「カゼイン分解性ミトコンドリアマトリックスペプチダーゼタンパク質分解サブユニット」、DFNB81及びPRLTS3としても知られている。

MWPGILVGGARVASCYPALGPRLAAHFPAQRPPQRTLQNLGLALQRCLHATATRALPLIPVVEQTGRGERAYDIYSRLLRERIVCVMGPIDDSVASLVI AQLLFLQSESNKKPIHMYINSPGGVVTAGLAIYDTMQYILNPICTWCVQAASMGSLLLAAGTPGMRHSLPNSRIMIHQPSGGARGQATDIAIQAEEMKLLKQLYNIYAKHTKQSLQVIESAMERDRYMSPMEAEQEFGLDKVLVHPPQDGEDEPTLVQKEPVEAAPAAEPVPAST(配列番号:1)

40

【0020】

(上記の)mRNAをコードするヒトC1pPのDNAバージョン(NM_006012.2)

*ORFに下線が施されている。

【0021】

【化 1】

CCTTAATGGCGCCCGCCAGACTCCTGGAAGTGAGCGGCCTAGCGAGCGAGCTCCCA
GGCGCAAAGCACGCCGGAAGCTGTAGTTCCGCCATCGGACGGAAGCCGACCGGGGC
GTGCGGAGGGATGTGGCCCGGAATATTGGTAGGGGGGGCCCGGGTGGCGTCATGCA
GGTACCCCGCGCTGGGGCCTCGCCTCGCCGCTCACTTCCAGCGCAGCGGCCGCGGC
AGCGGACACTCCAGAACGGCCTGGCCCTGCAGCGGTGCCTGCACGCGACGGCGACC
CGGGCTCTCCCGCTCATTCCCATCGTGGTGGAGCAGACGGGTGCGCGCGAGCGCGC
CTATGACATCTACTCGCGGCTGCTGCGGGAGCGCATCGTGTGCGTCATGGGCCCGAT
CGATGACAGCGTTGCCAGCCTTGTTATCGCACAGCTCCTCTTCCCTGCAATCCGAGAGC
AACAAGAAGCCCATCCACATGTACATCAACAGCCCTGGTGGTGTGGTGACCGCGGGC
CTGGCCATCTACGACACGATGCAGTACATCCTCAACCCGATCTGCACCTGGTGCCTG
GGCCAGGCCGCGCAGCATGGGCTCCCTGCTTCTCGCCGCCGGCACCCCAGGCATGCGC
CACTCGCTCCCCAACTCCCGTATCATGATCCACCAGCCCTCAGGAGGCGCCCGGGC
CAAGCCACAGACATTGCCATCCAGGCAGAGGAGATCATGAAGCTCAAGAAGCAGCTC
TATAACATCTACGCCAAGCACACCAAACAGAGCCTGCAGGTGATCGAGTCCGCCATG
GAGAGGGACCGCTACATGAGCCCCATGGAGGCCAGGAGTTTGGCATCTTAGACAAG
GTTCTGGTCCACCCTCCCCAGGACGGTGAGGATGAGCCCACGCTGGTGCAGAAGGA
GCCTGTAGAAGCAGCGCCGGCAGCAGAACCCTGTCCCAGCTAGCACCTGAGAGCTGG
GCCTCCTCTCCAGAATCATGTGGAGGGGCCAGAGGCCTGCCAGACCCCCAGCTGGGC
CCTGCTCACCCCTTGTTGCTGGGCTTGAGGGGCCCTTTGAGGAACTTTAATTTGCA
GGGGTGCCCGCTATGGACGGGGCATTCAGCTGAGACACTGTGATTTAAATTAATC
TTTGTGGTCTTTGCAA
 (配列番号 : 3)

10

20

【 0 0 2 2 】

野生型 マウスClpP (NP_059089.1)

* 「カゼイン分解性ミトコンドリアマトリックスペプチダーゼタンパク質分解サブユニット」、AU019820及びD17Wsu160eとしても知られている。

MWPRVLLGEARVAVDGCRALLSRLAVHFSPWTAVSCSPLRRSLHGTATRAFPLIPVVEQTGRGERAYDIYSRLLRERI
 VCVMGPIDDSVASLVIQLLFLQSESNKKPIHMYINSPGGVVTAGLAIYDTMQYILNPICTWCVGQAASMGSLLLAAGSP
 GMRHSLPNSRIMIHQPSGGARGQATDIAIQAEEMKLLKKQLYNIYAKHTKQSLQVIESAMERDRYMSPMEAQEFGILDKV
 LVHPPQDGEDEPELVQKETATAPTDPPAPTST

30

(配列番号 : 2)

【 0 0 2 3 】

(上記の) mRNAをコードするマウスClpPのDNA バージョン (NM_017393.2)

* ORF に下線が施されている。

【 0 0 2 4 】

【化 2】

AGTGA CTCCCGCAAAGCACGCCGGGTGTTGTAGTTCCGGAAGCCAAGCCGGAGTGC
 GCGTCGTCATGTGGCCAGAGTGCTGCTGGGGGAGGCCCGGGTGGCTGTGGACGGA
TGTCGCGCTCTGTTGTCTCGCCTTGCCGTGCATTTCTCCCGCCATGGACTGCTGTGA
GCTGCTCACCCCTGCGGAGGAGCCTGCATGGAAGTGCAGCGAGCTTTCCCGCTCA
TCCCATAGTGGTGGAGCAGACGGGTCGAGGCGAGCGCGCTTATGACATATACTCGA
GGCTGTTGCGGGAACGCATCGTGTGCGTCATGGGCCCGATTGACGACAGTGTGGCA
GTCTGGTCATTGCCAGCTGTTGTTCTTACAGTCTGAAAGCAACAAGAAGCCCATTC
TATGTATATCAACAGCCCAGGTGGTGTGGTAACTGCGGGCCTGGCCATCTACGACACA
ATGCAGTACATCCTGAACCCCATCTGCACGTGGTGTGTTGGACAGGCTGCCAGCATG
GGCTCCCTGCTCCTCGCTGCTGGCAGCCCGGGCATGCGCCATTCCTGCCCAATTCC
AGAATCATGATCCACCAGCCCTCTGGAGGAGCCAGGGGCCAAGCCACAGACATCGCC
ATCCAGGCAGAGGAAATCATGAAGCTGAAAAAGCAGCTATAACAACATCTACGCCAAAC
ACACCAAGCAGAGCCTACAGGTGATCGAGTCAGCAATGGAGAGGGACCCTACATGA
GCCCCATGGAGGCCAAGAGTTTGGCATCTTGGACAAGGTCTTGGTCCACCCACCTC
AGGACGGGGAGGATGAGCCAGAAGTGGTACAGAAGGAGACTGCCACAGCGCCGACG
GATCCTCCTGCCCGACAAGCACCTAAGGAGTGGAGACCAGACTGAAACTTCCTCTG
CTGGGCCCAAGAACAACCCCTAGAGGAGATGTGGATTGAGGTTGCCCTCAGAGCAGG
GCAGACTGCCTGAGACACTGTGATTTAAATTAATCTTTGTAGTCTTTGTCCCATGTC
TGAAGCACCTTCCATTACTTCTCCAAGACAGCAGGCCTCCTTACCTTGACAAACCAC
TTCAGTAAGCAAACCCCTGGCTCTCCTGGAAGTAAACCAATCTAGCCTCAGACTCAGGT
ACCCACCTGCCTCACCTCCTGAGTGCTAGGATTAAGGTGTACACCACCACACCTGAC
TTCAA

(配列番号：4)

10

20

【0025】

スクリーニング法

肥満及び／又は糖尿病を処置するための候補薬剤を識別するためのスクリーニング法を
 提供する。例として、このような候補薬剤は、個体の脂肪組織の量を減らすための候補薬
 剤、個体の体重増加を防ぐ若しくは低下させるための候補薬剤、個体のインスリン感受性
 を高めるための候補薬剤、及び／又は個体の耐糖能を高めるための候補薬剤を含んでもよ
 い。ある実施形態では、本明細書に記載されているスクリーニング法は、(a) 哺乳類細胞
 又は細胞集団（例えば、マウス細胞、ラット細胞、非ヒト霊長類細胞、ヒト細胞又はこれ
 らの細胞集団）を試験薬と接触させること、及び(b) 哺乳類細胞（試験薬と接する細胞）
 又は試験薬と接する細胞集団の細胞のC1pPの発現レベル及び／又は活性レベル（例えばC1
 pPのタンパク質発現レベル及び／又はmRNA発現レベル又は活性レベル）を測定して、試験
 薬が細胞又は細胞集団の細胞のC1pPの発現レベル及び／又は活性レベルを低下させたか否
 かを判断することを有する。

30

【0026】

C1pPの発現（例えばタンパク質及び／若しくはmRNA）並びに／又は活性のレベルを低下
 させる試験薬は、肥満及び／又は糖尿病の処置に使用するための候補薬剤として識別され
 得る。従って、化合物が、細胞又は細胞集団と（例えばインビトロ、エクスピボ又はイン
 ビボで）接する前に「試験薬」とみなされ、化合物（試験薬）が（例えばC1pPタンパク質
 及び／又はC1pPコードmRNAのレベルを測定することにより示され得るような）C1pP発現及
 び／又は活性レベルを低下させる場合、この化合物は、「候補薬剤」（例えば肥満及び／
 又は糖尿病のような、C1pPの低下が有益な疾患を処置するための候補薬剤）とみなされる
 。従って、提供されるスクリーニング法は更に、C1pPの阻害剤を識別する方法、C1pP発現
 レベル及び／又は活性レベルを低下させる薬剤を識別する方法、C1pP発現の阻害剤及び／
 又は活性レベルを識別する方法などと称され得る。

40

【0027】

ある実施形態では、本方法（例えば上述されているような方法）は、(a) 哺乳類細胞（

50

例えば、マウス細胞、ラット細胞、非ヒト霊長類細胞、ヒト細胞)を試験薬と接触させること、(b) (例えば基準値に対する、例えば試験薬と接触させる前のCipPの発現レベル及び/又は活性レベル、CipP発現を低下させないことが知られている対照薬剤と接触させた後のCipPの発現レベル及び/又は活性レベルなどに対する)接触ステップによって生じるCipPの発現レベル及び/又は活性レベルの低下を測定すること、(c) 試験薬が基準値に対して発現レベル及び/又は活性レベルを低下させたと判断すること、並びに(d) 試験薬を肥満及び/又は糖尿病を処置するための候補薬剤として識別することを有する。

【0028】

場合によっては、インビトロで接触させる(例えば、細胞は培養物中にあり、インビトロで接触させる)。場合によっては、エキスピボで接触させる(例えば、細胞は培養物中にあり、個体から分離された一次細胞である)。

10

【0029】

主スクリーニング法は、細胞(又は細胞集団)を試験薬と接触させるステップを有する。試験薬が(例えばCipPタンパク質又はCipPタンパク質をコードするmRNAのレベルで)CipPの発現レベル及び/又は活性レベルを低下させると、その試験薬は、(例えば肥満及び/又は糖尿病を処置するための)候補薬剤であると判断される。従って一般に、CipPの発現レベル及び/又は活性レベル(例えばタンパク質及び/又はmRNAの発現レベル)の変化が潜在的に検出され得るような時間、接触させる。言い換えれば、接触時間は、試験薬が実際に処置のための候補薬剤である場合、CipPの発現レベル及び/又は活性レベルの変化が検出可能であることを合理的に予期し得る好適な時間である。場合によっては、2分以上(例えば5分以上、10分以上、15分以上、30分以上、1時間以上、2時間以上、5時間以上、6時間以上、12時間以上、18時間以上など)の時間、接触させる。場合によっては、2分~48時間(例えば、5分~24時間、5分~6時間、5分~2時間、15分~24時間、15分~6時間、15分~2時間、1時間~24時間、1時間~6時間又は1時間~2時間)の範囲内の時間、接触させる。

20

【0030】

場合によっては、インピボで接触させる。例えば、場合によっては、本方法(例えばスクリーニング法)は、個体に薬剤(例えば試験薬又は候補薬剤)を投与するステップを有する。投与するステップは多くの異なる目的に役立つことができる。例えば、場合によっては、本方法は、個体(例えばマウス又はラット)に試験薬を投与して、次に、試験薬が処置のための候補薬剤であるか否かを判断するためにCipPの発現レベル及び/又は活性レベルを測定するステップを有する。このような投与を、処置のための候補薬剤である試験薬を識別するためのスクリーニングの一部として行うことができる。

30

【0031】

別の例として、場合によっては、本方法(例えばスクリーニング法)は、候補薬剤(つまり、例えば本方法を使用して細胞をインビトロ、エキスピボ又はインピボで接触させて、CipPの発現レベル及び/又は活性レベルを低下させると既に判断された薬剤)を投与するステップを有する。このような投与を処置ステップとして、又は例えば肥満及び/又は糖尿病に関連した特徴の測定可能な変化(例えば、脂肪組織の量の減少、体重増加の防止若しくは低下、インスリン感受性の上昇、耐糖能の上昇など)を候補薬剤が引き起こすか否かを判断するために行うことができる。

40

【0032】

標的細胞

あらゆる好適な哺乳類細胞又は細胞集団が、標的細胞又は標的細胞集団(つまり試験薬と接触する細胞又は細胞集団)として、提供されるスクリーニング法に使用され得る。例えば、場合によっては、標的細胞又は標的細胞集団(試験薬と接触する細胞又は細胞集団)は、哺乳類細胞、齧歯類細胞(例えばマウス細胞、ラット細胞)、ウサギ細胞、非ヒト霊長類細胞、ヒト細胞などである。上述したように、標的細胞又は標的細胞集団は、(例えば樹立細胞株から)インビトロ、エキスピボ(例えば一次細胞)又はインピボにあり得る。標的細胞は、あらゆる好適なタイプの細胞(例えば幹細胞、前駆細胞、脂肪細胞、二

50

ユーロン、膵臓の細胞、繊維芽細胞、上皮細胞、腎細胞、胚細胞など)とすることができ、場合によっては、接触する細胞(標的細胞)は肝実質細胞である。

【0033】

本スクリーニング法のための好適な哺乳類細胞の例として、SV40(COS-7, ATCC CRL 1651)によって形質転換されたサル腎臓CV1細胞株; ヒト胚腎細胞株(293細胞又は浮遊培養物での成長のためにサブクロニングされた293細胞, Graham等著, J. Gen Virol. 36:59 (1977)); ベビーハムスター腎細胞(BHK, ATCC CCL 10); チャイニーズハムスター卵巣細胞/-DHFR(CHO, Urlaub等著, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); マウスセルトリ細胞(TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); サル腎細胞(CV1 ATCC CCL 70); アフリカミドリザル腎細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587); ヒト子宮頸部癌細胞(HELA, ATCC CCL 2); イヌ腎細胞(MDCK, ATCC CCL 34); バッファローラット肝細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442); ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75); ヒト肝細胞(Hep G2, HB 8065); マウス乳腺腫瘍(MMT 060562, ATCC CCL51); TR1細胞(Mather等著, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1.982)); MRC 5細胞; FS4細胞; 及びヒト肝癌細胞株(Hep G2)が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0034】

試験薬

提供されるスクリーニング法で使用される「試験薬」(例えば「試験化合物」)は、あらゆる好適な薬剤(例えば有機分子、小分子、ポリヌクレオチド、RNA、DNA、タンパク質、抗体、ペプチド、脂質、炭水化物などが含まれるが、これらに限定されない)とすることができる。試験薬は更に化合物の混合物とすることができる。場合によっては、空間的に局在化された試験薬のアレイ(例えば、ペプチドアレイ、ポリヌクレオチドアレイ及び/又は組み合わせの小分子アレイ; ここで「アレイ」は、表面に固定された様々な分子種の集合体を指す)が使用され得る。場合によっては、小分子ライブラリがスクリーニングされる(つまり、試験薬が小分子ライブラリのメンバーとすることができる)。試験薬は生体高分子とすることができ、バクテリオファージペプチドディスプレイライブラリの一部とすることができ、バクテリオファージ抗体(例えばscFv)ディスプレイライブラリ、ポリソームペプチドディスプレイライブラリなどとすることができる。試験薬は、バクテリア、植物、菌類又は動物(例えば哺乳類動物)細胞及び/又は組織から生成された抽出物とすることができる。本スクリーニング法で提示されているように、試験薬は、肥満及び/又は糖尿病を処置するための薬剤(例えば、個体の脂肪組織の量を減らすための候補薬剤、個体の体重増加を防ぐ若しくは低下させるための候補薬剤、個体のインスリン感受性を高めるための候補薬剤、及び/又は個体の耐糖能を高めるための候補薬剤)として可能性のある活性について評価される。場合によっては、本方法は複数の試験薬をスクリーニングするための方法である。試験薬は、個々に(逐次的に)又は並行して評価(スクリーニング)され得る。

20

30

【0035】

場合によっては、試験薬(例えば試験化合物)が、1モル当たり10,000グラム未満(例えば1モル当たり5,000グラム未満、1モル当たり1,000グラム未満又は1モル当たり500グラム未満)の式量を有することができる。試験薬は、天然に存在する(例えば薬草若しくは天然物)ものでも合成物質でもよく、又は天然成分及び合成成分の両方を含んでもよい。小分子の例として、ペプチド、ペプチドミメティクス(例えばペプトイド)、アミノ酸、アミノ酸類似体、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチド類似体、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、及び有機化合物又は無機化合物のような小分子、例えばヘテロ有機化合物又は有機金属化合物が含まれる。

40

【0036】

CipPの発現レベル及び/又は活性レベル

場合によっては、本スクリーニング法は、CipPの発現レベル及び/又は活性レベルを測定するステップを有する。CipP mRNAを低下させることにより、CipPのタンパク質レベルが下げられ得るので、発現レベルを測定するためのどちらかの分析(CipPコードmRNAを測

50

定するための分析又はCipPタンパク質を測定するための分析)を使用することができる。例えば、場合によっては、標的細胞(又は標的細胞集団の細胞)のCipPタンパク質のレベルを下げる試験薬が、肥満及び/又は糖尿病の処置に使用するための候補薬剤として識別される。場合によっては、標的細胞(又は標的細胞集団の細胞)のCipPコードmRNAのレベルを下げる試験薬が、肥満及び/又は糖尿病の処置に使用するための候補薬剤として識別される。

【0037】

「分析」及び「測定」という用語は、生体試料(たとえば細胞試料)を操作して、試料に関連するデータを生成する(例えば、生体試料の発現レベル及び/又は活性レベルを測定する)物理的なステップを含めるべく本明細書に使用されている。本方法を実行する際に、CipP発現産物(例えばmRNA又はタンパク質)の発現レベル及び/又はCipPの活性レベルを測定することができる。発現レベルは、個体からの細胞、細胞集団、生体試料などの発現レベルであってもよい。一又は複数の発現レベル及び/又は一又は複数の活性レベルを、あらゆる好適な方法によって測定することができる。例えば、CipPの一又は複数の核酸転写物、例えばmRNAのレベル/量を測定することにより、RNA発現レベルを測定することができる。CipPのタンパク質のレベル/量を測定することにより、CipPのタンパク質発現レベルを検出することができる。

10

【0038】

「測定」は、測定された発現レベル及び/又は活性レベルが特定の閾値(閾値は予め決定されるか、若しくは対照試料を分析することにより決定され得る)未満であるか否か、閾値より大きいか否か、閾値「以下」であるか否か、又は閾値「以上」であるか否かを判断するために使用され得る。他方では、「発現レベル(及び/若しくは活性レベル)を決定するために測定する」、又は単に「発現レベル(及び/若しくは活性レベル)を測定する」は、CipPの特定の発現産物(例えばCipP発現産物)の発現レベル(例えばタンパク質及び/若しくはRNA、例えばmRNAの量)及び/又は活性レベルを表す(何らかの好適な測定基準を使用した)定量値を決定することを意味し得る。発現及び/又は活性のレベルは、特定の分析に関連した任意の単位(例えば蛍光単位、例えば平均蛍光強度(MFI)、サイクル数(C_t 値)、サイクル数(C_q 値)など)で表現され得るか、又は定められた単位を有する絶対値(例えばmRNA転写物の数、タンパク質分子の数、タンパク質の濃度、切断された基質の量など)として表現され得る。

20

30

【0039】

発現レベル及び/又は活性レベルを、生の測定値とするか、又は生の測定値から得られた正規化値及び/若しくは加重値とすることができる。「発現レベル」及び「測定された発現レベル」という用語は、何らかの方法で操作された(例えば、正規化された及び/又は重みが加えられた)値と生の測定値とを包含すべく本明細書に使用されている。場合によっては、正規化された発現レベル及び/又は活性レベルが、発現産物及び/又は活性レベルの生の測定値が正規化された試料からの発現産物の測定された発現レベル及び/又は活性レベルである。例えば、発現産物(例えばCipPコードRNA、CipPタンパク質)の発現レベルは、一又は複数の他の発現産物の発現レベル(例えばハウスキーピング遺伝子の発現レベル、同義遺伝子の平均された発現レベルなど)と比較されて、正規化された発現レベルを表す正規化された値を得ることができる。正規化の方法は本技術分野では当業者にとって公知であり、あらゆる好適な正規化方法が使用され得る。多くのマーカ及び/又は多くの生体試料(例えば、多くの個体からの試料若しくは同一の個体からの多くの試料)を評価するとき、同一の単位が使用されている(又は同一の単位への変換が行われている)限り、選択された特定の測定基準(又は単位)は重大ではない。

40

【0040】

CipPの発現レベル及び/又は活性レベルの低下を多くの異なる方法で決定することができる。例えば、場合によっては、CipPの発現レベル及び/又は活性レベルは、試験薬と接触する前及び試験薬と接触した後(又は薬剤を個体に投与する前及び投与した後)に細胞(又は個体、例えば個体からの生体試料)で測定され、接触(又は投与)により低下した

50

か否かに関して判断する。場合によっては、細胞集団の一部の細胞が薬剤（例えば試験薬）と接触せず、細胞集団の他の細胞が薬剤（例えば試験薬）と接触し、接触した細胞と接触していない細胞とで比較することができる。場合によっては、細胞集団の一部の細胞が薬剤（例えば試験薬）と接触せず、細胞集団の他の細胞は偽の薬剤（例えば変化をもたらさないことが知られている薬剤）と接触し、試験薬と接触した細胞と偽の薬剤（対照薬剤）と接触した細胞（対照細胞）とで比較することができる。

【0041】

このような比較は一般に、測定値と基準値との比較、又は薬剤が基準値と比較してCipPの発現レベル及び/若しくは活性レベルを低下させたとの判断とみなされ得る。基準値は、薬剤と接触させる前に測定されたCipP（タンパク質及び/若しくはmRNA）のレベル並びに/又はCipPの活性レベル、偽の薬剤（対照薬剤）と接触させた後に測定されたCipP（タンパク質及び/若しくはmRNA）のレベル並びに/又はCipPの活性レベル、薬剤との接触無しで測定されたCipP（タンパク質及び/若しくはmRNA）のレベル並びに/又はCipPの活性レベルなどとしてすることができる。基準値は更に、場合によっては予め定められた値（閾値）としてすることができる。

10

【0042】

場合によっては、本方法は、試験薬又は候補薬剤がCipPの発現レベル及び/又は活性レベルを低下させたと判断することを有する。場合によっては、発現レベル及び/又は活性レベルは、基準値（例えば、薬剤と接触させる前のCipPタンパク質及び/又はmRNAの活性レベル及び/又は発現レベル、偽の処置された細胞又は偽の処置された対照個体の、例えばCipPタンパク質及び/又はmRNAの活性レベル及び/又は発現レベルなど）と比較して10%以上（例えば、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上又は90%以上）低下する。場合によっては、測定された発現レベル及び/又は活性レベルは、基準値の95%以下（例えば基準値の90%以下、基準値の85%以下、基準値の80%以下、基準値の75%以下、基準値の70%以下、基準値の65%以下、基準値の60%以下、基準値の55%以下、基準値の50%以下、基準値の45%以下、基準値の40%以下、基準値の35%以下、基準値の30%以下、基準値の25%以下、基準値の20%以下、基準値の15%以下、基準値の10%以下又は基準値の5%以下）である。場合によっては、CipPの発現レベル及び/又は活性レベルの基準値は、測定値より1.1倍以上（例えば1.2倍以上、1.3倍以上、1.4倍以上、1.5倍以上、2倍以上、2.5倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、7.5倍以上又は10倍以上）である。

20

30

【0043】

RNA の測定

注目する遺伝子（CipP）によってコードされた一又は複数のRNA 転写物又はその断片の量又はレベルを検出することにより、CipPの発現産物の発現レベルを測定してもよい。このような検出として、細胞抽出物、固定細胞、生細胞、生体試料などのCipP遺伝子によってコードされた一又は複数のRNA 転写物又はその断片のレベルを検出することが含まれてもよい。RNA レベルを測定するために、試料中のRNA の量又はレベル、例えばmRNAの発現レベルを決定する。場合によっては、一又は複数の追加のRNA の発現レベルを更に測定してもよく、一又は複数の追加のRNA のレベルと比較したCipP RNA発現レベルによって、CipP発現レベルの正規化された値が得られる。

40

【0044】

試料の核酸の発現レベル（例えばCipP mRNA の発現レベル）をあらゆる好適なプロトコルを使用して検出してもよい。試料のRNA（例えばmRNA）発現レベルを測定するための多くの例示的な方法は、様々な遺伝子発現解析の分野で用いられる方法など、当業者にとって公知であり、あらゆる好適な方法を使用することができる。例示的な方法として、ハイブリダイゼーションに基づく方法（例えば、ノーザンブロット法、アレイハイブリダイゼーション（例えば、マイクロアレイ）；インサイトハイブリダイゼーション；インサイトハイブリダイゼーションの後にFACS；など）（Parker & Barnes, Methods in Molecular Biology 106:247-283 (1999)）；リボヌクレアーゼプロテクションアッセイ（Hod, Biote

50

chniques 13:852-854 (1992)) ; PCR に基づく方法 (例えば逆転写PCR (RT-PCR)、定量 RT-PCR (qRT-PCR)、リアルタイムRT-PCRなど) (Weis等著, Trends in Genetics 8:263-264 (1992)) ; 核酸シーケンシング法 (例えば、サンガーシーケンシング、次世代シーケンシング (つまり、超並列高処理シーケンシング、例えばIlluminaの可逆ターミネータ法、Roche のピロシーケンス法(454) 、Life Technologies の連結反応によるシーケンシング (SOLiD プラットフォーム)、Life Technologies のIon Torrent プラットフォーム、一分子シーケンシングなど) ; ナノポア式シーケンシング法などが含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 4 5 】

ある実施形態では、生体試料を直接分析することができる。ある実施形態では、生体試料の核酸を、分析前に (例えばPCR によって) 増幅する。そのため、PCR (ポリメラーゼ連鎖反応)、RT-PCR (逆転写PCR)、qRT-PCR (定量RT-PCR、リアルタイムRT-PCR) などの技術を、上述したハイブリダイゼーション法及び / 又はシーケンシング法の前に使用することができる。

【 0 0 4 6 】

上記の方法の内の一部の例が、Margulies 等著 (Nature 2005 437: 376-80) ; Ronaghi 等著 (Analytical Biochemistry 1996 242: 84-9) ; Shendure 著 (Science 2005 309: 1728) ; Imelfort 等著 (Brief Bioinform. 2009 10:609-18) ; Fox 等著 (Methods Mol Biol. 2009;553:79-108) ; Appleby 等著 (Methods Mol Biol. 2009;513:19-39) ; Soni 等著 (Clin Chem 53: 1996-2001 2007) ; 及びMorozova (Genomics. 2008 92:255-64) の文献に記載されており、これらの文献は、本方法及び本方法の特定のステップ、ステップ毎の出発物質、試薬及び最終生成物を含めた一般的な記載のために参照によって本明細書に組み込まれる。

【 0 0 4 7 】

タンパク質の測定

一又は複数のタンパク質 (例えばCipP) 又はその断片の量又はレベルを検出することにより、CipPの発現産物の発現レベルを測定してもよい。このような検出として、細胞抽出物、固定細胞、生細胞、生体試料などのCipPタンパク質又はその断片のレベルを検出することが含まれてもよい。タンパク質レベルを測定するために、(例えば細胞、細胞集団、細胞抽出物などの) 試料のタンパク質の量又はレベルを決定する。場合によっては、一又は複数の追加のタンパク質の濃度を更に測定してもよく、一又は複数の追加のタンパク質のレベルと測定された発現レベルを比較することによって、測定された発現レベルの正規化された値が得られる。ある実施形態では、測定された発現レベルは、1つのタンパク質のレベルを別のタンパク質のレベルと比較することにより算出された相対値である。他の実施形態では、濃度は絶対測定 (例えば重量 / 体積又は重量 / 重量) である。

【 0 0 4 8 】

試料中の一又は複数のタンパク質 / ポリペプチド又はその断片の量又はレベルを検出することによりタンパク質 (例えばCipP) の発現レベルを測定してもよい。「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」という用語は、本明細書ではアミノ酸残基のポリマーを指すために互換的に使用される。「ポリペプチド」は、アミノ酸 (アミノ酸配列) のポリマーを指し、分子の特定の長さを指すものではない。従って、ペプチド及びオリゴペプチドはポリペプチドの定義内に含まれる。場合によっては、発現レベルを測定する前に生体試料から (例えば遠心分離、細胞の皿又はプラスチックへの付着などによって) 細胞を取り除く。場合によっては、細胞内容物のタンパク質のレベルを測定するために、試料の細胞を溶解することにより細胞内タンパク質のレベルを測定する。場合によっては、細胞の形態を崩壊させることなくタンパク質のレベルを測定することができる (例えば、タンパク質のレベルを、例えば蛍光抗体染色などによって視覚化することができる)。

【 0 0 4 9 】

タンパク質のレベルを検出するとき、タンパク質のレベルの測定に適したいかなるプロトコルを使用してもよい。タンパク質のレベルを分析する方法の例として、抗体に基づく

10

20

30

40

50

方法、及び抗体に基づかない方法が含まれるが、これらに限定されない。好適な方法の例として、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)、質量分析法、プロテオーム解析、xMAP (商標) ミクロスフェア技術、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット、免疫蛍光法及び免疫組織化学法が含まれるが、これらに限定されない。

【0050】

一部のタンパク質検出法は抗体に基づく方法である。「抗体」という用語は最も広い意味で使用されており、具体的には、所望の生物活性を示す限り、(全長モノクローナル抗体を含む)モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多特異性抗体(例えば二重特異性抗体)及び抗体断片を包含する。抗体断片の例として、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、及びFv断片; scFv、二重特異性抗体; 及び抗体断片から形成された多特異性構造又は多価構造が含まれる。

10

【0051】

CipP活性レベル

上述したように、CipPはCipP及びCipXの両方を含む複合体(CipXP)の一部として機能し、ATPがタンパク質基質をアンフォールドして加水分解することを必要とする。そのため、CipPとCipXとの相互作用を崩壊させるか、CipP/CipX複合体の活性を低下させる(例えば、タンパク質基質の加水分解を低下させる)あらゆる薬剤を、CipPの活性レベルを低下させる薬剤とみなすことができる。CipPの活性レベルを、あらゆる好適な方法を使用して測定することができる。例えば、CipP活性を測定するために酵素分析法を使用することができる。CipXPによるATPの加水分解の動態及び/又はCipXPによる基質の分解などのパラメータを、あらゆる好適な方法を使用して測定することができる。CipPの活性レベルを測定する様々な方法の例に関して、例えば、Burton等著, Protein Sci. 2003 May;12(5):893-902; Joshi 等著, Nat Struct Mol Biol. 2004 May;11(5):404-11; Kang等著, J Biol Chem. 2005 Oct 21;280(42):35424-32; Baker 等著, Biochim Biophys Acta. 2012 Jan;1823(1):15-28、及びAl-Furoukh等著, (2014) PLoS ONE 9(7): e103141を参照し、これらの各々の開示は、参照によって本明細書に組み込まれる。

20

【0052】

更に、以下の実施例で実証されるように、(この場合にはロックアウトマウスのCipPの欠如によって引き起こされる)CipPの活性レベルの低下によって、TNF受容体関連タンパク質1 (TRAP1) (ミトコンドリアHsp90)、熱ショックタンパク質ファミリーA (Hsp70)メンバー9 (Grp75) (ミトコンドリアHsp70)、ロイシンリッチペントトリコペプチドリプト含有 (LRPPRC)、カゼイン分解性ミトコンドリアマトリックスペプチダーゼシャペロンサブユニット (CipX) (ミトコンドリアHsp100)、オルニチンアミノトランスフェラーゼ (OAT) 及びLonペプチダーゼ1, ミトコンドリア (LonP1) (ミトコンドリアプロテアーゼ)のタンパク質の量が増加する。そのため、場合によっては、CipPの活性レベルの測定として、TRAP1、Grp75、LRPPRC、CipX、OAT及びLonPのタンパク質の一又は複数(例えば2以上、3以上、4以上、5以上又は6全て)の量の測定が含まれ得る。例えば、本明細書に記載されているような試験薬と接触させる前の、例えばTRAP1、Grp75、LRPPRC、CipX、OAT及びLonPの一又は複数のレベルのような好適な対照に対する、TRAP1、Grp75、LRPPRC、CipX、OAT及びLonPの一又は複数(例えば2以上、3以上、4以上、5以上又は6全て)のレベルの増加を測定することにより、CipP活性の減少を検出することができる。

30

40

【0053】

評価ステップ

以下の実施例に記載されているように、本発明者らは、(CipP^(-/-))と表されるCipP遺伝子のゲノムのロックアウトにより)CipP発現を低下させたマウスが多くの表現型を示すことを発見した。表現型として、白色脂肪組織、(総体脂肪量又は体脂肪含有率(体脂肪率)によって測定されるような)体脂肪、体重、内臓脂肪の脂肪細胞サイズ、血漿レプチンのレベル及び(例えば絶食後の)血糖レベルの減少と、インスリン感受性、耐糖能、成長ホルモンレベル、エネルギー消費量(例えば基礎エネルギー消費量の増加)、筋肉及び

50

ノ又は繊維芽細胞のリン酸化AKT (p-AKT) のレベル及び除脂肪含有率(除脂肪率)の増加とが含まれるが、これらに限定されない。C1pP^{-/-} マウスはより多くの食料を消費しながら、体重を増やさず脂肪を減らし、高脂肪食(HFD)による体重増加に耐性を示した(例えば、HFDによる体脂肪量及び体重の増加量は、野生型対照で見られた増加量より小さかった)。

【0054】

場合によっては、本方法(例えばスクリーニング法又は処置法)は、個体に薬剤(例えば、本スクリーニング法で識別されるような処置のための候補薬剤、C1pPに特異的なRNAi剤又はゲノム編集剤のようなC1pPの阻害剤など)を投与した後、(例えば薬剤が所望の成果をもたらすことを確認するために)個体の一又は複数の特徴を測定するステップを有する。測定され得る好適な特徴として、インスリン感受性、血糖レベル、耐糖能、体脂肪量、脂肪組織の量、白色脂肪組織の量、体脂肪率、体重、内臓脂肪の脂肪細胞サイズ、血漿レプチンレベル、成長ホルモンレベル、基礎エネルギー消費量、筋肉及びノ又は繊維芽細胞のリン酸化AKT (p-AKT) レベル、除脂肪率、肝実質細胞のミトコンドリアの数、肝実質細胞のミトコンドリアの量、肝実質細胞のミトコンドリアの形態、繊維芽細胞の呼吸容量、繊維芽細胞の最大酸素消費速度(OCR)及びH₂O₂による細胞毒性に対する繊維芽細胞耐性が含まれるが、これらに限定されない。評価ステップ(例えば上記の特徴の一又は複数を測定するステップ)を、本スクリーニング法(例えば候補薬剤を識別する方法)の一部として含むことができる。評価ステップ(例えば上記の特徴の一又は複数を測定するステップ)を本処置法の一部として含めることができる。

10

20

【0055】

報告書の作成

場合によっては、本方法(例えば上記のスクリーニング法のいずれか)は、報告書(例えば、試験薬が肥満及びノ又は糖尿病を処置するための候補薬剤であるという報告書)を作成するステップを有する。本明細書に記載されているような「報告書」は、結果に関連する注目する情報及びノ又は本方法(例えばスクリーニング法)のこのような結果の評価を提供する報告要素を含む電子文書又は有形文書である。ある実施形態では、本報告書は、上記により詳細に述べられているような測定された発現レベル及びノ又は活性レベル(例えば生の値、正規化された値、正規化されて重みが加えられた値など)(例えばC1pPの活性レベル、又はC1pPタンパク質及びノ又はC1pPコードmRNAのようなC1pP発現産物の発現レベル)を含んでいる。ある実施形態は、本報告書は、C1pPの発現レベル及びノ又は活性レベルを含んでいる。場合によっては、本報告書は、評価(例えば一又は複数の試験薬がC1pPの発現レベル及びノ又は活性レベルを低下させたか否かの判断)を含んでいる。例えば、所与の試験薬若しくは一覧表の試験薬が(例えばタンパク質及びノ若しくはmRNAのレベルで)C1pPの発現レベル及びノ若しくは活性レベルを低下させたか否か、並びにノ又は所与の試験薬若しくは一覧表の試験薬が処置のための候補薬剤であるか否かが報告書に記載され得る。

30

【0056】

処置法

(C1pPに特異的なRNAi剤又は遺伝子編集剤のような)C1pPの阻害剤を個体に投与することを有する方法が提供されており、C1pPの阻害剤は、(例えばタンパク質及びノ又はmRNAのレベルで検出され得るように)C1pPの活性レベル及びノ又は発現レベルを低下させる。このような方法は、C1pPの発現レベル及びノ若しくは活性レベルを低下させる方法、並びにノ又は肥満及びノ若しくは糖尿病の個体を処置する方法とみなされ得る。(例えばタンパク質及びノ又はmRNAのレベルでの)C1pPの活性レベル及び発現レベル、並びにこのようなレベルを測定する方法の説明は、本明細書の他の箇所に見出され得る。

40

【0057】

ある実施形態では、このような方法は、肥満及びノ又は糖尿病の個体を処置する方法、エネルギー出力を増加させる方法、脂肪組織(例えば白色脂肪組織)の量を減少させる方法、体重増加を防止する若しくは低下させる方法、インスリン感受性を高める方法、及び

50

／又は耐糖能を高める方法である。例えば、場合によっては、本方法は、エネルギー出力を増加させて、脂肪組織の量を減らして、インスリン感受性を高めて、耐糖能を高めて、及び／又は体重増加を防止する若しくは低下させる方法であり、この方法は、C1pPの発現レベル及び／又は活性レベルを低下させる（C1pPに特異的なRNAi剤又は遺伝子編集剤のような）C1pPの阻害剤を個体に投与することを有する。ある実施形態では、本方法は肥満及び／又は糖尿病の個体を処置する方法であり、この方法は、C1pPの発現レベル及び／又は活性レベルを低下させる（C1pPに特異的なRNAi剤又は遺伝子編集剤のような）C1pPの阻害剤を個体に投与することを有する。

【0058】

ある実施形態では、本方法は、個体の脂肪組織の量を減らす、個体の体重増加を防ぐ若しくは減らす、個体のインスリン感受性を高める、及び／又は個体の耐糖能を高めるのに有効な量で個体（例えば肥満及び／又は糖尿病を患う個体）にC1pPの阻害剤を投与する方法である。

【0059】

場合によっては、上記の本処置法のいずれも、処置される個体からの生体試料（例えばC1pPの阻害剤が投与された個体の／個体からの肝実質細胞）のC1pPの発現レベル及び／又は活性レベルを測定するステップを有することができる。場合によっては、本処置法は、個体から生体試料を得て、生体試料のC1pPの発現レベル及び／又は活性レベルを測定するステップを有する。場合によっては、このようなステップを（例えば投与が所望の成果をもたらしたことを確認するために）処置前及び処置後に行う。

【0060】

場合によっては、C1pPの阻害剤（例えばC1pPを標的とするRNAi剤又は遺伝子編集剤）を、個体の脂肪組織の量を減らす、個体の体重増加を防止する若しくは低下させる、個体のインスリン感受性を高める、及び／又は個体の耐糖能を高めるのに有効な量で個体（例えば肥満及び／又は糖尿病を患う個体）に投与する。

【0061】

RNAi剤及びゲノム編集剤

場合によっては、C1pPの阻害剤（例えばC1pPの発現レベル及び／又は活性レベルを低下させる薬剤）が、C1pPを標的とする（例えばC1pPに特異的な）RNAi剤又はゲノム編集剤である。「RNAi剤」という用語は、細胞の遺伝子特異的RNA干渉（RNAi）反応を生じさせるために使用され得るあらゆる薬剤を意味すべく本明細書に使用されている。RNAi剤の好適な例として、短干渉RNA（siRNA）及び短ヘアピンRNA（shRNA）及びマイクロRNA（miRNA）が含まれるが、これらに限定されない。C1pPに特異的なRNAi剤（例えばshRNA、siRNA、miRNA）は、C1pPタンパク質をコードするmRNAを標的とする薬剤である。RNAi剤は、適切なヌクレオチド配列を選ぶことにより、あらゆる所望のmRNA（例えばC1pPコードmRNA）を特異的に標的とすべく容易に設計され得る。

【0062】

様々なRNAi剤の設計（様々な特徴を有するRNAi剤）は本技術分野では公知であり、C1pPを標的とするあらゆる好適なRNAi剤を使用することができる。例えば、RNAi剤（及びこれらを送達する方法）の様々な設計を、米国特許第7022828号明細書、米国特許第7176304号明細書、米国特許第7592324号明細書、米国特許第7667028号明細書、米国特許第7718625号明細書、米国特許第7732593号明細書、米国特許第7772203号明細書、米国特許第7781414号明細書、米国特許第7807650号明細書、米国特許第7879813号明細書、米国特許第7892793号明細書、米国特許第7910722号明細書、米国特許第7947658号明細書、米国特許第7973019号明細書、米国特許第7973155号明細書、米国特許第7981446号明細書、米国特許第7993925号明細書、米国特許第8008271号明細書、米国特許第8008468号明細書、米国特許第8017759号明細書、米国特許第8034922号明細書、米国特許第8399653号明細書、米国特許第8415319号明細書、米国特許第8426675号明細書、米国特許第8466274号明細書、米国特許第8524679号明細書、米国特許第8524679号明細書、米国特許第8569065号明細書、米国特許第8569256号明細書、米国特許第8569258号明細書、米国特

10

20

30

40

50

許第9233102号明細書、米国特許第9233170号明細書及び米国特許第9233174号明細書を含むがこれらに限定されない多くの特許に見出すことができ、これらは全て参照によって本明細書に組み込まれている。必要に応じて、RNAi剤が、薬剤をコードするDNA（例えばshRNAをコードする発現ベクタ）の形態で提供されてもよい。ClpP（受託番号NM_003321）コード配列を標的とするshRNAは、例えばCole等著，2015，Cancer Cell 27，864-876に記載されており、この開示全体があらゆる目的のために参照によって本明細書に組み込まれている。これらのshRNAは、5'-GCCCATCCACATGTACATCAA-3'（配列番号5）；5'-CACGATGCAGTACATCCTCAA-3'（配列番号6）；及び5'-GCTCAAGAAGCAGCTCTATAA-3'（配列番号7）を含んでいる。

【0063】

「ゲノム編集剤」及び「ゲノム標的組成物」という用語は、ゲノム編集ヌクレアーゼを含む組成物を意味すべく本明細書に互換的に使用されている。ある実施形態では、ゲノム編集ヌクレアーゼは、天然又は内在性の認識配列を結合する。ある実施形態では、ゲノム編集ヌクレアーゼは、非天然又は外因性の認識配列を結合して、天然又は内在性の認識配列を結合しない修飾エンドヌクレアーゼである。

【0064】

好適なゲノム編集ヌクレアーゼの例として、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、TAL エフェクタDNA 結合領域ヌクレアーゼ融合タンパク質（転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN））、CRISPR/Casエンドヌクレアーゼ（例えば、II型、V型又はVI型のCRISPR/Casエンドヌクレアーゼのようなクラス2のCRISPR/Casエンドヌクレアーゼ）、及びリコンビナーゼ（例えばCre リコンビナーゼ、Hin リコンビナーゼ、RecA、RAD51、Tre、FLP など）が含まれるが、これらに限定されない。従って、ある実施形態では、ゲノム編集剤は、ZFN、TALEN、リコンビナーゼ（例えばCre リコンビナーゼ、Hin リコンビナーゼ、RecA、RAD51、Tre、FLP など）及びCRISPR/Casエンドヌクレアーゼ（例えばII型、V型又はVI型のCRISPR/Casエンドヌクレアーゼのようなクラス2のCRISPR/Casエンドヌクレアーゼ）から選択される一又は複数のゲノム編集ヌクレアーゼを含み得る組成物である。

【0065】

リコンビナーゼは、Cre リコンビナーゼ、Hin リコンビナーゼ、RecA、RAD51、Tre 及びFLP を含んでいるが、これらに限定されない。

【0066】

クラス2でII型のCRISPR/CasエンドヌクレアーゼCas9タンパク質及びCas9ガイドRNAに関連する情報（及びこれらを送達する方法）（及び標的とされた核酸に存在するプロトスペーサ隣接モチーフ（PAM）配列に関連する要件に関する情報）を本技術分野で見つけることができ、例えば、Jinek 等著，Science. 2012 Aug 17;337(6096):816-21；Chylinski 等著，RNA Biol. 2013 May;10(5):726-37；Ma等著，Biomed Res Int. 2013;2013:270805；Hou 等著，Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Sep 24;110(39):15644-9；Jinek 等著，E life. 2013;2:e00471；Pattanayak等著，Nat Biotechnol. 2013 Sep;31(9):839-43；Qi 等著，Cell. 2013 Feb 28;152(5):1173-83；Wang等著，Cell. 2013 May 9;153(4):910-8；Auer等著，Genome Res. 2013 Oct 31；Chen等著，Nucleic Acids Res. 2013 Nov 1;41(20):e19；Cheng 等著，Cell Res. 2013 Oct;23(10):1163-71；Cho 等著，Genetics. 2013 Nov;195(3):1177-80；DiCarlo 等著，Nucleic Acids Res. 2013 Apr;41(7):4336-43；Dickinson 等著，Nat Methods. 2013 Oct;10(10):1028-34；Ebina 等著，Sci Rep. 2013;3:2510；Fujii 等著，Nucleic Acids Res. 2013 Nov 1;41(20):e187；Hu等著，Cell Res. 2013 Nov;23(11):1322-5；Jiang 等著，Nucleic Acids Res. 2013 Nov 1;41(20):e188；Larson 等著，Nat Protoc. 2013 Nov;8(11):2180-96；Mali等著，Nat Methods. 2013 Oct;10(10):957-63；Nakayama等著，Genesis. 2013 Dec;51(12):835-43；Ran 等著，Nat Protoc. 2013 Nov;8(11):2281-308；Ran 等著，Cell. 2013 Sep 12;154(6):1380-9；Upadhyay等著，G3 (Bethesda). 2013 Dec 9;3(12):2233-8；Walsh 等著，Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Sep 24;110(39):15514-5；Xie 等著，Mol Plant. 2013 Oct 9；Yang等著，Cell. 20

10

20

30

40

50

13 Sep 12;154(6):1370-9 ; Briner 等著 , Mol Cell. 2014 Oct 23;56(2):333-9 ; 及び米国特許第8906616号明細書、米国特許第8895308号明細書、米国特許第8889418号明細書、米国特許第8889356号明細書、米国特許第8871445号明細書、米国特許第8865406号明細書、米国特許第8795965号明細書、米国特許第8771945号明細書、米国特許第8697359号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0068797号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0170753号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0179006号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0179770号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0186843号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0186919号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0186958号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0189896号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0227787号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0234972号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0242664号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0242699号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0242700号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0242702号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0248702号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0256046号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0273037号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0273226号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0273230号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0273231号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0273232号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0273233号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0273234号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0273235号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0287938号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0295556号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0295557号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0298547号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0304853号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0309487号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0310828号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0310830号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0315985号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0335063号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0335620号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0342456号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0342457号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0342458号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0349400号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0349405号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0356867号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0356956号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0356958号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0356959号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0357523号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0357530号明細書、米国特許出願公開第2014 / 0364333号明細書及び米国特許出願公開第2014 / 0377868号明細書を参照し、これら全ての全体が参照によって本明細書に組み込まれている。V型又はVI型のCRISPR/Casエンドヌクレアーゼ及びガイドRNAに関連する例及び案内(並びに標的とする核酸に存在するプロトスペーサ隣接モチーフ(PAM)配列に関連する要件に関する情報)は本技術分野で見出されることができ、例えば、Zetsche 等著, Cell. 2015 Oct 22;163(3):759-71 ; Makarova 等著, Nat Rev Microbiol. 2015 Nov;13(11):722-36 ; 及びShmakov 等著, Mol Cell. 2015 Nov 5;60(3):385-97を参照。

10

20

30

【 0 0 6 7 】

有用なデザイナーのジンクフィンガーモジュールは、様々なGNNトリプレット及びANNトリプレットを認識するモジュール(Dreier 等著, (2001) J Biol Chem 276:29466-78 ; Dreier 等著, (2000) J Mol Biol 303:489-502 ; Liu 等著, (2002) J Biol Chem 277:3850-6)、並びに様々なCNNトリプレット又はTNNトリプレットを認識するモジュール(Dreier 等著, (2005) J Biol Chem 280:35588-97 ; Jamieson 等著, (2003) Nature Rev Drug Discov 2:361-8)を含んでいる。更に、Durai 等著, (2005) Nucleic Acids Res 33:5978-90 ; Segal 等著, (2002) Methods 26:76-83 ; Porteus 及びCarroll 等著, (2005) Nat Biotechnol 23:967-73 ; Pabo 等著, (2001) Ann Rev Biochem 70:313-40 ; Wolfe 等著, (2000) Ann Rev Biophys Biomol Struct 29:183-212 ; Segal 及びBarbas 著, (2001) Curr Opin Biotechnol 12:632-7 ; Segal 等著, (2003) Biochemistry 42:2137-48 ; Beerli 及びBarbas 著, (2002) Nat Biotechnol 20:135-41 ; Carroll 等著, (2006) Nature Protocols 1:1329 ; Ordiz 等著, (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99:13290-5 ; Guan 等著, (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99:13296-301を参照。

40

【 0 0 6 8 】

50

ZFN 及びTALEN に関する更なる情報（並びにこれらを送達する方法）に関して、Sanjana 等著, Nat Protoc. 2012 Jan 5;7(1):171-92、並びに国際公開第2002/099084号パンフレット、国際公開第00/42219号パンフレット、国際公開第02/42459号パンフレット、国際公開第2003/062455号パンフレット、国際公開第03/080809号パンフレット、国際公開第05/014791号パンフレット、国際公開第05/084190号パンフレット、国際公開第08/021207号パンフレット、国際公開第09/042186号パンフレット、国際公開第09/054985号パンフレット、国際公開第10/079430号パンフレット及び国際公開第10/065123号パンフレット、米国特許第8685737号明細書、米国特許第6140466号明細書、米国特許第6511808号明細書、米国特許第6453242号明細書、米国特許出願公開第2011/0145940号明細書、米国特許出願公開第2003/0059767号明細書及び米国特許出願公開第2003/0108880号明細書を参照し、これら全ての全体が参照によって本明細書に組み込まれている。

10

【0069】

小分子ClpP阻害剤

本明細書に記載されているスクリーニング法又は処置法の一又は複数で使用されてもよいClpPの小分子阻害剤は公知である。例えば、(A2-32-01として知られており、A2-32-01及びA2-32として本明細書で互換的に称される)(3RS,4RS)-3-(non-8-en-1-yl)-4-(2-(ピリジン-3-yl)エチル)オキセタン-2-oneのような β -ラクトンは、バクテリアのClpP及び哺乳類のClpPの両方の阻害剤として識別された。例えば、Cole等著, 2015, Cancer Cell 27, 864-876を参照し、この開示全体があらゆる目的のために参照によって本明細書に組み込まれている。

20

【0070】

β -ラクトンは、その開示全体があらゆる目的のために参照によって本明細書に組み込まれている米国特許出願公開第2014/0243255号明細書に記載されており、トランス- β -ラクトン、 β -プロピオラクトン、飽和脂肪族 β -ラクトン、 β -ブチロラクトン、 β -イソブチロラクトン、 β -バレロラクトン、 β -イソバレロラクトン、 β -n-カプロラクトン、アルファ-エチル β -プロピオラクトン、アルファ-イソプロピル- β -プロピオラクトン、アルファ-ブチル- β -プロピオラクトン、アルファイソプロピル- β -プロピオラクトン、 β -イソプロピル- β -プロピオラクトン、アルファ-メチル- β -ブチロラクトン、 β -エチル- β -ブチロラクトン、アルファ-エチル- β -ブチロラクトン、アルファ-メチル β -プロピオラクトン、シクロアルキル置換基、アリール置換基及びアラルキル置換基を含む β -ヒドロキシ-モノ-カルボン酸のラクトン、例えば β -シクロヘキシル- β -プロピオラクトン、 β -フェニル- β -プロピオラクトン、アルファ-フェニル- β -プロピオラクトン、 β -taenyl- β -プロピオラクトン及びこれらの誘導体を含むことができるが、これらに限定されない。

30

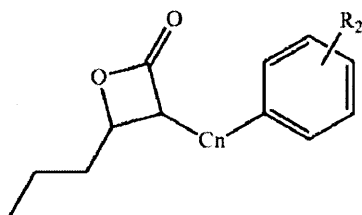
【0071】

開示された方法との関連で利用されてもよいClpPの β -ラクトン阻害剤は、米国特許出願公開第2016/0221977号明細書に記載された阻害剤を含んでおり、この開示全体があらゆる目的のために参照によって本明細書に組み込まれている。ClpPのこのような β -ラクトン阻害剤は、以下の構造の化合物を含んでいる。

40

【0072】

【化3】



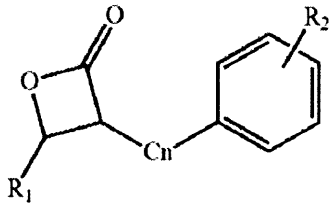
50

【0073】

ここで、 R_2 は、置換された部分がアルキル、置換アルキル、アルキニル、置換アルキル、ビニル、ニトロ、(例えば臭素、塩素、フッ素及びヨウ素を含む)ハロゲン、シアノ、アリール、ヘテロアリール、アルコキシからなる群から選択されているベンゼン環の任意の位置での水素の単一置換であり、 C_n は炭素であり、 n は1~5の数である。

【0074】

【化4】



10

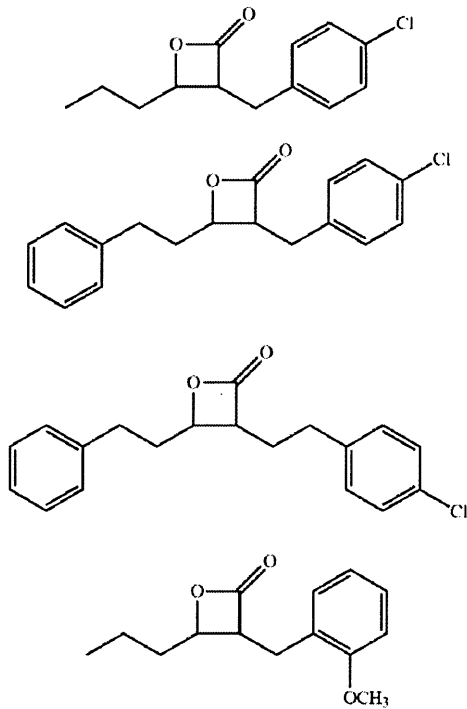
【0075】

ここで、 R_1 は、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、アルコキシ、置換アルコキシ、アルコシアルキル、置換アルコシアルキル、 NH_2 、 NHR 、 NR_2 、モノ置換又はポリヒドロキシ置換されたアルキル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール及び置換ヘテロアリールからなる群から選択されており、 R_2 は、置換された部分がアルキル、置換アルキル、アルキニル、置換アルキル、ビニル、ニトロ、ハロゲン、シアノ、アリール、ヘテロアリール、アルコキシからなる群から選択されているベンゼン環の任意の位置での水素の単一置換であり、 C_n は炭素であり、 n は1~5の数である。上記の構造の特定の形態が以下に示されている。

20

【0076】

【化5】

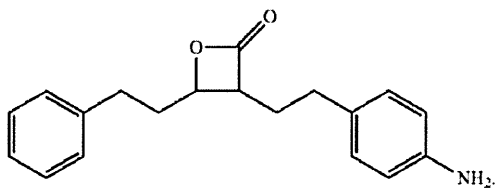
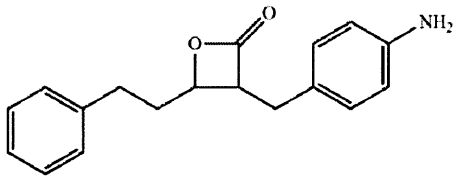
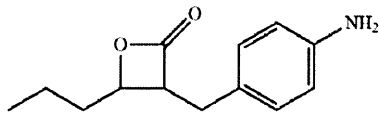
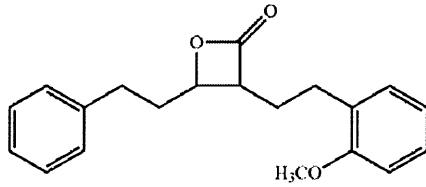
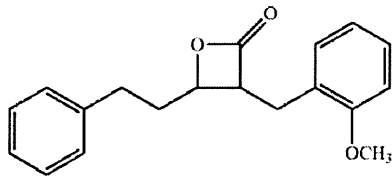


30

40

【0077】

【化6】



10

20

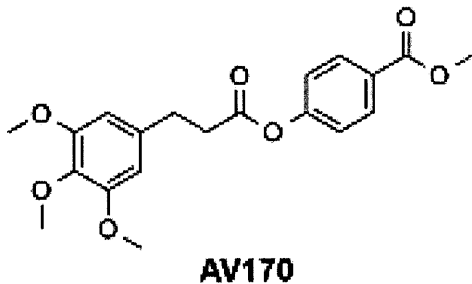
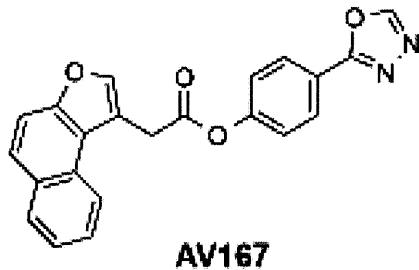
【0078】

小分子フェニルエステルもバクテリアのClpPを阻害することが示されている。例えば、Hackl 等著, J. Am. Chem. Soc., 137, 8475-8483 (2015)を参照し、この開示全体があらゆる目的のために参照によって本明細書に組み込まれている。このような小分子阻害剤は、例えば以下を含んでいる。

30

【0079】

【化7】



10

【0080】

上述された化合物に加えて、その薬学的に許容される塩及びプロドラッグを本明細書に開示されている方法で利用してもよい。

20

【0081】

薬剤送達

ある実施形態では、本方法（例えば本明細書に記載されているようなスクリーニング法又は処置法）は、薬剤（例えば試験薬、候補薬剤、C1pPの発現レベル及び/又は活性レベルを低下させるC1pP阻害剤、例えばC1pPの発現を特異的に低下させるRNAi剤又は遺伝子編集剤など）を個体に投与するステップを有する。状況に応じて、個体は、あらゆる好適な種（例えば哺乳類、齧歯類、マウス、ラット、非ヒト霊長類、ヒトなど）とすることができる。例えば、場合によっては、試験薬をマウスに投与する。場合によっては、（例えば主スクリーニング法によって識別されるような）候補薬剤を、マウス、ラット、非ヒト霊長類又はヒト（例えば肥満、糖尿病の個体、インスリン感受性が低下した個体、耐糖能が低下した個体など）に投与する。場合によっては、本明細書に記載されているようなC1pPの発現レベル及び/又は活性レベルを低下させるC1pP阻害剤を、マウス、ラット、非ヒト霊長類又はヒトに投与する。

30

【0082】

場合によっては、本明細書に記載されているような薬剤を全身に投与する。場合によっては、本明細書に記載されているような薬剤を局所的に（例えば、肝臓のような所望の組織に直接）投与する。場合によっては、本明細書に記載されているような薬剤を、非経口手段、局所手段、静脈内手段、腫瘍内手段、経口手段、皮下手段、動脈内手段、頭蓋内手段、腹腔内手段、鼻腔内手段又は筋肉内手段によって投与する。典型的な投与経路は静脈内又は腫瘍内であるが、他の投与経路でも同様に有効性を示し得る。場合によっては、本明細書に記載されているような薬剤を注射によって投与する。場合によっては、本明細書に記載されているような薬剤を組織特異的な方法で投与する（例えば、肝臓のような特異組織に向けて投与する）。

40

【0083】

用量レベルが特定の化合物、症状の重症度及び被験体の副作用に対する感受性の関数として変わり得ると当業者は容易に理解する。所与の化合物の好ましい用量は、様々な手段によって当業者により容易に決定可能である。

【0084】

ある実施形態では、単回用量のC1pP阻害剤を投与する。他の実施形態では、複数回用量

50

のC1pP阻害剤を投与する。ある期間に亘って複数回用量を投与する場合、C1pP阻害剤を、ある期間に亘って1日2回(qid)、毎日(qd)、1日おき(qod)、2日おき、週3回(tiw)又は週2回(biw)投与する。例えば、C1pP阻害剤を、1日～約2年以上の期間に亘ってqid、qd、qod、tiw又はbiw投与する。例えば、C1pP阻害剤を様々な要因に応じて1週間、2週間、1ヶ月、2ヶ月、6ヶ月、1年又は2年以上、上記の頻度のいずれかで投与する。

【0085】

場合によっては、本明細書に記載されているようなC1pPの小分子阻害剤、例えば -ラクトン、例えば(3RS,4RS)-3-(non-8-en-1-yl)-4-(2-(ピリジン-3-yl)エチル)オキセタン-2-one又はその薬学的に許容される塩若しくはプロドラッグを、1日当たり約50mg/kg ~ 約1000mg/kg、例えば1日当たり約100 mg/kg ~ 約900 mg/kg、1日当たり約200 mg/kg ~ 約800 mg/kg、1日当たり約300 mg/kg ~ 約700 mg/kg 又は1日当たり約400 mg/kg ~ 約600 mg/kg の量で、小分子阻害剤を必要とする被験体、例えば本明細書に記載されているような被験体に投与する。場合によっては、本明細書に記載されているようなC1pPの小分子阻害剤、例えば -ラクトン、例えば(3RS,4RS)-3-(non-8-en-1-yl)-4-(2-(ピリジン-3-yl)エチル)オキセタン-2-one又はその薬学的に許容される塩若しくはプロドラッグを、1日1回の用量又は1日2回の用量で被験体に投与する。

10

【0086】

場合によっては、薬剤によってもたらされるC1pP発現の低下が特定の組織型(例えば肝臓)に限定されるように、RNAi剤又はゲノム編集剤が構成されている。例えば、RNAi剤(例えばshRNA、siRNA)又はゲノム編集剤(CRISPR/Casタンパク質及びガイドRNA)の成分は特定の組織のみで活性であることができ、例えば、成分を特定の組織に送達することができ、成分は、組織特異的なプロモータなどに操作可能にリンクされ得る。例えば、以下の実施例に記載されているように、マウスのゲノムのC1pP遺伝子のloxPが導入された対立遺伝子が潜伏するマウスの肝臓へのCre リコンビナーゼの送達、C1pPノックアウトマウスによって示されたインスリン感受性の増加を反復する。従って、肝臓のC1pP発現を低下させることによって、個体全体に亘ってC1pP発現を低下させるという可能性のある副作用無しでインスリン感受性が高められ得る。場合によっては、C1pPの発現及び/又は活性を低下させるC1pPの阻害剤(例えば、C1pPに特異的な小分子阻害剤、RNAi剤又は遺伝子編集剤)を全身に、場合によっては局所的に(例えば肝臓に、例えばその両方全体が参照によって組み込まれる米国特許第8524679号明細書及び米国特許第8008468号明細書参照)投与する。

20

30

【0087】

場合によっては、本明細書に記載されているような薬剤の効果は実質的に肝臓特異的である(例えばCre リコンビナーゼ、CRISPR/Casエンドヌクレアーゼ、ZFN、TALENなどのゲノム編集ヌクレアーゼは、組織特異的な方法で送達されるか、又は組織特異的なプロモータの制御下にあることができる)。「実質的に肝臓特異的である」とは、C1pP発現の低下の大部分が肝臓にあることを意味する。このようなことは多くの様々な方法で達成され得る。C1pP発現の低下が肝臓のみに限定されなくてもよく、一又は複数の他の組織が同様にC1pP発現の低下を示してもよいと理解される。例えば、プロモータが(例えば、C1pP阻害剤、例えばゲノム編集ヌクレアーゼ又はC1pP阻害剤の成分、例えばCRISPR/CasガイドRNAの発現を駆動するために発現ベクタの一部として)使用される場合、そのプロモータは肝臓のみに完全に限定される必要はない。このようなプロモータは他の組織で「リーキー」発現を示してもよく、又は肝臓のみではない組織(例えば、肝臓に加えて、全ての組織ではないが一又は複数の更なる組織)に限定されてもよく(つまり、プロモータは構成的プロモータではない)。別の例として、薬剤が局所的に(例えば直接注射によって)送達される場合、薬剤の一部が肝臓に加えて組織(例えば隣接器官、血液など)に更に影響を及ぼす場合があると理解される。従って、「実質的に肝臓特異的である」という用語が使用される場合、(例えば全身に亘る)全体的なC1pP発現は低下されないが、肝臓のC1pP発現は低下されることを意味する。

40

50

【 0 0 8 8 】

例えば、薬剤がRNAi剤であるとき、薬剤を肝臓に直接送達する（例えば肝臓に注射するなど）により、肝臓特異性が達成され得る。他方では、薬剤をコードするDNA（例えばshRNAをコードする発現ベクタ）からRNAi剤を発現させることにより肝臓特異性が達成されることができ、薬剤の発現を駆動するプロモータ（例えば肝臓特異的プロモータ）は、肝臓内での薬剤の発現を駆動する。同様に、ゲノム編集剤は、肝臓に直接送達されることができ、又は（例えば、肝臓内での発現を駆動するプロモータ、例えば肝臓特異的プロモータを有する発現ベクタから成分の一若しくは複数を発現させることにより）肝臓で機能的であり得る。場合によっては、ClpPの阻害剤は、ClpP発現の低下が実質的に肝臓特異的であるように投与され、投与される量は、個体のインスリン感受性を高めるのに有効な量である。

10

【 0 0 8 9 】

ClpPの発現及び/又は活性を低下させるClpPの阻害剤が不活性型である場合、肝臓特異的な酵素によって活性型に変換されない限り、肝臓特異性が更に達成され得る。例えば、ClpPの阻害剤はプロドラッグの形態で送達されることができ、その後、例えばヒト肝臓カルボキシルエステラーゼ1（hCE1）のようなカルボキシルエステラーゼ、PON3のようなパラオキシナーゼ、アルカリホスファターゼ、ヒトのバラシクロピラーゼ（VACVase）、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ（PNP）などによって肝臓で活性型に変換される。例えば、Yang等著，Enzyme-mediated hydrolytic activation of prodrugs, Acta Pharmaceutica Sinica B 2011;1(3):143-159参照。

20

【 0 0 9 0 】

薬剤は、注射剤として溶液又は懸濁液のいずれかとして調製されることができ、注射前に液体賦形剤への溶解又は懸濁に適した固形が更に調製され得る。調剤は、上述されているように、ポリラクチド、ポリグリコリド又はアジュバント効果を高めるための共重合体のようなりポソーム又は微粒子で更に乳状化又はカプセル化され得る。Langer著，Science 249: 1527, 1990 and Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28: 97-119, 1997参照。本薬剤を、有効成分の持続放出又はパルス放出を可能にするように処方され得る蓄積注射又は埋込調剤の形態で投与することができる。薬剤は、無菌で、実質的に等張であるように処方されることができ、米国食品医薬品局の全ての製造品質管理基準（GMP）の規則に完全に準拠している。

30

【 0 0 9 1 】

キットが更に本開示の範囲内にある。例えば、場合によっては、本キットは、(i) ClpP（例えば、タンパク質、mRNA）の活性レベル及び/又は発現レベルを検出するための検出試薬、例えば抗ClpP抗体と、(ii) 対照薬剤（例えばClpPの活性レベル及び/又は発現レベルを低下させることが知られている正の対照薬剤、及び/又はClpPの活性レベル及び/又は発現レベルを低下させないことが知られている負の対照薬剤）を含むことができる。場合によっては、本キットは、使用説明書を含むことができる。キットは典型的には、キットの内容物の使用目的を示すラベルを含んでいる。ラベルという用語は、キット上に若しくはキットと共に与えられるか、又はキットに伴うあらゆる文書又は記録材を含んでいる。

40

【 0 0 9 2 】

本開示の例示的な非制限態様

上述された本主題の実施形態を含む態様が、単独で、又は一若しくは複数の他の態様又は実施形態と組み合わせることで有益であってもよい。上記の記載を制限することなく、本開示の1～26と番号付けされたある非制限態様が以下に提示される。本開示を読むと当業者に明らかであるように、個々に番号付けされた態様の各々は、上記又は以下の個々に番号付けされた態様のいずれかと使用されてもよく、又は組み合わせられてもよい。これは、態様のこのような全ての組合せのサポートを提供することが意図されており、以下に明示的に提供される態様の組合せに限定されない。

【 0 0 9 3 】

50

付記 1 . 肥満及び / 又は糖尿病を処置するための候補薬剤を識別する方法であって、
(a) 哺乳類細胞を試験薬と接触させて、
(b) 接触させた後、基準値に対する哺乳類細胞のClpPの発現レベル及び / 又は活性レベルを測定して、
(c) 前記試験薬が前記基準値に対して前記発現レベル及び / 又は前記活性レベルを低下させたと判断し、
(d) 前記試験薬を肥満及び / 又は糖尿病を処置するための候補薬剤として識別することを特徴とする方法。

【 0 0 9 4 】

付記 2 . 前記哺乳類細胞はマウスの細胞であることを特徴とする付記 1 に記載の方法。

10

【 0 0 9 5 】

付記 3 . 前記哺乳類細胞はヒトの細胞であることを特徴とする付記 1 に記載の方法。

【 0 0 9 6 】

付記 4 . 前記哺乳類細胞はインビトロにあることを特徴とする付記 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【 0 0 9 7 】

付記 5 . 前記哺乳類細胞はエクスピボにあることを特徴とする付記 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【 0 0 9 8 】

付記 6 . 前記哺乳類細胞はインビボにあることを特徴とする付記 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

20

【 0 0 9 9 】

付記 7 . 前記哺乳類細胞は肝実質細胞であることを特徴とする付記 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【 0 1 0 0 】

付記 8 . 接触させる際に、前記試験薬をマウスに投与することを特徴とする付記 2 に記載の方法。

【 0 1 0 1 】

付記 9 . 前記基準値を得るためにステップ(a) で接触させる前に前記マウスのClpPの発現レベル及び / 又は活性レベルを測定することを特徴とする付記 8 に記載の方法。

30

【 0 1 0 2 】

付記 10 . ステップ(d) の後、識別された前記候補薬剤を、肥満及び / 又は糖尿病を患う個体に投与することを特徴とする付記 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

【 0 1 0 3 】

付記 11 . 前記個体はマウス、非ヒト霊長類又はヒトであることを特徴とする付記 10 に記載の方法。

【 0 1 0 4 】

付記 12 . 識別された前記候補薬剤を前記個体に投与した後、インスリン感受性、血糖レベル、耐糖能、体脂肪量、脂肪組織の量、白色脂肪組織の量、体脂肪率、体重、内臓脂肪の脂肪細胞サイズ、血漿レプチンレベル、成長ホルモンレベル、基礎エネルギー消費量、筋肉及び / 又は繊維芽細胞のリン酸化AKT (p-AKT) レベル、除脂肪率、肝実質細胞のミトコンドリアの数、肝実質細胞のミトコンドリアの質量、肝実質細胞のミトコンドリアの形態、繊維芽細胞の呼吸容量、繊維芽細胞の最大酸素消費速度 (OCR) 及びH₂O₂による細胞毒性に対する繊維芽細胞耐性から選択された前記個体の一又は複数の特徴を測定することを特徴とする付記 10 又は 11 に記載の方法。

40

【 0 1 0 5 】

付記 13 . 前記試験薬は小分子又はポリペプチドであることを特徴とする付記 1 ~ 12 のいずれかに記載の方法。

【 0 1 0 6 】

付記 14 . 定量RT-PCR、マイクロアレイ又はRNA シーケンシングを使用して、RNA 発現

50

レベルであるClpPの発現レベルを測定することを特徴とする付記1～13のいずれかに記載の方法。

【0107】

付記15．タンパク質発現レベルであるClpPの発現レベルを測定し、測定する際に、抗ClpP抗体、質量分析及び／又は酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)を使用してClpPタンパク質を検出することを特徴とする付記1～13のいずれかに記載の方法。

【0108】

付記16．TNF受容体関連タンパク質1(TRAP1)、熱ショックタンパク質ファミリーA(Hsp70)メンバー9(Grp75)、ロイシンリッチペントトリコペプチドリピート含有(LRPPRC)、カゼイン分解性ミトコンドリアマトリックスペプチダーゼシャペロンサブユニット(ClpX)、オルニチンアミノトランスフェラーゼ(OAT)及びlonペプチダーゼ1(LonP1)から選択された一又は複数のタンパク質の量の増加を測定することにより、ClpPの活性レベルの低下を測定することを特徴とする付記1～13のいずれかに記載の方法。

10

【0109】

付記17．複数の試験薬をスクリーニングして、肥満及び／又は糖尿病を処置するための一又は複数の候補薬剤を識別することを特徴とする付記1～16のいずれかに記載の方法。

【0110】

付記18．肥満及び／又は糖尿病の個体を処置する方法であって、
個体の脂肪組織の量を減らす、個体の体重増加を防止する若しくは低下させる、個体のインスリン感受性を高める、及び／又は個体の耐糖能を高めるのに有効な量でClpPの阻害剤を前記個体に投与することを特徴とする方法。

20

【0111】

付記19．ClpPの前記阻害剤は、ClpPの発現を特異的に低下させるRNAi剤又は遺伝子編集剤であることを特徴とする付記18に記載の方法。

【0112】

付記20．ClpP発現の低下が実質的に肝臓特異的であるように、ClpPの前記阻害剤を投与し、投与される量は、個体のインスリン感受性を高めるのに有効な量であることを特徴とする付記18又は19に記載の方法。

30

【0113】

付記21．ClpPの前記阻害剤は小分子であることを特徴とする付記18に記載の方法。

【0114】

付記22．前記小分子は -ラクトンであることを特徴とする付記21に記載の方法。

【0115】

付記23． -ラクトンは、(3RS,4RS)-3-(non-8-en-1-yl)-4-(2-(ピリジン-3-yl)エチル)オキサタン-2-one、又はその薬学的に許容される塩であることを特徴とする付記22に記載の方法。

【0116】

付記24．ClpPの前記阻害剤を、前記個体の肝臓に直接送達し、投与される量は、前記個体のインスリン感受性を高めるのに有効な量であることを特徴とする付記18～23のいずれかに記載の方法。

40

【0117】

付記25．投与する際に局所注射することを特徴とする付記18～24のいずれかに記載の方法。

【0118】

付記26．前記個体のインスリン感受性を測定するステップを更に有することを特徴とする付記18～25のいずれかに記載の方法。

【0119】

本発明の趣旨又は範囲から逸脱することなく、様々な変更及び調整がなされ得ることは

50

、当業者にとって明らかである。

【0120】

実験

以下の実施例は、本発明をどのように作製して使用するかについての完全な開示及び説明を当業者に提供するために記載されるのであって、本発明の範囲を制限することを意図するものではなく、以下の実験が、行われた全て又は唯一の実験であると表すことを意図するものでもない。使用された数値（例えば、量、温度等）に関して正確性を確保するために努力がなされたが、ある程度の実験誤差及び偏差は考慮に入れられるべきである。別途記載のない限り、部は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏であり、圧力は大気圧であるか又は大気圧に近い圧力である。

10

【0121】

本明細書に引用されている全ての刊行物及び特許出願は、個々の刊行物又は特許出願が、具体的に且つ個別に参照によって組み込まれると示されているかのように参照によって本明細書に組み込まれている。

【0122】

本発明は、本発明を実施するための好ましい態様を含むと分かる、又は提案される特定の実施形態に関して記載されている。本開示の観点から、本発明の意図した範囲から逸脱することなく例示された特定の実施形態に多くの調整及び変更がなされ得ることは、当業者によって理解される。例えば、コドンの冗長性により、タンパク質配列に影響を及ぼすことなく、基本的なDNA配列に変更がなされ得る。更に、生物学的な機能等価の考察により、生物作用に種類又は量で影響を及ぼすことなく、タンパク質構造に変更がなされ得る。このような調整は全て、添付の特許請求の範囲内に含まれると意図されている。

20

【0123】

材料及び方法

以下の方法を、本明細書に記載されている実施例で利用した。

【0124】

動物

全てのマウスを無菌の動物設備で12時間の明/暗サイクルで維持した。マウスを、全ての代謝研究のために遺伝子型によって別々に収容した。高脂肪食（HFD）による肥満の研究のために、HFD（21重量%、脂肪からの42% kcal、0.2%の総コレステロール；TD.01064、Harlan-Teklad）を動物に特定期間、与えた。麻酔をイソフルラン（生存処置）又はアベルチン（終末処置）で導入した。処置は全て、UCSF動物実験委員会によって承認され、NIHガイドラインに従った。様々な分析のための動物の試料サイズを以前の文献に基づいて選択した。動物を遺伝子型によってグループ化し、ランダム化を使用しなかった。全ての行動試験に関して、全ての動物IDは試験者に対して盲検化された。試験者は他の分析のためには盲検化されなかった。

30

【0125】

ClpPノックアウト（ClpP^{-/-}）マウス及びClpPコンディショナルノックアウト（ClpP-cKO）マウスの生成及び維持

凍結ClpP^{+/-}精子を回復してClpP^{+/-}マウスを生成した。ClpP^{-/-}マウスを3世代以上、C57BL/6遺伝的背景に戻し交配した。ClpP^{-/-}マウスは生殖力がなかったので、ClpP^{+/-}マウスを互いに繁殖させて3つの異なる遺伝子型（WT、ClpP^{+/-}、ClpP^{-/-}）の同腹子を生成して使用し、系統を維持した。

40

【0126】

ClpPコンディショナルノックアウト（Clp-cKO）マウスの生成及び維持

ClpP遺伝子を相同の長腕（5'末端、約6Kb）及び相同の短腕（3'末端、約3Kb）と隣接させることにより、ClpP-cKO構築体を生成した。今後取り除くために、ClpPエキソン1~3を含む領域の両端にLoxP部位を追加した。F3部位によって隣接したピューロマイシン耐性遺伝子を、3'末端LoxP部位の目前に挿入した。標的とされたClpP対立遺伝子を保有するマウスES細胞クローンを選択して、マイクロインジェクションのために使用した。生

50

じたキメラをFlp マウスと繁殖させて、標的とされたC1pP対立遺伝子を保有する子孫を生成した。その後、異型接合のC1pP-cKOマウスを繁殖させて、同型接合のC1pP-cKOマウスを生成した。C1pP-cKOマウスをC57BL/6 遺伝的背景で生成した。同型接合のC1pP-cKOマウスを使用して系統を維持した。

【0127】

体組成解析

4時間の絶食後のマウスの体組成を、PIXImus2スキャナ (GE Healthcare Lunar) を用いて二重エネルギーX線吸収測定法 (DEXA) によってイソフルラン麻酔下で解析した。

【0128】

食料摂取の研究

マウスを遺伝子型によって別々に収容した。ケージ毎に、4日間毎日午前10:00に食料の重量を測った。開始時間の食料の重量から24時間後の食料の重量を引くことにより、ケージ毎の毎日の食料摂取量を算出した。毎日の食料摂取量を動物数又は体重のいずれかによって正規化した。

【0129】

絶食 - 再摂食の研究

マウスは24時間、絶食して、その後に自由摂食に戻った。マウスの体重を絶食の前後に測定した。食料摂取量及び体重増加量を、8時間及び24時間の再摂食期間後にモニタした。

【0130】

体温測定

マウスの深部体温を齧歯類直腸検温器で得た。

【0131】

血糖及び血漿インスリンの測定

血糖を血糖値測定器及びグルコース試験紙 (Free Style Lite) を用いて測定した。血漿インスリンをインスリンElisaキット (Crystal Chem) を用いて定量化した。

【0132】

糖負荷試験、インスリン耐性試験及びピルビン酸塩耐性試験

グルコース及びピルビン酸塩に関して一晩絶食後、又はインスリンに関して4時間絶食後、糖負荷試験、インスリン耐性試験及びピルビン酸塩耐性試験をグルコース (2 g/kg)、インスリン (0.5 単位/kg) 又はピルビン酸塩 (2 g/kg) の腹腔内注射によって行った。血糖レベルを注射前及び注射後の様々な時点で測定した。グルコース刺激性のインスリン放出を評価するために、マウスを一晩 (16時間) 絶食させ、その後、グルコース (2 g/kg) を腹腔内に注射した。血液試料を注射前及び注射後の様々な時点で尾静脈から収集した。

【0133】

行動試験

C1pP^{-/-} マウスの一般的な神経学的行動プロファイルを握力試験、傾斜試験及びテールサスペンション試験によって評価した。これらのマウスの運動機能をロータロッド試験によって判断した。不安レベルを高架式十字迷路によって決定した。活性レベルをオープンフィールド試験によって調べた。これらのマウスの学習及び記憶をモリス水迷路を使用して検査した。聴覚機能をプレパルス抑制試験によって試験した。

【0134】

組織学的解析

組織 (肝臓、内臓脂肪、腓腹筋、肩甲骨間褐色脂肪及び膵臓) を一晩、4%のパラホルムアルデヒド (pH 7.4) に固定してパラフィンに包埋し、7~8 µmで連続的に薄片に切り分けた。標準的なヘマトキシリン・エオシン染色を行った。

【0135】

脂肪細胞サイズの測定

脂肪組織切片のヘマトキシリン・エオシン染色を行って、画像をimage J を用いて解析

10

20

30

40

50

した。

【0136】

肝臓切片の電子顕微鏡解析

WTマウス又はClpP^{-/-}マウスをEM固定剤で灌流した。肝臓組織を収集して、2日間EM固定剤に固定した。組織を処理して、電子顕微鏡画像をJEOL JEM-1230 透過電子顕微鏡を使用して収集した。ミトコンドリアの数、面積及び丸さをImage J ソフトウェアによって13,600の倍率で測定した。

【0137】

脂肪細胞特異的ClpP-cKOマウスの生成

ClpP-cKOマウスをap2-Cre マウスと繁殖させることにより、脂肪細胞特異的ClpPノックアウトマウスを生成した。Cre⁺ マウスは脂肪組織のClpPタンパク質レベルを大幅に低下させ、Cre-同腹子は代謝分析の対照として機能した。

10

【0138】

AAV-CMV-Cre の尾静脈注射

AAV8.2-CMV-Cre及び対照AAV8.2を利用した。これらのウイルスを5 × 10⁹ ゲノムコピー/グラム (gc/グラム) 体重の用量で尾静脈を通して3 ~ 5ヶ月のClpP-cKOマウスに注射した。注射されたマウスの体重を週に1回測定した。血糖レベル及び血漿インスリンレベルを注射前及び注射の3週間後に測定した。糖負荷試験をこれらのマウスに注射の4週間後に行った。これらのマウスにHFD を注射の6週間後に与えた。その後、HFD に反応して体重増加が起こり、HFD を2週間与えた後に糖負荷試験を行った。

20

【0139】

ウェスタンブロット

組織又は細胞を、プロテアーゼ阻害剤の混合物と共に低界面活性剤のバッファ (50mM トリス/HCl、pH 8.0、150 mM NaCl、0.1 % SDS、0.5 % ノニデットP-40、0.5 % デオキシコール酸ナトリウム) に溶解した。溶解物バッファにホスファターゼ阻害剤を更に含めた。溶解物を10分間13,000rpm で遠心分離してペレットを除去した。業者のプロトコルに従って、InvitrogenのNuPAGE bis-tris システムを用いてSDS-PAGEを行った。標準的なウェスタンブロットプロトコルを、IRDye で標識した二次抗体 (Li-cor) と共に使用した。Li-cor画像システムを使用してウェスタンブロット画像をスキャンした。

30

【0140】

二次元蛍光ディファレンスゲル電気泳動

二次元蛍光ディファレンスゲル電気泳動解析のために、ClpP^{-/-}マウス、ClpP^{+/-}マウス又はWTマウスの器官を提出した。質量分析解析のために最も劇的に変化したスポットをゲルからカットしてタンパク質を識別した。これは同一の会社によって行われた。

【0141】

マウスの繊維芽細胞の調製

新生の幼体から収集された皮膚組織からマウスの繊維芽細胞を調製した。皮膚組織を小片にカットして、100 mmの細胞培養皿に皮膚を上にして置いた。5 ~ 10分後、10mlの繊維芽細胞培地 (10%のFBS を含むDMEM) を細胞培養皿に徐々に加えた。埋込物を、加湿された37 °C、5 % CO₂ の培養器で培養した。繊維芽細胞は最終的に培養中7 ~ 10日後に増殖した。マウスの繊維芽細胞を多くの継代に亘って同一の培地で維持した。

40

【0142】

ClpP^{-/-} 繊維芽細胞のClpPの過剰発現

ヒトのClpPのためのレンチウイルス過剰発現ベクターを、Life TechnologiesのpLenti7.3 TOPO TAクローニングキットを用いて構築した。レンチウイルスを、Life TechnologiesのViraPower (商標) レンチウイルスパッケージングミックスを用いてパッケージング化した。空のベクター (対照) 又はヒトのClpP cDNA のいずれかを保有するレンチウイルスをClpP^{-/-} 繊維芽細胞に加えて、更なる実験の前に48時間、培養した。

【0143】

ClpP^{-/-} 繊維芽細胞の異なる遺伝子のshRNA ノックダウン

50

レンチウイルスshRNA 構築体を得た。レンチウイルスを、Life TechnologiesのViraPower (商標) レンチウイルスパッケージングミックスを用いてパッケージング化した。空のベクタ (対照) 又は異なるshRNA のいずれかを保有するレンチウイルスをClpP^{-/-} 繊維芽細胞に加えて、更なる実験の前に48時間、培養した。

【0144】

細胞生存率分析

マウスの繊維芽細胞を黒いきれいな底の96ウェルプレートにウェル当たり10,000で播いた。24時間、培養した後、細胞をOPTI-MEM培地に一晚培養した。細胞をH₂O₂で様々な用量で4時間処置した。その後、Alamar blue 試薬 (Invitrogen) をウェルに (1:10の比率で) 加えた。2時間の培養後、蛍光強度を590 nmの放射 (560 nmの励起) で測定した。

10

【0145】

Seahorse OCR分析

マウスの繊維芽細胞をコンフルエンスまで繊維芽細胞成長培地で維持した。分析の前日、繊維芽細胞をトリプシン処理して、96ウェルSeahorse培養プレートにウェル当たり40,000細胞で播いた。分析の前に培養培地を、Seahorse Bioscience によって提供されているCO₂ 非依存性培地に変えた。その後、細胞をCO₂ 無しで0.5 ~ 1時間37 °Cで培養した。業者のプロトコルに従って、XF Cell mito-stress test kit及びXF Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience) を用いて酸素消費速度 (OCR) 分析を行った。

【0146】

成長ホルモン (GH) 及びレプチンのレベル決定

20

マウスの血漿のGHレベル及びレプチンレベルを、Crystal Chem, Inc のマウスGH ELISA キット及び超高感度マウスインスリンELISA キットによって決定した。

【0147】

抗体

使用された抗体は、抗-ClpP (ウサギ, Novus Biologicals)、抗-ClpX (SDI, 特注)、抗-Akt (ウサギ, Cell Signaling)、抗-ホスホ-Akt (ウサギ, Cell Signaling)、抗-Grp75 (ウサギ, Cell Signaling)、抗-TRAP1 (マウスmAb, AbCam)、抗-LRPPRC (ウサギ, Proteintech Group)、抗-LonP (ウサギ, Sigma-Aldrich)、抗-OAT (マウス, Abcam)、抗-SDH2 (ウサギ, aric antibodies)、抗-ATP6V1A (ウサギ, Proteintech Group)、抗-CPS1 (マウス, Lifespan)、抗-Hsp70 (ウサギ, Cell Signaling)、抗-GAPDH (マウスmAb, Millipore)、抗Hsp60 (ウサギ, Abcam)、抗-VDAC (マウスmAb, EMD Chemical) 及び抗アクチン (ウサギ, Sigma-Aldrich) であった。

30

【0148】

統計解析

特に指定されていない限り、データを平均 ± SDとして示した。統計解析は全てPrism 6 ソフトウェア (GraphPad) を使用して行った。平均の差を、t検定、one-way ANOVA 又は反復測定ANOVA、その後ポソニ事後検定又はテューキー-クレーマー事後検定によって評価した。全ての場合で、P<0.05を統計的に有意であるとみなした。

【0149】

哺乳類ClpXP、触媒サブユニットClpP及び調節サブユニットClpXから構成されたATPアーゼ複合体が、不明瞭な生理機能を有するミトコンドリアプロテアーゼである。以下の実施例で示されているデータは、ClpPノックアウト (ClpP^{-/-}) マウスが、野生型対照と比較してより多くのエネルギーを消費して脂肪組織を減らし、インスリン感受性を高めたことを示している。ミトコンドリアのシャペロンの劇的な増加が、ミトコンドリアの数の増加と共にClpP^{-/-} マウスの様々な器官で検出された。ClpPの除去は、LRPPRCレベル及び/又はTRAP1 レベル (これらの両方がミトコンドリアの機能の役割を有するタンパク質である) を上昇させることにより、細胞のミトコンドリアの機能及び抗ストレス能力を増大させ、細胞のミトコンドリアの機能及び抗ストレス能力は、いずれかのタンパク質をノックダウンすることにより反転された。肝臓のClpPは、脂肪細胞のClpPが存在しない間、インスリン感受性の調節に関与していた。従って、ClpPはミトコンドリアの機能及びストレス

40

50

反応の主要制御因子であり、同様に、エネルギー恒常性、脂質貯蔵及びインスリン感受性を調節する。これらのデータは、肥満及び糖尿病を処置するための治療標的としてC1pPを際立たせている。

【0150】

実施例1：マウスのC1pPの欠如により、食事又は高脂肪食で脂肪組織が減少した。

哺乳類C1pXP プロテアーゼの生理的役割を理解するために、C1pPノックアウト (C1pP^{-/-}) マウスモデルをジーントラップ法によって生成した (図7, パネルa)。定量ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) (不図示) 及びウェスタンブロットにより、異なる器官にC1pP遺伝子が効率的に除去されたことが確認された (図7, パネルb~i)。C1pP^{-/-} の幼体は生存可能に正常なメンデル比で生まれた。肝臓及び筋肉の形態的評価により、6ヶ月の同型接合 (C1pP^{-/-}) 又は異型接合 (C1pP^{+/-}) のノックアウトマウスの異常がないことが明らかになった (図8)。一般的な神経学的行動、運動機能 (ロータロッド試験及び泳ぐ速度試験)、不安 (高架式十字迷路試験)、又は学習及び記憶 (モリス水迷路試験) でC1pP^{-/-} 同腹子及びWT同腹子に差がなく (図9)、正常な神経学的プロファイルを示した。

10

【0151】

しかしながら、オス及びメスの成体のC1pP^{-/-} マウスの両方が、WT同腹子及びC1pP^{+/-} 同腹子より重量及びサイズで著しく小さかった (図1, パネルa~b)。対照的に、新生幼体は全て、C1pP遺伝子型に関わらず同様の体重であった (図1, パネルc)。加えて、5~6ヶ月のC1pP^{-/-} マウスの成長ホルモンレベルが他のグループのマウスより高かった (C1pP^{-/-}, 8.54 ± 5.41 ng/ml ; C1pP^{+/-}, 2.48 ± 0.67 ng/ml ; WT, 0.91 ± 0.53 ng/ml ; 遺伝子型毎に n = 3~5 ; one way ANOVA, p = 0.0053) ため、成体の体重差が初期の発生異常又は成長ホルモン欠乏症から生じなかった。

20

【0152】

C1pP^{-/-} マウスは、総体脂肪量又は体脂肪含有率 (体脂肪率) によって測定されるように、WTマウスより体脂肪を劇的に低下させた (図1, パネルd~e)。C1pP^{+/-} マウスはWTマウスと同様の体重であったが、体脂肪を下げる傾向にあった (図1, パネルd~e)。対照的に、C1pP^{-/-} マウスの除脂肪量はC1pP^{+/-} マウス及びWTマウスより著しく低かった (図1, パネルf) が、C1pP^{-/-} マウスの除脂肪含有率 (除脂肪率) はC1pP^{+/-} マウス及びWTマウスより著しく高かった (図1, パネルg)。興味深いことには、熱産生で重要であり、代謝調節で有益な肩甲骨間褐色脂肪組織の定量化により、3つのC1pP遺伝子型で除脂肪組織と同様のプロファイルが示された (図1, パネルh~i)。より低い体脂肪含有率と一致して、C1pP^{-/-} マウスからの内臓脂肪は、C1pP^{+/-} マウス及びWTマウスと比較してより小さな脂肪細胞を有した (図1, パネルm及び図10)。対照的に、C1pP^{-/-} マウス、C1pP^{+/-} マウス及びWTマウスの褐色脂肪組織の形態は同様であった (図11, パネルa)。従って、C1pPをノックアウトすることにより、白色脂肪組織が大幅に減り、成体のC1pP^{-/-} マウスにみられるより低い体重に寄与する可能性がある。

30

【0153】

次に、マウスに高脂肪食 (HFD) を2ヶ月間与えて、HFDによる肥満に対してC1pPを除去する効果を決定した。C1pP^{-/-} マウスはHFDによる体重増加に耐性を示し、C1pP^{+/-} マウスは、最初の10日間以内で体重増加の遅延を示した (図1, パネルj及び図12, パネルa)。HFDの40日で、3つのグループ全ての体重変化が安定状態になると、C1pP^{-/-} マウスは、体脂肪量及び体重で僅かな増加のみを示したが、C1pP^{+/-} マウス及びWTマウスは大幅に体重を増やした (図1, パネルk, 図1, パネルl)。従って、C1pP^{-/-} マウスはHFDによる肥満に耐性を示す。HFDは、(図1, パネルf~gを図12, パネルc~dと比較して) 様々なグループのマウス間の差を除脂肪量及び除脂肪含有率で変化させなかった。

40

【0154】

より低い体脂肪含有率と更に一致して、C1pP^{-/-} マウスは、他のグループのマウスより血漿レプチンの十分低いレベルを有した (C1pP^{-/-}, 0.409 ± 0.224 ng/ml ; C1pP^{+/-}, 1.927 ± 1.928 ng/ml ; WT, 2.056 ± 2.022 ; n = 5~6ヶ月齢の11~12マウス ; one way ANOVA, p < 0.05)。興味深いことに、C1pP^{-/-} マウスは、レプチンが枯渇した動物モデ

50

ルに観察されるように生殖力がなかった。何らかの特定の理論によって縛られることを意図しないが、低いレプチンレベルはC1pP^{-/-} マウスの生殖欠陥に關与することが可能である。

【0155】

実施例2：マウスのC1pPの欠如はエネルギー消費プロファイルを変えた。

低いレプチンレベルはWTマウスの摂食行動及び脂肪堆積をもたらす。より低い血清レプチンレベルと一致して、全てのグループのマウスで1日当たり動物毎に同様の食料摂取量であった(図2、パネルa)が、体重に正規化された食料摂取量は、WTマウス及びC1pP^{+/-} マウスよりC1pP^{-/-} マウスで著しく多かった(図2、パネルb)。従って、C1pP^{-/-} マウスはより多くの食料を消費しながら、体重を増やさず脂肪を減らし、より多くのエネルギーを消費したか、又は栄養を適切に利用しなかったことを示唆している。

10

【0156】

絶食-再摂食手法を使用して、これら2つの可能性を分析した(図2、パネルc)。24時間の絶食後、C1pP^{-/-} マウスはWTマウス及びC1pP^{+/-} マウスと同一量の体重を減らした(図2、パネルd)。C1pP^{-/-} マウスは体重を減らしたので、体重減少率は、WT同腹子及びC1pP^{+/-} 同腹子の体重減少率より著しく高く(図2、パネルe)、C1pP^{-/-} マウスはより多くのエネルギーを消費することを示唆している。再摂食期間中、C1pP^{-/-} マウスは、WT同腹子及びC1pP^{+/-} 同腹子と比較して著しく多い食料を消費して、著しくより高い割合の体重を得た(図2、パネルf~g)。

20

【0157】

より高いエネルギー消費は活動亢進又は高い熱産生に起因する場合がある。オープンフィールド試験によって、全てのグループで活性レベルが同様であることが示された(図13)。意外なことに、深部体温は、WTマウス及びC1pP^{+/-} マウスよりC1pP^{-/-} マウスで著しく低く(図2、パネルh~i)、C1pP^{-/-} マウスは熱産生のためにより多くのエネルギーを使用しなかったことを示唆している。従って、C1pP^{-/-} マウスはより高い基礎エネルギー消費量を有した可能性がある。

【0158】

実施例3：マウスのC1pPの欠如はインスリン感受性を高めた。

C1pP^{-/-} マウスの血糖レベル及び血漿インスリンレベルを解析した。血糖レベルは、C1pP^{+/-} マウス及びWTマウスよりC1pP^{-/-} マウスで著しく低かった(図3、パネルa)。血漿インスリンレベルも、自由摂食及び絶食の両方の条件下でWT対照よりC1pP^{-/-} マウスで著しく低く、C1pP^{+/-} マウスの血漿インスリンレベルは中間であった(図3、パネルb~c)。低いインスリンレベルは、形態データに基づき、膵臓欠損による可能性が低かった(図11、パネルb)。従って、C1pP^{-/-} マウスは、非常に低いインスリンレベルを有するにもかかわらず正常な血糖レベルを維持した。HFDの2ヶ月後、WTマウス及びC1pP^{+/-} マウスの血糖レベルは大幅に上昇した。対照的に、C1pP^{-/-} マウスは、HFDで遥かに低い血糖レベル及びインスリンレベルを維持した(図3、パネルd~e)。糖負荷試験及びインスリン耐性試験によって、C1pP^{-/-} マウスのインスリン感受性が高められたことが更に明らかになった(図3、パネルf~h)。C1pP^{-/-} マウスのピルビン酸塩耐性の上昇傾向が、有意性に達していないが検出された(図3、パネルi)。インスリン感受性の上昇の裏付けとして、インスリンシグナル経路の主成分であるp-AKTのより高いレベルが、C1pP^{-/-} マウスの筋肉及び繊維芽細胞で見つかった(図3、パネルj~l)。更に、C1pP^{-/-} 繊維芽細胞は、WT繊維芽細胞より培養物のIGFによるAKT活性化に更に反応し易かった(図3、パネルm)。これらのデータは、C1pPの除去がマウスのインスリン感受性を高めるという結論を強く裏付けている。

30

40

【0159】

C1pPの枯渴がdb/dbマウスの肥満及び糖尿病の表現型に影響を及ぼすか否か及びどのように影響を及ぼすかを判断するために、C1pP^{-/-} マウスをdb/dbマウス(肥満、糖尿病及び脂質異常症のモデル)と異種交配した。C1pPのノックアウトにより、db/dbマウスの体重の小さいが有意な減少がもたらされた(図14、パネルa)。C1pPのノックアウトにより

50

、絶食の4時間後、db/dbマウスの血糖レベルが更に著しく低下した(図3, パネルn)が、この効果は、恐らく16時間の絶食後のWT ClpPを有するdb/dbマウスのグルコースレベルが正常レベルに既に下がったことにより、絶食の16時間後に消えた(図14, パネルb~c)。より重要なことは、ClpPの除去により、db/dbマウスの耐糖能が非常に高められたということである(図3, パネルo)。

【0160】

実施例4: マウスのClpPの欠如により、ミトコンドリアのシャペロンレベルが上方制御される。

ClpPの下流エフェクタを識別するために、二次元(2D)蛍光ディファレンスゲル電気泳動(2D-DIGE)を使用して、異なるClpP遺伝子型を有するマウスの様々な器官のタンパク質プロファイルと比較した(図15)。その後、質量分析を使用して、ClpP^{-/-}マウスの様々な器官の最も劇的に変化したタンパク質を識別した(図20)。ウェスタンブロットによる検証によって、6つの可能性のあるClpXP下流エフェクタ(TRAP1、Grp75、LRPPRC、ClpX、OAT及びLonP; 図21)が確認され、これらのタンパク質レベルは多くの器官で大幅に上昇した(図4, パネルa~h及び図16)が、mRNAレベルは、ほとんどの場合で同一のままであった(図22)。従って、ClpPは、これらのタンパク質のレベルを転写後に制御し得る。タンパク質レベルの著しい上昇が、体重の減少無しで胎生19日齢の幼体(不図示)で更に検出され、これらのタンパク質の蓄積が、観察された表現型の結果ではなく、原因であり得ることを示唆している。同一のタンパク質のレベルの上昇がマウスの繊維芽細胞で更に検出され(図4, パネルi~j)、これらのレベルは、その後、マウスのClpPを過剰発現させることにより低下し(図4, パネルk~l)、ClpPが細胞自律的にこれらのタンパク質レベルを特異的に調節することを示唆している。

【0161】

際立って、可能性のあるClpP下流エフェクタの多くは、分子シャペロンのClpX(ミトコンドリアHsp100)、TRAP1(ミトコンドリアHsp90)及びGrp75(ミトコンドリアHsp70)並びにミトコンドリアプロテアーゼLonPを含むミトコンドリアタンパク質恒常性に関連する(図4, パネルa~h, 図16)。ClpPのノックアウトは、ミトコンドリアタンパク質のVDAC及びHsp60のレベルに有意な影響を及ぼさなかった(図16)。更に、Bip及びHsp90のような多くのサイトゾル及び小胞体(ER)の熱ショックタンパク質に有意差がなかった(図16)。従って、ClpPは、特定のグループのミトコンドリアタンパク質、特にシャペロンを直接又は間接的に制御する。

【0162】

実施例5: ClpPの欠如はミトコンドリアの数を増加させて、ミトコンドリアの機能及び抗ストレス能力を高めた。

ミトコンドリアの数及び機能をClpP^{-/-}マウスで解析した。ClpP^{-/-}肝臓切片の電子顕微鏡(EM)研究によって、ClpPの枯渇がミトコンドリアの数を増加させて、肝実質細胞のミトコンドリアの形態を変えたことが示された(図5, パネルa~b及び図17, パネルa~b)。(フィールド当たりの総ミトコンドリア面積によって測定された)ミトコンドリアの質量は、ClpP^{-/-}肝実質細胞で更に著しく増加した(図5, パネルc及び図17, パネルa~b)。ClpP^{-/-}ミトコンドリアは、恐らくClpP^{-/-}ミトコンドリアのタンパク質含有量の増加により、WTと比較してより密なマトリクスを有した(図5, パネルa及び図17, パネルa~b)。ClpP^{-/-}肝実質細胞及びWT肝実質細胞のミトコンドリアのサイズ分布は同様であった(図17, パネルc)が、丸さがより低いClpP^{-/-}ミトコンドリアの割合がより高く(図17, パネルd)、より多くのClpP^{-/-}ミトコンドリアの形状が細長かったことを示唆している。

【0163】

ClpPがミトコンドリアの機能を調節するか否かを判断するために、ClpP^{-/-}マウス及びWTマウスの繊維芽細胞の呼吸容量を、Seahorse XFアナライザを使用して比較した。ClpP^{-/-}繊維芽細胞は、同様の基礎酸素消費速度(OCR)を有したが、WT繊維芽細胞と比較して著しく高い最大OCRを有し(図5, パネルd)、ClpPの欠如でのミトコンドリアの機能

10

20

30

40

50

の上昇を示している。C1pP^{-/-} 繊維芽細胞は、WT繊維芽細胞と比較してH₂O₂による細胞毒性に対する耐性を更に示し(図5, パネルe)、C1pPの欠如での抗酸化ストレス能力の上昇を示唆している。C1pP^{-/-} 繊維芽細胞のマウスC1pPの過剰発現により、C1pP下流エフェクタのレベルが減少しただけでなく(図4, パネルk~l)、C1pP^{-/-} 細胞で観察されたミトコンドリアの機能及びH₂O₂による細胞毒性に対する耐性の向上が消失した(図5, パネルf~g)。

【0164】

実施例6:ミトコンドリアのエフェクタのTRAP1、Grp75及びLRPPRCは、ミトコンドリアの機能及び抗ストレス能力に対するC1pP欠如の効果を媒介した。

C1pPによって調節されたミトコンドリアのエフェクタがC1pP^{-/-} 繊維芽細胞で見られたミトコンドリアの機能の向上を媒介したか否か、またC1pPによって調節されたミトコンドリアのエフェクタのどれがC1pP^{-/-} 繊維芽細胞で見られたミトコンドリアの機能の向上を媒介したかを判断するために、レンチウイルスshRNAを使用してC1pP^{-/-} 繊維芽細胞のミトコンドリアのエフェクタの各々をノックダウンした。この後、機能分析を行った(図18, パネルa~d)。LRPPRC及びC1pXではなくTRAP1又はGrp75をノックダウンすることにより、H₂O₂細胞毒性に対するC1pP^{-/-} 繊維芽細胞の耐性が消失又は低下した(図5, パネルh~i及び図18, パネルe~f)。LRPPRC又はTRAP1のいずれかをノックダウンすることにより、C1pP^{-/-} 細胞の呼吸容量の増加が消失した一方、C1pX又はGrp75のレベルの低下はこのような影響を及ぼさなかった(図5, パネルj)。これらのデータは、エフェクタレベル、特にTRAP1、Grp75及びLRPPRCを制御することによりC1pPがミトコンドリアの機能を調節することを示唆している。これらのタンパク質は、別個の経路を介してミトコンドリアの機能に影響を及ぼすか、又は同一の経路で相乗効果をもたらす場合がある。

【0165】

実施例7:肝臓のC1pPはインスリン感受性の調節に関与していた。

多くの組織は、異なるメカニズムによってインスリン感受性に影響を及ぼし得る。C1pPコンディショナルノックアウトマウス(C1pP-cKO)を使用して、C1pP^{-/-} マウスの表現型の基礎となる一又は複数の組織特異的なメカニズムを更に分析した。このマウスモデルでは、今後取り除くために、C1pPエキソン1~3を含むマウスゲノム領域に隣接させるためにLoxP部位を挿入した。特に肝臓のC1pPを除去するために、AAV-CMV-CreをC1pP-cKOマウスに尾静脈を介して注射した。免疫染色により検出された肝臓のC1pPレベルは、AAVが注射された対照マウスと比較して、Creが注射されたマウスで劇的に低下した(図6, パネルa)。注射の3週間後に、2つのグループのマウスの総体重に有意差はなかった(図6, パネルb~c)が、Creが注射されたマウスは対照マウスより体重増加が著しく低かった(図6, パネルd)。Creが注射されたマウスの血糖レベルも対照マウスの血糖レベルより著しく低かった(図6, パネルf)が、血漿インスリンレベルの差は検出されなかった(図6, パネルe)。Creが注射されたマウスのインスリン感受性の向上は、食事制限又はHFDを2週間行ったマウスで糖負荷試験によって明らかにされた(図6, パネルg~h)。C1pP^{-/-} マウスとは異なり、C1pPの肝臓特異的なノックダウンは、HFDによる体重増加に影響を及ぼさなかった(図6, パネルi)。これらのデータは、肝臓のC1pPレベルが、脂肪含有量に影響を及ぼすことなく、C1pP^{-/-} マウスで観察されたインスリン感受性の調節に関与することを示唆している。

【0166】

C1pP-cKOマウスをap2-Creマウスと更に交配して、脂肪細胞特異的なC1pP-cKOマウスを確立した。C1pP-cKO/ap2-Creマウスの脂肪組織のC1pPレベルは、対照マウスの約4分の1であった(図19, パネルa~b)。残りのC1pPレベルが、ap2-CreによるC1pPの不完全な欠失、又は集められた脂肪組織の他の組織又は細胞(例えば血管細胞又は免疫細胞)の汚染によるものであるか否かが明らかではなかった。体重、血糖レベル及び耐糖能の著しい変化は、C1pP-cKO/ap2-Creマウスで検出されなかった(図19, パネルc~e)。HFDのC1pP-cKO/ap2-Creマウスの体重増加及び耐糖能も、同一の食事の対照マウスと同様であった(図19, パネルf~g)。従って、脂肪細胞のC1pPは、C1pP^{-/-} マウスで見られた脂肪堆

積の減少及びインスリン感受性の向上に起因する可能性が低い。

【0167】

実施例8：マウス胚繊維芽細胞（MEF）の小分子ClpP阻害剤のインビトロ解析

野生型マウスMEF細胞を、処置の前日に6つのウェルプレートにウェル当たり200,000の細胞で播いた。細胞を、OPTI-MEMで（本明細書に既に記載されている）10 μ Mの小分子ClpP阻害剤のA2-32-01、AV167及びAV179で2日間（48時間）1日に2回処置した。処置毎に古い培地を取り除き、新しい培地をウェルに追加した。48時間の処置後、細胞をClpP基質のウェスタンブロット解析又はqPCR分析のために収集した。

【0168】

図24及び25に示されているように、ClpP阻害剤のA2-32-01で処置することにより、マウスMEF細胞のClpP基質タンパク質レベルが上昇し、ClpPノックアウトMEF及びClpPノックアウトマウス器官で観察された表現型を再現した。図26に示されているように、マウスMEF細胞のこれらの遺伝子のmRNAレベルはA2-32-01処置後に変化しないままであり、これは、転写調節によるA2-32-01の可能性のある非特異的な影響を除外した。

10

【0169】

これらのインビトロデータに基づき、高脂肪食（HFD）による肥満及び糖尿病のマウスモデルのA2-32-01の更なるインビボ試験を、以下の実施例9に記載されているように行った。

【0170】

実施例9：高脂肪食（HFD）による肥満及び糖尿病のマウスモデルの小分子ClpP阻害剤A2-32-01のインビボ解析

20

7～9ヶ月のWTメスの（20匹のマウス）に3週間高脂肪食を与えた。HFDに応じた体重変化及び血糖/血漿インスリンのレベルを測定した。4週目の初めに処置グループ毎にA2-32-01を300 mg/kg、8日間1日2回腹腔に注射した。対照グループについては、トウモロコシ油（賦形剤）を注射した。マウスをHFDで維持した。毎日、体重変化を追跡した。A2-32-01注射の8日目に血糖レベルを測定し、糖負荷試験を適用してインスリン感受性を測定した。インビボA2-32-01処置の最初の7日間の体重データが図28に示されており、賦形剤対照グループと比較して2日目～7日目で体重の著しい減少を示す。インスリン感受性を反映する糖負荷試験を8日目に行った。そのデータが図29に示されており、賦形剤対照マウスと比較してA2-32-01で処置されたマウスでインスリン感受性の有意な向上を示す。

30

【0171】

実施例10：高脂肪食（HFD）による肥満及び糖尿病のマウスモデルの小分子ClpP阻害剤A2-32-01の継続インビボ解析（仮想例）

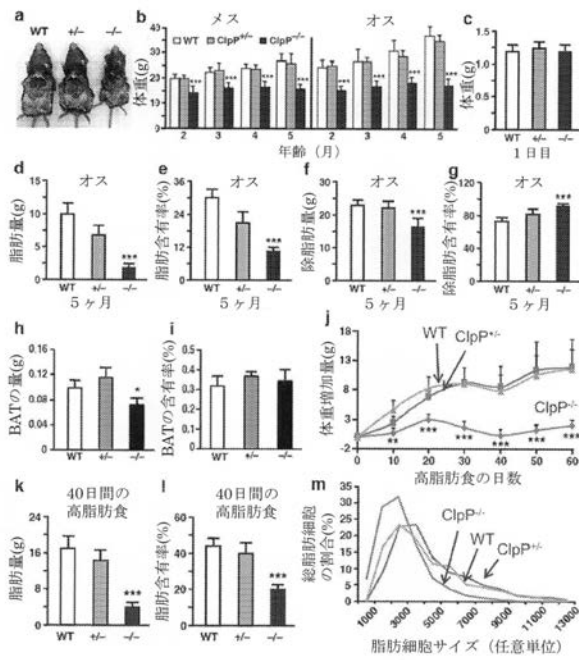
実施例9のインビボ解析を継続し、A2-32-01注射の9日目に血液及び多くの器官（肝臓/筋肉/脳）を収集する。ミトコンドリアをマウスの肝臓から分離し、ClpP活性を、例えば本明細書に記載されているようにペプチド基質を使用して試験する。ウェスタンブロット解析を行って、ClpP基質レベルを検出する。

【0172】

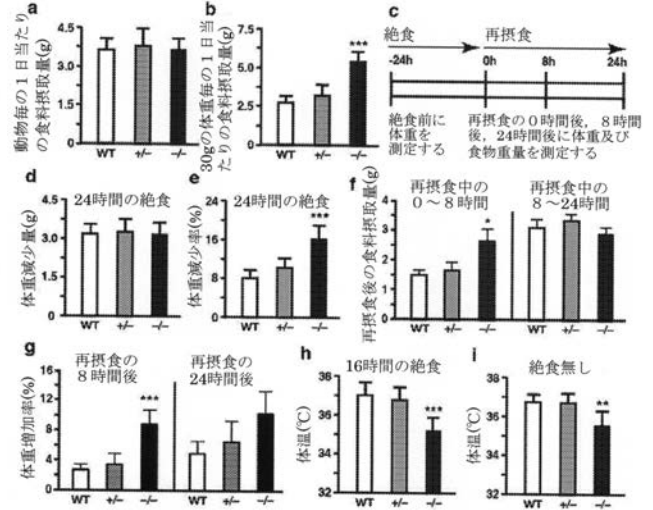
本出願は、2016年3月16日に出願された米国特許仮出願第62/309,311号の利益を主張するものであり、その出願全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

40

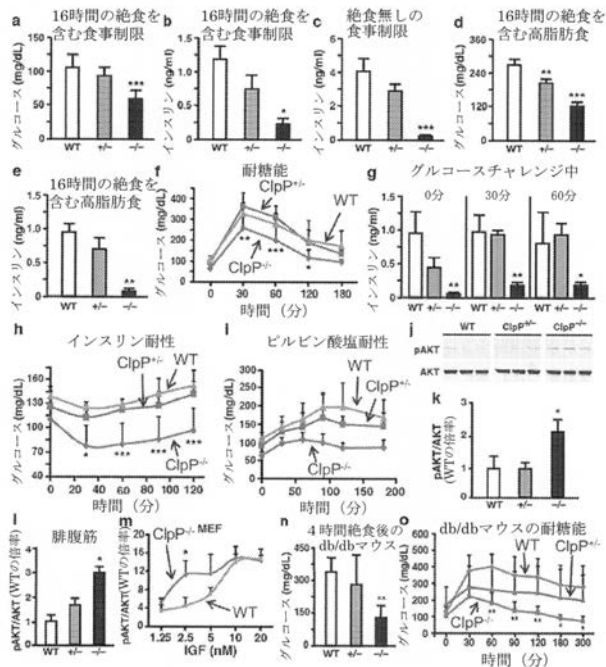
【 図 1 】



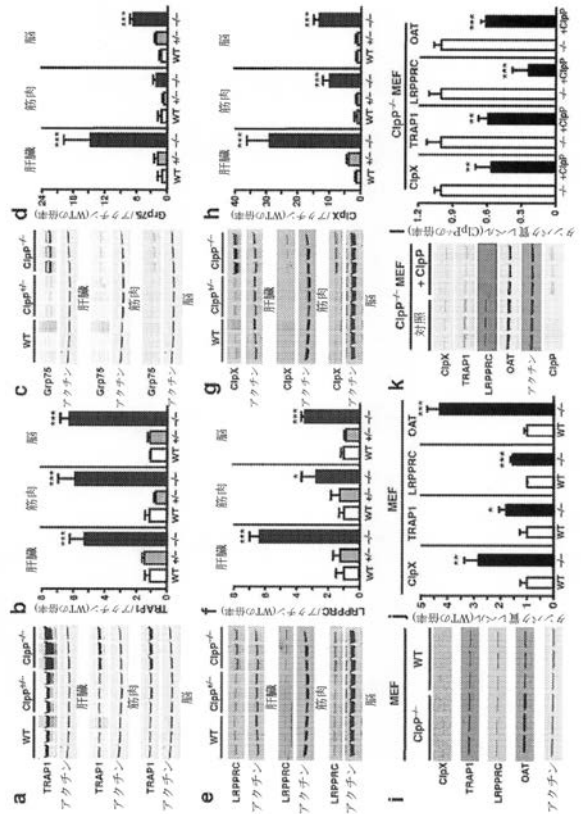
【 図 2 】



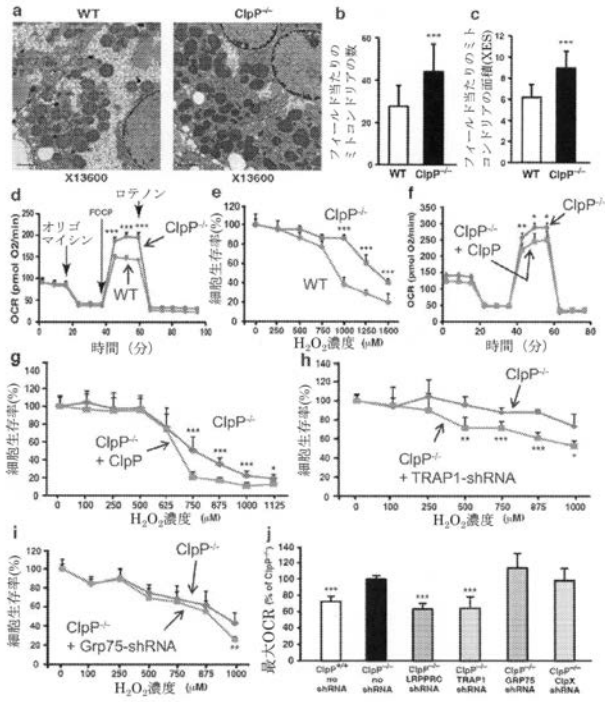
【 図 3 】



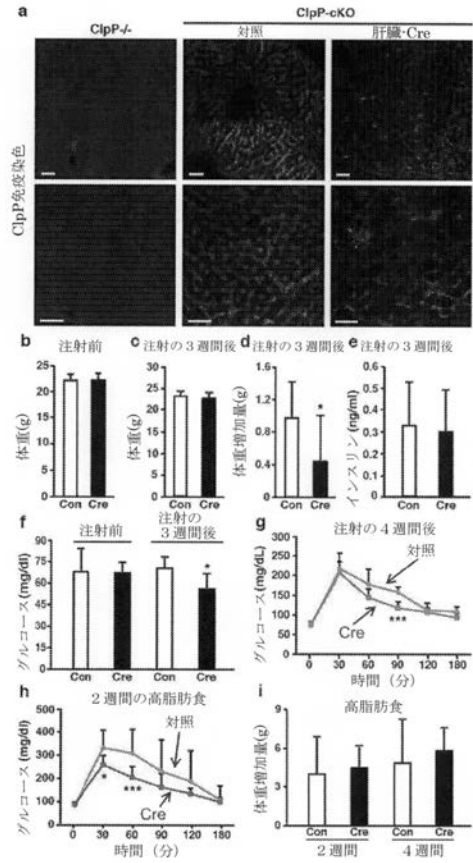
【 図 4 】



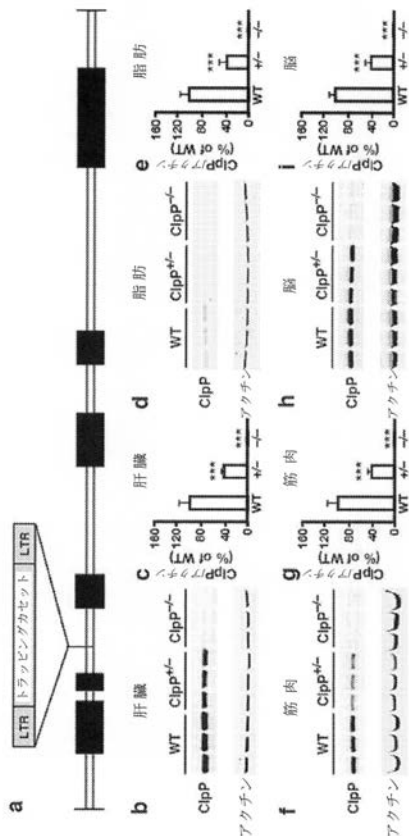
【 図 5 】



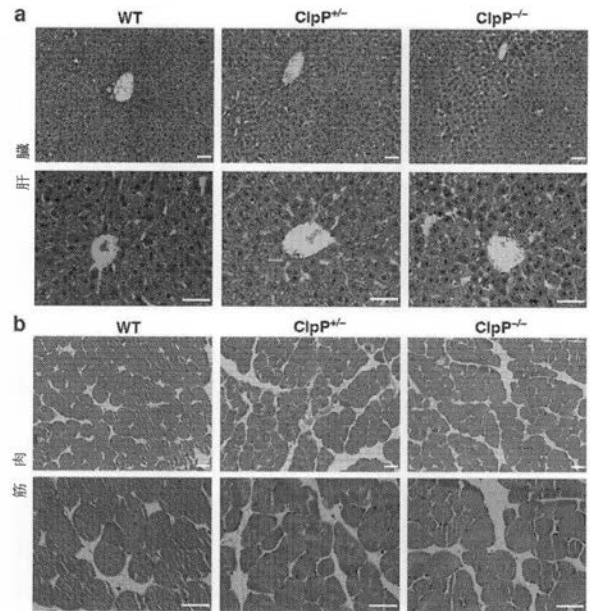
【 図 6 】



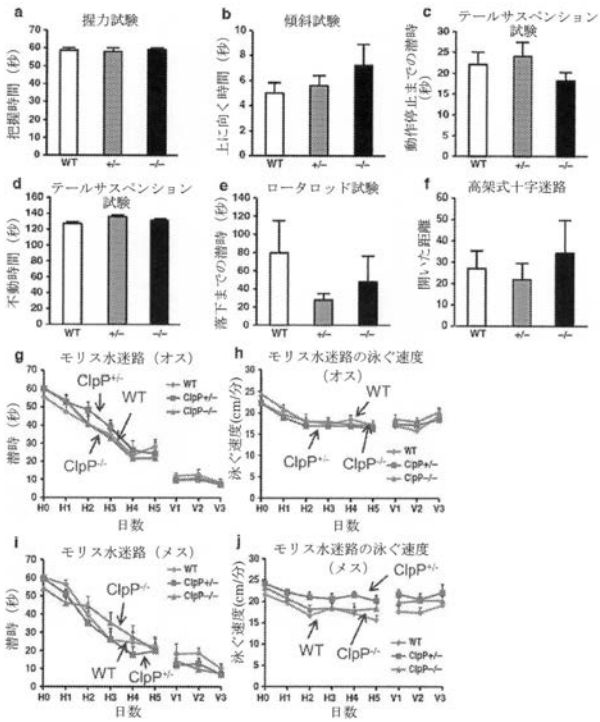
【 図 7 】



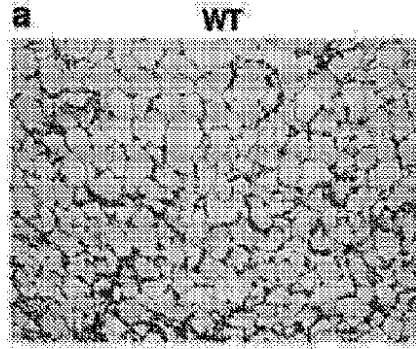
【 図 8 】



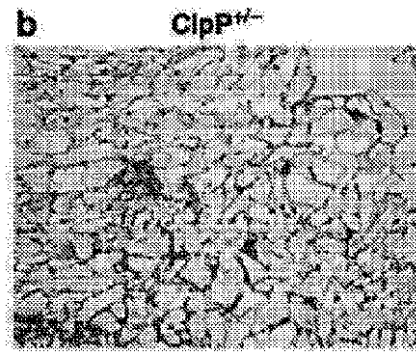
【 図 9 】



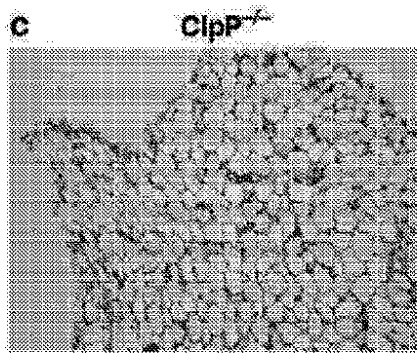
【 図 10 a 】



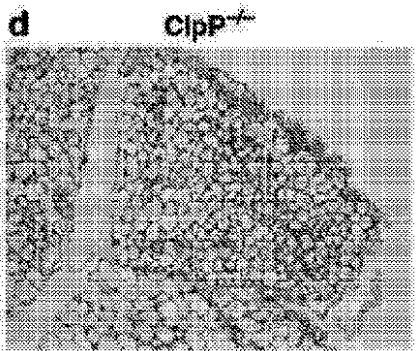
【 図 10 b 】



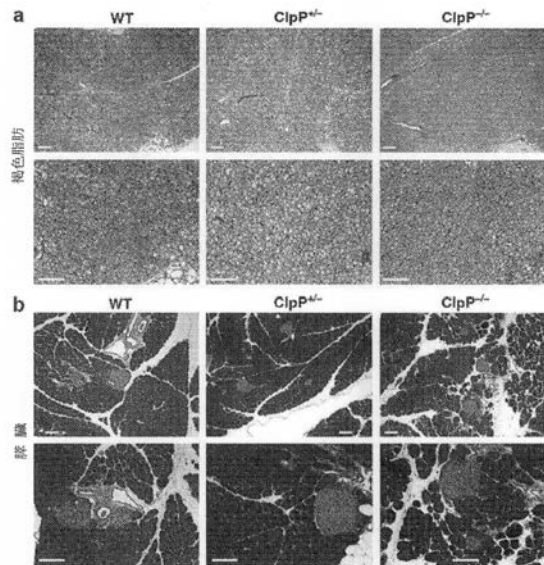
【 図 10 c 】



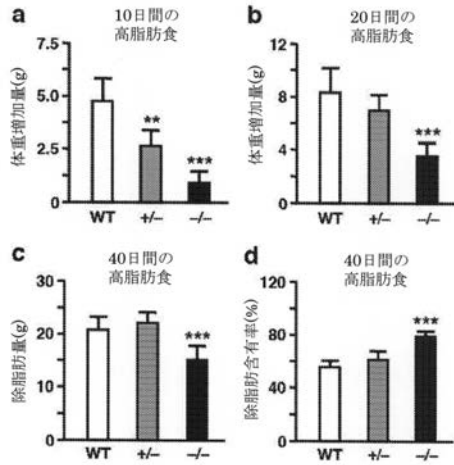
【 図 10 d 】



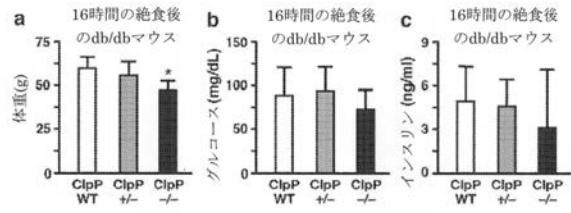
【 図 11 】



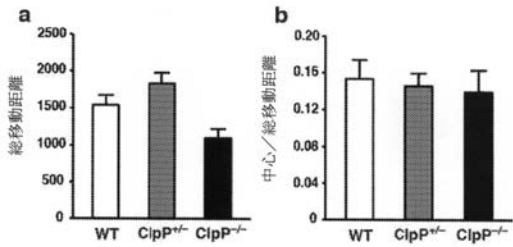
【 図 1 2 】



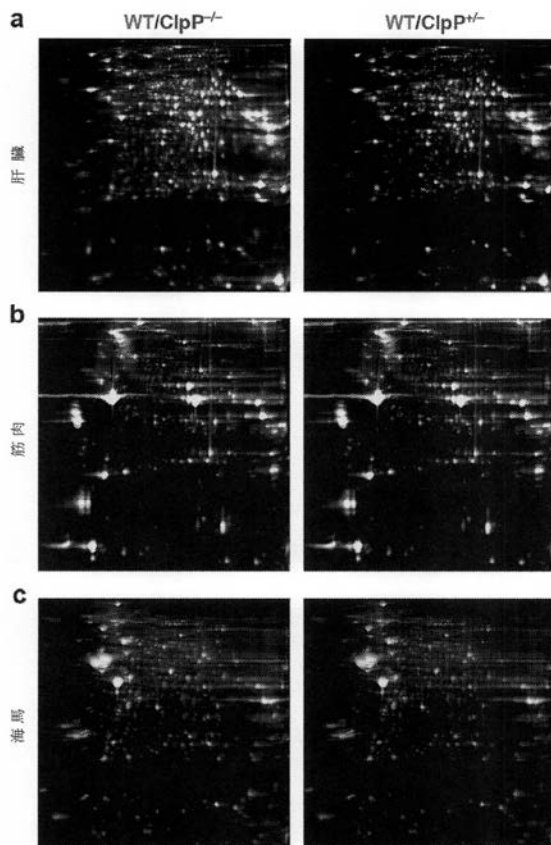
【 図 1 4 】



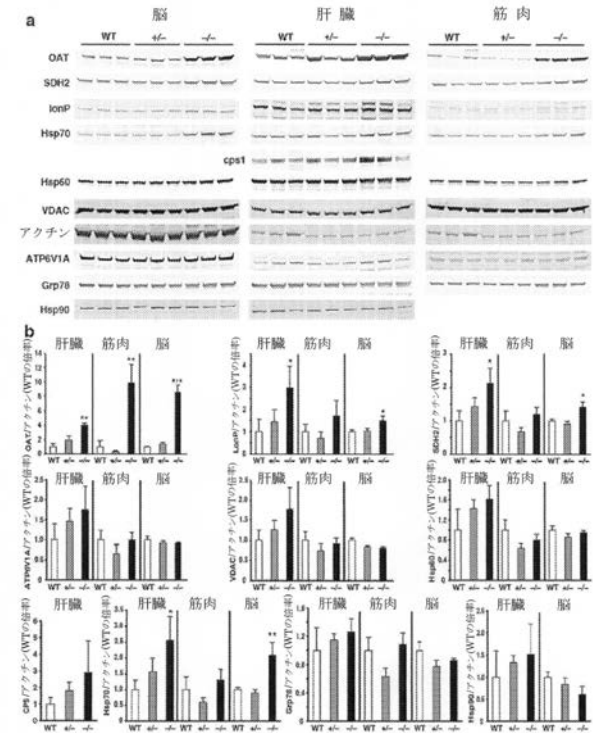
【 図 1 3 】



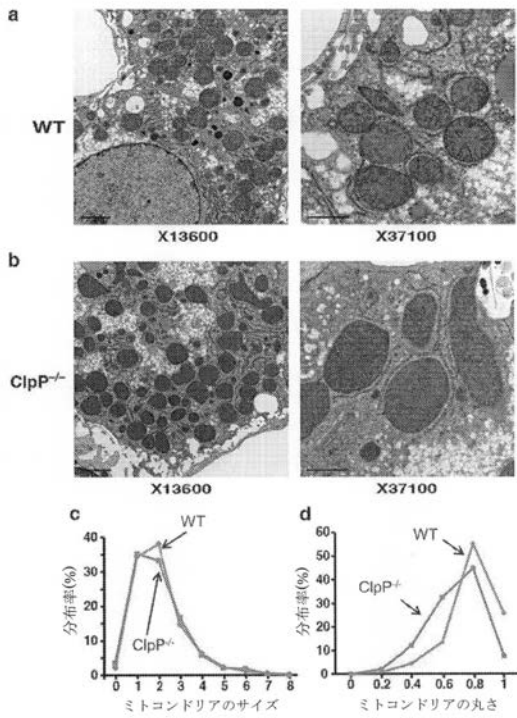
【 図 1 5 】



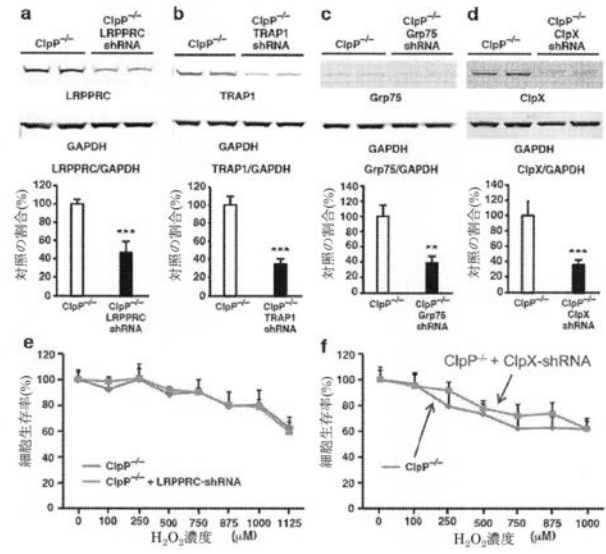
【 図 1 6 】



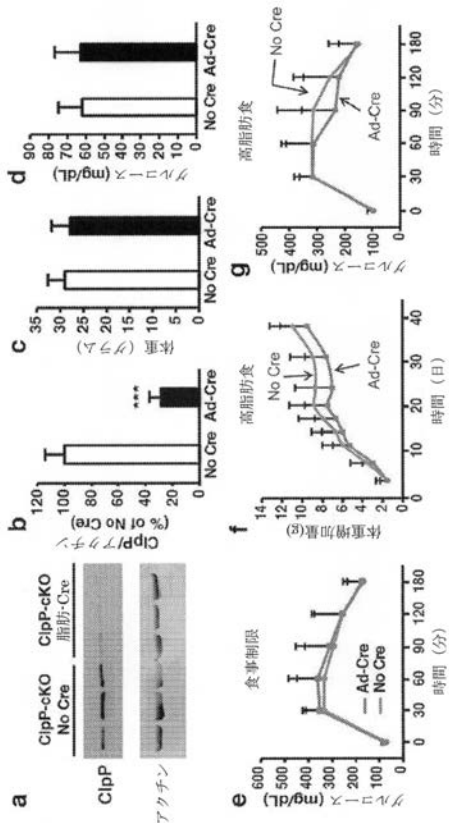
【 図 1 7 】



【 図 1 8 】



【 図 1 9 】



【 図 2 0 - 1 】

組織	WTと比較した ClpP-KO 組織の変化	上位の ID
海馬	増加	オルニチンアミノトランスフェラーゼ, ミトコンドリア
		熱ショックタンパク質 75KD, ミトコンドリア
		グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ, ミトコンドリア
		ストレス 70 タンパク質, ミトコンドリア
		V型プロトン ATP アーゼ触媒サブユニット A
		熱ショックタンパク質 HSP90
		ロイシンリッチ PPR モチーフ含有タンパク質, ミトコンドリア
		トリペプチジルペプチダーゼ 2
		リシール-tRNA-シテターゼ
		2-オキソイソ吉草酸デヒドロゲナーゼサブユニット α
		グリオキサラーゼ領域含有タンパク質 4
		チュープリン α-IB 鎖
		コハク酸デヒドロゲナーゼ[ユビキノ]フラビンタンパク質, ミトコンドリア
		ヒストン H4
ダイニン軽鎖 roadblock-type 1		
シトクロム bc1 複合体サブユニット 1, ミトコンドリア		
クレアチンキナーゼ B型		
減少	小胞体タンパク質 29	
	NADH デヒドロゲナーゼ[ユビキノ] 1 α	
	シトクロム e1, ヘムタンパク質, ミトコンドリア	
	NmrA 様ファミリー領域含有タンパク質 1	
	カルシニューリンサブユニット B型 1	
	グルタチオン S トランスフェラーゼ P	
プロテアソームサブユニット β型 1		

【 図 2 0 - 2 】

組織	WTと比較した ClpP-KO 組織の変化	上位の ID
肝臓	増加	グルタチオン S 転スフェラーゼ A4
		グルタチオン S 転スフェラーゼ P1
		グルタチオン S 転スフェラーゼ P2
		アルデヒドデヒドロゲナーゼ, ミトコンドリア
		ペルオキシレドキシニン-1
		ペルオキシレドキシニン-4
		ストレス 70 タンパク質, ミトコンドリア
		熱ショックタンパク質 75kDa, ミトコンドリア
		5-オキソプロリナーゼ
		カルバモイルリン酸シテターゼ, ミトコンドリア
		プロテアソームサブユニット β 型 2
		オルニチンアミノトランスフェラーゼ, ミトコンドリア
		ロイシリンリッチ PPR モチーフ含有タンパク質, ミトコンドリア
	減少	フェニルアラニン-4-ヒドロキシラーゼ
		タンパク質 SERAC1
		チトクロム b5 型 B
		ミオシン調節領域 12B
		脂肪酸結合タンパク質, 腸
		甲状腺ホルモン誘導性肝臓タンパク質
		主要尿タンパク質 2
主要尿タンパク質 11,8		
脂肪酸結合タンパク質, 肝臓		
炭酸脱水酵素 3		
非特異的脂質輸送タンパク質		

【 図 2 0 - 3 】

組織	WTと比較した ClpP-KO 組織の変化	上位の ID
筋肉	増加	ペルオキシレドキシニン-5, ミトコンドリア
		オルニチンアミノトランスフェラーゼ, ミトコンドリア
		タンパク質 SERAC1
		ミオシン結合タンパク質 H
		テロメア伸長ヘリカーゼ 1 の制御因子
		アタキシン 7
		ストレス 70 タンパク質, ミトコンドリア
		ミオシン 4
		ミオグロビン
		NADH デヒドロゲナーゼ [ユビキノン] 1 α 部分複合体サブユニット 8
	減少	ヘモグロビンサブユニット β I
		ヒストン H4
		アクチン
		NADH デヒドロゲナーゼ [ユビキノン] 鉄硫黄タンパク質, ミトコンドリア
		乳酸グルタチオンリナーゼ
		NADH デヒドロゲナーゼ [ユビキノン] 1 α 部分複合体サブユニット 10, ミトコンドリア
		NADH ユビキノン酸化還元酵素 75kDa サブユニット, ミトコンドリア

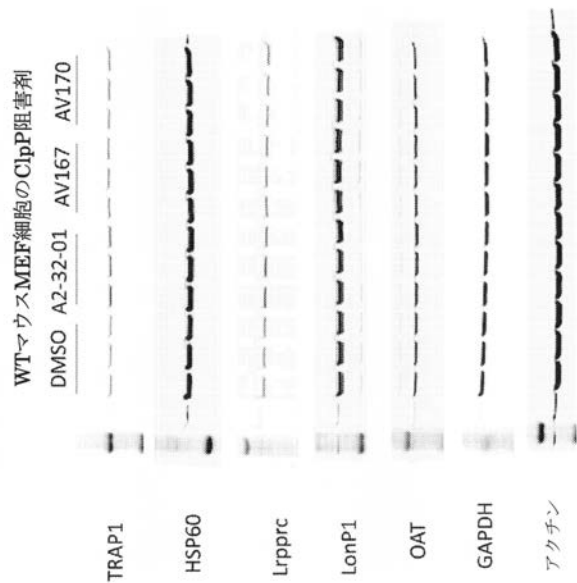
【 図 2 1 】

ClpX	カゼイン分解性ペプチダーゼ X 相同体
Trap1	熱ショックタンパク質 75KD (ミトコンドリア)
Grp75	ストレス 70 タンパク質 (ミトコンドリア)
LRPPRC	ロイシリンリッチ PPP 含有タンパク質 (ミトコンドリア)
OAT	オルニチンアミノトランスフェラーゼ (ミトコンドリア)
LonP1	Lon ペプチダーゼ 1 (ミトコンドリア)

【 図 2 2 】

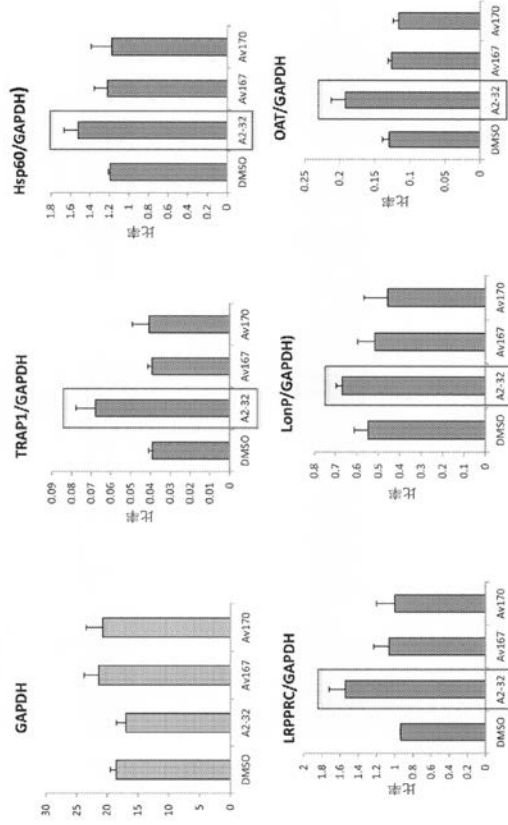
	海馬		肝臓		筋肉		脂肪	
	倍率変化 (KO vs WT)	FDR	倍率変化 (KO vs WT)	FDR	倍率変化 (KO vs WT)	FDR	倍率変化 (KO vs WT)	FDR
ClpX	0.973	1.000	1.880	0.207	0.887	1.000	0.898	1.000
Trap1	0.835	0.973	1.020	1.000	1.070	1.000	0.760	0.844
Grp75	1.140	1.000	1.030	1.000	1.220	0.997	0.841	1.000
LRPPRC	1.090	1.000	0.942	1.000	0.940	1.000	0.857	1.000
OAT	0.982	1.000	0.613	0.626	1.080	1.000	0.740	0.885
LonP1	0.883	0.999	0.976	1.000	1.050	1.000	0.734	0.656

【 図 2 3 】



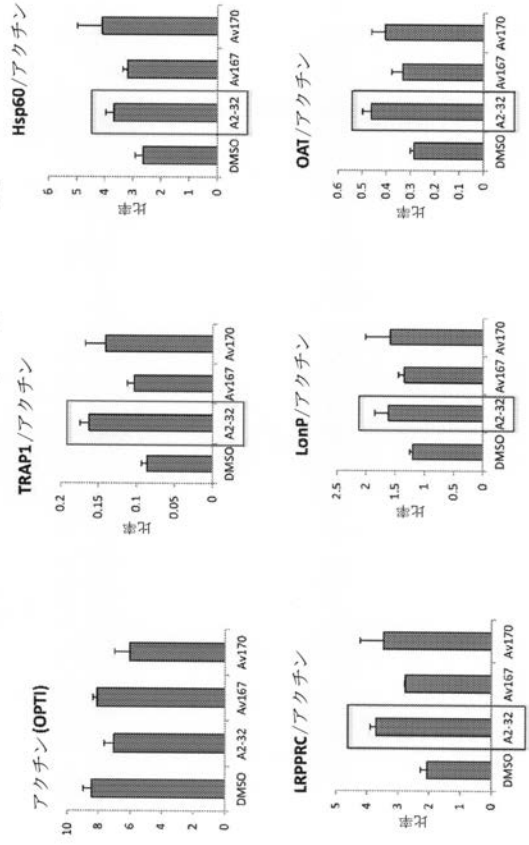
【 図 2 4 】

(GAPDHに正規化された) 処置後のCipP基質のタンパク質レベル



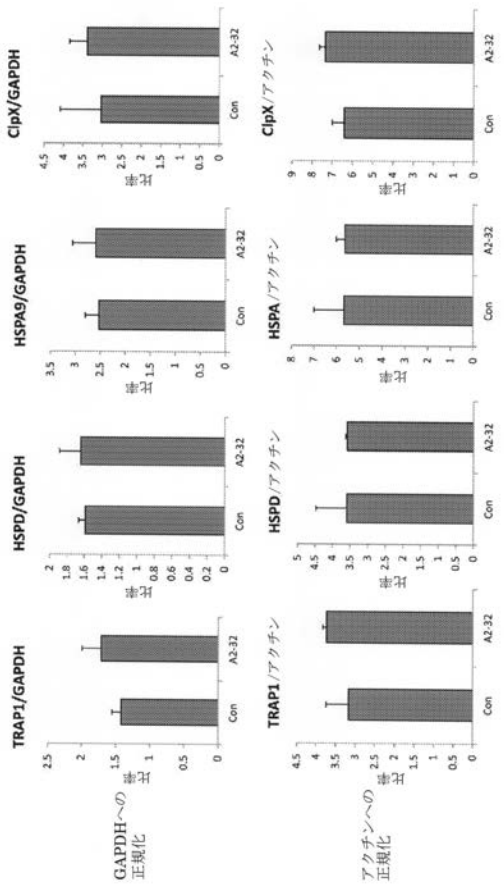
【 図 2 5 】

(アクチンに正規化された) 処置後のCipP基質のタンパク質レベル



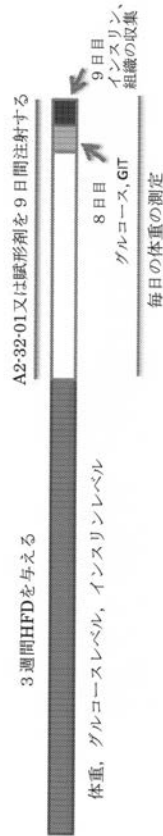
【 図 2 6 】

CipP基質のmRNAレベルはA2-32-01処置後に変化しないままである



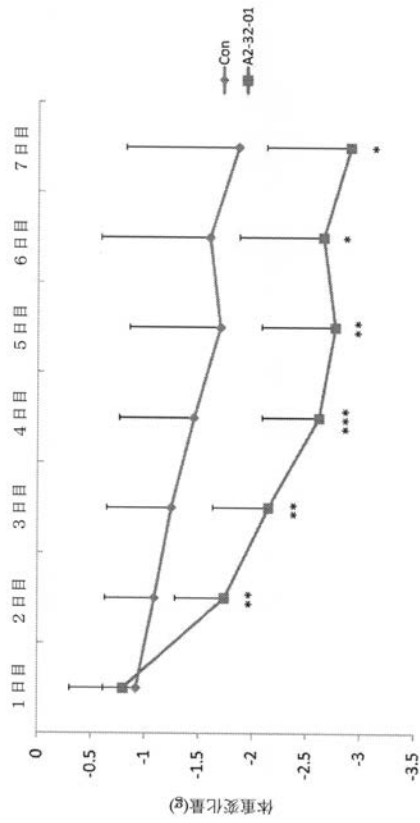
【 図 2 7 】

A2-32-01インビボ研究計画



【 図 2 8 】

A2-32-01処置は、高脂肪食のマウスの体重を著しく減らす



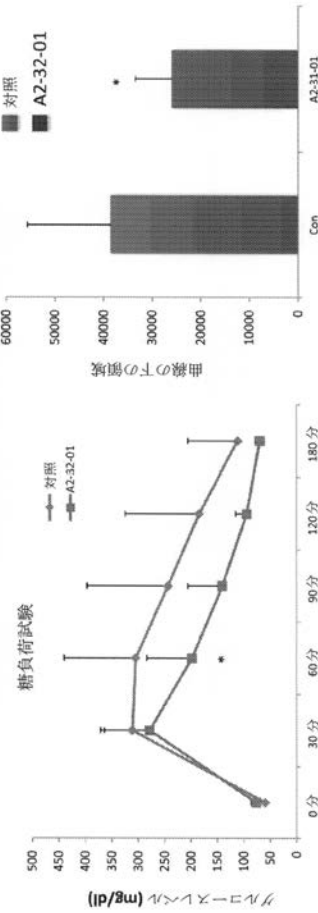
*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001

【 配 列 表 】

2019515654000001.app

【 図 2 9 】

A2-32-01処置は、高脂肪食のマウスの耐糖能によって測定されるように、インスリン感受性を著しく向上させる



*p < 0.05

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2017/022584
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 31/00; A61K 31/7088; A61K 38/00 (2017.01) CPC - A61K 31/195; A61K 38/005; A61K 39/3955 (2017.05)		
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) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 514/44A; 514/277; 514/1.1 (keyword delimited)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2010/059942 A1 (THE J. DAVID GLADSTONE INSTITUTES et al) 27 May 2010 (27.05.2010) entire document	1-6, 8, 9, 18-23
Y	LEE et al. "ApoE Polymorphism May Determine Low-Density Lipoprotein Cholesterol Level in Association with Obesity and Metabolic Syndrome in Postmenopausal Korean Women," Yonsei Med J, 06 April 2011 (06.04.2011), Vol. 52, No. 3, Pgs. 429-434. entire document	1-6, 8, 9, 18-23
Y	RATH et al. "Induction of dsRNA-activated protein kinase links mitochondrial unfolded protein response to the pathogenesis of intestinal inflammation," Gut, 13 October 2011 (13.10.2011), Vol. 61, Iss. 9, Pgs. 1269-1278. entire document	20
Y	COLE et al. "Inhibition of the mitochondrial protease, ClpP, as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia," Cancer Cell, 08 June 2015 (08.06.2015), Vol. 27, Iss. 6, Pgs. 884-876. entire document	22, 23
A	WO 2003/031939 A2 (INCYTE GENOMICS, INC. et al) 17 April 2003 (17.04.2003) entire document	1-6, 8, 9, 18-23
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 04 May 2017		Date of mailing of the international search report 05 JUN 2017
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/022584

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.: 7, 10-17, 24-26
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 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.:

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.

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 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 31/337 (2006.01)	A 6 1 K 31/337	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
C 1 2 Q 1/6837 (2018.01)	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6837	Z
	C 1 2 Q 1/6869	Z

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

(72)発明者 シュー, チン

アメリカ合衆国 9 4 0 1 0 カリフォルニア州, バーリンゲーム, セコイア アベニュー 1 7 2 7

(72)発明者 マーリー, ロバート ダブリュー.

アメリカ合衆国 9 4 1 0 7 カリフォルニア州, サン フランシスコ, ベリー ストリート 3 2 5 # 3 2 7

Fターム(参考) 2G045 AA24 BB20 CB01 DA14 DA36
 4B063 QA01 QA13 QA19 QQ08 QQ52 QR08 QR42 QR62 QS25 QS34
 QX01 QX02
 4C084 AA13 AA17 NA14 ZA701 ZA702 ZC201 ZC202 ZC351 ZC352
 4C086 AA01 AA02 BA17 EA16 MA01 MA04 MA66 NA14 ZA70 ZC20
 ZC35

专利名称(译)	用于治疗肥胖症和/或糖尿病的方法和组合物，以及用于鉴定候选治疗剂的方法和组合物		
公开(公告)号	JP2019515654A	公开(公告)日	2019-06-13
申请号	JP2018548758	申请日	2017-03-15
[标]申请(专利权)人(译)	杰伊大卫格莱斯顿制度津市		
申请(专利权)人(译)	周杰伦大卫格莱斯顿制度津市		
发明人	フアン,ヤドン シュー,チン マーリー,ロバート ダブリュー.		
IPC分类号	C12Q1/6851 A61K45/00 A61P3/10 A61P3/04 A61P43/00 A61K48/00 A61K31/7105 A61K31/337 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 C12Q1/6837 C12Q1/6869		
CPC分类号	A61K31/365 A61K31/44 A61P1/16 A61P3/04 A61P3/10 C12Q1/37 G01N2500/10 G01N2800/042 G01N2800/044 A61K9/0019 C12Q1/686 G01N33/5067 G01N33/5091 G01N33/6848		
FI分类号	C12Q1/6851.ZNA.Z A61K45/00 A61P3/10 A61P3/04 A61P43/00.111 A61K48/00 A61K31/7105 A61K31/337 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/53.D C12Q1/6837.Z C12Q1/6869.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA14 2G045/DA36 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX01 4B063/QX02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA701 4C084/ZA702 4C084/ZC201 4C084/ZC202 4C084/ZC351 4C084/ZC352 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BA17 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/MA66 4C086/NA14 4C086/ZA70 4C086/ZC20 4C086/ZC35		
优先权	62/309311 2016-03-16 US		
其他公开文献	JP2019515654A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

种类代码：A1提供了用于鉴定用于治疗肥胖症和/或糖尿病的候选药剂的方法和组合物。此类方法包括，例如，使哺乳动物细胞或细胞群与测试试剂接触，并测量哺乳动物细胞或细胞群细胞中ClpP的表达水平和/或活性水平。此外，提供了用于治疗个体（例如，肥胖个体和/或患有糖尿病的个体）的方法和组合物。治疗方法包括向个体施用ClpP抑制剂（例如，以预防或减少体重增加，增加胰岛素敏感性和/或增强葡萄糖耐量）。

