

(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2009-523122

(P2009-523122A)

(43) 公表日 平成21年6月18日(2009.6.18)

(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 Z N A	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 H 0 4 5
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/12	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-545764 (P2008-545764)  
 (86) (22) 出願日 平成18年12月12日 (2006.12.12)  
 (85) 翻訳文提出日 平成20年8月1日 (2008.8.1)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/047518  
 (87) 国際公開番号 W02007/070564  
 (87) 国際公開日 平成19年6月21日 (2007.6.21)  
 (31) 優先権主張番号 60/750,206  
 (32) 優先日 平成17年12月13日 (2005.12.13)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 508176979  
 ハルクネスス プハルマセウティカルス、  
 インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 92121 カリフォル  
 ニア州 サンディエゴ エアストガテ マ  
 ルル 4401 シー/オー サンデルリ  
 ング ベンツレス  
 (74) 代理人 100097456  
 弁理士 石川 徹  
 (72) 発明者 ブイロン ルビン  
 アメリカ合衆国 14472 ニューヨー  
 ク州 ホネオイエ ファルルス ピトス  
 フォルド センテル ロード 1180

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エンテロスタチンを使用して肥満を治療する方法

(57) 【要約】

本発明は、有効量のエンテロスタチンを、エンテロスタチン欠乏に関連する障害又は状態の治療又は予防を必要とする対象に投与することによって、エンテロスタチン欠乏に関連する障害又は状態を治療又は予防する方法を提供する。本発明はまた、エンテロスタチンによる治療の対象を選択する方法も提供する。エンテロスタチン欠乏に関連する代表的な障害又は状態としては、過体重、肥満、代謝障害、高血圧症、脂質関連障害及びII型糖尿病が挙げられる。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

エンテロスタチン欠乏に関連する障害又は状態の治療又は予防を必要とする対象における、エンテロスタチン欠乏に関連する障害又は状態を治療又は予防する方法であって、前記障害又は状態を治療又は予防するのに有効な量のエンテロスタチンをエンテロスタチン欠乏の対象に投与することを含む、前記方法。

## 【請求項2】

前記障害又は対象が、過体重、肥満、代謝障害、高血圧症、脂質関連障害、II型糖尿病から選択される、請求項1記載の方法。

## 【請求項3】

前記障害又は状態が過体重である、請求項2記載の方法。

## 【請求項4】

前記障害又は状態が肥満である、請求項2記載の方法。

## 【請求項5】

前記障害又は状態がII型糖尿病である、請求項2記載の方法。

## 【請求項6】

エンテロスタチン欠乏の治療を必要とする対象における、エンテロスタチン欠乏を治療する方法であって、前記欠乏を治療するのに有効な量のエンテロスタチンを前記対象に投与することを含む、前記方法。

## 【請求項7】

前記エンテロスタチンが、APGPR(配列番号1)、VPDPR(配列番号2)及びVPGPR(配列番号3)からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドである、請求項1又は6記載の方法。

## 【請求項8】

前記エンテロスタチンが、アミノ酸配列APGPR(配列番号1)を有するペプチドである、請求項7記載の方法。

## 【請求項9】

前記エンテロスタチンが、アミノ酸配列VPDPR(配列番号2)を有するペプチドである、請求項7記載の方法。

## 【請求項10】

前記エンテロスタチンが、アミノ酸配列VPGPR(配列番号3)を有するペプチドである、請求項7記載の方法。

## 【請求項11】

前記対象がヒトである、請求項1又は6記載の方法。

## 【請求項12】

前記対象が、 $25\text{kg}/\text{m}^2$ を超える肥満度指数(「BMI」)を有する、請求項11記載の方法。

## 【請求項13】

前記対象が、 $30\text{kg}/\text{m}^2$ を超える肥満度指数(「BMI」)を有する、請求項11記載の方法。

## 【請求項14】

前記対象が、 $35\text{kg}/\text{m}^2$ を超える肥満度指数(「BMI」)を有する、請求項11記載の方法。

## 【請求項15】

前記対象が、 $25\text{kg}/\text{m}^2$ 未満の肥満度指数(「BMI」)を有する、請求項11記載の方法。

## 【請求項16】

前記対象が、 $22\text{kg}/\text{m}^2$ 未満の肥満度指数(「BMI」)を有する、請求項11記載の方法。

## 【請求項17】

前記対象が、 $20\text{kg}/\text{m}^2$ 未満の肥満度指数(「BMI」)を有する、請求項11記載の方法。

## 【請求項18】

エンテロスタチンが経口投与される、請求項1又は6記載の方法。

## 【請求項19】

エンテロスタチンが静脈内投与される、請求項1又は6記載の方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 20】  
エンテロスタチンが胃内投与される、請求項1又は6記載の方法。
- 【請求項 21】  
エンテロスタチンが十二指腸内投与される、請求項1又は6記載の方法。
- 【請求項 22】  
エンテロスタチンが腹腔内投与される、請求項1又は6記載の方法。
- 【請求項 23】  
エンテロスタチンが脳室内投与される、請求項1又は6記載の方法。
- 【請求項 24】  
エンテロスタチンが、約2mg/日から約100mg/日の量で投与される、請求項1又は6記載の方法。 10
- 【請求項 25】  
エンテロスタチンが食事時間の頃に投与される、請求項1又は6記載の方法。
- 【請求項 26】  
前記対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量が正常なエンテロスタチン値を下回る場合に、前記対象がエンテロスタチン欠乏である、請求項1又は6記載の方法。
- 【請求項 27】  
エンテロスタチンによる治療の対象を選択する方法であって、前記対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量を測定するステップを含み、前記対象は、前記対象のサンプル中のエンテロスタチンの量が正常なエンテロスタチン値を下回る場合に治療の対象に選択される、前記方法。 20
- 【請求項 28】  
前記対象がヒトである、請求項27記載の方法。
- 【請求項 29】  
前記サンプルが、血液サンプル、血漿サンプル、唾液サンプル、血清サンプル、痰サンプル、尿サンプル、細胞サンプル、細胞抽出物サンプル及び組織生検サンプルから選択される、請求項27記載の方法。
- 【請求項 30】  
前記サンプルが血液サンプルである、請求項29記載の方法。
- 【請求項 31】  
前記サンプルが尿サンプルである、請求項29記載の方法。 30
- 【請求項 32】  
前記対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量が、分光光度法、クロマトグラフィー、免疫アッセイ法又は電気泳動によって測定される、請求項27記載の方法。
- 【請求項 33】  
前記対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量が免疫アッセイ法によって測定される、請求項32記載の方法。
- 【請求項 34】  
前記対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量がELISAによって測定される、請求項33記載の方法。 40
- 【請求項 35】  
前記対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量が電気泳動によって測定される、請求項32記載の方法。
- 【請求項 36】  
前記対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量がCGEによって測定される、請求項35記載の方法。
- 【請求項 37】  
前記対象が絶食しているときにエンテロスタチンの量が測定される、請求項27記載の方法。
- 【請求項 38】 50

前記対象が摂食しているときにエンテロスタチンの量が測定される、請求項27記載の方法。

【請求項39】

前記対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量が正常なエンテロスタチン値の75%未満である場合に前記対象が治療の対象に選択される、請求項27記載の方法。

【請求項40】

前記対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量が正常なエンテロスタチン値の50%未満である場合に前記対象が治療の対象に選択される、請求項27記載の方法。

【請求項41】

前記対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量が正常なエンテロスタチン値の25%未満である場合に前記対象が治療の対象に選択される、請求項27記載の方法。

10

【請求項42】

エンテロスタチン欠乏に関連する障害又は状態を治療又は予防する方法であって、(a)エンテロスタチンが欠乏した対象を治療の対象に選択すること、及び(b)前記障害又は状態を治療又は予防するのに有効な量のエンテロスタチンを前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項43】

前記障害又は対象が、過体重、肥満、代謝障害、高血圧症、脂質関連障害、II型糖尿病から選択される、請求項42記載の方法。

【請求項44】

前記障害又は状態が過体重である、請求項43記載の方法。

20

【請求項45】

前記障害又は状態が肥満である、請求項43記載の方法。

【請求項46】

前記障害又は状態がII型糖尿病である、請求項43記載の方法。

【請求項47】

前記対象がヒトである、請求項42記載の方法。

【請求項48】

前記対象が、 $25\text{kg}/\text{m}^2$ を超える肥満度指数(「BMI」)を有する、請求項47記載の方法。

【請求項49】

前記対象が、 $30\text{kg}/\text{m}^2$ を超える肥満度指数(「BMI」)を有する、請求項47記載の方法。

30

【請求項50】

前記対象が、 $35\text{kg}/\text{m}^2$ を超える肥満度指数(「BMI」)を有する、請求項47記載の方法。

【請求項51】

前記対象が、 $25\text{kg}/\text{m}^2$ 未満の肥満度指数(「BMI」)を有する、請求項47記載の方法。

【請求項52】

前記対象が、 $22\text{kg}/\text{m}^2$ 未満の肥満度指数(「BMI」)を有する、請求項47記載の方法。

【請求項53】

前記対象が、 $20\text{kg}/\text{m}^2$ 未満の肥満度指数(「BMI」)を有する、請求項47記載の方法。

【請求項54】

前記対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量を測定することをさらに含む、請求項42記載の方法。

40

【請求項55】

前記サンプルが、血液サンプル、血漿サンプル、唾液サンプル、血清サンプル、痰サンプル、尿サンプル、細胞サンプル、細胞抽出物サンプル及び組織生検サンプルから選択される、請求項42記載の方法。

【請求項56】

前記サンプルが血液サンプルである、請求項55記載の方法。

【請求項57】

前記サンプルが尿サンプルである、請求項55記載の方法。

50

- 【請求項 5 8】  
前記対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量が、分光光度法、クロマトグラフィー、免疫アッセイ法又は電気泳動によって測定される、請求項54記載の方法。
- 【請求項 5 9】  
前記対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量が免疫アッセイ法によって測定される、請求項58記載の方法。
- 【請求項 6 0】  
前記対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量がELISAによって測定される、請求項59記載の方法。
- 【請求項 6 1】 10  
前記対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量が電気泳動によって測定される、請求項58記載の方法。
- 【請求項 6 2】  
前記対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量がCGEによって測定される、請求項61記載の方法。
- 【請求項 6 3】  
前記対象が絶食しているときにエンテロスタチンの量が測定される、請求項54記載の方法。
- 【請求項 6 4】 20  
前記対象が摂食しているときにエンテロスタチンの量が測定される、請求項54記載の方法。
- 【請求項 6 5】  
前記対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量が正常なエンテロスタチン値を下回る場合に前記対象が治療の対象に選択される、請求項54記載の方法。
- 【請求項 6 6】  
前記対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量が正常なエンテロスタチン値の75%未満である場合に前記対象が治療の対象に選択される、請求項65記載の方法。
- 【請求項 6 7】 30  
前記対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量が正常なエンテロスタチン値の50%未満である場合に前記対象が治療の対象に選択される、請求項65記載の方法。
- 【請求項 6 8】  
前記対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量が正常なエンテロスタチン値の25%未満である場合に前記対象が治療の対象に選択される、請求項65記載の方法。
- 【請求項 6 9】  
前記エンテロスタチンが、APGPR(配列番号1)、VPDPR(配列番号2)及びVPGPR(配列番号3)からなる群から選択されるアミノ酸を有するペプチドである、請求項42記載の方法。
- 【請求項 7 0】  
前記エンテロスタチンが、アミノ酸配列APGPR(配列番号1)を有するペプチドである、請求項69記載の方法。
- 【請求項 7 1】 40  
前記エンテロスタチンが、アミノ酸配列VPDPR(配列番号2)を有するペプチドである、請求項69記載の方法。
- 【請求項 7 2】  
前記エンテロスタチンが、アミノ酸配列VPGPR(配列番号3)を有するペプチドである、請求項69記載の方法。
- 【請求項 7 3】  
エンテロスタチンが経口投与される、請求項42記載の方法。
- 【請求項 7 4】  
エンテロスタチンが静脈内投与される、請求項42記載の方法。
- 【請求項 7 5】 50

エンテロスタチンが胃内投与される、請求項42記載の方法。

【請求項76】

エンテロスタチンが十二指腸内投与される、請求項42記載の方法。

【請求項77】

エンテロスタチンが腹腔内投与される、請求項42記載の方法。

【請求項78】

エンテロスタチンが脳室内投与される、請求項42記載の方法。

【請求項79】

エンテロスタチンが、約2mg/日から約40mg/日の量で投与される、請求項42記載の方法

10

。【請求項80】

エンテロスタチンが食事時間の頃に投与される、請求項42記載の方法。

【請求項81】

脂肪摂取量の減少を必要とする対象における、脂肪摂取量を減少させる方法であって、(a)エンテロスタチンが欠乏した対象を選択すること、及び(b)脂肪摂取量を減少させるのに有効な量のエンテロスタチンを前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項82】

肥満の治療を必要とする対象における、肥満を治療する方法であって、(a)エンテロスタチンが欠乏した対象を治療の対象に選択すること、及び(b)肥満を治療するのに有効な量のエンテロスタチンを前記対象に投与することを含む、前記方法。

20

【請求項83】

エンテロスタチンによる肥満の治療の対象を選択するためのキットであって、前記対象の体液を得ることが可能な装置、及び前記体液におけるエンテロスタチンを検出することが可能な試薬を含む、前記キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、その内容が全面的に参照により本明細書に組み込まれている、2005年12月13日に出願された米国仮出願第60/750,206号の優先権の有益性を主張するものである。

【0002】

30

(1. 発明の分野)

本発明は、エンテロスタチン欠乏に関連する障害又は状態の治療又は予防を必要とする対象に、有効量のエンテロスタチンを投与することによって、エンテロスタチン欠乏に関連する障害又は状態を治療又は予防する方法を提供する。本発明は、また、エンテロスタチンによる治療の対象を選択する方法を提供する。本発明は、さらに、患者に有効量のエンテロスタチンを投与することによって、患者集団、例えば、エンテロスタチン欠乏患者を治療する方法を提供する。エンテロスタチン欠乏に関連する代表的な障害又は状態としては、過体重、肥満、代謝障害、高血圧症、脂質関連障害及びII型糖尿病が挙げられる。

【0003】

(2. 発明の背景)

40

肥満は、世界中の人口に益々影響を与えている複雑な状態である。世界保健機構によれば、1995年には、世界中で肥満の成人が2億人存在すると推定され、さらに1800万人の5歳未満の子供が過体重に分類された。2000年では、肥満の成人の数が3億人以上まで増加した(Formigueraらの論文、2004、Best Practice & Research Clinical Gastroenterology、18:6、1125-1146参照)。

【0004】

過体重又は肥満は、高血圧症、異脂肪症(高全コレステロール又は高レベルのトリグリセリド)、II型糖尿病、冠状動脈性心疾患、卒中、胆嚢病、骨関節炎、睡眠無呼吸及び呼吸障害並びにいくつかの癌(例えば、子宮体癌、乳癌及び結腸癌)を含むいくつかの疾患及び健康状態の危険性を高めることが示された(例えば、米国国立慢性疾患予防/健康増進セ

50

ンター参照)。その健康上の結果は、早死の危険性の増加から、生活の全体的な質を低下させる重度の慢性状態までに及ぶ。

過体重又は肥満のような状態をもたらす得る生理的過程の変調のための様々な療法が提案又は試験された(Orzanoらの論文、2004、J.Am.Board Fam.Pract.17(5):359-69参照)。その1つがエンテロスタチンである。

#### 【0005】

エンテロスタチンは、齧歯類の食餌性脂肪嗜好を変調する上で有望であることを示したペプチドである(例えば、Erlanson-Albertssonらの論文、1991、Physiol.Behav.49:1191-1194;Okadaらの論文、1991、Physiol.Behav.49:1185-1189;Shargillらの論文、1991、Brain Res.544:137-140参照)。エンテロスタチンは、腸又は胃におけるプロコリパーゼのトリプシンによる活性化によってコリパーゼを生成することにより生成される。コリパーゼは、酵素リパーゼを結合、活性化して、腸の脂肪を代謝する。プロペプチドエンテロスタチンは、齧歯類の研究で実証されたように、哺乳類における食餌性脂肪嗜好を低減させると考えられる(Erlanson-Albertssonらの論文、1991、Okadaらの論文、1991、Physiol.Behav.49:1185-1189、Shargillらの論文、1991参照)。よって、有効量のエンテロスタチンペプチドを投与することによって、哺乳類の食欲を減少させる研究が報告された(Erlanson-Albertsson、1996、米国特許第5,494,894号参照)。

10

#### 【0006】

ヒトにおける1つの研究では、1つの形態のエンテロスタチン(VDPDR)の免疫反応性が肥満女性の血清で上昇するようであること、及び肥満女性の血清における食事後の別の形態のエンテロスタチン(APGPR)の免疫反応性の上昇が抑えられることが報告された(Prasadらの論文、1999、J.Clin.Endocrinol.Metab.84:937-941参照)。別の研究では、ヒトに経口投与したエンテロスタチンは食物摂取、エネルギー消費又は体重に影響しないことが報告された(Kovacsらの論文、2003、British J.Nutrition 90:207-214参照)。

20

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0007】

肥満及び関連疾患を治療する効果的な方法が当該技術分野で必要とされている。本発明は、これらの必要性を満たし、当該方法を提供する。本発明は、一部に、エンテロスタチンのレベルを評価することによって、エンテロスタチン治療に応答する対象を識別することが可能になることに基づいている。

30

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0008】

#### (3.発明の要旨)

一態様において、本発明は、エンテロスタチン欠乏の対象におけるエンテロスタチン欠乏に関連する障害又は状態を治療又は予防する方法を提供する。該方法は、障害又は状態を治療又は予防するのに有効な量のエンテロスタチンをエンテロスタチン欠乏の対象に投与するステップを含む。

#### 【0009】

作用の特定の理論に縛られることを意図するものではないが、過体重又は肥満のような状態を治療するための最も効果的な手法は、特定の療法を特定の患者集団に適用することであると考えられる。有利には、ある実施態様において、本発明は、本明細書に記載されている方法に従って有効量のエンテロスタチンで治療するのに好適な対象の分集団を選択する方法を提供する。

40

エンテロスタチン欠乏に関連する代表的な障害又は状態としては、過体重、肥満、代謝障害、高血圧症、脂質関連障害及びII型糖尿病が挙げられるが、それらに限定されない。

#### 【0010】

別の態様において、本発明は、エンテロスタチン欠乏の治療を必要とする対象におけるエンテロスタチン欠乏の治療方法を提供する。該方法は、エンテロスタチン欠乏の対象に対して、該欠乏を治療するために有効な量のエンテロスタチンを投与するステップを含む

50

。

別の態様において、本発明は、エンテロスタチンで治療する対象を選択する方法を提供する。ある実施態様において、該方法は、対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量を測定するステップを含む。対象は、対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量が正常なエンテロスタチン値を下回る場合に治療の対象に選択される。正常なエンテロスタチン値については、以下に詳述する。

#### 【0011】

さらなる態様において、本発明は、エンテロスタチン欠乏に関連する障害又は状態を治療又は予防する方法を提供する。該方法は、治療の対象となるエンテロスタチン欠乏の対象を選択し、障害又は状態を治療又は予防するのに有効な量のエンテロスタチンを対象に投与するステップを含む。エンテロスタチン欠乏の対象を選択し、エンテロスタチンを投与する方法を以下に説明する。

10

#### 【0012】

ある実施態様において、対象が、コントロールの対象量より低量のエンテロスタチンを示す、又は分泌する場合にその対象はエンテロスタチン欠乏である。対象がエンテロスタチン欠乏であるかどうかを当業者に利用可能な任意の方法によって判断することができる。代表的な方法を以下に説明する。

#### 【0013】

該方法で投与されるエンテロスタチンは、エンテロスタチン活性又は $F_1$ -ATPアーゼ活性を有する任意のペプチドであり得る。いくつかの実施態様において、エンテロスタチンは、APGPR(配列番号1)、VPDPR(配列番号2)及びVPGPR(配列番号3)からなる群から選択される配列を有するペプチドである。エンテロスタチンを当該技術分野で知られているあらゆる方法で調製及び処方することができる。有用なエンテロスタチン形態及び組成物は、その内容が全面的に参照により本明細書に組み込まれている、2005年12月13日に出願された「エンテロスタチンの非吸湿性組成物(Non-Hygroscopic Compositions of Enterostatin)」という題名の米国仮出願第60/750,208号及び2005年12月13日に出願された「エンテロスタチンの安定な固体形態(Stable Solid Forms of Enterostatin)」という題名の代理人明細書第60/750,207号に記載されている。

20

#### 【0014】

経口、静脈内、胃内、十二指腸内、腹腔内又は脳室内を含むが、それらに限定されない当業者に知られている任意の経路によってエンテロスタチンを投与することができる。ある実施態様において、エンテロスタチンは、約1mg/日から約500mg/日、約1mg/日から約400mg/日、約1mg/日から約300mg/日、約1mg/日から約200mg/日、又は約1mg/日から約100mg/日の量で投与される。

30

#### 【0015】

有利なことに、正常なエンテロスタチン値を本発明の方法の実施者が測定する必要はない。その代わりに、当業者が利用可能な知識又はデータを参照することによって、正常なエンテロスタチン値を特定することができる。当該データを当業者が利用可能な任意の情報源から得ることができる。ある実施態様において、本明細書に記載されている方法に従って当業者が収集した量のエンテロスタチンにより情報源を開発することができる。

40

#### 【0016】

ある実施態様において、正常なエンテロスタチン量は、エンテロスタチン欠乏に関連する障害又は状態の症状を示さないコントロール対象からのものである。いくつかの実施態様において、コントロール対象は、正常体重の健常対象である。いくつかの実施態様において、コントロール対象は、正常体重の痩せ形の個体である。

#### 【0017】

対象におけるエンテロスタチンの量は、限定することなく当業者に知られている任意の技術に従って測定することができる。ある実施態様において、エンテロスタチンを測定するための技術は、本発明にとって重要でなく、本明細書における方法の実施者が実施する必要もない。ある実施態様において、対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量を本

50

明細書に記載の技術によって測定した後、エンテロスタチンで治療する対象を選択すべきかどうかを判断するために、該量を正常なエンテロスタチン値と比較する。ある実施態様において、対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量は、以下に詳述するように、分光光度法、クロマトグラフィー、免疫アッセイ法又は電気泳動によって測定される。いくつかの好ましい実施態様において、エンテロスタチンの量は、免疫アッセイ法によって測定される。1つの好ましい実施態様において、免疫アッセイ法はELISAである。いくつかの好ましい実施態様において、エンテロスタチンの量は、電気泳動によって測定される。1つの好ましい実施態様において、免疫アッセイ法はCGEである。

【0018】

エンテロスタチンの量を本明細書で提示する対象の任意のサンプルで測定することができる。サンプルは、本明細書に記載されている体液又は組織サンプルであり得る。体液又は組織を調製するための方法、例えば、エンテロスタチンを抽出又は精製するための方法を本明細書に記載する。

10

【0019】

別の態様において、本発明は、エンテロスタチンで肥満を治療する対象を選択するためのキットを提供する。いくつかの実施態様において、キットは、対象の体液を収容することが可能な装置及び体液中のエンテロスタチンを検出することが可能な試薬を含む。キットは、キットの使用説明を記した標示又はラベルをさらに含むことができる。ある実施態様において、キットは、正常なエンテロスタチン値を記した標示又はラベルを含む。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

(4. 発明の詳細な説明)

(4.1. 定義)

本明細書に用いられているように、以下の用語が以下の意味を有する。

「対象」という用語は、霊長類(例えばヒト)、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット及びマウス等を含むがそれらに限定されない哺乳類などの動物を指す。好ましい実施態様において、対象はヒトである。

【0021】

「エンテロスタチン」という用語は、当業者に知られているように、プロコリパーゼのプロペプチドを包括する。代表的なエンテロスタチンは、APGPR(配列番号1)、VPDPR(配列番号2)及びVPGPR(配列番号3)からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。好ましい実施態様において、エンテロスタチンは、APGPR(配列番号1)のアミノ酸配列を有する。

30

【0022】

対象が「エンテロスタチン欠乏」である、又は対象が「エンテロスタチン欠乏」を有するという用語は、当業者の判断により、対象に期待される量より低量のエンテロスタチンを示す、又は分泌する対象を指す。いくつかの実施態様において、対象が、当該技術分野で利用可能な技術を用いて検出可能な量のエンテロスタチンを示さない、又は分泌しない場合にその対象は「エンテロスタチン欠乏」である。いくつかの実施態様において、対象が、エンテロスタチンをまったく示さない、又は分泌しない場合にその対象は「エンテロスタチン欠乏」である。

40

【0023】

ある実施態様において、対象が、空腹状態において、コントロール対象量より低量のエンテロスタチンを示す、又は分泌する場合にその対象は「エンテロスタチン欠乏」である。ある実施態様において、対象は、食後にコントロール対象量より低量のエンテロスタチンを示す、又は分泌する場合に「エンテロスタチン欠乏」である。食事は、正規の食事又は高脂肪食であり得る。いくつかの実施態様において、食事は、約600、700、800、900、1000、1100又は1200カロリーを含む。いくつかの実施態様において、食事は、脂肪による約20、30、40、35、45、50、55、60又は65%のエネルギーを含む。一実施態様において、食事は、脂肪による約800カロリー及び約45%のエネルギーを含む。

【0024】

50

対象が「エンテロスタチン欠乏」であるかどうかを、当業者に知られている技術によって判断することができる。ある実施態様において、対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量を測定し、それを正常なエンテロスタチン値と比較することによって判断する。好ましくは、高脂肪の食事から約1、2又は3時間後に対象からサンプルを取得する。いくつかの実施態様において、サンプルを対象から採取し、食事後一定時間、例えば3時間にわたって連続的に測定する。いくつかの実施態様において、対象は、当業者の判断により、対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量が、正常なエンテロスタチン値の95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、2%又は1%未満である場合に「エンテロスタチン欠乏」である。

【0025】

「コントロール対象」という用語は、当業者に認識される標準に従って、エンテロスタチン欠乏に関連する1つ以上の障害又は状態の症状を示さない対象である。いくつかの実施態様において、コントロール対象は、エンテロスタチンによる治療の対象に選択される対象と類似した年齢、身長、人種及び性別を有する。いくつかの実施態様において、コントロール対象は、痩せ形の対象又は正常な体重の対象である。対象がヒトである場合は、コントロール対象は、BMI範囲が20~25kg/m<sup>2</sup>の個人であり得る。コントロール対象は、対象がエンテロスタチン欠乏であるかどうかを評価するのに用いることができる正常なエンテロスタチン値を確立するのに有用である。

【0026】

「予防すること」又は「予防」は、疾患又は障害を生じる危険性を抑える(即ち、疾患に曝される、又はかかる恐れがあるが、疾患の症状をまだ経験していない又は示さない対象に疾患の臨床的症状の少なくとも1つを発生させない)ことを指す。好ましくは、予防は、まだ疾患又は障害の影響を受けていない、或いは疾患又は障害の症状をまだ示していない対象、例えばまだ感染していない、又は感染の症状をまだ示していない対象に化合物又は組成物を使用することを指す。

【0027】

任意の疾患又は障害を「治療すること」又はその「治療」は、一実施態様において、対象に存在する疾患又は障害を改善する(即ち、疾患又はその臨床的症状の少なくとも1つの発生を抑制又は低減する)ことを指す。別の実施態様において、「治療すること」又は「治療」は、対象によって識別不可能であり得る少なくとも1つの物理的パラメータを改善することを指す。さらに別の実施態様において、「治療すること」又は「治療」は、物理的(例えば、識別可能な症状の安定化)又は生理的(例えば、物理的パラメータの安定化)或いはその両方で疾患又は障害を変調することを指す。さらに別の実施態様において、「治療すること」又は「治療」は、疾患又は障害の発症を遅らせることを指す。

【0028】

「有効量」という用語は、疾患を治療する対象に投与する場合に、当該疾患の治療を行うのに十分なエンテロスタチン又はエンテロスタチンを含む組成物の量を意味する。有効量は、なかでも、使用されるエンテロスタチン、疾患及びその重症度、並びに治療される対象の年齢、体重等に応じて異なり得る。

【0029】

「肥満」という用語は、特に脂肪組織の重量及び体質量が現在許容されている標準を超える対象を指す。いくつかの実施態様において、肥満度指数(「BMI」)が現在許容されている標準を超える対象は、肥満である。BMIは、体重(キログラム)を身長(メートル)の平方で割ることによって求められる。対象がヒトである場合は、「正常」として認められる男性及び女性の双方についての現在の標準は、20~24.9kg/m<sup>2</sup>のBMIである。当該実施態様において、肥満の対象は、BMIが30kg/m<sup>2</sup>以上である。いくつかの実施態様において、肥満の対象は、BMIが40kg/m<sup>2</sup>以上である。他の実施態様において、対象は、その年齢及び身長に対する正常な体重の120%を超える体重である場合に肥満である。正常な体重は、身長、体格、骨格及び性別に基づいて、種及び個体間で異なる。

「過体重」という用語は、対象における中程度に過剰の脂肪を指す。いくつかの実施態

10

20

30

40

50

様において、対象がヒトである場合は、過体重の対象は、BMIが25kg/m<sup>2</sup>以上である。肥満度指数(BMI)は、体重(キログラム)を身長(メートル)の平方で割ることによって求められる。

【0030】

20種の遺伝子コード化L-アミノ酸について本明細書に用いられているアミノ酸表記法は、従来のであり、以下の通りである。

【表1】

アミノ酸	一文字略語	三文字略語	
アラニン	A	Ala	
アルギニン	R	Arg	
アスパラギン	N	Asn	
アスパラギン酸	D	Asp	
システイン	C	Cys	
グルタミン	Q	Gln	
グルタミン酸	E	Glu	
グリシン	G	Gly	20
ヒスチジン	H	His	
イソロイシン	I	Ile	
ロイシン	L	Leu	
リシン	K	Lys	
メチオニン	M	Met	
フェニルアラニン	F	Phe	
プロリン	P	Pro	
セリン	S	Ser	
トレオニン	T	Thr	30
トリプトファン	W	Trp	
チロシン	Y	Tyr	
バリン	V	Val	

【0031】

特に指定されているものを除いて、本明細書に用いられている三文字アミノ酸略語は、L-配置のアミノ酸を指す。D-配置のアミノ酸には「D-」を前置きする。例えば、Argは、L-アルギニンを指し、D-Argは、D-アルギニンを指す。同様に、大文字の一文字略語は、L-配置のアミノ酸を指す。小文字の一文字略語は、D-配置のアミノ酸を指す。例えば、「R」は、L-アルギニンを指し、「r」は、D-アルギニンを指す。他に指定がなければ、ペプチド又はポリペプチド配列が、一連の一文字及び/又は三文字略語として示される場合は、該配列は、慣例に従ってN-末端からC-末端の方向で示される。

好ましい実施態様において、本明細書の任意のペプチド又はアミノ酸は、特に指定がなければ、L型である。

【0032】

(4.2. 治療又は予防方法)

本発明は、エンテロスタチン欠乏の治療を必要とする対象におけるエンテロスタチン欠乏を治療する方法を提供する。ある実施態様において、該方法は、エンテロスタチン欠乏の対象に対して、該欠乏を治療するのに有効な量のエンテロスタチンを投与するステップ

を含む。対象がエンテロスタチン欠乏であるかどうかを当業者に利用可能な任意の方法によって判断することができる。ある実施態様において、対象が、コントロール対象量より低量のエンテロスタチンを示す、又は分泌する場合にその対象はエンテロスタチン欠乏である。代表的な方法を本明細書に記載する。

【0033】

本発明は、エンテロスタチン欠乏の対象におけるエンテロスタチン欠乏に関連する障害又は状態を治療又は予防する方法をさらに提供する。該方法は、エンテロスタチン欠乏の対象に対して、該障害又は状態を治療又は予防するのに有効な量のエンテロスタチンを投与するステップを含む。

エンテロスタチン欠乏に関連する代表的な障害又は状態としては、過体重、肥満、代謝障害、高血圧症、脂質関連障害及びII型糖尿病が挙げられるが、それらに限定されない。

【0034】

ある実施態様において、エンテロスタチン欠乏に関連する障害又は状態は、過体重である。別の実施態様において、エンテロスタチン欠乏に関連する障害又は状態は、肥満である。ある実施態様において、エンテロスタチン欠乏に関連する障害又は状態は、代謝障害である。ある実施態様において、エンテロスタチン欠乏に関連する障害又は状態は、脂質関連障害である。ある実施態様において、エンテロスタチン欠乏に関連する障害又は状態は、II型糖尿病である。ある実施態様において、エンテロスタチン欠乏に関連する障害又は状態は、高血圧症である。

【0035】

一態様において、本発明は、食欲の減少を必要とするエンテロスタチン欠乏の対象における、食欲を減少させる方法を提供する。該方法は、エンテロスタチン欠乏の対象に対して、食欲を抑えるのに有効な量のエンテロスタチンを投与するステップを含む。

別の態様において、本発明は、食物摂取量の減少を必要とするエンテロスタチン欠乏の対象における、食物摂取量を減少させる方法を提供する。該方法は、エンテロスタチン欠乏の対象に対して、食物摂取量を減少させるのに有効な量のエンテロスタチンを投与するステップを含む。

【0036】

別の態様において、本発明は、脂肪摂取量の減少を必要とするエンテロスタチン欠乏の対象における、脂肪摂取量を減少させる方法を提供する。該方法は、エンテロスタチン欠乏の対象に対して、脂肪摂取量を減少させるのに有効な量のエンテロスタチンを投与するステップを含む。

別の態様において、本発明は、体重の減少又は体重減少を促すことを必要とするエンテロスタチン欠乏の対象における、体重を減少させる、又は体重減少を促す方法を提供する。該方法は、エンテロスタチン欠乏の対象に対して、体重を減少させる、又は体重減少を促すのに有効な量のエンテロスタチンを投与するステップを含む。「体重減少」という用語は、以前の対象の質量と比較して、検出可能な対象の体質量の減少を指す。

【0037】

別の態様において、本発明は、体脂肪の減少を必要とする対象における、体脂肪を減少させる方法を提供する。該方法は、エンテロスタチン欠乏の対象に対して、体脂肪を減少させるのに有効な量のエンテロスタチンを投与するステップを含む。

別の態様において、本発明は、異常糖値の治療を必要とする対象における、異常糖値を治療する方法を提供する。該方法は、エンテロスタチン欠乏の対象に対して、異常糖値を治療するのに有効な量のエンテロスタチンを投与するステップを含む。

【0038】

エンテロスタチンは、体重減少を誘発し、体脂肪を減少させ、食欲に影響を与え、食物摂取量、特に脂肪摂取量を減少させることができることが報告されている(Erlanson-Albertssonらの論文、1997、Obesity Research 5:4、360-372も参照のこと)。したがって、本発明は、また、食物摂取及び体重抑制に関連する様々な状態又は疾患を治療又は予防する方法を提供する。

10

20

30

40

50

## 【0039】

## (4.2.1対象)

本発明のある実施態様において、対象は、動物、好ましくは哺乳類、より好ましくはヒト以外の霊長類である。最も好ましい実施態様において、対象はヒトである。対象は、雄又は雌の対象であり得る。

任意の対象においてエンテロスタチンによる治療の対象を選択するのに本発明の方法を用いることができる。特に有用な対象としては、エンテロスタチン欠乏の対象が挙げられる。対象がエンテロスタチン欠乏であるかどうかを当業者に利用可能な任意の方法によって判断することができる。代表的な方法を以下に説明する。

## 【0040】

ある実施態様において、対象は、過体重、肥満、代謝障害、高血圧症、脂質関連障害及びII型糖尿病を含むが、それらに限定されないエンテロスタチン欠乏に関連する障害又は状態の危険性を有する。いくつかの実施態様において、対象は、過体重又は肥満の危険性を有する。いくつかの実施態様において、対象は、代謝障害の危険性を有する。いくつかの実施態様において、対象は、高血圧症の危険性を有する。いくつかの実施態様において、対象は、脂質関連障害の危険性を有する。いくつかの実施態様において、対象は、II型糖尿病の危険性を有する。

## 【0041】

ある実施態様において、対象は健康でない。いくつかの実施態様において、対象は、糖尿病、胃腸疾患及び/又は心臓血管疾患を有する。いくつかの実施態様において、対象は、過体重、肥満、代謝障害、高血圧症、脂質関連障害及びII型糖尿病を含むが、それらに限定されないエンテロスタチン欠乏に関連する障害又は状態を有する、又はそれらにかかっている。いくつかの実施態様において、対象は、代謝障害を有する。いくつかの実施態様において、対象は、高血圧症を有する。いくつかの実施態様において、対象は、脂質関連障害を有する。いくつかの実施態様において、対象は、II型糖尿病を有する。いくつかの実施態様において、対象は、異常糖値を有する。

## 【0042】

いくつかの実施態様において、対象は過体重である。特定の実施態様において、対象は、ヒトであり、BMIが $25\text{kg}/\text{m}^2$ 以上である。いくつかの実施態様において、対象は、ヒトであり、BMIが $25\text{kg}/\text{m}^2$ から $30\text{kg}/\text{m}^2$ である。いくつかの実施態様において、対象は肥満である。いくつかの実施態様において、対象は、ヒトであり、BMIが $30\text{kg}/\text{m}^2$ 以上である。いくつかの実施態様において、対象は、ヒトであり、BMIが $30\text{kg}/\text{m}^2$ から $35\text{kg}/\text{m}^2$ である。いくつかの実施態様において、対象は、ヒトであり、BMIが $35\text{kg}/\text{m}^2$ 以上である。いくつかの実施態様において、対象は、ヒトであり、BMIが $40\text{kg}/\text{m}^2$ 以上である。いくつかの実施態様において、対象は、体重がその年齢及び身長に対して正常な体重の120%を超える。いくつかの実施態様において、対象は、ヒトであり、体重が96kgを超える。

## 【0043】

いくつかの実施態様において、対象は、ヒトであり、胴囲が1.02mを超える。いくつかの実施態様において、対象は、ヒトであり、腰囲が1.06mを超える。いくつかの実施態様において、対象は、ヒトであり、胴囲:腰囲比が0.98を超える。いくつかの実施態様において、対象は、ヒトであり、40.9%を超える体脂肪を有する。

## 【0044】

いくつかの実施態様において、対象は、正常な体重範囲内にある。本発明の文脈において、正常な体重の対象としては、当業者の判断による何らかの理由によって、エンテロスタチンによる治療を必要とする対象が含まれる。いくつかの実施態様において、対象は、ヒトであり、BMIが $25\text{kg}/\text{m}^2$ 以下である。いくつかの実施態様において、対象は、ヒトであり、BMIが $22\text{kg}/\text{m}^2$ 以下である。いくつかの実施態様において、対象は、ヒトであり、BMIが約 $20\text{kg}/\text{m}^2$ から約 $25\text{kg}/\text{m}^2$ である。いくつかの実施態様において、対象は、ヒトであり、BMIが $20\text{kg}/\text{m}^2$ 以下である。当該対象は、例えば、過食症のような状態により、該対象の重量を維持しながらエンテロスタチン欠乏を有し得る。

10

20

30

40

50

## 【0045】

いくつかの実施態様において、対象は、エンテロスタチン欠乏に関連する障害又は状態に対する何らかの治療をこれまで受けたことがない。他の実施態様において、対象は、エンテロスタチン欠乏に関連する1つ以上の障害又は状態に対する治療をこれまで受けたことがあるか、或いは現在受けている。ある実施態様において、対象は、当該障害又は状態に対するエンテロスタチンによる治療をこれまで受けたことがあるか、或いは現在受けている。ある実施態様において、対象は、エンテロスタチン以外の治療をこれまで受けたことがあるか、或いは現在受けている。

## 【0046】

いくつかの実施態様において、対象は、異常糖値を有する。特定の実施態様において、対象は、高血糖値を有する。いくつかの実施態様において、対象は糖尿病である。ある実施態様において、対象はII型糖尿病である。他の実施態様において、対象は、糖尿病ではない。

10

いくつかの実施態様において、対象は、21歳未満である。いくつかの実施態様において、対象は、15歳未満である。他の実施態様において、対象は、49歳を超えている。いくつかの実施態様において、対象は、15、25、35、40、45、50、55又は65歳を超えている。

いくつかの実施態様において、対象は、規則的に運動する。他の実施態様において、対象は、規則的に運動しない。

## 【0047】

## (4.3. エンテロスタチンによる治療の対象を選択する方法)

20

本発明は、一部に、エンテロスタチン治療に応答する対象、及びエンドスタチンの内生レベルが欠乏している対象を含むエンテロスタチン治療に応答する対象において、エンテロスタチンによる肥満及び関連疾患の治療が有効であり得るという発見に基づく。

## 【0048】

## (4.3.1 エンテロスタチンのレベルの測定)

対象中のエンテロスタチンの内生レベルを当業者に利用可能な任意の方法によって測定することができる。それを直接又は間接的に測定することができる。いくつかの実施態様において、それは、対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量を測定することによって測定される。他の実施態様において、それは、対象からのサンプル中のエンテロスタチンの前駆体であるプロコリパーゼの活性を測定することによって測定される。

30

## 【0049】

本発明のある実施態様において、エンテロスタチンの量を測定する方法は、重要でない。よって、本発明は、対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量に基づいて、対象が治療に好適であるかどうかを判断する単一のステップを含む、エンテロスタチンによる治療の対象を選択するための方法を提供する。

エンテロスタチンの量は、本発明の方法の実施者が何らかの方法で測定することができる。代表的な技術を本明細書に記載する。

## 【0050】

エンテロスタチンの量を、例として、限定することなく、血液サンプル、血漿サンプル、唾液サンプル、血清サンプル、痰サンプル、尿サンプル、便サンプル、細胞サンプル、細胞抽出物サンプル、組織生検サンプル、又は当業者によく知られている技術を用いて対象から得ることができる任意のサンプルであり得る、対象の任意のサンプルから測定することができる。対象から採取される厳密なサンプルは、異なり得るが、サンプリングは、好ましくは侵襲性が最小限であり、従来技術によって容易に行われる。

40

例えば、使用されるサンプル及び測定技術の種類に基づき、当業者の判断に従ってサンプルを処理又は精製することができる。特に有用な処理ステップは、析出、遠心分離、濾過及び/又はクロマトグラフィーである。

## 【0051】

ある実施態様において、エンテロスタチンを抽出及び精製するために、例えば、その内容が全面的に参照により本明細書に組み込まれているPrasadらの論文、1999、J.Clin.End

50

ocrinol.Metab.84:937-941に記載されているように血液サンプルを処理することができる。例えば、5mlの血液を対象から採取することができる。血液サンプルを遠心分離し、エンテロスタチンの分析のために処理することができる。血液サンプルをエンテロスタチンについて検査するまで-70 で凍結保存することができる。エンテロスタチンを抽出するために、血液サンプルを容量比1:9でメタノールと混合することができる。混合物を30~60分間にわたって氷上で保存し、次いで4 で10分間にわたって11,000gで遠心分離することができる。透明な上清を凍結乾燥して乾固させ、ELISA又はクロマトグラフィーに向けて適切に再構成することができる。

#### 【0052】

ある実施態様において、エンテロスタチンを抽出及び精製するために、例えば、その内容が全面的に参照により組み込まれているBowyerらの論文、1993、Gut、34:1520-1525に記載されているように尿サンプルを処理することができる。例えば、10mlの尿サンプルを対象から採取することができる。尿サンプルを20mMの酢酸亜鉛と混合することができる。保管中のエンテロスタチン免疫活性の低下を最小限にするために、各尿サンプルを3000gで20分間遠心分離し、上清を煮沸浴で10分間懸濁させ、10,000gで5分間遠心分離し、上清を分割し、アッセイするまで-20 で保管することができる。

#### 【0053】

抽出したエンテロスタチンを分析するために、保管された尿又は血液サンプルのアリコットを室温で解凍し、十分に旋回混合し、10,000gで5分間遠心分離し、上清を検査することができる。セファデックスG-25(50×1.0cm;39.3ml;球状タンパク質の分画範囲1~5kDa)カラムを使用して、ゲル濾過クロマトグラフィーを実施することができる。最小容量の蒸留水で再構成された凍結乾燥メタノール抽出サンプルを、緩衝液A(10mmol/l NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)で平衡化したカラムに充填することができる。

#### 【0054】

##### (4.3.1.1.エンテロスタチンの量の測定)

対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量を、限定することなく当業者に知られているあらゆる方法によって測定することができる。例えば、それを分光光度法、クロマトグラフィー、免疫アッセイ法又は電気泳動によって測定することができる。いくつかの実施態様において、エンテロスタチンの量は、免疫アッセイ法によって測定される。いくつかの好ましい実施態様において、エンテロスタチンの量は、その内容が全面的に参照により組み込まれているImamuraらの論文、1998、Peptides、19:8、1385-1391;Bowyerらの論文、1991、Clinica.Chimica.Acta.200:137-152(APGPRについて);Mizumaらの論文、1995、Biochemical & Biophysical Research Communications 1995、215(1):227-234(VDPDRについて)に記載されているようなELISAによって測定される。他の好ましい実施態様において、エンテロスタチンの量は、その内容が全面的に参照により組み込まれているZhaoらの論文、2001、Fresenius J.Anal.Chem.、269:220-224に記載されているような毛管ゲル電気泳動(「CGE」)によって測定される。

#### 【0055】

サンプルに存在するペプチド又は対象となるペプチドの量を測定するための標準的な技術を、サンプルにおけるエンテロスタチンの量を測定するのに利用することができる。例えば、ウェスタンブロット、硫酸ドデシルナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を伴う免疫アッセイ法、及び免疫細胞化学等のような免疫検定法を用いて、サンプルにおけるタンパク質又は対象となるタンパク質の量を測定する標準的な技術を採用することができる。対象となるタンパク質を検出するための1つの代表的な薬剤は、対象となるタンパク質に特異的に結合することが可能な抗体、好ましくは、直接又は間接的に検出可能に標識された抗体である。

#### 【0056】

当該検出法では、要望に応じて、当業者によく知られている技術を用いてサンプルからエンテロスタチンを容易に単離することができる。それらの方法は、例えば、全面的に参照により本明細書に組み込まれているHarlow及びLane、1988、「抗体:実験室マニュアル(

Antibodies:A Laboratory Manual)」、Cold Spring Harbor Laboratory Press(Cold Spring Harbor、New York)に記載されているようなものであり得る。

【 0 0 5 7 】

ある実施態様において、サンプル中のエンテロスタチンの量についての方法は、エンテロスタチンに特異的な抗体との相互作用を介する検出を含む。当業者によく知られている標準的な技術を利用して抗体を生成することができる。具体的な実施態様において、抗体は、ポリクローナル、又はより好ましくはモノクローナルであり得る。例えば、無処置の抗体又は抗体断片(例えばscFv、Fab又はF(ab')<sub>2</sub>)を使用することができる。代表的な免疫アッセイ法を以下に説明する。

【 0 0 5 8 】

いくつかの実施態様において、プロテインチップアッセイ(例えば、Zhu & Snyder、2003、Curr.Opin.Chem.Biol.7:55-63;Mitchell、2002、Nature Biotechnology 20:225-229参照)を用いて、生物マーカープロファイルにおける生物マーカーに対する量を測定する(また、例えば、全面的に参照により本明細書に組み込まれているLin、2004、Modern Pathology、1-9;Li、2004、Journal of Urology 171、1782-1787;Wadsworth、2004、Clinical Cancer Research、10、1625-1632;Prieto、2003、Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 26、2315-2328;Coombes、2003、Clinical Chemistry 49、1615-1623;Mian、2003、Proteomics 3、1725-1737;Lehreらの論文、2003、BJU International 92、223-225;及びDiamond、2003、Journal of the American Society for Mass Spectrometry 14、760-765参照)。本発明のある実施態様において特に有用なのは、MALDI又はSELDIによる検出を容易にする抗体チップである(例えば、内容が全面的に参照により本明細書に組み込まれているWangらの論文、2001、Int'l.J.of Cancer 92:871-876;Figeys、2002、Proteomics 2:373-382;Sonksenらの論文、1998、Anal.Chem.70:2731-6;Glokler、& Angenendt、2003、J.Chromatography B、797:229-240参照)。

【 0 0 5 9 】

ある実施態様において、エンテロスタチンに特異的な抗体又は抗体の断片を使用して、サンプル中のエンテロスタチンの量を測定することができる。これを例えば免疫蛍光技術によって遂行することができる。また、エンテロスタチンのインサイチュ測定のために、免疫蛍光又は免疫電子顕微鏡法のように、抗体(又はその断片)を組織学的に採用することができる。

【 0 0 6 0 】

免疫アッセイ法は、典型的には、エンテロスタチンを識別することが可能な検出可能に標識された抗体のサンプルをインキュベートし、当該技術分野でよく知られているいくつかの技術のいずれかによって結合抗体を検出することを含む。代表的な免疫アッセイ法は、サンプルにおけるペプチドの量を測定するためのウェスタンブロット、硫酸ドデシルナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を伴う免疫沈降法、及び免疫細胞化学等である。

【 0 0 6 1 】

エンテロスタチンに特異的な抗体を検出可能に標識できる方法の1つは、それを酵素に結合し、酵素免疫アッセイ法(EIA)に使用することである(それぞれ全面的に参照により本明細書に組み込まれているVoller、1978、「酵素結合免疫吸着アッセイ(The Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA))」、Diagnostic Horizons 2:1-7、Microbiological Associates Quarterly Publication、Walkersville、MD;Vollerらの論文、1978、J.Clin.Pat hol.31:507-520;Butler、J.E.、1981、Meth.Enzymol.73:482-523;Maggio、E.(編)、1980、「酵素免疫アッセイ(Enzyme Immunoassay)」、CRC Press、Boca Raton、FL;Ishikawa、E.らの論文(編)、1981、「酵素免疫アッセイ(Enzyme Immunoassay)」、Kgakusha、Tokyo)。抗体に結合した酵素は、例えば、分光光度的手段、蛍光定量的手段又は視覚的手段によって検出できる化学成分を生成するように適切な基質、好ましくは色素産性基質と反応する。抗体を検出可能に標識するのに使用できる酵素としては、リンゴ酸脱水素酵素、ブドウ球菌性核酸分解酵素、デルタ-5-ステロイド異性化酵素、酵母アルコール脱水素酵素

10

20

30

40

50

、アルファ-グリセロホスフェート、脱水素酵素、トリオースリン酸異性化酵素、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、リボ核酸分解酵素、尿素分解酵素、カタラーゼ、グルコール-6-リン酸脱水素酵素、グルコアミラーゼ及びアセチルコリンエステラーゼが挙げられるが、それらに限定されない。酵素に対する色素産性基質を採用する比色法によって検出を遂行することができる。基質の酵素反応の程度を同様の調製標準と視覚的に比較することによって検出を遂行することもできる。

#### 【0062】

様々な他の免疫アッセイ法のいずれかを用いて測定を遂行することもできる。例えば、抗体又は抗体断片を放射性標識することによって、放射性免疫アッセイ法(RIA)の使用を通じて生物マーカーを検出することが可能である(例えば、参照により本明細書に組み込まれているWeintraub,B.、「ラジオイムノアッセイの原理、放射性リガンドアッセイ手法に関する第7回トレーニングコース(Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques)」、The Endocrine Society, March, 1986)。ガンマカウンタ若しくはシンチレーションカウンタを使用する等の手段又はオートラジオグラフィーによって放射性同位体(例えば、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 又は $^3\text{H}$ )を検出することができる。

10

#### 【0063】

抗体を蛍光化合物で標識することも可能である。蛍光標識された抗体を適切な波長の光に露光すると、その存在を蛍光により検出することができる。最も広く使用されている蛍光標識化合物には、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリスリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、*o*-フタルデヒド及びフルオレサミンがある。

20

$^{152}\text{Eu}$ 又はランタンニド族の他の金属のような蛍光発光金属を使用して、抗体を検出可能に標識することもできる。ジエチレントリアミンペンタ酢酸(DTPA)又はエチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)のような金属キレート化基を使用して、これらの金属を抗体に結合させることができる。

#### 【0064】

抗体を化学発光化合物に結合させることによって検出可能に標識することもできる。次いで、化学反応の過程を通じて発生する発光の存在を検出することによって、化学発光タグ付け抗体の存在を確認する。特に有用な化学発光標識化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、セロマティックアクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩及びシュー酸エステルである。

30

#### 【0065】

同様に、生物発光化合物を使用して、本発明の抗体を標識することができる。生物発光は、触媒タンパク質が化学発光反応の効率を高める生態系に見いだされる化学発光の一種である。生物発光タンパク質の存在は、発光の存在を検出することによって確認される。標識を目的とした重要な生物発光化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼ及びエクオリンである。

#### 【0066】

例えば、以下に記載する方法の1つ以上を用いることによって、エンテロスタチンの量を測定することもできる。例えば、方法としては、核磁気共鳴(NMR)分光光度法、エレクトロスプレーイオン化質量分析法(ESI-MS)、ESI-MS/MS、ESI-MS/(MS)<sup>n</sup>(nは、0より大きい整数)、マトリックス補助レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析法(MALDI-TOF-MS)、表面励起レーザー脱離/イオン化飛行時間質量分析法(SELDI-TOF-MS)、シリコンによる脱離/イオン化(DIOS)、二次イオン質量分析法(SIMS)、四極飛行時間(Q-TOF)、大気圧化学イオン化質量分析法(APCI-MS)、APCI-MS/MS、APCI-(MS)<sup>n</sup>、大気圧光イオン化質量分析法(APPI-MS)、APPI-MS/MS及びAPPI-(MS)<sup>n</sup>のような質量分析法を挙げることができる。他の質量分析法としては、とりわけ四極、フーリエ変換質量分析法(FTMS)及びイオントラップを挙げることができる。他の好適な方法としては、化学抽出分割、カラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性(逆相)液体クロマトグラフィー、等電点集束法、一次

40

50

元ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)、二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動(2D-PAGE)、又は薄層、ガス若しくは液体クロマトグラフィーのような他のクロマトグラフィー、或いはそれらの組合せを挙げることができる。一実施態様において、生体サンプルを分離法の適用前に分割することができる。

【0067】

一実施態様において、レーザ脱離/イオン化飛行時間質量分析法は、入射レーザ放射によってイオン化され、固定化支持体から蒸発された分子である生物マーカーの量を測定するのに用いられる。様々なレーザ脱離/イオン化技術が、当該技術分野で知られている(例えば、参照により本明細書に組み込まれているGuttmanらの論文、2001、Anal.Chem.73:1252-62及びWeiらの論文、1999、Nature 399:243-246参照)。

10

【0068】

レーザ脱離/イオン化飛行時間質量分析法は、比較的短時間で大量の情報を生成することを可能にする。生体サンプルを、サンプルにおけるすべての生物マーカー又はその部分集合体を結合させる数種類の支持体の1つに適用する。細胞可溶化物又はサンプルを、予め精製又は分画し、又は予め精製又は分画せずになぜか0.5 $\mu$ L程度の容量でこれらの表面に直接適用する。該可溶化物又はサンプルを支持体表面に適用する前に濃縮又は希釈することができる。次いで、レーザ脱離/イオン化を用いて、わずか3時間でサンプル(複数も可)の質量スペクトルを生成する。

【0069】

液体クロマトグラフィー-質量分析による分析は、そのピークがサンプルの様々な成分を表し、各成分が特徴的な質量対電荷比(m/z)及び保持時間(r.t.)を有する質量強度スペクトルを生じる。生物マーカーのそのm/z及び保持時間を有するピークの存在は、マーカーが存在することを示す。マーカーを表すピークを他のスペクトル(例えばコントロールサンプルからの)の対応するピークと比較して、相対的測定値を得ることができる。定量的測定値が望まれる場合は、当該技術分野における任意の正規化技術(例えば内部標準)を用いることができる。加えて、重複ピークを分離するのに逆重畳積分ソフトウェアが利用可能である。保持時間は、液体クロマトグラフィー分離を行うのに採用される条件にある程度依存する。

20

【0070】

MALDI質量分析法(MALDI-MS)では、様々な分析装置、例えば、シングル又はトリプル四重極型(MS/MS)の磁気セクター/磁気偏向装置、フーリエ変換、及び直交飛行時間(O-TOF)を含む飛行時間(TOF)、質量分析の技術分野で知られている構造を使用することができる。脱離/イオン化法では、多くのマトリックス/レーザの組合せを使用することができる。イオントラップ及び反射構造を採用することもできる。

30

【0071】

エレクトロスプレーイオン化質量分析法(ESI-MS)は、タンパク質、核酸及び炭水化物を含む巨大分子の分析に広く適用可能である(Fennらの論文、1989、Science 246:64-71;Crainらの論文、1998、Curr.Opin.Biotechnol.9:25-34;Smithらの論文、1990、Anal.Chem.62:882-99;Han & Gross、1994、Proc Natl Acad Sci USA 91:10635-10639)。式I及び式Iaのような生物マーカーを分離及び測定するのにエレクトロスプレー技術が使用された(その内容が全面的に参照により本明細書に組み込まれているPetkovicらの論文、2001、Anal Biochem.289(2):202-16;Pulfer & Murphy、2003、Mass Spec Rev 22:332-364;Han & Gross、1995、J.Amer.Soc.Mass Spec.6:1202-1210参照)。

40

【0072】

タンパク質又はペプチドについては、例えば、Vorm, O.らの論文、Anal.Chem.66:3281-3287(1994);及びVorm and Mann、J.Am.Soc.Mass.Spectrom.5:955-958(1994)に当該分子の質量スペクトル分析に関するさらなるガイダンスが示されており、該文献は、全面的に参照により組み込まれている。これらの出版物の内容は、全面的に参照により本明細書に組み込まれている。

【0073】

50

#### (4.3.1.2. プロコリパーゼの活性の測定)

エンテロスタチンの内生レベルの直接的な測定に加えて、プロコリパーゼ又はその開裂生成物のコリパーゼの活性からもエンテロスタチンのレベルを測定できることを当業者なら理解するであろう。

エンテロスタチンの親分子であるプロコリパーゼは、膵液に分泌されるまでは不活性である。膵液にトリプシンが存在すると、プロコリパーゼが開裂して、活性コリパーゼ及びアミノ末端ペプチド、即ちエンテロスタチンを形成する。コリパーゼの役割は、リパーゼに結合して、膵臓リパーゼを活性化することである(Erlanson-Albertssonらの論文、1997、Obesity Research 5:4、360-372参照)。プロコリパーゼの活性を対象におけるエンテロスタチンのレベルの指標として利用することができる。

10

##### 【0074】

プロコリパーゼ活性を当業者に知られている任意の方法によって測定することができる。例えば、その内容が全面的に参照により組み込まれているErlanson-Albertssonらの論文、1987、Regul. Pept. 22:325-331; Okadaらの論文、1992、Am. J. Physiol. 262(6 pt 2):R1111-16に記載されているように十二指腸含有率で測定することができる。

##### 【0075】

#### (4.3.2 エンテロスタチンによる治療の対象の選択)

ある実施態様において、エンテロスタチンのレベルが低い対象又はエンテロスタチン欠乏の対象を治療の対象に選択する。対象は、対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量が、正常なエンテロスタチン値より低い場合に治療の対象に選択される。いくつかの実施態様において、当該技術分野で利用可能な技術を用いて検出可能なエンテロスタチンの量を示さない、又は分泌しない対象が選択される。他の実施態様において、エンテロスタチンをまったく示さない、又は分泌しない対象が選択される。好ましい実施態様において、対象は、高脂肪の食事後にコントロール対象より低量のエンテロスタチンを示す、又は分泌する場合に選択される。対象におけるエンテロスタチンのレベルが低いのは、当該技術分野で知られている何らかの原因の可能性がある。例えば、エンテロスタチンの発現又は分泌のレベルが低いこと、或いは腸又は胃におけるプロコリパーゼのトリプシン活性が不十分であることに起因し得る。また、例えばペプチダーゼジペプチジルペプチダーゼIV (DPPIV) のような、エンテロスタチンを加水分解することができる過剰のプロテアーゼ活性のような過剰のタンパク質分解活性の結果であり得る。

20

30

##### 【0076】

ある実施態様において、対象のサンプル中のエンテロスタチンの量及び正常なエンテロスタチン値に基づいて選択することができる。正常なエンテロスタチン値を以下のセクションに記載する。いくつかの実施態様において、試験対象におけるエンテロスタチンの量が正常なエンテロスタチン値を下回る、又は実質的に下回る場合は、試験対象をエンテロスタチンによる治療の対象に選択する。いくつかの実施態様において、対象は、対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量が、正常なエンテロスタチン値未満である場合に選択される。他の実施態様において、対象は、対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量が、正常なエンテロスタチン値の95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、2%又は1%未満である場合に選択される。

40

##### 【0077】

ある実施態様において、単一時点に対象から採取した1つ以上のサンプルを使用して、選択を行う。いくつかの実施態様において、単一時点に単一サンプルのみを採取する。他の実施態様において、単一時点に対象から複数のサンプルを採取する。複数のサンプルは同一又は異なるサンプル種であり得る。特定の実施態様において、血液サンプル及び尿サンプルの両方を対象から採取して、選択を行う。複数の同一種のサンプルを使用する場合は、ANOVA又はカイ二乗試験のような当業者に知られている任意の統計技術に基づいて評価を行うことができる。

##### 【0078】

50

単一時点のサンプルを使用する場合は、対象が一晩絶食したとき、対象が摂食したとき、又は対象が摂食してから約0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5若しくは4.0時間後にサンプルを対象から得ることができる。いくつかの実施態様において、対象は、高脂肪食又は正規食を摂食する。いくつかの実施態様において、高脂肪食は、約600、700、800、900、1000、1100又は1200カロリーを含む。いくつかの実施態様において、高脂肪食は、約35、45、50、55、60又は65%のエネルギーを脂肪として含む。一実施態様において、高脂肪食は、約800カロリー及び約45%のエネルギーを脂肪として含む。

#### 【0079】

ある実施態様において、異なる時点に対象から採取した複数のサンプルを使用して、選択を行う。それらの時点当業者の判断に応じて分割することができる。いくつかの実施態様において、これらのサンプルを1日1回、或いはより高頻度で、例えば4、6、8又は12時間毎に対象から得る。

いくつかの実施態様において、異なる時点で採取した複数のサンプルは、反復測定を目的とする。当該実施態様において、ANOVA又はカイ二乗試験のような当業者に知られている任意の統計技術に基づいて評価を行うことができる。好ましくは、当業者の判断に応じて、対象が同一又は類似の摂食条件下にあるときにサンプルを対象から採取する。いくつかの実施態様において、対象が一晩絶食したときにすべてのサンプルを採取する。いくつかの実施態様において、対象が摂食したときにすべてのサンプルを採取する。いくつかの実施態様において、対象が摂食してからほぼ特定時間後にすべてのサンプルを採取する。特定の実施態様において、対象が高脂肪食を摂食してから約0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5又は4.0時間後にすべてのサンプルを採取する。

#### 【0080】

他の実施態様において、異なる時点に対象から採取された複数のサンプル及びエンテロスタチンの量の変化又は無変化を評価して、選択を行う。肥満の対象は、エンテロスタチンの内生レベルが低下しているばかりでなく、食事に誘発されるエンテロスタチンの増加が損なわれていることが報告されている(Prasadらの論文、1999、J.Clin.Endocrinol.Metab.84(3):947-941参照)。肥満における食事に誘発されるエンテロスタチンの分泌の減少は、満腹感の遅れを示唆し、カロリー摂取の増加をもたらす。よって、エンテロスタチンの量の摂食:絶食比を測定し、それを用いて、エンテロスタチンによる治療の対象を選択することができる。

#### 【0081】

ある実施態様において、対象が一晩絶食したとき、対象が摂食したとき、或いは対象が正規食又は高脂肪食を摂食してから1、2若しくは3時間にわたってサンプルを採取し、対象からのエンテロスタチンの量の摂食:絶食比を計算する。好ましい実施態様において、対象が高脂肪食を摂食してから3時間にわたってサンプルを採取する。ある実施態様において、エンテロスタチンレベルを食事後1、2又は3時間にわたって連続的に測定する。いくつかの実施態様において、対象は、絶食:摂食比が、正常なエンテロスタチン絶食:摂食比と比較して低下した場合に選択される。別の実施態様において、対象は、絶食:摂食比が、正常なエンテロスタチン絶食:摂食比の95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、2%又は1%未満である場合に選択される。エンテロスタチンの正常な摂食:絶食比を以下に記載する。

#### 【0082】

エンテロスタチンのレベルに加えて、他のパラメータ又は変数をエンテロスタチンのレベルと併用して、エンテロスタチンによる治療の対象を選択することができる。いくつかの実施態様において、対象の血糖値を用いる。他の実施態様において、対象の体重又はBMIを用いて、選択を行う。さらに対象をエンテロスタチンによる治療の対象に選択するかどうかは、例えば、血液試験、心電図、空腹時化学パネル、CBC、血圧、脈拍数、検尿、及びエンテロスタチンのレベルと組み合わせた対象の有害事象に基づいて、当業者の判断によるものであってもよい。

#### 【0083】

10

20

30

40

50

#### (4.3.3. 正常なエンテロスタチン値及び正常なエンテロスタチン摂食: 絶食比)

正常なエンテロスタチン値は、例えば、コントロール対象又は複数のコントロール対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量であり得る。コントロール対象又は複数のコントロール対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量を、本明細書に記載されているものを含む当業者に知られている技術によって測定することができる。有利には、ある実施態様において、コントロール対象におけるエンテロスタチンの量及び試験対象におけるエンテロスタチンの量を同一の技術によって得る。正常なエンテロスタチン値は、特定のアッセイ法、サンプルの種類及び無細胞抽出物の種類毎に異なり得ることを当業者なら理解するであろう。正常なエンテロスタチン値は、選択される対象の異なる種又は性別に応じて異なり得ることを当業者なら理解するであろう。例えば、正常なエンテロスタチン値は、同一種の雄の対象の方が雌の対象より高くなる可能性がある。よって、好ましい実施態様において、雌の対象のエンテロスタチンレベルを雌の対象について期待されるレベルと比較し、雄の対象のエンテロスタチンレベルを雄の対象について期待されるレベルと比較する。

10

##### 【0084】

コントロール対象は、痩せ形の対象又は正常な体重の対象であり得る。対象がヒトである場合は、コントロール対象は、 $20 \sim 25 \text{kg/m}^2$ の正常なBMI範囲の個人又は個人(複数)であり得る。ある実施態様において、正常なエンテロスタチン量は、エンテロスタチン欠乏に関連する障害又は状態の症状を示さない複数のコントロール対象によるものである。正常なエンテロスタチン量を当業者に知られている任意の好適な統計手法に従って計算することができる。例えば、正常なエンテロスタチン量は、エンテロスタチン欠乏に関連する障害又は状態の症状を示さないコントロール対象からのサンプル中のエンテロスタチン量の統計的平均値に基づくものとしてすることができる。

20

##### 【0085】

有利には、正常なエンテロスタチン値は、本発明の方法の実施者が入手又は測定する必要はない。その代わりに、科学文献、公的データベース又は私的データベースのような当業者に利用可能な情報源を参照することによって、或いは本明細書に示されているデータを参照することによって、正常なエンテロスタチン値の量を特定することができる。

##### 【0086】

正常なエンテロスタチン値は、当業者によって測定される絶対値、誤差限界を有する絶対値又はある範囲の値であり得る。ある実施態様において、エンテロスタチンの量の正常な値の範囲に基づいて選択が行われる。その正常値の範囲を、本明細書に記載されているように入手し、本発明の方法の実施者に利用できるようにすることが可能である。

30

##### 【0087】

ある実施態様において、正常なエンテロスタチン値は、カットオフ基準量である。カットオフ基準量は、正常なエンテロスタチン量の絶対値である。例えば、高脂肪食の後の血液におけるエンテロスタチンについての $30 \text{nM}$ のカットオフ基準量は、正常なエンテロスタチン値を示し得る。試験対象は、高脂肪食後3時間の間に採取されたその血液サンプル中のエンテロスタチンの量が $30 \text{nM}$ 未満である場合にエンテロスタチン欠乏である。コントロール対象から得られた対照量に基づいて、当業者に知られている統計技術を使用してカットオフ基準量を求めることができる。例えば、コントロール対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量の統計的平均値に基づいて求めることができる。

40

対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量を、当業者に知られている任意の好適な統計手法に従って正常なエンテロスタチン値と比較することができる。好ましい実施態様において、反復測定との比較に二又は三元配置分散分析(ANOVA)又はカイ二乗試験を用いる。

##### 【0088】

ある実施態様において、対象のサンプル中のエンテロスタチンの摂食: 絶食比及び正常なエンテロスタチンの摂食: 絶食比に基づいて、エンテロスタチンによる治療の対象を選択する。エンテロスタチンの摂食: 絶食比は、対象が一晩絶食したときの対象からのサン

50

ブル中のエンテロスタチンの量を、対象が摂食した時、又は対象が摂食してから約0.5、1、1.5、2、2.5若しくは3時間後のサンプル中のエンテロスタチンの量で割ることによって求められる。正常なエンテロスタチン値に関する上記説明は、正常なエンテロスタチン摂食：絶食比にも適用される。例えば、正常なエンテロスタチン摂食：絶食比は、例えば、コントロール対象又は複数のコントロール対象の正常なエンテロスタチン摂食：絶食比であり得、本発明の方法の実施者が求める、又は測定する必要はない。それは、特定のアッセイ法、サンプルの種類、及び無細胞抽出物の種類毎に異なってもよい。それは、絶対値、誤差限界を有する絶対値、ある範囲の値又はカットオフ基準量であり得る。

【0089】

#### (4.4. 投与用エンテロスタチン)

エンテロスタチンは、当業者に知られている任意のエンテロスタチンであり得る。エンテロスタチンは、治療される対象と同種によるものであるか、或いは異なる種類によるものであり得る。好ましい実施態様において、エンテロスタチンは、対象と同種によるものである。代表的なエンテロスタチンとしては、ヒトエンテロスタチン、ラットエンテロスタチン、マウスエンテロスタチン、ブタエンテロスタチン、イヌエンテロスタチン及びウマエンテロスタチンが挙げられる。いくつかの実施態様において、対象は、ヒトであり、APGPR(配列番号1)のアミノ酸配列を有するエンテロスタチンが投与される。

【0090】

ある実施態様において、エンテロスタチンは、全長エンテロスタチンである。代表的なエンテロスタチンは、APGPR(配列番号1)、VPDPR(配列番号2)及びVPGPR(配列番号3)からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。本発明の方法で投与されるエンテロスタチンは、単一のエンテロスタチンを含むことができるか、又は複数のエンテロスタチンを含むことができる。APGPR(配列番号1)が好ましい。エンテロスタチンの製造方法を以下に詳述する。

【0091】

好ましい実施態様において、エンテロスタチンは、実質的に純粋である。この文脈において、「実質的に純粋」という用語は、エンテロスタチンには投与することを意図しない汚染物質が実質的に存在しないことを指す。例としては、ペプチド又はアミノ酸汚染物質及びペプチド合成試薬が挙げられる。ある実施態様において、エンテロスタチンは、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%又は99.9%の純度である。以下のセクションで詳述されるように、エンテロスタチンを1つ以上の担体、賦形剤又は希釈剤とともに投与のために処方することができる。

【0092】

エンテロスタチンは、当業者の判断に応じて、遊離末端又は閉鎖末端を含むことができる。有用な閉鎖末端としては、C末端アミド又はN末端アセチル、或いはその両方が挙げられる。好ましい実施態様において、エンテロスタチンは、遊離N末端及びC末端を有する。

本発明に使用されるエンテロスタチンは、単一のエンテロスタチンを含むことができるか、又は複数のエンテロスタチンを含むことができる。例えば、エンテロスタチンは、異なるアミノ酸配列を有する全長エンテロスタチンの組合せであり得る。

【0093】

エンテロスタチンは、中性の形又は塩の形であり得る。塩の形は、当業者に知られている任意の塩の形であり得る。特に有用な塩の形は、酢酸塩、塩化物、硫酸塩及びリン酸塩と調和されたものである。酢酸塩及び塩化物の塩が好ましい。

エンテロスタチンは、当業者に知られている任意の形のエンテロスタチンであり得る。エンテロスタチンは、共複合体の形であり得る。いくつかの実施態様において、エンテロスタチンは、その内容が全面的に参照により組み込まれている、2005年12月13日に出願された米国仮出願第60/750,208号に記載されている共複合体の形である。

【0094】

本発明の方法で投与されるエンテロスタチンは、当業者に明らかな任意のエンテロスタチン製剤又は組成物で存在することができる。代表的な医薬製剤及び組成物を以下に詳細

10

20

30

40

50

に記載する。特に有利な組成物は、その内容が全面的に参照により組み込まれている、2005年12月13日に出願された米国仮出願第60/750,207号に記載されているものである。

以下に記載する当業者に明らかな任意の方法によって、エンテロスタチンを調製し、処方し、かつ対象に投与することができる。

【0095】

#### (4.5. 治療用エンテロスタチンの調製)

当業者に明らかな任意の技術に従ってエンテロスタチンを調製することができる。エンテロスタチンを調製するための代表的な技術は、その内容が全面的に参照により本明細書に組み込まれている米国特許第5,494,894号に記載されている。ある実施態様において、エンテロスタチンを、例えば、液相又は固相ペプチド合成によって合成的に調製することができ(その内容が全面的に参照により本明細書に組み込まれているMerrifield, 1963、J. Am. Chem. Soc. 85:2149; Fieldsらの論文、1990、Int J Pept Protein Res. 35:161-214; Fieldsらの論文、1991、Pept Res. 4:95-101参照)。

【0096】

さらなる実施態様において、エンテロスタチンを天然供給源、組換え供給源又は商業的供給源から得ることができる。いくつかの実施態様において、プロコリパーゼを組換え発現し、プロコリパーゼを開裂して、エンテロスタチンを生成し、次いでエンテロスタチンを精製することによってエンテロスタチンを得ることができる。

本発明に使用されるエンテロスタチンを高速液体クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動及びアフィニティクロマトグラフィー等の当該技術分野で知られている任意の技術によって精製することができる。特定のエンテロスタチンを精製するのに使用される実際の条件は、当業者にとって明らかになるであろう。

【0097】

#### (4.6. エンテロスタチンの製剤及び投与経路)

治療に使用されるエンテロスタチンを、本質的に、医薬組成物の形、共複合体の形、又は共複合体を含む医薬組成物の形で対象に投与することができる。

当業者の判断に応じて、経口投与、静脈内投与、胃内投与、十二指腸内投与、腹腔内投与又は脳室内投与を含むが、それらに限定されない任意の経路によってエンテロスタチンを投与することができる。

【0098】

いくつかの実施態様において、1つ以上のエンテロスタチン共複合体、又はその医薬として許容し得る塩、溶媒和物若しくは水和物を含む組成物を投与する。有用なエンテロスタチン共複合体及び/又は組成物は、その内容が全面的に参照により組み込まれている、2005年12月13日に出願された米国仮出願第60/750,208号、及び2005年12月13日に出願された第60/750,207号に記載されている。好ましい実施態様において、エンテロスタチン又はエンテロスタチン共複合体を含む医薬組成物又は単一単位剤形を投与する。具体的な実施態様において、1つ以上の共複合体、又はその医薬として許容し得る塩、溶媒和物若しくは水和物を含む組成物を投与する。

【0099】

好ましい実施態様において、投与される組成物は、医薬組成物又は単一単位剤形である。医薬組成物及び単一単位剤形は、予防又は治療有効量の1つ以上の予防又は治療薬(例えば、エンテロスタチンを含む共複合体、或いは他の予防又は治療薬)、及び典型的には1つ以上の医薬として許容し得る担体又は賦形剤を含むことができる。具体的な実施態様及びこの文脈において、「医薬として許容し得る」という用語は、連邦又は州政府の管理機関によって承認されている、或いは動物、より好ましくはヒトにおける使用について米国薬局方又は広く認識されている他の薬局方に掲載されていることを意味する。「担体」という用語は、希釈剤、補助剤(例えば、フロイントアジュバント(完全又は不完全))、賦形剤、又は治療薬を投与するための媒体を指す。当該医薬担体は、水、並びにピーナッツ油、大豆油、鉱油及びゴマ油等のような石油、動物、食物又は合成起源のものを含む油などの無菌液であり得る。水は、医薬組成物が静脈内投与される場合に好ましい担体である。食

10

20

30

40

50

塩水並びにデキストロース及びグリセロール水溶液を特に注射可能溶液の液体担体として採用することもできる。好適な医薬担体の例が、E.W.Martinによる「レミントンの医薬科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)」に記載されている。

【0100】

典型的な医薬組成物及び剤形は、1つ以上の賦形剤を含む。好適な賦形剤は、製薬の当業者によく知られており、好適な賦形剤の非限定的な例としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦、白墨、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥脱脂乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水及びエタノール等が挙げられる。特定の賦形剤が、医薬組成物又は剤形に組み込むのに好適であるかどうかは、剤形を患者に投与する方法及び剤形における具体的な活性成分を含むが、それらに限定されない、当該技術分野でよく知られている様々な要因に依存する。組成物又は単一単位剤形は、要望に応じて、少量の湿潤剤若しくは乳化剤又はpH緩衝剤を含むこともできる。

10

【0101】

本発明の無ラクトース組成物は、当該技術分野でよく知られており、例えば、米国薬局方(USP)SP(XXI)/NF(XVI)に掲載されている賦形剤を含むことができる。概して、無ラクトース組成物は、活性成分、結合剤/充填剤、及び潤滑剤を医薬として適合し得る量及び医薬として許容し得る量で含む。代表的な無ラクトース剤形は、活性成分、微結晶セルロース、アルファ化デンプン及びステアリン酸マグネシウムを含む。

【0102】

本発明は、エンテロスタチンを含む無水医薬組成物及び剤形の投与をさらに包括する。例えば、水(例えば5%)を添加することは、保存寿命又は経時的な製剤の安定性を測定するために長期的保管をシミュレートする手段として、医薬技術分野で広く受け入れられている(例えば、Jens T.Carstensen、「医薬品の安定性:原理と実践(Drug Stability:Principles & Practice)」、第2版、Marcel Dekker、NY、NY、1995、379-380頁参照)。実際、水及び熱は、いくつかの化合物の分解を加速させる。したがって、湿分及び/又は湿度は、製剤の製造、処理、包装、保管、出荷及び使用中に広く遭遇するため、製剤に対する水分の影響は非常に重要な場合がある。

20

【0103】

無水又は低湿分含有成分及び低湿分又は低湿度条件を用いて、本発明の無水医薬組成物及び剤形を調製することができる。製造、包装及び/又は保管中に湿分及び/又は湿度に実質的に接触することが想定される場合は、ラクトース、及び一級又は二級アミンを含む少なくとも1つの活性成分を含む医薬組成物及び剤形は、無水であることが好ましい。

30

【0104】

無水医薬組成物は、無水性が維持されるように調製及び保管されるべきである。よって、無水組成物は、好ましくは、好適な処方キットに含めることができるように、水との接触を防止することが知られている材料を使用して包装される。好適な包装の例としては、気密密封箱、プラスチック、単一剤形容器(例えばバイアル)、プリスターパック及びストリップパックが挙げられるが、それらに限定されない。

本発明は、活性成分が分解する速度を小さくする1つ以上の化合物を含む医薬組成物及び剤形の投与をさらに包括する。本明細書において「安定剤」と称する当該化合物としては、アスコルビン酸のような酸化防止剤、pH緩衝液又は塩緩衝液が挙げられるが、それらに限定されない。

40

【0105】

医薬組成物及び単一単位剤形は、液剤、懸濁剤、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、粉剤及び持続放出製剤等の形をとることができる。経口製剤は、医薬グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ナトリウムサッカリン、セルロース、炭酸マグネシウム等の標準的な担体を含むことができる。当該組成物及び剤形は、予防又は治療有効量の予防又は治療薬を好ましくは精製された形で、患者に適切に投与するための形を提供するように好適な量の担体とともに含むことになる。製剤は、投与の様式

50

に適する必要がある。好ましい実施態様において、医薬組成物又は単一単位剤形は、無菌であり、対象、好ましくは動物対象、より好ましくは哺乳類対象、最も好ましくはヒト対象に対する投与に好適な形である。

#### 【0106】

エンテロスタチンを含む医薬組成物は、その意図する投与経路と適合するように処方される。投与経路の例としては、非経口投与、例えば、静脈内投与、内皮投与、皮下投与、筋肉内投与、皮下投与、経口投与、頬投与、舌下投与、吸入投与、鼻内投与、経皮投与、局部投与、経粘膜投与、腫瘍内投与、滑液包内投与及び直腸投与が挙げられるが、それらに限定されない。具体的な実施態様において、組成物は、ヒトに対する静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、経口投与、鼻内投与又は局部投与に適合させた医薬組成物として、慣例手順に従って処方される。一実施態様において、医薬組成物は、ヒトに対する皮下投与のための慣例手順に従って処方される。典型的には、静脈内投与のための組成物は、無菌の等張性水性緩衝液の溶液である。必要な場合には、組成物は、可溶化剤、及び注射部位の痛みを緩和するためのリグノカムネのような局部麻酔剤を含むこともできる。

10

#### 【0107】

剤形の例としては、錠剤;カプレット剤;軟質弾性ゼラチンカプセル剤のようなカプセル剤;カシェ剤;トローチ剤;ロゼンジ剤;分散剤;坐薬;軟膏剤;パップ剤(湿布剤);糊剤;粉剤;包帯剤;クリーム剤;硬膏剤;液剤;貼付剤;エアロゾル剤(例えば、鼻スプレー剤又は吸入剤);ゲル剤;懸濁剤(例えば、水性又は非水性液体懸濁剤、水中油乳剤、或いは油中水液体乳剤)、液剤及びエリキシル剤を含む、患者に対する経口又は粘膜投与に好適な液体剤形;患者に対する非経口投与に好適な液体剤形;患者に対する非経口投与に好適な液体剤形を提供するように再構成できる無菌固体剤(例えば、結晶性又は非晶質の固体)が挙げられるが、それらに限定されない。

20

#### 【0108】

エンテロスタチンの剤形の組成、形状及び種類は、それらの使用に応じて典型的に異なる。例えば、障害の急性治療に使用される剤形は、同じ疾患の慢性治療に使用される剤形より多量の1つ以上のエンテロスタチンを含んでいてもよい。また、治療に有効な剤形は、それぞれの種類の癌の間で異なってもよい。同様に、非経口剤形は、同じ疾患又は障害を治療するのに使用される経口剤形より少量の1つ以上の活性成分を含んでいてもよい。本発明に包括される具体的な剤形が互いに異なるこれら及び他の方法を当業者なら容易に理解するであろう(例えば、「レミントンの医薬科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)」、第18版、Mack Publishing、Easton PA(1990)参照)。

30

#### 【0109】

一般に、エンテロスタチンを含む組成物の成分は、個別に供給されるか、或いは、例えば、活性剤の量を示したアンプル又はサシェのような気密密封容器内の凍結乾燥粉末又は無水濃縮物として単位剤形で共に混合される。組成物を注入によって投与する場合には、無菌の医薬グレードの水又は食塩水を含む注入ボトルで分配することができる。組成物を注射によって投与する場合には、成分を投与前に混合できるように、注射用無菌水又は食塩水のアンプルを提供することができる。

40

#### 【0110】

本発明の方法において投与される典型的な剤形は、エンテロスタチン、或いはエンテロスタチン、又はその医薬として許容し得る塩、溶媒和物若しくは水和物を含む共複合体を含む。1日当たり約0.1mgから約1000mgの範囲内であり、午前中に単一の1日1回の投与として与えられるが、食物とともに1日を通じて分割投与として摂取されるのが好ましい。本発明の特定の剤形は、約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1.0、2.0、2.5、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、40.0、50.0、60.0、100、200、250、500又は1000mgの活性エンテロスタチンを有する。

#### 【0111】

##### (4.6.1経口剤形)

経口投与に好適である、本発明の方法に使用される医薬組成物を錠剤(例えば咀嚼性錠

50

剤)、カプレット剤、カプセル剤及び液剤(例えば香りづけしたシロップ)などの(但し、それらに限定されない)個別剤形として提供することができる。当該剤形は、所定量の活性成分を含み、当業者によく知られている製薬方法で調製され得る(概要は「レミントンの医薬科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)」、第18版、Mack Publishing、Easton PA(1990)参照)。

好ましい実施態様において、経口剤形は、固体であり、上記セクションに詳述されるように、無水成分により無水条件下で調製される。しかし、本発明の範囲は、無水の固体経口剤形を超えている。そのため、さらなる剤形を本明細書に記載する。

#### 【0112】

典型的な経口剤形は、従来の医薬混合技術に従って、均一混合物における活性成分を少なくとも1つの賦形剤と組み合わせることによって調製される。賦形剤は、投与に応じた所望の調製の形に応じて、広範な形をとることができる。例えば、経口液体剤形又はエアロゾル剤形における使用に好適な賦形剤としては、水、グリコール、油、アルコール、香料、防腐剤及び着色剤が挙げられるが、それらに限定されない。固体の経口剤形(例えば、粉剤、錠剤、カプセル剤及びカプレット剤)における使用に好適な賦形剤の例としては、デンプン、糖、微結晶セルロース、希釈剤、造粒剤、潤滑剤、結合剤及び崩壊剤が挙げられるが、それらに限定されない。

#### 【0113】

錠剤及びカプセル剤は、投与が容易であるため、最も有利な経口単位剤形であり、その場合は固体の賦形剤が採用される。要望に応じて、標準的な水性又は非水性技術により錠剤をコーティングすることができる。当該剤形を製薬方法のいずれかによって調製することができる。概して、医薬組成物及び剤形は、活性成分を液体担体、微細固体担体又はその両方と均質且つ均一に混合し、次いで製品を必要に応じて所望の形に成形することによって調製される。

#### 【0114】

例えば、錠剤を圧縮又は成形によって調製することができる。賦形剤と場合により混合された粉末又は顆粒のような易流動形態の活性成分を好適な装置で圧縮することによって圧縮錠剤を調製することができる。不活性液体希釈剤で湿らせた粉末化合物の混合物を好適な装置で成形することによって成形錠剤を製造することができる。

#### 【0115】

本発明の経口剤形に使用できる賦形剤の例としては、結合剤、充填剤、崩壊剤及び潤滑剤が挙げられるが、それらに限定されない。医薬組成物及び剤形における使用に好適な結合剤としては、トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプン又は他のデンプン、ゼラチン、アカシアのような天然及び合成ゴム、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸、他のアルギン酸塩、粉末化トラガカント、グアールガム、セルロース及びその誘導体(例えば、エチルセルロース、酢酸セルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、ナトリウムカルボキシメチルセルロース)、ポリビニルピロリドン、メチルセルロース、アルファ化デンプン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース(例えば第2208、2906、2910)、微結晶セルロース並びにそれらの混合物が挙げられるが、それらに限定されない。

#### 【0116】

本明細書に開示されている医薬組成物及び剤形における使用に好適な充填剤の例としては、タルク、炭酸カルシウム(例えば、顆粒又は粉末)、微結晶セルロース、粉末化セルロース、デキストレート、カオリン、マンニトール、珪酸、ソルビトール、デンプン、アルファ化デンプン、及びそれらの混合物が挙げられるが、それらに限定されない。本発明の医薬組成物における結合剤又は充填剤は、典型的には医薬組成物又は剤形の約50から約99重量パーセントで存在する。

#### 【0117】

微結晶セルロースの好適な形としては、AVICEL-PH-101、AVICEL-PH-103 AVICEL RC-581、AVICEL-PH-105(FMC Corporation、American Viscose Division、Avicel Sales、ペンシルベニア州Marcus Hookから入手可能)として販売されている材料及びそれらの混合物が挙

10

20

30

40

50

げられるが、それらに限定されない。具体的な結合剤は、AVICEL RC-581として販売されている微結晶セルロースとナトリウムカルボキシメチルセルロースとの混合物である。好適な無水又は低湿分賦形剤又は添加剤としては、AVICEL-PH-103(商標)及びデンプン1500LM(Starch 1500LM)が挙げられる。

#### 【0118】

水性環境に曝されると崩壊する錠剤を提供するために、崩壊剤を本発明の組成物に使用する。過大量の崩壊剤を含有する錠剤は、保管中に崩壊し得るのに対して、過少量の崩壊剤を含有する錠剤は、所望の速度又は所望の条件下で崩壊し得ない可能性がある。したがって、活性成分の放出を不利に改変するほど過大でも過小でもない十分量の崩壊剤を使用して、本発明の固体経口剤形を形成すべきである。使用される崩壊剤の量は、製剤の種類に応じて異なり、当業者にとって容易に識別可能である。典型的な医薬組成物は、約0.5から約15重量パーセントの崩壊剤、具体的には約1から約5重量パーセントの崩壊剤を含む。

10

#### 【0119】

本発明の医薬組成物及び剤形に使用できる崩壊剤としては、寒天、アルギン酸、炭酸カルシウム、微結晶セルロース、クロスカルメロースナトリウム、クロスポビドン、ポラクリリンカリウム、グリコール酸ナトリウムデンプン、ジャガイモ又はタピオカデンプン、アルファ化デンプン、他のデンプン、粘土、他のアルギン、他のセルロース、ガム、並びにそれらの混合物が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0120】

本発明の医薬組成物及び剤形に使用できる潤滑剤としては、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、鉱油、軽油、グリセリン、ソルビトール、マンニトール、ポリエチレングリコール、他のグリコール、ステアリン酸、ラウリル硫酸ナトリウム、タルク、水素化植物油(例えば、ピーナッツ油、綿実油、ヒマワリ油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油及び大豆油)、ステアリン酸亜鉛、オレイン酸エチル、ラウリン酸エチル、寒天、及びそれらの混合物が挙げられるがそれらに限定されない。さらなる潤滑剤としては、例えば、シロイドシリカゲル(syloid silica gel)(メリーランド州BaltimoreのW.R. Grace Coが製造するAEROSIL 200)、合成シリカの凝集エアロゾル(テキサス州PlanoのDegussa Co.により市販)、CAB-O-SIL(マサチューセッツ州BostonのCabot Co.が販売する発熱性酸化珪素製品)及びそれらの混合物が挙げられる。潤滑剤は、使用される場合は、典型的には、それらが組み込まれる医薬組成物又は剤形の約1重量パーセント未満の量で使用される。

20

30

#### 【0121】

##### (4.6.2 遅延放出剤形)

本発明の方法に使用されるエンテロスタチンを当業者によく知られている徐放手段又は送達デバイスによって投与することができる。例としては、それぞれ参照により本明細書に組み込まれている米国特許第3,845,770号;同第3,916,899号;同第3,536,809号;同第3,598,123号;及び同第4,008,719号、同第5,674,533号、同第5,059,595号、同第5,591,767号、同第5,120,548号、同第5,073,543号、同第5,639,476号、同第5,354,556号、同第5,639,480号、同第5,733,566号、同第5,739,108号、同第5,891,474号、同第5,922,356号、同第5,972,891号、同第5,980,945号、同第5,993,855号、同第6,045,830号、同第6,087,324号、同第6,113,943号、同第6,197,350号、同第6,248,363号、同第6,264,970号、同第6,267,981号、同第6,376,461号、同第6,419,961号、同第6,589,548号、同第6,613,358号、同第6,699,500号及び同第6,740,634号に記載されているものが挙げられるが、それらに限定されない。様々な割合で所望の放出プロファイルを与えるために、例えば、ヒドロプロピルメチルセルロース、他のポリマーマトリックス、ゲル、浸透膜、浸透圧系、多層コーティング、微粒子、リポソーム、微球体又はそれらの組合せを使用して、1つ以上の活性成分の遅延又は徐放性を提供するのに当該剤形を使用することができる。本明細書に記載されているものを含む当業者に知られている好適な徐放製剤を本発明の活性成分との使用に向けて容易に選択することができる。したがって、本発明は、徐放に適合させた錠剤、カプセル

40

50

剤、ゲルカップ剤及びカプレット剤のような(但し、それらに限定されない)経口投与に好適な単一単位剤形を包括する。

【0122】

すべての徐放性医薬品は、非徐放性医薬品によって達成される薬物治療と比べて、薬物治療を向上させるという共通の目標を有する。理想的には、医薬治療における最適に設計された徐放性製剤の使用は、状態を最短時間で治癒又は抑制するために最小限の薬剤物質を採用することを特徴とする。徐放性製剤の利点は、薬剤の活性の延長、投与頻度の低減及び患者コンプライアンスの向上を含む。加えて、徐放性製剤を使用して、作用の発生時間、又は薬剤の血液レベルのような他の特性に影響を与えることができ、副作用(例えば逆効果)の発生に影響を与えることができる。

10

【0123】

多くの徐放性製剤は、所望の治療効果を即座にもたらず量の薬剤(活性成分)を最初に放出し、異なる量の薬剤を徐々に且つ連続的に放出して、長期間にわたってこのレベルの治療又は予防効果を維持するように設計されている。この一定レベルの薬剤を体内に維持するためには、体から代謝及び排泄される薬剤の量を補う速度で薬剤を剤形から放出しなければならない。pH、温度、酵素、水又は他の生理的条件又は化合物を含むが、それらに限定されない様々な条件によって活性成分の徐放を促すことができる。

【0124】

(4.6.3経皮、局部及び粘膜剤形)

固体の無水経口剤形が好ましいが、本発明は、また、経皮剤形、局部剤形又は粘膜剤形によるエンテロスタチンの投与を提供する。本発明の経皮剤形、局部剤形及び粘膜剤形としては、眼科用液剤、スプレー剤、エアロゾル剤、クリーム剤、ローション剤、軟膏剤、ゲル剤、液剤、乳剤、懸濁剤、又は当業者に知られている他の形が挙げられるが、それらに限定されない(例えば、「レミントンの医薬科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)」、第16版及び第18版、Mack Publishing、Easton PA(1980及び1990);及び「医薬剤型序説(Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms)」、第4版、Lea & Febiger、Philadelphia(1985)参照)。口腔内の粘膜組織を治療するのに好適な剤形を口内洗浄液又は経口ゲルとして処方することができる。さらに、経皮剤形は、皮膚に貼付し、所望量の活性成分の浸透を可能にするために、特定時間にわたって着用することができる「リザーバ型」又は「マトリックス型」貼付剤を含む。

20

30

【0125】

好適な賦形剤(例えば、担体及び希釈剤)、並びに本発明に包括される経皮剤形、局部剤形及び粘膜剤形を提供するために使用できる他の材料は、製薬技術分野の当業者によく知られており、所定の医薬組成物又は剤形が適用される特定の組織に依存する。その事実を念頭において、典型的な賦形剤としては、無毒性で、医薬として許容し得るローション剤、チンキ剤、クリーム剤、乳剤、ゲル剤又は軟膏剤を形成するための水、アセトン、エタノール、エチレングリコール、プロピレングリコール、ブタン-1,3-ジオール、ミリスチン酸イソプロピル、パルミチン酸イソプロピル、鉱油、並びにそれらの混合物が挙げられるが、それらに限定されない。要望に応じて、加湿剤又は保湿剤を医薬組成物及び剤形に添加することもできる。当該追加的な成分の例は、当該技術分野でよく知られている(例えば、「レミントンの医薬科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)」、第16版及び第18版、Mack Publishing、Easton PA(1980 & 1990)参照)。

40

【0126】

治療される具体的な組織に応じて、本発明の活性成分による治療の前に、治療とともに、又は治療の後に追加的な成分を使用することができる。例えば、活性成分の組織への送達を助けるために浸透向上剤を使用することができる。好適な浸透向上剤としては、アセトン;エタノール、オレイル及びテトラヒドロフリルのような様々なアルコール;ジメチルスルホキシドのようなアルキルスルホキシド;ジメチルアセトアミド;ジメチルホルムアミド;ポリエチレングリコール;ポリビニルピロリドンのようなピロリドン;コリドングレード(ポビドン、ポリビドン);尿素;Tween 80(ポリソルベート80)及びSpan 60(モノステアリ

50

ン酸ソルビタン)のような様々な水溶性又は水不溶性糖エステルが挙げられるが、それらに限定されない。

【0127】

医薬組成物又は剤形、或いは医薬組成物又は剤形が適用される組織のpHを調整して、1つ以上の活性成分の送達を向上させることもできる。同様に、溶媒担体の極性、そのイオン強度又は緊張度を調整して、送達を向上させることができる。ステアリン酸塩のような化合物を医薬組成物又は剤形に添加して、送達を向上するように、1つ以上の活性成分の親水性又は親油性を有利に改変することもできる。この点に関して、ステアリン酸塩は、製剤の脂質媒体として、乳化剤又は界面活性剤として、且つ送達向上剤又は浸透向上剤としての役割を果たすことができる。活性成分の異なる塩、水和物又は溶媒和物を使用して、得られた組成物の特性をさらに調整することができる。

10

【0128】

(4.6.4投与量及び投与頻度)

障害又はその1つ以上の症状の予防、治療、管理又は改善に有効な本発明の方法におけるエンテロスタチンの量は、疾患又は状態の性質及び重度、及び活性成分の投与経路に応じて異なる。頻度及び投与量は、投与される具体的な治療薬(例えば、治療又は予防薬)、障害、疾患又は状態の重度、投与経路、並びに患者の年齢、身体、体重、応答及び病歴に応じて、各患者に特有の要因によっても異なる。インビトロ又は動物モデル試験系から導かれた用量反応曲線から有効な投与量を推定することができる。

【0129】

エンテロスタチンの代表的な投与量は、対象の体重又はサンプル重量1キログラム当たりミリグラム又はマイクログラム量の活性ペプチド(例えば、1キログラム当たり約1マイクログラムから1キログラム当たり約500ミリグラム、1キログラム当たり約100マイクログラムから1キログラム当たり約5ミリグラム、又は1キログラム当たり約1マイクログラムから1キログラム当たり約50マイクログラム)を含む。本発明に使用されるエンテロスタチンでは、患者に投与される投与量は、典型的には、活性ペプチドの重量で、患者の体重1kg当たり0.01mgから15mgである。好ましくは、患者に投与される投与量は、患者の体重1kg当たり0.01mgから15mg、0.01mgから10mg、0.01mgから5mg、0.01から4mg、0.01から3mg、0.01mgから2mg、0.01mgから1mg、0.02mgから1mg、0.10mgから2.5mgである。

20

【0130】

概して、本明細書に記載されている状態に対する本発明の方法におけるエンテロスタチンの推奨される1日投与量範囲は、1日当たりの単回投与又は複数回投与として、1日当たり約0.01mgから約1000mgの範囲内にある。具体的には、1日の総投与量範囲は、1日当たり約1mgから約500mg、より具体的には1日当たり約10mgから約200mgである。患者を管理する上で、治療をより低い投与量、恐らく約1mgから約25mgから開始し、必要であれば、患者の全体的な応答に応じて、単回投与又は分割投与として1日当たり約200mgから約1000mgまで増加させることができる。当業者にとって明らかなように、場合によっては、本明細書に開示されている範囲外の投与量の活性成分を使用することが必要である場合がある。また、臨床医又は治療医師は、個々の患者の応答に関連して、治療をいつ、どのようにして中断、調整又は終了するかを知っていることを注記する。ある実施態様において、エンテロスタチンは、約1mg/日から約500mg/日の量で投与される。いくつかの実施態様において、それは、約1mg/日から約400mg/日の量で投与される。いくつかの実施態様において、それは、約1mg/日から約300mg/日の量で投与される。いくつかの実施態様において、それは、約1mg/日から約200mg/日の量で投与される。いくつかの実施態様において、それは、約1mg/日から約100mg/日の量で投与される。

30

40

【0131】

エンテロスタチンを、単一の1日1回の投与として、又は好ましくは1日を通しての分割投与として投与することができる。いくつかの実施態様において、1日投与量は、等分された投与量で1日2回投与される。他の実施態様において、1日投与量は、1日3回投与される。特定の実施態様において、1日投与量は、等分された投与量で1日3回投与される。い

50

くつかの実施態様において、1日投与量は、三分割された投与量で1日3回投与され、各投与量は、エンテロスタチンを約1~100mg、約4~60mg、約4~40mg、約4~30mg、約4~25mg又は4~20mgの量で含む。好ましくは、エンテロスタチンの三分割された投与量は、毎日3度の食事の頃与えられる。

【0132】

エンテロスタチンを様々な時点で投与することができる。いくつかの実施態様において、それは、エンテロスタチン欠乏の対象に対して、対象が絶食したときに投与される。いくつかの実施態様において、食事の前に投与される。いくつかの実施態様において、食事中に投与される。いくつかの実施態様において、食後に投与される。

【0133】

当業者であれば容易にわかるように、異なる治療有効量が異なる疾患及び状態に適用可能であり得る。同様に、当該障害を予防、管理、治療又は改善するのに十分であるが、本発明のエンテロスタチンの投与に関連する悪影響を引き起こすのに不十分、又は該悪影響を低減するのに十分な量も、上記投与量及び投与頻度スケジュールに包括される。さらに、患者に複数回投与量の本発明のエンテロスタチンが投与される場合は、投与量のすべてが同一である必要はない。例えば、共複合体の予防又は治療効果を向上させるために、患者に投与する投与量を増加させてもよいし、特定の患者が経験する1つ以上の副作用を低減するために減少させてもよい。

【0134】

具体的な実施態様において、患者における障害又はその1つ以上の症状を予防、治療、管理又は改善するために投与される活性ペプチドの重量に基づくエンテロスタチンの投与量は、患者の体重1kg当たり0.01mg、0.05mg、0.10mg、0.15mg、0.20mg、0.25mg、0.5mg、0.75mg、1mg、1.5mg、2mg、3mg、4mg、5mg、10mg又は15mg以上である。別の実施態様において、患者における障害又はその1つ以上の症状を予防、治療、管理又は改善するために投与されるエンテロスタチンの投与量は、0.1mgから20mg、0.1mgから15mg、0.1mgから12mg、0.1mgから10mg、0.1mgから8mg、0.1mgから7mg、0.1mgから5mg、0.1から2.5mg、0.25mgから20mg、0.25から15mg、0.25から12mg、0.25から10mg、0.25から8mg、0.25mgから7mg、0.25mgから5mg、0.5mgから2.5mg、1mgから20mg、1mgから15mg、1mgから12mg、1mgから10mg、1mgから8mg、1mgから7mg、1mgから5mg、又は1mgから2.5mgの単位投与量である。

【0135】

ある実施態様において、本発明におけるエンテロスタチンの投与を繰り返すことができ、少なくとも1日、2日、3日、5日、10日、15日、30日、45日、2カ月、75日、3カ月又は6カ月の間隔をあけて投与することができる。他の実施態様において、同じ予防又は治療薬の投与を繰り返すことができ、少なくとも1日、2日、3日、5日、10日、15日、30日、45日、2カ月、75日、3カ月又は6カ月の間隔をあけて投与することができる。

【0136】

ある実施態様において、該方法及び組成物を単一の1回投与として、又は慢性的に施すことができる。慢性的とは、本発明の方法及び組成物を所定の個体に2回以上施すことを意味する。例えば、慢性的投与は、当業者にとって明らかなように、1日1回、1日2回、又はより高い若しくは低い頻度で対象に投与される医薬組成物の複数回投与であり得る。慢性的投与は、当業者の判断に応じて、適宜数日間、数週間、数カ月間又は数年間持続し得る。

【0137】

別の実施態様において、該方法及び組成物を急性的に施す。急性的とは、本発明の方法及び組成物を事象の発生に近い時間又は同一時間に施すことを意味する。例えば、急性的投与は、食事の開始頃に投与される医薬組成物の単回投与又は複数回投与であり得る。いくつかの実施態様において、食事は、高カロリー又は高脂肪食である。急性的投与は、また、食物の渴望の発生、特に脂肪性食物の渴望の発生頃に投与される医薬組成物の単回投与又は複数回投与であり得る。事象の発生に近い時間又は同一時間は、事象に応じて異なるが、例えば、食事又は食物の渴望の約30分以内であり得る。ある実施態様において、急

10

20

30

40

50

性的投与は、食事又は食物の渴望の約1時間以内の投与である。ある実施態様において、急性的投与は、食事又は食物の渴望から約2時間、約6時間、約10時間、約12時間、約15時間又は約24時間以内の投与である。

#### 【0138】

具体的な実施態様において、本発明は、障害、又はその1つ以上の症状を予防、治療、管理又は改善する方法であって、それを必要とする対象に対して、少なくとも150 µg/kg、好ましくは少なくとも250 µg/kg、少なくとも500 µg/kg、少なくとも1mg/kg、少なくとも5mg/kg、少なくとも10mg/kg、少なくとも25mg/kg、少なくとも50mg/kg、少なくとも75mg/kg、少なくとも100mg/kg、少なくとも125mg/kg、少なくとも150mg/kg又は少なくとも200mg/kg以上の投与量の1つ以上のエンテロスタチン含有共複合体又は組成物を3日に1回、好ましくは4日に1回、5日に1回、6日に1回、7日に1回、8日に1回、10日に1回、2週間に1回、3週間に1回、又は1カ月に1回投与することを含む、前記方法を提供する。

本明細書に記載されているエンテロスタチンの有効量は、実質的な毒性を生じることなく、治療の有益性を提供する。

#### 【0139】

エンテロスタチンの毒性を細胞培養又は実験動物による標準的な薬学的手順、例えば、LD<sub>50</sub>(集団の50%にとって致死的な投与量)又はLD<sub>100</sub>(集団の100%にとって致死的な投与量)を測定することによって測定できる。毒性効果と治療効果との投与量比が治療指数である。高い治療指数を示す化合物が好ましい。ヒトにおける使用に対して無毒な投与量範囲を処方するのに、これらの細胞培養アッセイ及び動物試験から得られたデータを用いることができる。本明細書に記載されている化合物の投与量は、好ましくは、毒性をほとんど又はまったく伴わない有効投与量を含む循環濃度の範囲にある。投与量は、採用される剤形及び利用される投与経路に応じて、この範囲内で異なってもよい。的確な処方、投与経路及び投与量は、個々の医師が患者の状態に鑑みて選択できる(例えば、Finglらの論文、1996:「治療薬の薬理学的基礎(The Pharmacological Basis of Therapeutics)」、第9版、第2章、29頁、Elliot M.Ross参照)。

#### 【0140】

#### (4.7.エンテロスタチン欠乏の対象を選択するためのキット)

本発明は、また、本発明によるエンテロスタチンによる治療の対象を選択するのに有用なキットを提供する。いくつかの実施態様において、本発明のキットは、対象からのサンプル中のエンテロスタチンを検出することが可能な試薬を含む。試薬は、エンテロスタチンを特異的に結合させる抗体又はその機能的断片若しくは誘導体(例えば、Fab、F(ab)<sub>2</sub>、Fv又はsc Fv断片)であってもよい。いくつかの実施態様において、抗体を検出可能に標識することができる。試薬は、アレイの一部であってもよいし、個別及び/又は個々に包装されてもよい。キットは、エンテロスタチンの量を測定するのに使用される少なくとも1つの内部標準を含むこともできる。

#### 【0141】

本発明のキットは、対象からサンプルを得るのに使用できる緩衝液のような試薬を含むこともできる。様々な抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール及びフェノールソルビン酸等を含めることによって、微生物の作用を確実に防ぐことができる。糖及び塩化ナトリウム等の等張剤を含むことも望ましいことがある。

#### 【0142】

ある実施態様において、キットは、本発明の方法を実施するための指示が記載された標示又はラベルをさらに含む。例えば、標示又はラベルは、正常なエンテロスタチン値を示すことができる。さらに、標示又はラベルは、当該基準量の情報源の引用又はリンクを提供することができる。いくつかの実施態様において、少なくとも1つの陽性コントロール及び少なくとも1つの陰性コントロールをキットに含める。

以下の実施例は、本発明を例示するものであり、本発明の範囲を限定するものと見なされるべきではない。

#### 【実施例】

## 【 0 1 4 3 】

## (5. 実施例)

## (5.1. 実施例1: 血液サンプル中のエンテロスタチンの量の測定)

本実施例では、ELISAを使用した血液サンプル中のエンテロスタチンの量の測定を提供する。抗APGPR抗体を使用するELISAを、その内容が全面的に参照により本明細書に組み込まれているImamuraらの論文、1998、Peptides、19:8、1385-1391; Bowyerらの論文、1991、Clinica.Chimica.Acta.、200:137-152に記載されているように実施することができる。

## 【 0 1 4 4 】

## (血液サンプルの採取)

5mlの血液サンプルを採取し、直ちに20mMの酢酸亜鉛と混合し、30分間にわたって室温で凝固させる。次いで、サンプルを3000gで20分間遠心分離する。分離した血清を、50mMのTRIS/HCl、0.05%(w/v)のカゼイン、3.1mMの $\text{NaN}_3$ 、10mMのエチレンジアミン四酢酸(EDTA)及び0.05%(w/v)のTween 20を含む等容量のELISA免疫アッセイ緩衝液(pH7.2~7.4)と混合する。サンプルを煮沸浴で10分間懸濁させ、次いで10,000gで5分間遠心分離し、エンテロスタチンについて評価を行うまで上清を-70 で凍結保存することができる。

10

## 【 0 1 4 5 】

保存された血清のアリコットを後に室温で解凍し、十分に混合し、10,000gで5分間遠心分離することができる。エンテロスタチンを抽出するために、上清を1:9の容量でメタノールと混合する。混合物を30~60分間にわたって氷上で保存し、次いで4 にて10分間にわたって11,000gで遠心分離する。透明な上清を凍結乾燥し、アッセイのためにELISA緩衝液に懸濁させるか、或いはクロマトグラフィーのためにTBS(50mM Tris.HCl、150mM NaCl、3.1mM  $\text{NaN}_3$ 、pH7.4)に懸濁させることができる。アッセイ中のエンテロスタチンのタンパク質分解を抑制するために、2つのプロテアーゼ阻害剤をELISAの前に血清サンプルに添加することができる(最終濃度、1mmol/LジプロテインA及び0.1mmol/Lカプトプリル)。

20

## 【 0 1 4 6 】

## (酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA))

当業者によく知られている標準的な技術を利用して、APGPRに対する抗体を生成することができる。抗体は、ポリクローナル又はモノクローナルであり得る。

コーティング抗原の調製:5mgのスベリン酸ビス(スルホスクシンイミジル)(BS)(米国イリノイ州Pierce)をPBSに含めた溶液(pH7.2)1mlを、10g/lのウサギ血清アルブミン(RSA)をPGSに含めた溶液2mlに対して徐々に滴下添加し、室温で2時間にわたって攪拌する。余剰のBSを2~20cmのSephadex G-50カラム上のPBS中ゲル濾過によって除去する。280nmの吸収によって監視されるタンパク質ピークをプールの。これを4 で一晩インキュベートしながら、透析緩衝液を2回交換する。ローリー法を用いてタンパク質含有量を730  $\mu\text{g}/\text{ml}$ として測定する(例えば、Markwellらの論文、1978、Anal.Biochem.87:206-210参照)。これを0.5mg/mlまで希釈し、3.1mmol/lの $\text{NaN}_3$ を添加する。一定分量を必要になるまで-20 で保管する。

30

## 【 0 1 4 7 】

競合ELISA:4 で一晩インキュベートすることによって、0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のRSA-BS-CCG-APGPR及び0.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のRSAを15mmol/lの $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、35mmol/lの $\text{NaHCO}_3$ 、3.1mmol/lの $\text{NaN}_3$ に含めた溶液(pH9.6)100  $\mu\text{l}$ をPVCマイクロタイタプレートのウェルにコーティングする。すべてのさらなるインキュベーションを攪拌器により室温で行う。次いで、プレートを3回洗浄し、洗浄用緩衝液(20mmol/lのTris/HCl、75mmol/lのNaCl、3.1mmol/lの $\text{NaN}_3$ 、0.05%(w/v)のTween 20(pH7.2~7.4))でブロックする。次いで、未知又は標準の合成APGPRペプチド(American Peptide Companyより購入)溶液100  $\mu\text{l}$ 及びマウス抗APGPRモノクローナル抗体をELISA緩衝液(50mMのTRIS/HCL、0.05%(w/v)のカゼイン、3.1mMの $\text{NaN}_3$ 、10mMのエチレンジアミン四酢酸(EDTA)及び0.05%(w/v)Tween 20(pH7.2~7.4))に含めた1:2000溶液50  $\mu\text{l}$ をウェルにて1時間インキュベートする。各インキュベーションの間に、プレートを洗浄用緩衝液で3回洗浄する。最初に、ヤギ抗マウスIgGビオチン複合体をELISA緩衝液に含めた1:1000溶液100  $\mu\text{l}$ を各ウェルにて30分間インキュベートし、次いで洗浄用緩衝液中エクストラピ

40

50

ジンアルカリホスファターゼ1:500溶液100 $\mu$ lを各ウェルにて30分間インキュベートする。最後に、1mg/mlのリン酸p-ニトロフェニルを基質緩衝液(10%(w/v)ジエタノールアミン/HCl、0.49mmol/lのMgCl<sub>2</sub>、3.1mmol/lのNaN<sub>3</sub>(pH9.8))に含めた溶液100 $\mu$ lを、Anthos 2001 ELISAプレートリーダーで測定される405nmの最大吸収が最小標準ペプチド濃度に対して1.5になるまで各ウェルにてインキュベートする。3mmol/lのNaOH(50 $\mu$ l)を添加することによって反応を終了させる。次いで、プレートを405nmで読み取り、標準曲線を作成して、読取値を補正する。

競合合成抗原(APGPR)の濃度を対数スケールのx軸にプロットし、吸光度を直線スケールのy軸にプロットすることによって、特定の条件下における標準阻害曲線を得る。対象からのサンプル中の抗原(APGPR)の濃度を標準抗原阻害曲線から推定することができる。

10

【0148】

(クロマトグラフィー分析)

血清APGPR免疫反応性のサイズを確認するために、Sephadex G-25(50 $\times$ 1.0m;9.3ml;球状タンパク質の分画範囲、1~5kDa)カラムを使用して、ゲル濾過クロマトグラフィーを行う。最小容量の蒸留水で再構成された凍結乾燥メタノール抽出血清を、緩衝液A(10mmol/lのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)で平衡化されたカラムに充填する。カラムを約5分/1ml留分の速度で10mmol/lのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>により溶出する。

【0149】

(5.2.実施例2:エンテロスタチンの経口剤形)

本実施例では、エンテロスタチン、又はエンテロスタチンを含む共複合体を含む経口剤形を提供する。

20

エンテロスタチンは、優良製造手順(Good Manufacture Procedures)(cGMP)に従ってAmerican peptide Companyにより製造される。HPLC分析によるエンテロスタチンの純度は、95%を超える。

【0150】

その内容が全面的に参照により組み込まれている、2005年12月13日に出願された米国仮出願第60/750,208号に記載されているようにエンテロスタチン共複合体を調製することができる。例えば、エンテロスタチン共複合体は、共結晶ゲストとエンテロスタチンを1:1のモル比で溶媒中にて混合することによる。溶媒を蒸発させ、得られた固体共複合体を回収する。溶媒はメタノールとすることができ、塩は酢酸エンテロスタチンであり、ゲストは1-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸である。得られる固体は、淡褐色の破片又は粉碎ガラスの形である。

30

【0151】

エンテロスタチンの経口剤形は、2.5、4、5、7.5、10、15、20、30、40、50、60又は70mgのエンテロスタチンを含有することができる。それらは、賦形剤又は非吸湿性添加剤を含むことができる。好適な賦形剤は、デンプン、糖及び微結晶セルロース等であってもよい。好適な非吸湿性添加剤は、二塩基性無水リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、粉末化セルロース、デキストロース及びラクチトール等であってもよい。エンテロスタチンの経口剤形は、錠剤又はカプセル剤の形であってもよい。

エンテロスタチンを含む代表的なカプセル剤は、エンテロスタチン2.5%(重量%)、クレモファーEL(Cremphor EL)42%、ラブラゾール20%及びラブラフィルムM2125CS30%を含む充填物、並びにゼラチン54%、グリセリン18%、アニドリソルブ(anidrisorb)35/70 22%及び水6%を含む殻を含有することができる。

40

【0152】

(5.3.実施例3:エンテロスタチンによる肥満の治療)

本実施例では、実施例2に記載したエンテロスタチンの経口剤形による肥満の対象の治療を提供する。対象からのサンプル中のエンテロスタチンの量及び正常なエンテロスタチン値に基づいて対象を選択する。本実施例では、正常なエンテロスタチン値を複数のコントロール対象から確定する。

【0153】

50

(エンテロスタチンによる肥満の治療の対象の患者の選択)

(コントロール対象からの正常なエンテロスタチン値の測定)

当業者の判断に応じて、年齢が18～60歳で、BMIが20kg/m<sup>2</sup>から25kg/m<sup>2</sup>の男性に対して身体検査、心電図測定、化学パネル試験、全血液検査及び尿検査を行う。これらの試験及び病歴に基づいて、正常なBMIを有する10人の健常男性を選択して、正常なエンテロスタチン値を決定する。定期的な投薬を受けている対象を試験から除外する。

【0154】

これらの対象を一晩絶食させ、水を与えるが、カロリー飲料は与えない。翌朝、高脂肪食をこれらの対象に与える。高脂肪食は、約800カロリーを含み、45%の脂肪を含む。食事を与えてから約100～約200分後、好ましくは約180分後に留置カテーテルを介して対象から5mlの血液サンプルを採取する。実施例1に記載したようにして各血液サンプルを調製及び処理する。各血液サンプルのエンテロスタチンの量を実施例1に従って測定する。

絶食させた対象の正常なエンテロスタチンを、これらの対象から採取したサンプルのエンテロスタチンの量の平均値として計算する。

【0155】

(エンテロスタチンによる肥満の治療の対象の選択)

それ以外は健康な18～60歳の肥満男性(BMIが30kg/m<sup>2</sup>から40kg/m<sup>2</sup>)をエンテロスタチンによる治療の対象に選別する。これらの対象の健康状態をコントロール対象について上述したように身体検査及び化学パネル試験等によって判断する。

上述のように、これらの肥満の対象を絶食及び摂食させ、血液サンプルを採取する。各血液サンプルのエンテロスタチンの量を、実施例1に従って、ELISAを用いて測定し、上記で決定した正常なエンテロスタチン値と比較する。

【0156】

対象の血液サンプルのエンテロスタチンの量が上記で決定した正常なエンテロスタチン値の半分未満である場合に、その対象をエンテロスタチンの治療の対象に選択する。20.0mgのエンテロスタチンを含む経口投与用カプセルを上記のように調製する。4週間にわたって毎日3回の食事開始時にエンテロスタチンカプセル剤を選択された対象に与える。

【0157】

心電図測定、化学パネル試験、全血液検査及び尿検査を行って、経口エンテロスタチン投与の安全性を監視する。食物摂取、エネルギー摂取、食欲、満腹感、体重、BMI、体脂肪率及び代謝効果(例えば睡眠時代謝率、休息時代謝率、脂肪酸化及び脂肪バランス)等を当業者によって監視して、経口エンテロスタチン投与の効果及び安全性を確認する。

【0158】

本明細書に引用されているすべての出版物及び特許出願は、各々の出版物又は特許出願が具体的且つ個別的に参照により組み込まれていることを意味するように、参照により本明細書に組み込まれている。上述の発明を明確に理解しやすいように例示及び実施例によりある程度詳細に説明したが、添付の請求項の主旨又は範囲を逸脱することなく一定の変更及び修正を加えることができることを本発明の教示に鑑みて当業者なら容易に理解するであろう。

【手続補正書】

【提出日】平成20年8月15日(2008.8.15)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2009523122000001.app

10

20

30

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 06/47518
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 38/00 (2008.01) USPC - 514/9; 514/17 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC - 514/9; 514/17  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) WEST; Google Scholar: Erlanson-Albertsson Enterostatin, Enterostatin "capillary gel electrophoresis", procolipase "capillary gel electrophoresis", Enterostatin capillary gel electrophoresis, Enterostatin Intragastrically; enterostatin kit, enterostatin intraduodenally, "enterostatin assay kit"		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 5,494,894 A (ERLANSON-ALBERTSSON) 27 February 1998 (27.02.1998); claim 1; col 1, ln 11-16; col 2, ln 5-17, 26, 31-63; col 3, ln 3-6, 61-67; col 4, ln 1-7	1-4, 6-8, 11, 18, 19, 22, 25, 42-45, 47, 69, 70, 73, 74, 77, and 80-82  5, 12-17, 20-24, 26, 46, 48-68, 75-76, 78-79 and 83
Y	MEI et al. Enterostatin—its ability to inhibit insulin secretion and to decrease high-fat food intake. Int-J-Obes-Relat-Metab-Disord. December 1993; 17(12):701-704; Abstract	5 and 46
Y	US 2004/0204472 A1 (BRIGGS et al) 14 October 2004 (14.10.2004); para [1285], [1341], [1344] and [1345]	12-17, 24, 48-53, 79
Y <sup>A</sup>	BOWYER et al. Effect of a satiating meal on the concentrations of procolipase propeptide in the serum and urine of normal and morbidly obese subjects. Gut 1993, 34:1520-1525; Abstract; pg 1521, col 2, para 2; pg 1522, col 1, para 1	26, 54-68
Y	LIN et al. Comparisons of the effects of enterostatin on food intake and gastric emptying in rats. Brain Research 1997, 745:205-209, Abstract	20, 23, 75 and 78
Y	MEI et al. Role of intraduodenally administered enterostatin in rats; inhibition of food. Obesity Research 1996, 4:161-165; Abstract	21 and 76
Y	US 4,948,723 A (HERMON-TAYLOR et al) 14 August 1990 (14.08.1990); Abstract, col 3, ln 46-67; col 4, ln 1-2; col 6, ln 30-39	83
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 31 March 2008 (31.03.2008)		Date of mailing of the international search report <b>24 JUN 2008</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young  PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 06/47518

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Lacroix et al. Laser-induced fluorescence detection schemes for the analysis of proteins and peptides using capillary electrophoresis. Electrophoresis 2005, 26:2608-2621; Abstract, pg 2608, col 2, para 1; pg 2610, col 1, para 3; col 2 para 1; pg 2620, col 1, para 1	61-62

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 06/47518

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

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

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

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

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

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group 1: claims 1-8, 11-26, directed to a method of treating or preventing a disorder or condition associated with enterostatin deficiency in a subject, comprising administering enterostatin to the subject, wherein claim 7 is limited to SEQ ID NO: 1.

Group 2: claims 27-41, directed to a method of selecting a subject for treatment with enterostatin comprising determining the amount of enterostatin in a sample from the subject.

Group 3: claims 42-70 and 73-83, directed to a method of treating or preventing a disorder or condition associated with enterostatin deficiency in a subject, comprising a) determining the amount of enterostatin in a sample from the subject, and b) administering enterostatin to the subject, wherein claim 89 is limited to SEQ ID NO: 1.

continued in Supplemental Box

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.:  
Claims 1-8, 11-26, 42-70 and 73-83
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.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

PCT/US 06/47518

\*\*\*\*\*Supplemental Box\*\*\*\*\*

Continuation of:

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

Group 4: claims 1-7, 9, 11-26, directed to a method of treating or preventing a disorder or condition associated with enterostatin deficiency in a subject, comprising administering enterostatin to the subject, wherein claim 7 is limited to SEQ ID NO: 2.

Group 5: claims 42-69, 71 and 73-83, directed to a method of treating or preventing a disorder or condition associated with enterostatin deficiency in a subject, comprising a) determining the amount of enterostatin in a sample from the subject, and b) administering enterostatin to the subject, wherein claim 69 is limited to SEQ ID NO: 2.

Group 6: claims 1-7, 10-26, directed to a method of treating or preventing a disorder or condition associated with enterostatin deficiency in a subject, comprising administering enterostatin to the subject, wherein claim 7 is limited to SEQ ID NO: 3.

Group 7: claims 42-69 and 72-83, directed to a method of treating or preventing a disorder or condition associated with enterostatin deficiency in a subject, comprising a) determining the amount of enterostatin in a sample from the subject, and b) administering enterostatin to the subject, wherein claim 69 is limited to SEQ ID NO: 3.

The inventions listed as Groups 1-7 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding technical features for the following reasons:

As to Groups 1-3, the special technical feature of Group 2 is determining the amount of enterostatin in a sample from the subject, which is not present in Group 3 that have a special technical feature of administering enterostatin to the subject;  
the special technical feature of Group 1 is administering enterostatin to the subject, which is not present in Group 2 that has a special technical feature of determining the amount of enterostatin in a sample from the subject;  
the special technical feature of Group 3 is a) determining the amount of enterostatin in a sample from the subject and b) administering enterostatin to the subject, which is not present in Groups 1 and 3.

Finally, determining the amount of enterostatin in a sample from the subject is not an improvement over the article entitled "Plasma Enterostatin: Identification and Release in Rats in Response to a Meal" by MEI et al. (OBESITY RESEARCH July 2002, 10(7): 688-694) that teaches the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for determining a level of enterostatin in blood (pg 688, col 2). Thus, unity of invention is lacking between Groups 1-3.

As to Groups 1, 4, and 6, under PCT Rule 13.2, unity of invention exists only when there is a shared same or corresponding special technical feature making a contribution over the prior art. The common technical feature of the listed groups is a polypeptide with enterostatin activity of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, or SEQ ID NO: 3. However, this is not an improvement over the direct submission AAL40733 to GenBank by ZUBERI et al. (01-FEB-2005, Retrieved from the Internet on 11.01.2007 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=17530175>>) that teaches cofactor for pancreatic lipase encoding the pentapeptide enterostatin and comprising SEQ ID NO:1. Thus, the shared technical feature cannot function as a novel (special) technical feature to maintain unity of invention between Groups 1, 4, and 6.

As to Groups 3, 5, and 7, unity of invention between them lacking for reasons set forth for Groups 1, 4, and 6.

As to Groups 4 and 5, unity of invention between them lacking for reasons set forth for Groups 1 and 3.

As to Groups 6 and 7, unity of invention between them lacking for reasons set forth for Groups 1 and 3.

Therefore, unity of invention between Groups 1-7 is lacking, because they do not share a same or corresponding special technical feature.

## 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	3/06 (2006.01)	A 6 1 P 3/06	
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N	33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 4 5 A
C 0 7 K	7/06 (2006.01)	C 0 7 K 7/06	

(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, 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, 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, LV, 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 ペテル シー . エム . マクウィルリアムス

アメリカ合衆国 9 4 1 0 9 カリフォルニア州 サンフランシスコ ジャックソン ストリート  
1 9 1 6

Fターム(参考) 4C084 AA02 BA16 BA44 CA18 MA52 MA56 MA66 NA14 ZA422 ZC332  
ZC352  
4H045 BA09 BA13 CA42 DA30 EA30 EA50

