

(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2004-521930

(P2004-521930A)

(43) 公表日 平成16年7月22日(2004.7.22)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 37/02	4 C O 8 4
A 6 1 P 3/04	A 6 1 P 3/04	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00 1 0 5	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 47 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2002-571107 (P2002-571107)</p> <p>(86) (22) 出願日 平成14年3月14日 (2002. 3. 14)</p> <p>(85) 翻訳文提出日 平成15年9月12日 (2003. 9. 12)</p> <p>(86) 国際出願番号 PCT/US2002/007897</p> <p>(87) 国際公開番号 W02002/072149</p> <p>(87) 国際公開日 平成14年9月19日 (2002. 9. 19)</p> <p>(31) 優先権主張番号 60/275, 755</p> <p>(32) 優先日 平成13年3月14日 (2001. 3. 14)</p> <p>(33) 優先権主張国 米国 (US)</p> <p>(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR) , AU, CA, JP</p>	<p>(71) 出願人 594003676 オクラホマ メディカル リサーチ ファ ウンデーション OKLAHOMA MEDICAL RE SEARCH FOUNDATION アメリカ合衆国 オクラホマ 73104 , オクラホマ シティ, エヌ. イー. 1 3ティエッチ ストリート 825 825 N. E. 13th Stree t, Oklahoma City, Okl ahoma 73104, United States of America</p> <p>(74) 代理人 100078282 弁理士 山本 秀策</p>
---	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アジポネクチンの投与により脂肪を減少させるための方法。

(57) 【要約】

骨髄内での血液細胞生成を支持する間質細胞は、前脂肪細胞であり、そして、骨髄脂肪細胞との機能的相互作用が、長く疑われている。アジポネクチンは、脂肪細胞生成物として近年単離され、そして、C1qならびにTNFスーパーファミリーのメンバーと構造類似性を有すると示されている。このアジポネクチンは、短期間の骨髄培養において骨髄分化を抑制し、そしてまた、マクロファージ機能を阻害する。PCR分析によって、COX-2がアジポネクチンへのクローン化されたプレ脂肪細胞の曝露の際に誘導され、プロスタグランジンの放出を生じることが、明らかになった。これは、脂肪生成の阻害について重要である。なぜならば、COX-2インヒビターであるDUP-697は、アジポネクチンに対するプレ脂肪細胞の応答を遮断したからである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

脂肪細胞における脂肪または脂肪細胞の数を減少させる方法であって、該方法が、有効量のアジポネクチンを脂肪細胞または脂肪細胞を含む組織に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 2】

前記アジポネクチンが、患者に投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記アジポネクチンが、アジポネクチンのフラグメントである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記アジポネクチンが、食欲を減少させる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記アジポネクチンが、腸内送達のための処方物において投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記アジポネクチンが、非経口送達のための処方物において投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記処方物が、肺送達のためである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記アジポネクチンが、ヒトアジポネクチンであり、そして、前記脂肪細胞が、ヒト脂肪細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記脂肪細胞が、糖尿病を有する患者中に存在する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

脂肪細胞中の脂肪または脂肪細胞の数を減少させるのに有効な量のアジポネクチン投与のための、アジポネクチンおよび薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項 11】

前記アジポネクチンが、腸内投与のために処方される、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記アジポネクチンが、非経口投与のために処方される、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記アジポネクチンが、肺送達のために処方される、請求項 12 に記載の組成物。

【請求項 14】

制御性放出処方または持続性放出処方における、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記アジポネクチンが、フラグメントである、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記アジポネクチンが、ヒトアジポネクチンである、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 17】

脂肪細胞中の脂肪または脂肪細胞の数を減少させるための処方物を作製する方法であって、該方法は、薬学的キャリアを添加する工程を包含し、該処方物は、脂肪細胞または脂肪細胞を含む組織への有効量のアジポネクチンの非経口投与または腸内投与のためのものである、方法。

【請求項 18】

前記アジポネクチンが、ヒトアジポネクチンである、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記アジポネクチンが、アジポネクチンのフラグメントである、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

10

20

30

40

50

制御性放出処方または持続性放出処方としての処方物を作製する工程を包含する、請求項 17 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

(発明の背景)

本発明は、一般に、特に、アジポネクチンの投与によって、体重減少を引き起こす分野である。

【0002】

米国政府は、Paul Kincade に対する国立衛生研究所からの助成金 AI 458 64、AI 33085 および AI 20069 に起因して、本出願の権利を有する。 10

【0003】

肥満の罹患率は、大部分の先進国において流行的な割合に達しており、そして、驚くべきほどの死亡率および罹患率の統計値を有する。肥満は、潜在的に生活を脅かす多数の疾患（例えば、アテローム性動脈硬化症、高血圧、糖尿病、発作、肺塞栓症および癌）に対する十分に確立された危険因子である (Meisler J., St. Jeor S. 1996. Am J Clin Nutr. 63: 409S~411S; Bray G. 1996. Endocrin Metab Clin North Amer. 25: 907~919)。さらに、肥満は、多数の慢性状態（例えば、呼吸疾患、変形性関節症、骨粗しょう症、胆嚢疾患、および異常脂肪症）を悪化させる。この問題の大きさは、体重の増加に伴い死亡率が上昇するという事実において最も反映される。アメリカ人の 3500 万人に見られるように、一旦、肥満度指数 (BMI) が 30 kg/m^2 を超えると、50% よりも高い全死亡率が、肥満関連状態に起因する (Lee L, Paffenbarger R. 1992. JAMA. 268: 2045~2049)。年間あたり 300,000 人以上の死者に起因することで、肥満は、潜在的に予防可能な死の最も一般的な原因として、喫煙に続いて第 2 位にランクする (McGinnis J., Foegen W. 1993. MA. 270: 2207~2212)。 20

【0004】

この問題に付随する衝撃的な医学的重要性は、米国における保健医療システムに対しての厳しい財政負担である。医療費および所得喪失からの肥満およびその関連疾患についての推定の経済的影響は、680 億ドル/年を超えると報告されている (Colditz G. 1992. Am J Clin Nutr. 55: 503S~507S; Wolf A., Colditz G. 1996. Am J Clin Nutr. 63: 466S~469S; Wolf A., Colditz G. 1994. Pharmacoeconomics. 5: 34~37)。これは、体重減少食品、体重減少製品および体重減少プログラムに費やされる、年間 300 億ドルより多い金額を含まない (Wolf A., Colditz G. 1994. Pharmacoeconomics. 5: 34~37; Ezzat ほか、1992. Vital Health Stat [2]. 113)。 30

【0005】

1990 年代、米国政府は、主要な国民健康の目標として、2000 年までに人口の 20% まで、肥満の罹患率を減少させることを制定することで、危機に応答した (Public Health Service. Healthy people 2000: national health promotion and disease prevention objectives. 1990; US Department of Health and Human Services Publication PHS 90-50212)。この目標にもかかわらず、米国における体重超過の罹患率は、着実に増加しており、最近の National Health and Nutrition Examination Survey (1988~1991) では、驚くべきことに 33.0% に達した (Kuczmarski ほか、1994. JAMA. 272: 205~211)。さらに、BMI の平均はまた、この期間にわたり 0.9 kg/m^2 増加した 40 50

。この憂慮すべき傾向は、努力の欠如の結果として生じていない。対照的に、推定された、男性の25%、女性の50%および青年の44%が、任意の所定の時間で、体重を減少させようとしている(Robinsonら、J. Amer Diabetic Assoc. 93:445~449)。むしろ、過去10年にわたる31%の比率の増加、および超過体重罹患率の8%の増加は、肥満が、現今の処置に対して周知なほどに耐性であるという事実の証明である(NIH Technology Assessment Conference Panel. 1993. Ann. Intern Med. 119:764~770)。

【0006】

確立されたアプローチの長期間の失敗についての主な原因は、このアプローチの誤解に基づき、そして、肥満の機構についての乏しい理解である。従来知見は、肥満が、暴食癖の自ら招いた疾患であるということを持続していた。従って、総合的な処置プログラムは、慢性的な摂食を減少させ、そして、無数のシステムを使用して身体活性を増加させるための行動改変に焦点をあてた。これらの方法は、効力を制限し、そして、95%を超える常習率に関連している。

【0007】

短期間のアプローチの失敗は、肥満の病態生理学の解明の際になされた近年の進歩とともに、潜在的な長期間のアジュバント処置のような薬理的治療の再評価を導いている(National Task Force on Obesity. 1996. JAMA. 276:1907~1915; Ryan, D. 1996. Endo Metab Clin N Amer. 25:989~1004)。この仮定は、体重が、血圧と類似の生理学的に制御されたパラメーターであり、そして、肥満が、高血圧と類似の慢性疾患であるということである。長期(恐らく、生涯)の内科療法の目標は、体重減少と、続く健康食および運動と組合せた体重維持の両方を容易にすることである。このアプローチを評価するために、現在利用可能な薬物の長期間の効力は、非薬理的処置単独の効力に対して判断されなければならない。後者のアプローチは、処置の21週目で、8.5kgの平均体重減少を生じ、そして、患者の10%~30%において、4年で体重減少の50%を維持するだけである(Wadden T. 1993. Ann Intern Med. 119:688~693; Kramerら、1989. Int J Obes. 13:123~136)。長期間(6ヶ月よりも長い)の単一薬物(Guy-Granら、1989. Lancet. 2:1142~1144; Goldsteinら、1994. Int J Obes. 18:129~135; Goldsteinら、1993. Obes Res. 2:92~98)または組合せ治療(Weintraub M. 1992. Clin Pharmacol. Ther. 51:581~585)を評価した研究のほとんどは、体重の減少におけるプラシーボと比較した場合、適度な効力を示さない。

【0008】

脂肪代謝は、複雑である。脂肪組織に寄与する複数の機能としては、体温調節、エネルギー貯蔵、エストロゲン合成およびサイトカイン生成が挙げられる。脂肪細胞およびそれらの前駆体は、肥満に関する多くの研究の焦点であるが、これらはまた、骨髄の正常成分を構成する。実際に、脂肪細胞、造血支持間質細胞、骨芽細胞および筋細胞は、それらの組織中の共通の間葉幹細胞由来であると思われる。培養において分化の可能性を有するクロニングされた前脂肪細胞株は、分化の分子調節を理解するために、非常に価値がある。これらの前駆体から脂肪細胞形成を誘導する因子としては、インスリン、ヒドロコルチゾン、メチルイソブチルキサンチン(MIBX)およびペルオキシソーム増殖因子アクチベーターレセプター(PPAR)に対するリガンドが挙げられる。一方、多くの発見は、脂肪生成がまた、負のフィードバック機構を介して制御されることを示す。例えば、脂肪組織は、レプチン、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター1型(PAI-1)、腫瘍壊死因子(TNF-)、トランスフォーミング増殖因子型(TGF-)およびプロスタグランジンE₂(PGE₂)(脂肪細胞形成をブロックすると考えられる因子)を生成する。

10

20

30

40

50

【0009】

脂肪細胞は、正常な骨髄中で顕著であり、そして造血に影響力を有することが長い間疑われている。確かに、脂肪生成は、骨髄における細胞外マトリクスおよびサイトカインの発現を変更し、直接および間接的の両方で造血に影響する。プレ脂肪細胞 (preadipocyte) は、培養物中で血液細胞の形成を支持し、そして完全に分化した脂肪細胞は、その前駆体よりも少ないCSF-1を産生する。幹細胞因子、インターロイキン-6および白血病阻害因子の発現、ならびに造血支持活性は、間質系統由来の胚の最終的な脂肪細胞の分化と共に減少した。脂肪生成を阻害する一方で、脂肪細胞産物であるレプチンは、骨芽細胞形成および造血を促進する。

【0010】

肥満を処置または予防するために現在使用されている全ての医薬は、組織の脂肪細胞画分に指向され、そしてエネルギー利用性を減少すること、またはエネルギー出力を増加することのいずれかによって、作用する。これらの薬剤は、機構に基づいて3つのカテゴリーに分けられ得る (National Task Force on Obesity, 1996, JAMA, 276:1907~1915)。

【0011】

(エネルギー摂取の減少)

このアプローチは、食欲を減少すること、または満腹感を増進することによって、食物摂取を減少することに関する。これらの「食欲抑制」薬物は、カテコールアミン作動性の系 (アンフェタミン、ベンズフェタミン、フェンジメトラジン、フェンテルミン、マチンドール、ジエチルプロピオン、およびフェニルプロパノールアミン) またはセロトニン作動性の系 (フェンフルラミン、デキスフェンフルラミン、フルオキセチン、セルトラリン、および他の抗鬱選択的セロトニン再取り込みインヒビター [SSRI]) のいずれかに対して作用することによって、神経伝達物質活性に影響する。

【0012】

(栄養吸収の減少)

このカテゴリー中の薬物は、栄養素の消化酵素または吸収の作用を遮断する。この型の薬物の例としては、オルリスタト (orlistat) があり、これは胃および膵臓のリパーゼ活性を阻害する (Drent M., van der Veen E., 1995, Obesity Res., 3 (補遺4): 623S~625S)。これらの医薬は、米国において実験的であり、そして肥満の処理には利用不可能である。

【0013】

(エネルギー支出の増加)

エネルギー支出の増加は、代謝速度を増加すること (例えば、交感神経系の調子における変化または酸化リン酸化のアンカップリングを介して) によって、達成され得る。熱生成代謝に影響する薬物としては、エフェドリン単独またはカフェインおよび/もしくはアスピリンとの組み合わせ (Passquali R., Casimirri F., 1993, Int J Obesity, 17 (補遺1): S65~S68) ならびにBRL26830A (アドレナリン受容体アゴニスト) (Connacherら, 1992, Am J Clin Nutr., 55: 258S~261S) が挙げられる。体重制御のためのこのクラスの医薬は、FDAに認可されていない。

【0014】

現在、体重損失の促進または持続のいずれかに優れた単独の薬物レジメンは出現していない。外科的介入 (例えば、胃の分割手順、空腸回腸バイパス、および迷走神経切断) もまた、重篤な肥満を処置するために開発されている (Greenway F., 1996, Endo Metab Clin N Amer., 25: 1005~1027)。長期間の実施における利点にも関わらず、急性の危険性利益率 (risk benefit ratio) は、肥満手術におけるNIH意見協議による病的な肥満患者 (BMIが40kg/m² よりも高い) のために、これらの侵襲性手順を留保した (NIH Conference, 1991, Ann Intern Med., 115: 956~961)。故に、

10

20

30

40

50

彼らが深刻な肥満になり、そして付随する合併症に罹患しない限り、そして罹患するまで、外科的介入は過体重の患者の大半について代替的ではない。

【0015】

組織の脈管の画分に指向される肥満のための医学的処置または外科的処置は存在しない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

故に、本発明の目的は、肥満を減少するための代替の処置を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0017】

10

(発明の要旨)

近年、脂肪細胞産物として単離され、そしてC1qおよび腫瘍壊死因子(TNF)スーパーファミリーのメンバーに対する構造的類似性を有することが示されたアジポネクチン(adiponectin)は、短期間の骨髄培養における骨髄系の分化を抑制し、そしてまたマクロファージの機能を阻害する。アジポネクチンは、培養物中の脂肪生成を劇的に阻害し、アジポネクチンが、このプロセスの通常のフィードバックインヒビターであり得ることを示唆する。PCR分析によって、COX-2がアジポネクチンへのクローン化されたプレ脂肪細胞の曝露の際に誘導され、プロスタグランジンの放出を生じることが、明らかになった。これは、脂肪生成の阻害について重要である。なぜならば、COX-2インヒビターであるDUP-697は、アジポネクチンに対するプレ脂肪細胞の応答を遮断したからである。さらに、アジポネクチンに応答した脂肪細胞形成は、COX-2遺伝子破壊マウスにおいて欠損していた。対照的に、TNF- α 、TGF- β 、インターフェロンおよびリミチン(limitin)として公知のインターフェロン様サイトカインの発現は、アジポネクチンによってアップレギュレートされない。アジポネクチンは、正常な骨髄内に存在し、そしてCOX-2依存性の機構を介して骨髄由来間質細胞によって、脂肪細胞の形成を阻害し得ることが示されている。これらの知見は、プレ脂肪細胞分化を調節するための新しい機構、および造血組織における脂肪の潜在的な役割を示唆する。

20

【0018】

これらの結果は、脂肪細胞および関連する脂肪組織において脂肪を減少するためのアジポネクチンの使用を支持する。32KDのタンパク質もしくはその三量体、または機能的に等価なそのフラグメントのようなアジポネクチンは、脂肪の減少を達成するために、当業者に公知の方法を用いて、投与され得る。

30

【0019】

(発明の詳細な説明)

(I. アジポネクチン処方物)

アジポネクチンは、脂肪細胞特異的分泌タンパク質であり、造血および免疫応答における可溶性防御コラーゲンのファミリーの新メンバーである。アジポネクチンは、脂肪細胞から独占的に分泌される血漿タンパク質である。健康なヒト由来の血漿において、アジポネクチンは、1.9~17.0 μ g/mLの濃度範囲で存在する。独立して発見されたこのタンパク質の4つの群は、Acrap30、adipoQ、またはマウスおよびヒトにおいて主要な脂肪細胞制限産物を表すアジポネクチンを示した(Schererら、J. Biol. Chem. 270:26746~26749(1995);Huら、(1996)J. Biol. Chem. 271:10697~10703;Maedaら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 221:286~289(1996);Nakanoraら、J. Biochem. (Tokyo). 120:803~812(1996))。これはまた、ヒト血清から単離され、そしてGBP28といわれる。アジポネクチンの産生は、脂肪細胞へのプレ脂肪細胞の分化と共に増加し、そしてTNF- α によって阻害される。脂肪細胞は、このタンパク質を放出するために、特別な分泌区画を利用する(Bogan, J. S., およびLodish, H. F. J. Cell Biol. 146:609~620(1999))。

40

50

【0020】

アジポネクチンは、コロニー形成単位 (CFU) - 顆粒球マクロファージ、CFU - マクロファージ、およびCFU - 顆粒球からのコロニー形成を抑制するが、バースト形成単位 - 赤血球または混合された赤血球 - 骨髄CFUのコロニー形成には影響しない。アジポネクチンはまた、9株中4株の骨髄細胞株の増殖を阻害するが、1つの細胞株を除く赤血球細胞株またはリンパ球細胞株の増殖を抑制しない。これらの結果は、アジポネクチンが、骨髄単球系統の細胞の増殖を優先的に阻害することを示唆する。少なくとも1つの増殖阻害の機構が、アポトーシスを誘導する。なぜならば、アジポネクチンでの急性骨髄単球性白血病株の処置は、二倍体未満の (a u b d i p o l d) ピークの出現およびオリゴヌクレオソームDNAフラグメント化を誘導するからである。骨髄単球の前駆体の増殖を阻害することは別として、アジポネクチンは、成熟マクロファージ機能を抑制する。アジポネクチンでの培養されたマクロファージの処理は、その食作用活性およびその腫瘍壊死因子 - のリポ多糖誘導性の生成を有意に阻害する。アジポネクチンによる食作用の抑制は、補体C1qレセプター (C1qRp) の1つによって媒介される。なぜならば、この機能は、抗C1qRpモノクローナル抗体の添加によって完全に抑制されるからである (Yokota, Blood, 96: 1723 ~ 1732 (2000))。これらの観察は、アジポネクチンが造血系および免疫系において重要なネガティブレギュレーターであること、ならびにアジポネクチンがその阻害機能を介して炎症応答を終了させることに関することを示唆する。

10

【0021】

アジポネクチンは、コラーゲン様配列が続く短い非コラーゲン性N末端セグメントを含む244個のアミノ酸残基からなる。Maedaら、J. Biochem. Biophys. Res. Commun. 221 (2), 286 ~ 289 (1996) MEDLINE 96224171。アジポネクチンは、サイズおよび全体の構造が、補体タンパク質C1qに類似し、得にC末端の球状ドメインで相同性が高いホモ三量体である。アジポネクチンの結晶構造は、同じドメインとTNF - との間のさらに高い類似性を明らかにした。これらの構造的特徴は、アジポネクチンが、可溶性防御コラーゲンとして同定されたタンパク質のファミリーに属することを示唆し、そして補体C1qならびに、マンノース結合レクチン (MBL)、肺界面活性タンパク質A (SP-A)、肺界面活性タンパク質D、およびコングルチニンの集合体を含む。コレクチン (collectin) は、生得的な体液性免疫系において重要な役割を果たす。これらのタンパク質は、微生物上に特有に存在する特定の糖質構造を検出することによって外来性の病原体を同定し得、その後、食作用細胞、または抗体の関与なしに標的の殺傷およびクリアランスをもたらす補体系と相互作用する。コレクチン発現の欠損または低レベルのコレクチン発現は、特に、種々の病原体に対する特異的な免疫系が完全に発達していない乳幼児において、感染に対する感受性を増加する。

20

30

【0022】

グルコース代謝および脂質代謝に対するその影響のために、アジポネクチンは、糖尿病および肥満に適用される。以下に記載されるように、正常なヒト骨髄における褐色脂肪がこのタンパク質を含むことが、見出されている。組換えアジポネクチンは、長期間の骨髄培養物における脂肪細胞形成を遮断し、そしてクローン化間質プレ脂肪細胞の分化を阻害した。アジポネクチンはまた、これらの間質細胞によってシクロオキシゲナーゼ - 2の発現を上昇させ、そしてプロスタグランジンE₂の放出を誘導した。シクロオキシゲナーゼ - 2インヒビターであるDup - 697は、プレ脂肪細胞の分化に対するアジポネクチンの阻害作用を妨げ、間質細胞由来のプロステノイドの関与を示唆した。さらに、骨髄細胞が、B6、129S - P t g s 2 t m 1 J e d (シクロオキシゲナーゼ - 2^{+/+}) マウス由来の場合、アジポネクチンは、脂肪細胞生成を遮断し損なう。これらの観察は、プレ脂肪細胞がアジポネクチン作用についての直接的な標的を表し、脂肪調節のためのパラクリンネガティブフィードバックループを確立することを示す。これらはまた、アジポネクチンを、このプロセスにおいて重要なシクロオキシゲナーゼ - 2依存性プロスタグランジン

40

50

に連結させる。

【0023】

アジポネクチンの正常な生物学的活性は、ほとんど理解されていないが、知見は、肥満、心血管疾患および糖尿病に潜在的に関与することを示唆する。産生および循環するタンパク質濃度は、肥満のマウスおよびヒトにおいて抑制されている (Huら、*J. Biol. Chem.* 271:10697-107032 (1996); Aritaら、*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257:79-83 (1999))。低い血漿レベルは、冠状動脈性心疾患における危険因子であり得、濃度はまた、2型糖尿病において有意に減少される (Ouchiら、*Circulation* 100:2473-2476 (1999); Hottaら、*Diabetes* 50:1126-1133 (2001))。グルコースを低減させそしてインスリン耐性を逆転させるアジポネクチンの能力は、糖尿病薬物としての適用を有し得ることを示唆する (Yamauchiら、*Nat. Med.* 7:941-946 (2001); Bergら、*Nat. Med.* 7:947-953 (2001))。さらに、タンパク質分解性により切断されたアジポネクチンのフラグメントは、肥満動物における体重減少を引き起こすことが示されている (Fruebisら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:2005-2010 (2001))。このタンパク質は、少なくとも4つの細胞型を直接的にかまたは間接的に影響を及ぼす。アジポネクチンは、単球に対するその接着性が減少したことにおそらく起因して、ヒト動脈内皮細胞におけるNF- κ B媒介性シグナルを調節する (Ouchiら、*Circulation* 102:1296-1301 (2000))。このタンパク質は、骨髄前駆細胞 (progenitor cell) の分化を抑制し、そして2つの単球細胞株に対する別々の効果を有する (Yokota、*Blood* 96:1723-1732 (2000))。アジポネクチンは、これらの細胞の生存を低減させ、そしてLPS誘導性のTNF- α 産生をブロックする。これは、正常なマクロファージ上のC1qRプレセプターを利用し、食作用粒子に対するそれらの能力をブロックするようである (Yokota 2000)。アジポネクチンのインタクテナ形態または切断された形態は、処置されたマウスにおける筋肉細胞による脂肪酸酸化の増加を生じる (Fruebis 2001)。このタンパク質はまた、肝細胞において代謝変化を誘導する (Yamauchiら、2001; Bergら、2001)。さらに、アジポネクチンは、肝細胞前駆体のクローニングアッセイにおいて骨髄造血をブロックすることが見出された (Yokota 2000)。実施例は、組換えアジポネクチンが、複合体化した長期骨髄培養物 (LTBMC) における脂肪細胞形成をブロックすることを実証する。この応答は、プレ脂肪細胞 (pre-adipocyte) におけるシクロオキシゲナーゼ (COX) - 2およびプロスタグランジン (PG) の誘導により生じるようである。

【0024】

マクロファージは、炎症性サイトカインの分泌、食作用活性および抗原提示による免疫応答において重要な役割を担う。これらの結果は、アジポネクチンが、成熟マクロファージの食作用およびLPS誘導性TNF- α 発現を阻害することを示し、そしてアジポネクチンが、抗炎症性効果を有し得ることを示唆する。アジポネクチンのマクロファージ機能に対するこれらの阻害効果は、マクロファージ細胞を殺傷することに起因するのではない。なぜなら、成熟マクロファージの生存性は変化しなかったからである。アジポネクチンが、LPSで刺激されたマクロファージにおけるTNF- α 産生およびTNF- α 遺伝子発現を取り消す機構は、明らかでないままである。動力学研究は、アジポネクチンがLPSを直接中和したりLPSレセプターをブロックしたりするのではないようであることを示す。LPSによって誘導されるIL-1 β 遺伝子およびIL-6遺伝子の発現は、アジポネクチンでの処置によって影響を受けず、このことは、マクロファージに対するアジポネクチンレセプターからのシグナルが、LPS刺激によって引き起こされるTNF- α 遺伝子転写を減弱することを示唆する。いくつかのサイトカインは、マクロファージにおけるTNF- α 合成を抑制することが見出され、IL-4およびIL-10は、LPS刺激されたヒトマクロファージにおけるTNF- α 合成を阻害し得る炎症性応答を抑制する。ア

ジボネクチンとは対照的に、IL-4およびIL-10はまた、IL-1およびIL-6の合成を阻害する。TGF- β は、マクロファージにおいてプロ炎症性サイトカイン産生を阻害することが知られているが、TNF- α 分泌のその阻害は、転写後に生じる。よって、アジボネクチンは、TNF- α 転写の特異的阻害に起因して、炎症性応答の独特なサブレッサーであるようである。

【0025】

炎症に関連する生理的物質の中で、E型プロスタグランジン(PGE)は、CFU-GMおよびCFU-M由来のコロニー形成を阻害するが、BFU-E由来のコロニー形成は阻害しないことが示された。さらに、PGE₂は、TNF- α 産生を阻害するが、IL-1またはIL-2の産生を阻害しないことが報告された。アジボネクチンの標的細胞および機能は、PGEのものと同様であり、そして現在、アジボネクチンが、少なくとも1つの細胞型において、COX2のアップレギュレーションを介するPGE合成を誘導し得ることが、明らかである(以下を参照のこと)。よって、アジボネクチンは、PGEを含む機構による造血、脂質生成および免疫応答に影響し得る。

10

【0026】

アジボネクチンが脂肪細胞の産生を阻害することを示すデータに基づいて、アジボネクチンは、体重減少をもたらすに有用であり、抗炎症剤として有用である。アジボネクチンは、全体で244アミノ酸のタンパク質、または本明細書中に記載されたアッセイにおいて実証されたその活性を残すフラグメントとして投与され得る。機能的分析に基づいて、各サブユニット、およびトリマー形態が効果的であることが予想される。機能的ドメインを含むフラグメントもまた有用である。アミノ酸の保存的置換がまた、生物学的活性を優位に変化させることなくなされ得る。本明細書中で使用される場合、保存的置換とは、あるアミノ酸を同様のサイズおよび/または電荷を有する別のアミノ酸へ置換させることをいう。

20

【0027】

(B. 投与のためのキャリア/経路/手段)

薬物は、非経口的または経腸的に投与され得る。好ましい実施形態において、薬物は、必要ならば、胃を通過する間その薬物を保護するための腸溶性キャリア中で、経口的に投与され得る。送達の代替法としては、静脈内送達、腹腔内(intraperitoneal)送達、肺の送達、鼻の送達、経口腔送達または他の経膜(trans-membrane)送達、および徐放性処方物が挙げられる。

30

【0028】

アジボネクチンは、例えば、任意の医薬調製物中で別々の粒子または微粒子の形態をとり得るような様式で吸収されたか、吸収されてそこに接着されたか、分散されたかまたは懸濁された特定の物質、ならびに/あるいは、キャリア(例えば、軟膏、ゲル、ペースト、ローションまたはスプレー)中に懸濁または溶解された特定の物質と、任意の物理的形態で「結合」され得る。

【0029】

アジボネクチンは、通常薬学的に受容可能なキャリアと組合わせて投与される。薬学的キャリアは、当業者に公知である。適切なキャリアは、典型的には、投与の様式に基づいて選択される。薬学的組成物はまた、1つ以上の活性成分(例えば、抗微生物剤、抗炎症性剤および鎮痛剤)を含み得る。

40

【0030】

非経口投与または注射による投与のための調製物は、滅菌した水溶液または非水溶液、懸濁物およびエマルジョンを含む。非水性溶媒の例としては、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油(例えば、オリーブ油)、および注入可能な有機エステル(例えば、エチルオレート)が挙げられる。水性キャリアとしては、水、アルコール/水溶液、エマルジョンまたは懸濁物(生理食塩水および緩衝化媒体を含む)が挙げられる。好ましい非経口ピヒクルとしては、塩化ナトリウム水溶液、デキストロースリンガー液(Ringer's dextrose)、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸リ

50

ンガー液 (lactated Ringer's)、または不揮発性油が挙げられる。静脈内ビヒクルとしては、流体および栄養素の補充物 (replenisher) ならびに電解質の補充物 (例えば、デキストロースリンガー液に基づくもの) が挙げられる。

【0031】

局所 (口、肺、鼻、膣または直腸を含む粘膜表面への適用を含む) 投与のための処方物は、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、ドロップ、坐剤、スプレー、液体および粉末を含み得る。これらの適用のための処方物は、公知である。例えば、薬物またはポリマーもしくは界面活性剤と組合わせた薬物から構成される、1~3ミクロンの空力 (aerodynamic) 直径を有する粒子を有する粉末を処方するためにスプレー乾燥を典型的に使用して、多くの肺処方物が、開発されている。

10

【0032】

経口投与のための組成物としては、粉末もしくは顆粒、水もしくは非水性媒体中の懸濁物もしくは溶液、カプセル、サシェ、または錠剤が挙げられる。シックナー、香味料、希釈剤、乳化剤、分散補助剤または結合剤が、好ましい。

【0033】

本明細書中で記載される場合、ペプチドがまた、無機酸 (例えば、塩酸、臭化水素酸、過塩素酸、硝酸、チオシアン酸、硫酸およびリン酸) と有機酸 (例えば、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、乳酸、ピルビン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、およびフマル酸) との反応、または無機塩基 (例えば、水酸化ナトリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カリウム) と有機塩基 (例えば、モノアルキルアミン、ジアルキルアミン、トリアルキルアミンおよびアリアルアミン、ならびに置換エタノールアミン) との反応、によって形成される薬学的に受容可能な酸付加塩または塩基付加塩として、投与され得る。

20

【0034】

徐放性または持続性 (controlled or sustained release) のための多くの処方物が公知であり、そして市販されている。これらは、典型的には、薬物の徐放性を提供するために作製される生分解性ポリマー材料またはポリマー材料で構成される。徐放性組成物は、好ましくは、微粒子処方物である。微粒子は、好ましくは、加水分解によって分解する生分解性、生体適合性のポリマー (例えば、ポリラクチド) を含む。微粒子系に加えて、他の徐放性の注入可能または移植可能な処方物が使用され得る。分解可能な賦形剤または分解不可能な賦形剤が、注入可能または移植可能な徐放性処方物の処方において使用され得るが、分解可能な賦形剤が好ましい。本明細書中で使用される場合、用語「微粒子」は、ミクロスフェアおよびマイクロカプセルを含む。微粒子は、好ましくは、生分解性および生体適合性であり、そして必要に応じて、化合物の送達について制御された速度で生分解され得る。この粒子は、種々のポリマー性材料および非ポリマー性材料で作製され得る。

30

【0035】

微粒子は、任意の生体適合性のポリマー、コポリマー、または混合物、好ましくは、生分解性のポリマー、コポリマー、または混合物を含み得る。適切なポリマーとしては、ポリヒドロキシ酸、ポリオルソエステル、ポリラクトン、ポリカーボネート、ポリホスファゼン、ポリサッカリド、タンパク質、ポリアンヒドリド、これらのコポリマーおよびこれらの混合物が挙げられる。適切なポリ (ヒドロキシ酸) としては、ポリグリコール酸 (PGA)、ポリ乳酸 (PLA) およびこれらのコポリマーが挙げられる。好ましくは、微粒子は、ポリ (D, L-乳酸) および/またはポリ (D, L-乳酸-コ-グリコール酸) (PLGA) を含む。好ましい材料は、ポリラクチドである。

40

【0036】

微粒子は、単一または二重のエマルジョン溶媒蒸発、スプレー乾燥、溶媒抽出、溶媒蒸発、相分離、単一および複合体のコアセルベーション、界面重合、および当業者に周知の他の方法を使用して、調製され得る。薬物送達のためのミクロスフェアを作製するために開発された方法は、文献 (例えば、Doubrow, M. 編、「Microcapsule

50

s and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy」CRC Press, Boca Raton, 1992)に記載されている。マイクロフェアを作製する方法について、Ticeらに対する米国特許第5,407,609号、およびHerbertらに対する米国特許第5,654,008号もまた参照のこと。

【0037】

微粒子系に加えて、偽妊娠を誘導する化合物を送達するために適切な他の制御された放出をする注射可能処方物または移植可能処方物は、使用され得る。分解可能な賦形剤および分解不能な賦形剤の両方は、注射可能または移植可能な制御された放出をする処方物の処方において使用され得るが、分解可能な賦形剤が、好ましい。

10

【0038】

注射可能な処方物の例としては、油状賦形剤およびろう状賦形剤を用いて調製された典型的なデポー（depot）処方物（例えば、Depot ProveraTMに類似）および酢酸スクロースイソブチレートまたは生分解性ポリマーを用いて調製されたインサイチュゲル化系のようなものが挙げられる。移植可能な処方物の例としては、ウシにおける増殖プロモーターの制御された放出について使用される処方物のような圧縮錠剤処方物（例えば、SynovexTM）、およびCompudoseTM（エストラジオールを含有する薬物を添加したシリコンゴムの薄層で被覆されたシリコンゴムコア）が挙げられる。1つの実施形態において、生分解性ゲルおよび/または生分解性移植物が、使用され得る。

20

【0039】

適切な処方物は、上記の任意のアプローチおよび代表的な薬学的賦形剤を使用して当業者によって開発され得る。

【0040】

（C．投薬：）

アジポネクチン（adiponectin）は、脂肪細胞もしくはそれに関連した組織の大きさおよび/または増殖を調節するために有効な量で投与される。この有効量は、代表的には、脂肪細胞の脂肪含量もしくは脂肪細胞の生存度もしくは細胞形成もしくは増殖を制限するか、または脂肪組織を減少させるのに効果的な量である。本明細書中において使用される組成物は、患者を処置するために有効量のアジポネクチンを含み、実質的に全身毒性もなく所望の調節を達成する。

30

【0041】

（II．処置の方法）

（A．提案される処置スケジュール）

アジポネクチンインヒビターは、脂肪含量および/または脂肪細胞の数の減少をもたらす量ならびに期間で投与される。この後者は、アポトーシス、それ程分化していない細胞の分化の減少、および/または増殖の減少によって減少され得る。肥満症の処置についての好ましい実施形態において、患者は、体重を維持レベルまで減少させるのに効果的な投薬で1日に1度薬物を受ける。

【0042】

（B．患者のタイプ）

処置方法は、正常な過体重の個体および遺伝的欠陥を有する個体の両方に適用可能であるべきである。この方法はまた、ホルモン性欠陥もしくは代謝性欠陥または薬物の副作用に起因する体重増加に関わるほとんどの場合において有用である。体脂肪の減少の促進に加えて、除脂肪体重の維持および長期投与の間に体重減少を持続し得るが、処置の他の利点は、肥満関連糖尿病において血中グルコースレベルの正常化を含み、そしてまた食欲を減少させるために（すなわち、食欲抑制剤として）使用され得る。

40

【0043】

本発明は、さらに、以下の非限定的な例に対する参照によって理解される。

【実施例】

50

【0044】

(実施例1: アジポネクチンは、LTBM Cにおいて脂肪細胞形成を阻害する)

(方法および材料)

(組換えアジポネクチンの作製および特徴付け)

ヒト組換えアジポネクチンは、Aritaら、1999によって記載されるように調製された。簡単には、ペプチドリーダー欠損タンパク質をコードする693-bpのアジポネクチンcDNAを、pET3c発現ベクター中にサブクローン化し、そして宿主E. coli (BL21 (DE3) pLysS)を形質転換するために使用した。組換えアジポネクチンの合成を、イソプロピルチオ-D-ガラクトシドによって誘導した。細菌細胞を、ペレット化し、50mM Tris-HCl (pH 8.0)およびTriton X-100 (最終濃度0.2%)で1時間懸濁し、そして超音波処理した。懸濁した緩衝液を、遠心分離し、次いでペレットを、同じ溶液で洗浄した。このペレットを、沈澱させ、そして7M Guanidinium HClおよび1% β-メルカプトエタノールを含有する100mM Tris-HCl (pH 8.0)で可溶化した。可溶化したタンパク質を、200容量の2M尿素、20mM Tris-HCl (pH 8.0)の存在下で、4℃で3日間リフォールディングさせた。リフォールドしたタンパク質を、遠心濾過により濃縮し、20mM Tris-HCl (pH 8.0)で透析し、そして20mM Tris-HCl (pH 7.2)で平衡化し、NaCl (0~1M)の線形勾配を用いるDEAE-5PWイオン交換高性能液体クロマトグラフィー(Toso, Japan)によって精製した。アジポネクチンの純度を確認するために、SDS-PAGEおよびアジポネクチン特異性モノクローナル抗体を用いるウエスタンブロットティングを使用した。アジポネクチンの多量化形態およびそれらの式量の分布を、Superdex 200 HR 10/30カラム(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)を用いるゲル濾過クロマトグラフィーによって試験した。組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)をまた、E. coliから調製し、そしてコントロールとして用いた。このタンパク質を、PBSで透析し、そして培養物中10μg/mlの濃度で使用した。細胞の超音波処理工程の後、全ての手順を、エンドトキシンのない緩衝液中で実施し、そして最終のエンドトキシン濃度を、Limulus Amebocyte Lysate Pyrogen Plus (BioWhittaker, Walkersville, MD)によって調べ、0.07 EU/ml未満であった。

10

20

30

【0045】

(試薬)

ヒトインスリンを、Roche Diagnosis (Mannheim, Germany)から購入した。MIBXを、Sigma (St. Louis, MO)から購入した。PGE₂およびDup-697を、Cayman Chemical (Ann Arbor, MI)から購入し、 1×10^{-6} M濃度で使用した。

【0046】

(組織、細胞およびマウス)

正常ヒト骨髓を、インフォームドコンセントとともに健康な若年ボランティアの後腸骨稜からの生検によって収集し、アジポネクチンの免疫組織化学分析のために使用した。BM S2細胞および3T3-L1細胞を、10%ウシ胎仔血清(FCS)(Hyclone, Logan, Utah)を補充したD-MEM(高グルコース)中で維持した。MS5細胞を、10%FCSを補充したD-MEM培地中で維持した。3~6週齢のBalb/cマウスを、Charles Rivers Breeding Laboratories (Wilmington, ME)から入手した。B6,129S-Ptgs2tm1Jed(COX-2^{+/+})マウスおよびC57BL/6マウス(3~5週齢)を、Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME)から購入した。これらの実験において、高い死亡率および入手困難性が、ホモ接合のCOX^{+/+}動物の使用を不可能にしたが、単一の標的化対立遺伝子は、アジポネクチンに対する前脂肪細胞の応答を抑制した。

40

50

【0047】

(骨髄におけるアジポネクチン発現)

アジポネクチンタンパク質の発現を、9108モノクローナル抗体を用いる間接免疫蛍光法によって正常ヒト骨髄検体において試験した。RT-PCRを、総ヒト骨髄RNA (CLONTECH, Palo Alto, CA) から購入したcDNA中のアジポネクチン転写物を検出するために使用した。このオリゴヌクレオチドプライマーは、アジポネクチンについて、5' - TGT T G C T G G G A G C T G T T C T A C T G - 3' (配列番号1) および5' - A T G T C T C C C T T A G G A C C C A A T A A G - 3' (配列番号2)、ならびに - アクチンについて、5' - C C A T C C T G C G T C T G G A C C T G - 3' (配列番号3) および5' - G T A A C A G T C C G C C T A G A A G C - 3' (配列番号4)であった。

【0048】

(LTBM C)

骨髄性細胞の形成を支持するLTBM C (Dexter cultures) を、公開された方法によって惹起し、そして維持した (Dexter, T. M. および Testa, N. G. Methods Cell Biol. 14: 387 ~ 405 (1976))。正常Balb/cマウスの骨髄細胞 (12×10^6) を、 25 cm^2 フラスコにおいて5% CO₂ 中33 で培養した。MEMから構成される培地を、100 nM ヒドロコルチゾンおよび20% ウマ血清 (HyClone) で補充した。培養物を、培養物の惹起の始めおよびその後6週間にわたって毎週、アジポネクチンまたはウシ血清アルブミン (BSA) で処理した。いくつかの実施形態において、アジポネクチンを、培養6週間後の培地から取り除き、そして培地のみでさらに6週間維持した。

【0049】

(RT-PCR)

総RNAを、TRIzol Reagent (GIBCO-BRL, Grand Island, NY) を用いて種々の期間アジポネクチンで処理したMS5細胞またはBMS2細胞から単離し、そしてDEPCで処理した水中に懸濁させた。総RNAをDNase (GIBCO-BRL) で処理した後、cDNAを、ランダムな6量体およびモロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素 (GIBCO-BRL) を用いて作製した。PCRについて、上記の10 μ l のRT混合物を、PCR緩衝液 (1.5 mM MgCl₂, 1U Taqポリメラーゼ (Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut)、2 mM の各dNTP、ならびに関連するセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーを含有する) に添加した。PCR反応混合物中のDNAを、25 ~ 35 サイクル (94 で1分間、55 で2分間、および72 で3分間) を用いて増幅させた。これらの反応について使用したオリゴヌクレオチドプライマーは、COX-2について、5' - G C A A A T C C T T G C T G T T C C A A T - 3' (配列番号5) および5' - G G A G A A G G C T T C C C A G C T T T T - 3' (配列番号6)、ならびにCOX-1について、5' - C C C A G A G T C A T G A G T C G A A G G A G - 3' (配列番号7) および5' - C A G G C G C A T G A G T A C T T C T C G G - 3' (配列番号8) であった。TNF-、TGF-、インターフェロン (IFN) - / /、およびリミチン (limitin) についてのプライマーもまた、調製し、そしてこの研究において使用した。

【0050】

(ノザンプロット分析)

ポリ(A)⁺ mRNAを、オリゴ(dT)カラム (Ambion Inc, Austin, TX) を用いて望ましいサンプルから調製した。ポリ(A)⁺ mRNAのアリコート (2 μ g) を、ホルムアミドおよびホルムアルデヒド中65 で変性させ、ホルムアルデヒド含有アガロースゲル上で電気泳動した。ナイロン膜 (MSI, Westborough, MA) への毛細管移動の後、RNAを、UV曝露によって架橋した。CCAAT/エンハンサー結合タンパク質 - (C/EBP -) および脂肪細胞P2 (aP2) につい

でのcDNAプローブを、それぞれResGenTM Invitrogen (Huntsville, AL)およびAmerican Type Culture Collection (Manassas, VA)から入手した。PPAR-、COX-1およびCOX-2に対応するサイズを有するプローブを、PCR産物として調製し、そして全てのプローブを、Amersham Pharmacia Biotechから購入したランダムプライム標識化システム (Redi PrimeTM II)を用いて [³²P]dCTPで放射標識した。

【0051】

(PGE₂ についての酵素 - イムノアッセイ)

24ウェルプレート中で調製したコンフルーエントなMS5細胞またはBMS2細胞を、アジポネクチンがあるかなしかの500 μlの培地中でインキュベートした。これらの培養物由来の上清を、Cayman Chemicalから購入した酵素 - イムノアッセイキットを用いてPGE₂ の存在について試験した。

10

【0052】

(脂肪細胞分化)

BMS2細胞の脂肪細胞への分化を、5 μg/mlのインスリンおよび0.5 mMのMIBXで10日間処理することによって達成した。MS5細胞の脂肪細胞への分化を、5 μg/mlのインスリンのみで15日間処理することによって達成した。培養物を、培養開始時からアジポネクチン (adiponectin)、PGE₂、またはDup-697で処理した。この段階の終わりに、培養物を撮影し、次いで脂肪細胞分化の脂肪蓄積表示を検出するために、ニールレッドで染色した。分化の程度を、フローサイトメトリー (FACScan; Becton-Dickinson, San Jose, CA)によって推定した。

20

【0053】

(接着性骨髄細胞培養物)

接着性骨髄細胞培養物を、ヘテロ接合性ノックアウトCOX-2^{+/-}マウスまたは正常C57BL/6マウスを用いて設定した。BM細胞を、6 mlのデクスター培養培地あたり2 × 10⁵ 個懸濁させ、そして25 cm² のフラスコに播種した。この細胞濃度によって、骨髄製細胞の増殖なしに、接着性間質層が生じる。培養物を、培養開始時およびその後6週間、毎週、アジポネクチンまたはBSAで処理した。

30

【0054】

(結果)

成人骨髄 (胎児組織および新生児組織に類似) は、褐色脂肪を含む。アジポネクチンは、もともと皮下脂肪 (subcutaneous white fat) の産物として発見され、RT-PCRを使用して、成人骨髄においても発現するかを決定した。このアジポネクチン特異的プライマーは、正常な成人骨髄cDNAからの増幅産物を生じた。増幅の特異性をPCR産物の配列決定によって確認した。アジポネクチン特異的モノクローナル抗体をまた使用して、タンパク質が、ヒト骨髄に存在するかを決定した。この組織中の大量の脂肪細胞に関連する特異的な染色が、見出された。

【0055】

単量体組換えアジポネクチンは、32 kDの見かけの分子量を有する。非還元性条件下でのSDS-PAGEによるさらなる64 kDのバンドおよびかすかな96 kDのバンドがまた、観察され、これらは、それぞれ二量体アジポネクチンおよび三量体アジポネクチンに対応した。102 kDのマーカー上では、バンドは検出されなかった。64 kDおよび96 kDのバンドは、還元性条件下において消失し、32 kDのバンドのみが残った。アジポネクチン特異的モノクローナル抗体は、ウェスタンブロットによって両条件において全てのバンドを認識した。三量体よりも大きい多量体構造は、SDS-PAGEによって検出されなかったが、ゲル濾過クロマトグラフィーは、三量体を超える式量を有する組換えアジポネクチンの広範な分布を示した。この多量体特徴は、ヒト血漿中のネイティブのアジポネクチンと一致し (Arita 1999)、そしてネイティブのACRP30も

40

50

しくは組換え ACRP30、アジポネクチンのマウスホモログと一致した (Schererら、J. Biol. Chem. 270: 26746 - 26749 (1995); Fruebisら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98: 2005 - 2010 (2001))。

【0056】

アジポネクチンが、血球形成に影響したか否かを決定するために、LTBM Cを、この因子の存在下および非存在下において設定した。典型的には、脂肪細胞が接着層ではっきりと見える、骨髄細胞生成に好ましい条件を選択した。骨髄造血に対する影響は見られなかったが、培地中のアジポネクチンの封入は、完全に脂肪細胞形成を阻害した。タンパク質を除去する場合に、このタンパク質のネガティブな影響は、可逆的であり、そして正常な数の脂肪細胞が産生された。どの細胞がアジポネクチンによって影響を受けるかを決定し、潜在的な調節機構を探索するためにさらなる研究を行った。

10

【0057】

骨髄培養物は、線維芽細胞、脂肪細胞、マクロファージおよび内皮細胞からなる接着性間質層との相互作用によって成熟する造血細胞の複合混合物を提示する。3回の前脂肪細胞株での実験は、前脂肪細胞が骨髄培養物中のアジポネクチンの1つの標的であり得ることを示唆した。インスリンを脂肪生成誘導化薬剤として加えた場合、3T3-L1細胞株は、脂肪細胞を急速に産生し、そしてこの応答は、アジポネクチンによってごくわずかに阻害された。しかし、実質的な抑制を、MS5クローンおよびBMS2クローンによって見出した(以下を参照のこと)。これらの実験は、前脂肪細胞が、この脂肪細胞生成の直接的な標的であり得ることを示す。

20

【0058】

(実施例2:アジポネクチンは、シクロオキシゲナーゼ-2およびPGE₂の合成を誘導する)

TNF-、TGF-、インターフェロンおよびPGE₂は、脂肪細胞生成を阻害することが以前に示された、脂肪細胞産物である。従って、これらの誘導をRT-PCR分析によって、アジポネクチン処理した前脂肪細胞についてスクリーニングした。TNF-またはインターフェロンに対応する転写は、アジポネクチンを培養物に加えた場合でさえもMS5細胞中で検出不可能であった。決められた範囲内のTGF-、インターフェロン / /、および新規のインターフェロン様サイトカインの基底発現は、RT-PCRによって検出可能であったが、明らかにアジポネクチンに影響されなかった。対照的に、COX-1ではなく、COX-2の転写物は、MS5またはBMS2間質細胞クローンのいずれかのアジポネクチン処理によって上方制御されたことが、一貫して見出された。これらの知見を、ノーザンブロット分析によって確認した。PGE₂は、脂肪生成を阻害することが知られており、そしてその産生のためのCOX-2に依存する基質である。従って、BMS2細胞またはMS5細胞を、アジポネクチンまたはBSAのいずれかを加える前に、コンフルエンスさせた。これらの培養物の上清中のPGE₂濃度を、指定時間において、ELISAによって評価した。アジポネクチンは、一貫して、PGE₂分泌の約2倍の増加を引き起こした。従って、プロスタグランジン合成は、アジポネクチンによる脂肪合成の阻害についての潜在的な機構を示す。

30

40

【0059】

(アジポネクチンに対する前脂肪細胞の応答は、COX-2を必要とする)

2つの実験アプローチを使用して、アジポネクチンによる脂肪細胞形成の阻害についてのCOX-2の重要性を評価した。BMS2細胞をMIBXおよびインスリンと共に培養して強力な脂肪細胞形成を誘導し、そしてこの応答を、培地中へのPGE₂の封入によって予想されるようにブロックした。アジポネクチンはまた、脂肪生成をブロックしたが、その一方、コントロールGST融合タンパク質は、影響を受けなかった。アジポネクチンによる阻害は、特異的COX-2インヒビターであるDup-697が存在する場合、観察されなかった。Dup-697のみの封入は、脂肪細胞形成に影響を及ぼさなかった。目に見える脂肪の液滴の蓄積は、PGE₂またはアジポネクチンによってブロックされたが

50

、インスリンとM I B Xの組み合わせはなお、培地のみでの培養物中の形態学変化と比較して、接着層における形態学変化を引き起こす。従って、同じ培養物のフローサイトメトリーおよびナイルレッド染色を使用して、顕微分析を延長した。インスリンおよびM I B Xに誘導された脂肪蓄積は、P G E₂またはアジポネクチンのいずれかによって完全にブロックされた。アジポネクチンに対する応答を、C O X - 2インヒビターの封入によって実質的にブロックした。脂肪細胞遺伝子発現分析によって細胞形態学および脂肪蓄積結果を確認した。脂肪形成のために重大なC / E B P - およびP P A R - の2つの転写因子は、B M S 2前脂肪細胞においては、弱く発現されただけであったが、インスリンおよびM I B Xによって激しく誘導された。P G E₂またはアジポネクチンのいずれかは、これらの増加を強力に阻害し、そしてD u p - 6 9 7はさらに、アジポネクチンによる誘導を抑制した。この結果は、脂肪細胞選択性脂肪酸結合タンパク質a P 2の転写物と非常に類似であった。

10

【0060】

次いで、接着性骨髄細胞培養物を、野生型マウスまたはヘテロ接合性ノックアウトC O X - 2^{+ / -}マウスを用いて、大量の脂肪細胞の形成に好ましい条件下で調製した。アジポネクチンは、正常C 5 7 B L / 6骨髄の培養物中で脂肪生成をブロックしたが、C O X - 2^{+ / -}動物由来の細胞に対しては最小限度の効果が存在した。これらの結果は、アジポネクチンが、C O X - 2の誘導を必要とする機構を介して、脂肪細胞前駆体からの脂肪細胞の形成を直接的にブロックすることの強い証拠を提供する。

【0061】

このデータは、C O X - 2依存性プロスタノイド経路が、脂肪細胞形成におけるアジポネクチンの抑制性活性に重要であることを示す。アジポネクチンに対するC O X - 2^{+ / -}マウスからの前脂肪細胞の応答は、無視できた。生存性の乏しいホモ接合性C O X - 2^{+ / -}マウスは、実験中にそれらの使用が不可能となり、そしてヘテロ接合体のアジポネクチン無応答性は、実質的な遺伝子線量効果を示唆する。さらに、C O X - 2阻害性化合物は、クローン化された前脂肪細胞の培養物中の脂肪細胞形成の阻害をブロックした。C O X - 2は、炎症誘発性(p r o - i n f l a m m a t o r y)サイトカインまたはホルモン応答して中で誘導され、そしてP Gの生合成における律速酵素である。これは、アラキドン酸のP G H₂への変換を媒介し、続いて、特定の合成によって種々のP Gに転換される。P Gは、複雑な方法で脂肪細胞形成に寄与するようである。例えば、2つの主用なP G (P G E₂およびプロスタサイクリン(P G I₂))は、脂肪細胞によって合成され、脂肪生成と反対の作用を有するようである。P G E₂は、c A M P産生を減少することによって、脂肪細胞の発達をネガティブに調節することが示された。逆に、P G I₂は、脂肪細胞アゴニストとして提案される。このデータは、骨髄脂肪細胞分化に対するP G E₂の抑制効果を確認し、そしてさらに、アジポネクチンが有する脂肪生成に対する抑制作用への重要な寄与を示す。脂肪細胞の発達に影響を及ぼす他のP Gとしては、P G J₂が挙げられ、これは、脂肪生成転写因子P P A R - についての重要なリガンドである。このプロスタグランジンは、脂肪細胞分化を促進する。対照的に、P G F₂は、3 T 3 - L 1細胞の脂肪生成分化を阻害する。さらに、逆の作用を有するP Gが、P G H₂(C O X - 2産物)から合成される。この3 T 3 - L 1株は、インスリンが唯一の誘導因子である標準的な培養培地中で脂肪細胞を産生し、そしてこの分化は、アジポネクチンまたはP G E₂のいずれかを加えることによって最小限に影響を受けた。3 T 3 - L 1細胞のアジポネクチン感受性前脂肪細胞との比較は、誘導性遺伝子について参考になるべきであり、そして正常組織中の脂肪細胞における機能的異質性を明らかにすることができた。

20

30

40

【0062】

他の2つの脂肪細胞産物であるアグーチおよびアンジオテンシンI I (A G T I I)は、肥満に、ポジティブに寄与することが知られている。アグーチは、カルシウム流入依存性様式(c a l c i u m - i n f l u x d e p e n d e n t m a n n e r)において培養された脂肪細胞中で、脂肪酸およびトリグリセリド合成を誘導する。A G T I I発現は、栄養的に調節され、高脂肪食および多量の脂肪を併せ持つ脂肪酸に伴って増加する

50

。アジボネクチン発現はまた、食事制限によって影響を受けるが、その傾向は、A G T I I の発現に関しては反対である (Y a m a u c h i ら 2 0 0 1) 。 A G T I I は、成熟脂肪細胞からの P G I ₂ の放出を刺激することによって、脂肪細胞分化を促進する。従って、P G 合成は、脂肪細胞分化における脂肪細胞産物のパラ分泌作用に不可欠な役割を担うようである。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
19 September 2002 (19.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/072149 A1

- (51) International Patent Classification: A61K 47/00 (74) Agents: PABST, Patrea, L. et al.; Holland & Knight LLP,
One Atlantic Center, 1201 West Peachtree Street, Suite
2000, Atlanta, GA 30309-3400 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/07897
- (22) International Filing Date: 14 March 2002 (14.03.2002) (81) Designated States (national): AU, CA, JP.
- (25) Filing Language: English (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE,
CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR).
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/275,755 14 March 2001 (14.03.2001) US Published:
— with international search report
before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments
- (71) Applicant: OKLAHOMA MEDICAL RESEARCH
FOUNDATION [US/US]; 825 N.E. Thirteenth Street,
Oklahoma City, OK 73104 (US).
- (72) Inventors: KINCADE, Paul, W.; 1229 Glenbrook Ter-
race, Nichols Hill, OK 73116 (US). YOKUTA, Takafumi;
311 Hood Court, Norman, OK 73072 (US).
For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/072149 A1

(54) Title: METHODS FOR REDUCING FAT BY ADMINISTRATION OF ADIPONECTIN

(57) Abstract: The stromal cells that support blood cell production within bone marrow are pre-adipocytes and functional interactions with marrow fat cells have long been suspected. Adiponectin was recently isolated as an adipocyte product and shown to have structural similarities to C1q as well as members of the TNF superfamily. It suppresses myeloid differentiation in short term bone marrow cultures and also inhibits macrophage functions.

**METHODS FOR REDUCING FAT BY
ADMINISTRATION OF ADIPONECTIN**

Background of the Invention

- 5 The present invention is generally in the field of causing weight loss, specifically by administration of adiponectin.
- The United States government has rights in this application by virtue of grants AI 45864, AI 33085, and AI 20069 from the National Institutes of Health to Paul Kincade.
- 10 The prevalence of obesity has reached epidemic proportions in most developed countries and carries with it staggering mortality and morbidity statistics. Obesity is a well established risk factor for a number of potentially life-threatening diseases such as atherosclerosis, hypertension, diabetes, stroke, pulmonary embolism, and cancer. (Meisler J., St. Jeor S. 1996. *Am J Clin Nutr.* 63:409S-411S; Bray G. 1996. *Endocrin Metab Clin North Amer.* 25:907-919). Furthermore, it complicates numerous chronic conditions such as respiratory diseases, osteoarthritis, osteoporosis, gall bladder disease, and dyslipidemias. The enormity of this problem is best reflected in the fact that death rates escalate with increasing body weight. More than 50% of all-cause mortality is attributable to obesity-related conditions once the body mass index (BMI) exceeds 30 kg/m², as seen in 35 million Americans. (Lee L, Paffenbarger R. 1992. *JAMA.* 268:2045-2049). By contributing to greater than 300,000 deaths per year, obesity ranks second only to tobacco smoking as the most common cause of potentially preventable death. (McGinnis J., Foege W. 1993. *MA.* 270:2207-2212).
- 15 Accompanying the devastating medical consequences of this problem is the severe financial burden placed on the health care system in the United States. The estimated economic impact of obesity and its associated illnesses from medical expenses and loss of income are reported to be in excess of \$68 billion/year. (Colditz G. 1992. *Am J Clin Nutr.* 55:503S-507S; Wolf A., Colditz G. 1996. *Am J. Clin Nutr.* 63:466S-469S; Wolf A., Colditz G. 1994. *Pharmacoeconomics.* 5:34-37). This does not include the greater
- 20
- 25
- 30

WO 02/072149

PCT/US02/07897

than \$30 billion per year spent on weight loss foods, products, and programs. (Wolf A., Colditz G. 1994. *Pharmacoeconomics*. 5:34-37; Ezzati, et al.1992. *Vital health Stat* [2]. 113).

5 In 1990, the US government responded to the crisis by establishing
as a major national health goal the reduction in the prevalence of obesity to
(20% of the population by the year 2000. (Public Health Service. *Healthy
people 2000: national health promotion and disease prevention objectives*.
1990; US Department of Health and Human Services Publication PHS 90-
50212) In spite of this objective, the prevalence of overweight people in the
10 United States has steadily increased, reaching an astounding 33.0% in the
most recent National Health and Nutrition Examination Survey (1988-1991).
(Kuczmarski, et al. 1994. *JAMA*. 272:205-211). Furthermore, the mean
BMI has also increased over this period by 0.9 kg/m². This alarming trend
has not occurred as the result of lack of effort. On the contrary, an estimated
15 25% of men, 50% of women, and 44% of adolescents are trying to lose
weight at any given time. (Robinson, et al. *J Amer Diabetic Assoc*. 93:445-
449). Rather, the 31% increase in rate and 8% increase in overweight
prevalence over the past decade is a testimony of the fact that obesity is
notoriously resistant to current interventions. (NIH Technology Assessment
20 Conference Panel. 1993. *Ann Intern Med*. 119:764-770).

A major reason for the long-term failure of established approaches
is their basis on misconceptions and a poor understanding of the mechanisms
of obesity. Conventional wisdom maintained that obesity is a self-inflicted
disease of gluttony. Comprehensive treatment programs, therefore, focused
25 on behavior modifications to reduce caloric intake and increase physical
activity using a myriad of systems. These methods have limited efficacy and
are associated with recidivism rates exceeding 95%.

Failure of short-term approaches, together with the recent progress
made in elucidating the pathophysiology of obesity, have lead to a
30 reappraisal of pharmacotherapy as a potential long-term, adjuvant treatment.
(National Task Force on Obesity. 1996. *JAMA*. 276:1907-1915; Ryan, D.
1996. *Endo Metab Clin N Amer*. 25:989-1004). The premise is that body

WO 02/072149

PCT/US02/07897

weight is a physiologically controlled parameter similar to blood pressure, and obesity is a chronic disease similar to hypertension. The goal of long-term (perhaps life-long) medical therapy would be to facilitate both weight loss and subsequent weight maintenance in conjunction with a healthy diet and exercise. To assess this approach, the long-term efficacy of currently available drugs must be judged against that of non-pharmacological interventions alone. The latter approach yields an average weight loss of 8.5 kg at 21 weeks of treatment and only maintains 50% of the weight reduction at 4 years in 10-30% of the patients. (Wadden T. 1993. *Ann Intern Med.* 119:688-693; Kramer, et al.1989. *Int J Obes.* 13:123-136). The few studies that have evaluated long-term (greater than 6 months) single-drug (Guy-Gran, et al. 1989. *Lancet.* 2:1142-1144; Goldstein, et al. 1994. *Int J Obes.* 18:129-135; Goldstein, et al. 1993. *Obes Res.* 2:92-98) or combination therapy (Weintraub M. 1992. *Clin Pharmacol. Ther.* 51:581-585) show modest efficacy compared with placebo in the reduction of body weight.

Fat metabolism is complicated. Multiple functions attributed to adipose tissue include thermoregulation, energy storage, estrogen synthesis and cytokine production. While fat cells and their precursors have been the focus of many studies involving obesity, they also constitute a normal component of bone marrow. Indeed, adipocytes, hematopoiesis-supporting stromal cells, osteoblasts and myocytes appear to derive from common mesenchymal stem cells in that tissue. Cloned preadipocyte lines with the potential for differentiation in culture have been extremely valuable for understanding the molecular regulation of differentiation. Agents that induce fat cell formation from these precursors include insulin, hydrocortisone, methylisobutylxanthine (MIBX) and ligands for peroxisome proliferator activator receptors (PPAR). On the other hand, many findings indicate that adipogenesis is also controlled through negative feedback mechanisms. For example, adipose tissue produces leptin, plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), transforming growth factor type beta (TGF- β), and prostaglandin E₂ (PGE₂); agents that are thought to block fat cell formation.

WO 02/072149

PCT/US02/07897

Fat cells are conspicuous in normal bone marrow and have long been suspected to have an influence on hematopoiesis. Indeed, adipogenesis alters expression of extracellular matrix and cytokines in bone marrow, affecting hematopoiesis both directly and indirectly. Preadipocytes support blood cell formation in culture and fully differentiated fat cells produce less CSF-1 than their precursors. Expression of stem cell factor, interleukin-6 and leukemia inhibitory factor as well as hematopoiesis-supportive activity declined with terminal adipocyte differentiation of an embryo derived stromal line. The fat cell product, leptin, promotes osteoblast formation and hematopoiesis, while inhibiting adipogenesis.

All medications currently used to treat or prevent obesity are directed at the adipocyte compartment of the tissue and work by either decreasing energy availability or increasing energy output. These agents can be placed into three categories based on mechanism. (National Task Force on Obesity. 1996. JAMA. 276:1907-1915).

Reduction of energy intake. This approach is directed at reducing food intake by decreasing appetite or increasing satiety. These 'anorexiants' drugs affect neurotransmitter activity by acting on either the catecholaminergic system (amphetamines, benzphetamine, phendimetrazine, phentermine, mazindol, diethylpropion, and phenylpropanolamine) or the serotonergic system (fenfluramine, dexfenfluramine, fluoxetine, sertraline, and other antidepressant selective serotonin reuptake inhibitors [SSRI]).

Reduction in absorption of nutrients: Drugs in this category block the action of digestive enzymes or absorption of nutrients. An example of this type of drug is orlistat, which inhibits gastric and pancreatic lipase activity. (Drent M., van der Veen E. 1995. Obes Res. 3(suppl 4):623S-625S). These medications are experimental in the United States and not available for the treatment of obesity.

Increase in energy expenditure: An increase in energy expenditure may be accomplished by increasing metabolic rate, for example, through changes in sympathetic nervous system tone or uncoupling of oxidative phosphorylation. Drugs that affect thermogenesis-metabolism include

WO 02/072149

PCT/US02/07897

ephedrine alone or in combination with caffeine and/or aspirin, (Passquali R., Casimirri F. 1993 *Int J Obes.* 17(suppl 1):S65-S68) and BRL 26830A, an adrenoceptor agonist. (Connacher, et al.1992. *Am J Clin Nutr.* 55:258S-261S). This class of medications is not approved by the FDA for weight control.

5
10
15
Currently, no single drug regimen emerges as superior in either promoting or sustaining weight loss. Surgical interventions, such as gastric partitioning procedures, jejunioileal bypass, and vagotomy, have also been developed to treat severe obesity. (Greenway F. 1996. *Endo Metab Clin N Amer.* 25:1005-1027). Although advantageous in the long run, the acute risk benefit ratio has reserved these invasive procedures for morbidly obese patients according to the NIH consensus conference on obesity surgery (BMI greater than 40 kg/m²). (NIH Conference. 1991. *Ann Intern Med.* 115:956-961). Therefore, this is not an alternative for the majority of overweight patients, unless and until they become profoundly obese and are suffering the attendant complications.

There is no medical or surgical treatment for obesity that is directed at the vascular compartment of the tissue.

18
20
It is therefore an object of the present invention to provide an alternative treatment to reduce obesity.

Summary of the Invention

22
25
30
Adiponectin, recently isolated as an adipocyte product and shown to have structural similarities to Clq, as well as to members of the tumor necrosis factor (TNF) superfamily, suppresses myeloid differentiation in short term bone marrow cultures and also inhibits macrophage functions. Adiponectin dramatically inhibits adipogenesis in culture, suggesting that it may normally be a feedback inhibitor of this process. PCR analyses revealed that COX-2 is induced on exposure of cloned pre-adipocytes to adiponectin, resulting in prostaglandin release. This is critical to the inhibition of adipogenesis, because a COX-2 inhibitor, DUP-697 blocked the response of preadipocytes to adiponectin. Furthermore, fat cell formation in response to adiponectin was defective in mice with disruption of the COX-2 gene. In

WO 02/072149

PCT/US02/07897

contrast, expression of TNF- α , TGF- β , interferons and a new interferon-like cytokine known as limitin are not up-regulated by adiponectin. It has now been shown that adiponectin is present within normal bone marrow and can inhibit fat cell formation by marrow derived stromal cells through a COX-2 dependent mechanism. These findings suggest a new mechanism for regulation of preadipocyte differentiation and possible roles for fat in hematopoietic tissue.

These results support the use of adiponectin to decrease fat in adipocytes and associated fatty tissue. The adiponectin, as the 32 KD protein or a trimer thereof, or functionally equivalent fragments thereof, can be administered using methods known to those skilled in the art to achieve a decrease in fat.

Detailed Description of the Invention

I. Adiponectin Formulations

Adiponectin is an adipocyte-specific secretory protein and a new member of the family of soluble defense collagens, in hematopoiesis and immune responses. Adiponectin is a plasma protein secreted exclusively from adipocytes. In plasma from healthy humans, it exists in concentrations ranging from 1.9 to 17.0 $\mu\text{g/mL}$. Four groups independently discovered this protein designated Acrp30, adipoQ, or adiponectin that represents a major fat cell-restricted product in mouse and man (Scherer, et al., *J. Biol. Chem.* **270**:26746-26749 (1995); Hu, et al., (1996) *J. Biol. Chem.* **271**:10697-10703; Maeda, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **221**:286-289 (1996); Nakano, et al., *J. Biochem. (Tokyo)*. **120**:803-812 (1996)). It was also isolated from human serum and termed GBP28. The production of adiponectin increases in accordance with the differentiation of preadipocytes to adipocytes and is inhibited by TNF- α . Adipocytes utilize a specialized secretory compartment to release this protein (Bogan, J.S., and Lodish, H.F. *J. Cell Biol.* **146**:609-620 (1999)).

Adiponectin suppresses colony formation from colony-forming unit (CFU)-granulocyte-macrophage, CFU-macrophage, and CFU-granulocyte, but has no effect on that of burst-forming units - erythroid or mixed

WO 02/072149

PCT/US02/07897

erythroid-myeloid CFU. Adiponectin also inhibits proliferation of 4 of 9 myeloid cell lines, but does not suppress proliferation of erythroid or lymphoid cell lines except for one cell line. These results suggest that adiponectin predominantly inhibits proliferation of myelomonocytic lineage cells. At least one mechanism of the growth inhibition is induction of apoptosis because treatment of acute myelomonocytic leukemia lines with adiponectin induces the appearance of subdiploid peaks and oligonucleosomal DNA fragmentation. Aside from inhibiting growth of myelomonocytic progenitors, adiponectin suppresses mature macrophage functions. Treatment of cultured macrophages with adiponectin significantly inhibits their phagocytic activity and their lipopolysaccharide-induced production of tumor necrosis factor- α . Suppression of phagocytosis by adiponectin is mediated by one of the complement C1q receptors, C1qRp, because this function is completely abrogated by the addition of an anti-C1qRp monoclonal antibody (Yokota, *Blood*, 96:1723-1732 (2000)). These observations suggest that adiponectin is an important negative regulator in hematopoiesis and immune systems and that it is involved in ending inflammatory response through its inhibitory functions.

Adiponectin is composed of 244 amino acid residues containing a short noncollagenous N-terminal segment followed by a collagen-like sequence. Maeda, et al. *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221 (2), 286-289 (1996) MEDLINE 96224171. Adiponectin is a homotrimer that is similar in size and overall structure to complement protein C1q, with particularly high homology in the C-terminal globular domain. The crystal structure of adiponectin revealed additional high similarity between the same domain and TNF- α . These structural features suggest that adiponectin belongs to a family of proteins identified as soluble defense collagens and including complement C1q and the collections mannose-binding lectin (MBL), lung surfactant protein A (SP-A), lung surfactant protein D, and conglutinin. The collectins play important roles in the innate humoral immune system. These proteins can identify foreign pathogens by detecting specific carbohydrate structures uniquely present on microorganisms, and

WO 02/072149

PCT/US02/07897

they subsequently interact with phagocytic cells or the complement system to bring about killing and clearance of targets without involvement of antibodies. Lack or low levels of collectin expression cause increased susceptibility to infections, especially in infants, whose specific immune systems for various pathogens have not fully developed.

Adiponectin has applications in diabetes and obesity because of its influence on glucose and lipid metabolism. As described below, it has been found that brown fat in normal human bone marrow contains this protein. Recombinant adiponectin blocked fat cell formation in long-term bone marrow cultures and inhibited the differentiation of cloned stromal preadipocytes. Adiponectin also caused elevated expression of cyclooxygenase-2 by these stromal cells and induced release of prostaglandin E₂. The cyclooxygenase-2 inhibitor Dup-697 prevented the inhibitory action of adiponectin on preadipocyte differentiation, suggesting involvement of stromal cell derived prostenoids. Furthermore, adiponectin failed to block fat cell generation when bone marrow cells were derived from B6,129S-^{Ptgs2tm1Jed} (Cyclooxygenase-2^{-/-}) mice. These observations show that preadipocytes represent direct targets for adiponectin action, establishing a paracrine negative feedback loop for fat regulation. They also link adiponectin to the cyclooxygenase-2 dependent prostaglandins that are critical in this process.

Normal biological activities of adiponectin are poorly understood, but findings suggest potential involvement in obesity, cardiovascular disease, and diabetes. Production and circulating protein concentrations are suppressed in obese mice and humans (Hu, et al., *J. Biol. Chem.* **271**:10697-107032 (1996); Arita, et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**:79-83 (1999)). Low plasma levels may be a risk factor in coronary heart disease and concentrations are also significantly reduced in type 2 diabetes (Ouchi, et al., *Circulation.* **100**:2473-2476 (1999); Hotta, et al., *Diabetes.* **50**:1126-1133 (2001)). The ability of adiponectin to lower glucose and reverse insulin resistance suggests that it may have application as a diabetes drug (Yamauchi, et al., *Nat. Med.* **7**:941-946 (2001); Berg, et al. *Nat. Med.* **7**:947-

WO 02/072149

PCT/US02/07897

953 (2001)). Furthermore, a proteolytically cleaved fragment of adiponectin was shown to cause weight loss in obese animals (Fruebis, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**:2005-2010 (2001)). This protein directly or indirectly affects at least four cell types. Adiponectin modulates NF- κ B mediated
5 signals in human aortic endothelial cells, presumably accounting for their reduced adhesiveness for monocytes (Ouchi, et al., *Circulation.* **102**:1296-1301 (2000)). The protein suppresses differentiation of myeloid progenitor cells and has discrete effects on two monocyte cell lines (Yokota, *Blood.* **96**:1723-1732 (2000)). Adiponectin reduces the viability of these cells and
10 blocks LPS induced production of TNF- α . It appears to utilize the C1qRp receptor on normal macrophages and blocks their ability to phagocytose particles (Yokota 2000). Intact or cleaved forms of adiponectin cause increased fatty acid oxidation by muscle cells in treated mice (Fruebis 2001). The protein may also induce metabolic changes in hepatocytes (Yamauchi, et
15 al., 2001; Berg, et al. 2001). Furthermore, adiponectin was found to block myelopoiesis in clonal assays of hematopoietic cell precursors (Yokota 2000). The examples demonstrate that recombinant adiponectin blocks fat cell formation in complex long-term bone marrow cultures (LTBMC). This response appears to result from the induction of cyclooxygenase (COX)-2
20 and prostaglandins (PGs) in pre-adipocytes.

Macrophages play a central role in immune responses by means of secretion of inflammatory cytokines, phagocytic activity, and antigen presentation. The results show that adiponectin inhibits phagocytosis and
25 LPS-induced TNF- α expression of mature macrophages and suggest that adiponectin may have anti-inflammatory effects. These inhibitory effects of adiponectin on macrophage functions are not due to killing of the cells because the viability of mature macrophages did not change. The mechanisms by which adiponectin cancels TNF- α production and TNF- α gene expression in macrophages stimulated with LPS remain unclear. The
30 kinetic studies indicate that it is unlikely that adiponectin directly neutralizes LPS or blocks LPS receptors. IL-1 β and IL-6 gene expression induced by LPS was not affected by treatment with adiponectin, suggesting that signals

WO 02/072149

PCT/US02/07897

to macrophages from adiponectin receptors attenuate the TNF- α gene transcription triggered by LPS stimulation. Several cytokines have been found to repress TNF- α synthesis in macrophages, IL-4 and IL-10 suppress inflammatory responses that can inhibit TNF- α synthesis in LPS-stimulated human macrophages. In contrast to adiponectin, IL-4 and IL-10 also inhibit synthesis of IL-1 and IL-6. TGF- β is known to inhibit proinflammatory cytokine production in macrophages, but its inhibition of TNF- α secretion occurs after transcription. Thus, adiponectin is likely to be a unique suppressor of inflammatory responses because of its specific inhibition of TNF- α transcription.

Among the physiologic substances associated with inflammation, E-type prostaglandins (PGE) were shown to inhibit colony formation from CFU-GM and CFU-M but not that from BFU-E. Furthermore, PGE₂ was reported to inhibit TNF- α production but not IL-1 α or IL-2 β . Target cells and functions of adiponectin are similar to those of PGE and it is now clear that adiponectin can induce PGE synthesis via upregulation of COX2 in at least one cell type (see below). Therefore, adiponectin can influence hematopoiesis, adipogenesis and immune responses by means of mechanisms involving PGE.

Based on the data showing that adiponectin inhibits production of adipocytes, adiponectin is useful to effect weight loss and as an antiinflammatory. Adiponectin can be administered as the entire 244 amino acid protein, or as fragments thereof retaining the activity as demonstrated in the assays described herein. Based on the functional analysis, it is expected that each subunit will be effective, as well as in the form of a trimer. Fragments including functional domains should also be useful. Conservative substitutions of amino acids may also be made without significantly changing the biological activity. As used herein a conservative substitution refers to the substitution of one amino acid for another having similar size and/or charge.

WO 02/072149

PCT/US02/07897

B. Carriers/routes/means for administration:

Drugs can be administered parenterally or enterally. In the preferred embodiment, drugs are administered orally, in an enteric carrier if necessary to protect the drug during passage through the stomach. Alternative methods of delivery include intravenous, intraperitoneal, pulmonary, nasal, transbuccal or other trans-membrane delivery, and controlled release formulations.

The adiponectin may be "associated" in any physical form with a particulate material, for example, adsorbed or absorbed, adhered to or dispersed or suspended in such matter, which may take the form of discrete particles or microparticles in any medicinal preparation, and/or suspended or dissolved in a carrier such as an ointment, gel, paste, lotion, or spray.

The adiponectin will usually be administered in combination with a pharmaceutically acceptable carrier. Pharmaceutical carriers are known to those skilled in the art. The appropriate carrier will typically be selected based on the mode of administration. Pharmaceutical compositions may also include one or more active ingredients such as antimicrobial agents, antiinflammatory agents, and analgesics.

Preparations for parenteral administration or administration by injection include sterile aqueous or non-aqueous solutions, suspensions, and emulsions. Examples of non-aqueous solvents are propylene glycol, polyethylene glycol, vegetable oils such as olive oil, and injectable organic esters such as ethyl oleate. Aqueous carriers include water, alcoholic/aqueous solutions, emulsions or suspensions, including saline and buffered media. Preferred parenteral vehicles include sodium chloride solution, Ringer's dextrose, dextrose and sodium chloride, lactated Ringer's, or fixed oils. Intravenous vehicles include fluid and nutrient replenishers, and electrolyte replenishers (such as those based on Ringer's dextrose).

Formulations for topical (including application to a mucosal surface, including the mouth, pulmonary, nasal, vaginal or rectal) administration may include ointments, lotions, creams, gels, drops, suppositories, sprays, liquids and powders. Formulations for these applications are known. For example, a

WO 02/072149

PCT/US02/07897

number of pulmonary formulations have been developed, typically using spray drying to formulate a powder having particles with an aerodynamic diameter of between one and three microns, consisting of drug or drug in combination with polymer and/or surfactant.

5 Compositions for oral administration include powders or granules, suspensions or solutions in water or non-aqueous media, capsules, sachets, or tablets. Thickeners, flavorings, diluents, emulsifiers, dispersing aids or binders may be desirable.

Peptides as described herein can also be administered as a
10 pharmaceutically acceptable acid- or base- addition salt, formed by reaction with inorganic acids such as hydrochloric acid, hydrobromic acid, perchloric acid, nitric acid, thiocyanic acid, sulfuric acid, and phosphoric acid, and organic acids such as formic acid, acetic acid, propionic acid, glycolic acid, lactic acid, pyruvic acid, oxalic acid, malonic acid, succinic acid, maleic
15 acid, and fumaric acid, or by reaction with an inorganic base such as sodium hydroxide, ammonium hydroxide, potassium hydroxide, and organic bases such as mono-, di-, trialkyl and aryl amines and substituted ethanolamines.

Many formulations for controlled or sustained release are known and commercially available. These are typically formed of a biodegradable
20 polymeric material or polymeric material which is fabricated to provide slow release of the drug. The controlled release composition is preferably a microparticle formulation. The microparticles preferably include a biodegradable, biocompatible polymer such as polylactide that degrades by hydrolysis. In addition to microparticle systems, other controlled-release
25 injectable or implantable formulations can be used. Both degradable and non-degradable excipients can be used in the formulation of injectable or implantable controlled-release formulations, although degradable excipients are preferred. As used herein, the term "microparticles" includes microspheres and microcapsules. The microparticles preferably are
30 biodegradable and biocompatible, and optionally are capable of biodegrading at a controlled rate for delivery of a compound. The particles can be made of a variety of polymeric and non-polymeric materials.

WO 02/072149

PCT/US02/07897

The microparticles can include any biocompatible, and preferably biodegradable polymer, copolymer, or blend. Suitable polymers include polyhydroxy acids, polyorthoesters, polylactones, polycarbonates, polyphosphazenes, polysaccharides, proteins, polyanhydrides, copolymers thereof and blends thereof. Suitable poly(hydroxy acids) include polyglycolic acid (PGA), polylactic acid (PLA), and copolymers thereof. Preferably, the microparticles include poly(D,L-lactic acid) and/or poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) ("PLGA"). The preferred material is polylactide.

Microparticles may be prepared using single and double emulsion solvent evaporation, spray drying, solvent extraction, solvent evaporation, phase separation, simple and complex coacervation, interfacial polymerization, and other methods well known to those of ordinary skill in the art. Methods developed for making microspheres for drug delivery are described in the literature, for example, as described in Doubrow, M., Ed., "Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy," CRC Press, Boca Raton, 1992. See also, U.S. Patent Nos. 5,407,609 to Tice et al., and 5,654,008 to Herbert et al., for methods of making microspheres.

In addition to microparticle systems, other controlled-release injectable or implantable formulations suitable for delivering a compound which induces pseudopregnancy can be used. Both degradable and non-degradable excipients can be used in the formulation of injectable or implantable controlled-release formulations, although degradable excipients are preferred.

Examples of injectable formulations include typical depot formulations prepared with oily and waxy excipients (e.g. similar to Depot Provera™) and *in situ* gelling systems such as those prepared using sucrose acetate isobutyrate or biodegradable polymers. Examples of implantable formulations include compressed tablet formulations such as those used for controlled release of growth promoters in cattle (e.g. Synovex™), and Compudose™ (a silicone rubber core coated with a thin layer of medicated silicone rubber containing estradiol). In one embodiment, biodegradable gels and/or implants can be used.

WO 02/072149

PCT/US02/07897

Suitable formulations can be developed by those skilled in the art using any of the approaches described above and typical pharmaceutical excipients.

C. Dosages:

5 The adiponectin is administered in an amount effective to regulate the size and/or growth of adipocytes or tissue associated therewith. The effective amount will be typically an amount effective to limit adipocyte fat content or adipocyte viability or cell formation or proliferation or to decrease adipose tissue. Compositions as used herein contain an effective amount of
10 adiponectin to treat a patient to achieve the desired regulation in the substantial absence of systemic toxicity.

II. Methods of Treatment

A. Proposed treatment schedules

The adiponectin inhibitor is administered in an amount and time
15 period which results in a decrease in the fat content and or number of adipocytes. The latter may be decreased by apoptosis, decreased differentiation from less differentiated cells, and/or decreased proliferation. In the preferred embodiment for the treatment of obesity, patients will receive drug once daily in a dosage effective to decrease the weight to
20 maintenance levels.

B. Types of patients

The method of treatment should be applicable to both normal
overweight individuals and individuals with genetic defects. The method should also be useful in most cases involving weight gains due to hormonal
25 or metabolic defects or drug side effects. In addition to promoting loss of body fat while maintaining lean body mass and being able to sustain weight loss during chronic administration, other benefits of the treatment include normalization of blood glucose levels in obesity related diabetes, and may also be used to reduce appetite (i.e., as an anorexic agent).

30 The present invention will be further understood by reference to the following non-limiting examples.

Examples**Example 1: Adiponectin inhibits fat cell formation in LTBMC.***Methods and Materials**Production and characterization of recombinant adiponectin.*

5 Human recombinant adiponectin was prepared as described by Arita, et al., 1999. Briefly, a 693-bp adiponectin cDNA encoding a peptide leader deficient protein was subcloned into the pET3c expression vector and used to transform host *E. coli*, BL21(DE3)pLysS. Synthesis of recombinant adiponectin was induced by isopropylthio- β -D-galactoside. Bacterial cells
10 were pelleted and suspended in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) for 1 hour and Triton X-100 at the final concentration at 0.2% and sonicated. The suspended buffer was centrifuged and the pellet was then washed with the same solution. The pellet was precipitated and solubilized with 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 7 M guanidine HCl and 1% β -mercaptoethanol.
15 The solubilized protein was refolded in the presence of 200 volumes of 2 M urea, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) for 3 days at 4^o C. The refolded protein was concentrated by centrifugal filtration, dialyzed with 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), and purified by DEAE-5PW ion-exchange high performance liquid chromatography (Toso, Japan) equilibrated in 20 mM Tris-HCl (pH 7.2)
20 using a linear gradient of NaCl (0-1 M). SDS-PAGE and Western blotting with adiponectin-specific monoclonal antibodies were used to confirm adiponectin purity. The distribution of its multimetric forms and their formula weights were examined by gel filtration chromatography using Superdex 200 HR 10/30 column (Amersham Pharmacia Biotech.,
25 Piscataway, NJ). Recombinant glutathione S-transferase (GST) was also prepared from *E. coli* and used as a control. The proteins were dialyzed with PBS and used at a concentration of 10 μ g/ml in culture. After the cell sonication step, all procedures were performed in endotoxin-free buffers and final endotoxin concentrations were less than 0.07 EU/ml checked by
30 Limulus Amebocyte Lysate Pyrogen Plus (BioWhittaker, Walkersville, MD).

WO 02/072149

PCT/US02/07897

Reagents

Human insulin was purchased from Roche Diagnosis (Mannheim, Germany). MIBX was purchased from Sigma (St. Louis, MO). PGE₂ and Dup-697, purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI), were used at
5 1 x 10⁻⁶ M concentrations.

Tissue, cells and mice

Normal human bone marrow was collected by biopsy from the posterior iliac crest of healthy young volunteers with informed consent, and used for immunohistochemical analysis of adiponectin. BMS2 and 3T3-L1
10 cells were maintained in D-MEM (high glucose) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (HyClone, Logan, Utah). MS5 cells were maintained in α -MEM medium supplemented with 10% FCS. Balb/c mice at 3-6 weeks old were obtained from Charles Rivers Breeding Laboratories (Wilmington, ME). B6,129S-^{Ptgs2^{tm1.1ed}} (COX-2^{-/-}) mice and C57BL/6 mice (3-5 weeks old)
15 were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). High mortality and unavailability precluded use of homozygous COX^{-/-} animals in these experiments, but a single targeted allele abrogated preadipocyte responses to adiponectin.

Adiponectin expression in bone marrow.

20 Expression of adiponectin protein was examined in normal human bone marrow specimens by indirect immunofluorescence methods using the 9108 monoclonal antibody. RT-PCR was used to detect adiponectin transcripts in cDNA prepared from total human bone marrow RNA (CLONTECH, Palo Alto, CA). The oligonucleotide primers were 5'-
25 TGTGCTGGGAGCTGTTCTACTG-3' (SEQ ID NO:1) and 5'-ATGTC¹CCCTTAGGACCAATAAG-3' (SEQ ID NO:2) for adiponectin, and 5'-CCATCCTGCGTCTGGACCTG-3' (SEQ ID NO:3) and 5'-GTAACAGTCCGCCTAGAAGC-3' (SEQ ID NO:4) for β -actin.

LTBMC

30 LTBMC that support formation of myeloid cells (Dexter cultures) were initiated and maintained by published methods (Dexter, T.M. and Testa, N.G. *Methods Cell Biol.* 14:387-405 (1976)). Bone marrow cells of normal

WO 02/072149

PCT/US02/07897

Balb/c mice (12×10^6) were cultured in 25-cm² flasks in 5% CO₂ at 33 °C. The medium consisted of α -MEM supplemented with 100 nM hydrocortisone and 20% horse serum (HyClone). Cultures were treated with adiponectin or bovine serum albumin (BSA) beginning at culture initiation and thereafter weekly for 6 weeks. In some experiments, adiponectin was omitted from the media after 6 weeks of culture, and maintained for another 6 weeks with medium alone.

RT-PCR

Total RNA was isolated from MS5 or BMS2 cells treated with adiponectin for various periods using TRIzol Reagent (GIBCO-BRL, Grand Island, NY) and suspended in DEPC-treated water. After treating total RNA with DNase (GIBCO-BRL), cDNA was made using random hexamers and moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (GIBCO-BRL). For PCR, 10 μ l of the RT mixtures described above were added to PCR buffer containing 1.5 mM MgCl₂, 1 U Taq polymerase (Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut), 2 mM each dNTP, and relevant sense and antisense primers. The DNA in the PCR reaction mixtures was amplified using 25 to 35 cycles of 94 °C for 1 min, 55 °C for 2 min and 72 °C for 3 min. The oligonucleotide primers used for these reactions were 5'-GCAAATCCTTGCTGTCCAAT-3' (SEQ ID NO:5) and 5'-GGAGAAGGCTTCCCAGCTTTT-3' (SEQ ID NO:6) for COX-2, and 5'-CCCAGAGTCATGAGTCGAAGGAG-3' (SEQ ID NO:7) and 5'-CAGGCGCATGAGTACTTCTCGG-3' (SEQ ID NO:8) for COX-1. Primers for TNF- α , TGF- β , interferon (IFN)- $\alpha/\beta/\gamma$, and limitin were also prepared and used in this study.

Northern blot analysis

Poly(A)⁺ mRNA was prepared from the indicated samples using oligo(dT) columns (Ambion Inc, Austin, TX). Aliquots of poly(A)⁺ mRNA (2 μ g) were denatured in formamide and formaldehyde at 65 °C and electrophoresed on formaldehyde-containing agarose gels. After capillary transfer to nylon membranes (MSI, Westborough, MA), the RNA was cross-linked by UV exposure. cDNA probes for CCAAT/enhancer binding protein- α (C/EBP- α) and adipocyte P2 (aP2) were obtained from ResGenTM

WO 02/072149

PCT/US02/07897

Invitrogen (Huntsville, AL) and American Type Culture Collection (Manassas, VA) respectively. Probes with sizes corresponding to PPAR- γ , COX-1 and COX-2 were prepared as PCR products and all probes were radiolabeled with [α - 32 P]dCTP using the random prime labeling system (Redi PrimeTM II) purchased from Amersham Pharmacia Biotech.

Enzyme-immunoassay for PGE₂

Confluent MS5 or BMS2 cells prepared in 24-well plates were incubated in 500 μ l of media with or without adiponectin. Supernatants from these cultures were examined for the presence of PGE₂ using an enzyme-immunoassay kit purchased from Cayman Chemical.

Adipocyte differentiation

Differentiation of BMS2 cells to adipocytes was achieved by treatment with 5 μ g/ml insulin and 0.5 mM MIBX for 10 days. Differentiation of MS5 cells to adipocytes was achieved by treatment with 5 μ g/ml insulin alone for 15 days. Cultures were treated with adiponectin, PGE₂ or Dup-697 from the time of culture initiation. At the end of this period, cultures were photographed and then stained with Nile red to detect lipid accumulation indicative of adipocyte differentiation. The extent of differentiation was estimated by flow cytometry (FACScan; Becton-Dickinson, San Jose, CA).

Adherent bone marrow cell cultures

Adherent bone marrow cell cultures were established with heterozygous knockout COX-2^{-/-} mice or normal C57BL/6 mice. BM cells were suspended at 2×10^5 per 6 ml of Dexter culture media and seeded in 25-cm² flasks. This cell concentration gives rise to adherent stromal layers without myeloid cell growth. Cultures were treated with adiponectin or BSA at the time of culture initiation and weekly thereafter for 6 weeks.

Results

Adult bone marrow, like fetal and neonatal tissues, contains brown fat. Adiponectin was originally discovered as a product of subcutaneous white fat, and RT-PCR was used to determine if it is also expressed in adult bone marrow. The adiponectin specific primers yielded an amplification

WO 02/072149

PCT/US02/07897

product from normal adult marrow cDNA. The specificity of amplification was confirmed by sequencing of the PCR product. An adiponectin specific monoclonal antibody was also used to determine if the protein is present in human bone marrow. Specific staining was found associated with the abundant fat cells in that tissue.

5 Monomeric recombinant adiponectin has an apparent molecular mass of 32 kD. Additional 64 kD and faint 96 kD bands on SDS-PAGE under non-reducing conditions were also observed, corresponding to dimers and trimers of adiponectin, respectively. No bands were detected above the 102 kD marker. The 64 kD and 96 kD bands disappeared under reducing conditions and only the 32 kD band remained. Adiponectin specific monoclonal antibodies recognized all bands in both conditions by Western-blotting. Although multimeric structures larger than trimers were not detected by SDS-PAGE, gel filtration chromatography showed a wide distribution of recombinant adiponectin with formula weights exceeding trimers. This multimeric character was consistent with native adiponectin in human plasma (Arita 1999), as well as native or recombinant ACRP30, the murine homolog of adiponectin (Scherer, et al. *J. Biol. Chem.* 270:26746-26749 (1995); Fruebis, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:2005-2010 (2001)).

20 To determine whether adiponectin influenced blood cell formation, LTBMC was established in the presence and absence of this factor. Conditions that favor myeloid cell production were selected, where adipocytes are typically conspicuous in the adherent layer. While no influence on myelopoiesis was found, inclusion of adiponectin in the medium completely inhibited fat cell formation. The negative influence of this protein was reversible and normal numbers of adipocytes were generated when the protein was removed. Additional studies were conducted to determine what cell types were influenced by adiponectin and explore potential regulatory mechanisms.

30 Bone marrow cultures represent a complex mixture of hematopoietic cells that mature through interactions with an adherent stromal

WO 02/072149

PCT/US02/07897

layer composed of fibroblasts, adipocytes, macrophages and endothelial cells. Experiments with three preadipocyte cell lines suggested that preadipocytes could be one target of adiponectin in the bone marrow cultures. The 3T3-L1 cell line rapidly generated adipocytes when insulin

5 was added as an adipogenesis-inducing agent and this response was only slightly inhibited by adiponectin. However, substantial suppression was found with MS5 and BMS2 clones (see below). These experiments demonstrate that preadipocytes can be a direct target of this fat cell product.

Example 2: Adiponectin induces cyclooxygenase-2 and PGE₂ synthesis.

TNF- α , TGF- β , interferons and PGE₂ are fat cell products previously shown to inhibit fat cell formation. Thus, their induction was screened for in adiponectin-treated preadipocytes by RT-PCR analysis. Transcripts corresponding to TNF- α or interferon- β were not detectable in

15 MS5 cells even when adiponectin was added to the cultures. Basal expression of TGF- β , interferon- $\alpha/\beta/\gamma$, and a new interferon-like cytokine designated limitin was detectable by RT-PCR, but not obviously influenced by adiponectin. In contrast, it was consistently found that transcripts for COX-2, but not COX-1, were up-regulated by adiponectin treatment of either

20 MS5 or BMS2 stromal cell clones. These observations were confirmed by Northern-blot analysis. PGE₂ is known to inhibit adipogenesis and is a substance that depends on COX-2 for its production. Therefore, BMS2 or MS5 cells were allowed to come to confluence before addition of either adiponectin or BSA. PGE₂ concentrations in the supernatants of these

25 cultures were evaluated by ELISA at the indicated times. Adiponectin consistently caused approximately two-fold increases in PGE₂ secretion. Thus, prostaglandin synthesis represents a potential mechanism for inhibition of adipogenesis by adiponectin.

Responses of pre-adipocytes to adiponectin require COX-2.

30 Two experimental approaches were used to assess the importance of COX-2 for the inhibition of fat cell formation by adiponectin. BMS2 cells were cultured with MIBX and insulin to induce strong fat cell formation and

WO 02/072149

PCT/US02/07897

this response was blocked as expected by inclusion of PGE₂ in the medium. Adiponectin also blocked adipogenesis, while a control GST fusion protein had no influence. The inhibition by adiponectin was not observed when the specific COX-2 inhibitor Dup-697 was present. Inclusion of Dup-697 alone
5 had no influence on fat cell formation. While accumulation of visible fat droplets was blocked by either PGE₂ or adiponectin, the combination of insulin and MIBX still caused a morphological change in adherent layers relative to those in cultures with medium alone. Flow cytometry and Nile red staining of the same cultures was therefore used to extend the
10 microscopic analysis. Lipid accumulation induced by insulin and MIBX was completely blocked by either PGE₂ or adiponectin. The response to adiponectin was substantially blocked by inclusion of the COX-2 inhibitor. Adipocyte gene expression analysis confirmed the cell morphology and lipid accumulation findings. C/EBP- α and PPAR- γ , two transcription factors
15 crucial for adipogenesis, were only weakly expressed in BMS2 preadipocytes, but intensely induced by insulin and MIBX. Either PGE₂ or adiponectin strongly inhibited these increases, and Dup-697 again abrogated the induction by adiponectin. The results were very similar with respect to transcripts for the adipocyte-selective fatty-acid-binding protein aP2.
20 Adherent bone marrow cell cultures were then prepared with wild type or heterozygous knockout COX-2^{-/-} mice under conditions that favored the formation of numerous fat cells. While adiponectin blocked adipogenesis in cultures of normal C57BL/6 bone marrow, there was minimum effect on cells derived from COX-2^{+/-} animals. These results provide strong evidence
25 that adiponectin directly blocks formation of adipocytes from fat cell precursors through a mechanism that requires induction of COX-2.

The data indicate that the COX-2-dependent prostanoid pathway is important for the suppressive activity of adiponectin on fat cell formation. The response of preadipocytes from COX-2^{+/-} mice to adiponectin was
30 negligible. Poor viability of homozygous COX-2^{-/-} mice precluded their use in the experiments and adiponectin unresponsiveness of the heterozygotes suggests a substantial gene dose effect. Furthermore, a COX-2 inhibitory

WO 02/072149

PCT/US02/07897

compound blocked the inhibition of fat cell formation in cultures of cloned preadipocytes. COX-2 is induced in response to pro-inflammatory cytokines or hormones, and is a rate-limiting enzyme in the biosynthesis of PGs. It mediates the conversion of arachidonic acid into PGE₂, which is

5 subsequently converted to various kinds of PGs by specific synthases. PGs appear to contribute to fat cell formation in complex ways. For example, PGE₂ and prostacyclin (PGI₂), the two major PGs synthesized by fat cells, appear to have opposing actions on adipogenesis. PGE₂ was shown to negatively regulate fat cell development by reducing cAMP production.

10 Conversely, PGI₂ is proposed as an adipogenic agonist. The data confirm the inhibitory effect of PGE₂ on marrow fat cell differentiation, and further indicate an important contribution to the inhibitory influence adiponectin has on adipogenesis. Other PGs that influence fat cell development include PGJ₂, an important ligand for the adipogenic transcription factor PPAR- γ .

15 This prostaglandin promotes adipocyte differentiation. In contrast, PGF₂ inhibits the adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. Again, PGs with opposing actions are synthesized from PGE₂, a COX-2 product. The 3T3-L1 line generated fat cells in standard culture medium where insulin was the only inducing agent, and this differentiation was minimally affected by

20 addition of either adiponectin or PGE₂. Comparison of 3T3-L1 cells to adiponectin sensitive preadipocytes should be informative about inducible genes and could reveal functional heterogeneity among fat cells in normal tissues.

Two other adipocyte products, agouti and angiotensin II (AGT II)

25 are known to positively contribute to obesity. Agouti induces fatty acid and triglyceride synthesis in cultured adipocytes in a calcium-influx dependent manner. AGT II expression is nutritionally regulated, increasing with high fat diet and fatty acids concomitant with fat mass volume. Adiponectin expression is also affected by diet, but the direction is contrary to that of

30 AGT II (Yamauchi, et al. 2001). AGT II promotes adipocyte differentiation by stimulating release of PGI₂ from mature adipocytes. Thus, PG synthesis appears to play an indispensable role in paracrine actions of adipocyte

WO 02/072149

PCT/US02/07897

products on fat cell differentiation.

WO 02/072149

PCT/US02/07897

We claim:

1. A method for decreasing fat in adipocytes or the number of adipocytes comprising administering an effective amount of adiponectin to adipocytes or tissue comprising adipocytes.
2. The method of claim 1 wherein the adiponectin is administered to a patient.
3. The method of claim 1 wherein the adiponectin is a fragment of adiponectin.
4. The method of claim 1 wherein the adiponectin reduces appetite.
5. The method of claim 1 wherein the adiponectin is administered in a formulation for enteral delivery.
6. The method of claim 1 wherein the adiponectin is administered in a formulation for parenteral delivery.
7. The method of claim 6 wherein the formulation is for pulmonary delivery.
8. The method of claim 1 wherein the adiponectin is human adiponectin and the adipocytes are human adipocytes.
9. The method of claim 8 wherein the adipocytes are in a patient with diabetes.
10. A pharmaceutical composition comprising adiponectin and a pharmaceutically acceptable carrier for administration of an effective amount of adiponectin to decrease fat in adipocytes or the number of adipocytes.
11. The composition of claim 10 wherein the adiponectin is formulated for enteral administration.
12. The composition of claim 10 wherein the adiponectin is formulated for parenteral administration.
13. The composition of claim 12 wherein the adiponectin is formulated for pulmonary delivery.
14. The composition of claim 10 in a controlled or sustained release formulation.
15. The composition of claim 10 wherein the adiponectin is a fragment.

WO 02/072149

PCT/US02/07897

16. The composition of claim 10 wherein the adiponectin is human adiponectin.
17. A method of making a formulation for decreasing fat in adipocytes or the number of adipocytes comprising adding to a pharmaceutical carrier for parenteral or enteral administration an effective amount of adiponectin to adipocytes or tissue comprising adipocytes.
18. The method of claim 17 wherein the adiponectin is human adiponectin.
19. The method of claim 17 wherein the adiponectin is a fragment of adiponectin.
20. The method of claim 17 comprising making the formulation as a controlled or sustained release formulation.

WO 02/072149

PCT/US02/07897

SEQUENCE LISTING

<110> Oklahoma Medical Research Foundation
Kincade, Paul W.
Yokuta, Takafumi

<120> Methods for Reducing Fat by Administration of Adiponectin

<130> OMRF 184

<150> 60/275,755
<151> 2001-03-14

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 23
<212> DNA
<213> homo sapien

<400> 1
tgttgtggtgg agctgttcta ctg
23

<210> 2
<211> 23
<212> DNA
<213> homo sapien

<400> 2
atgtctocct taggaccaat aag
23

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> homo sapien

<400> 3
ccatcctgcy tctggacctg
20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA

WO 02/072149

PCT/US02/07897

<213> homo sapien

<400> 4
gtaacagtcc gctagaagc
20<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> homo sapien<400> 5
gcaaatcctt gctgttcaa t
21<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> homo sapien<400> 6
ggagaaggct tcccagttt t
21<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> homo sapien<400> 7
cccagagtca tgagtgaag gag
23<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> homo sapien<400> 8
cagggcatg agtacttctc gg
22

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/07897
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : A 61K 47/00 US CL : 424/400, 439, 441, 489, 78.01; 514/909 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) U.S. : 424/400, 439, 441, 489, 78.01; 514/909		
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) USPATENTS, USFG-PUB, DERWENT, EPO, Google, ProQuest		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HOTTA, K. et al. Plasma Concentrations of a Novel, Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Type 2 Diabetic Patients. <i>Arterioscler Thromb Vasc Biol.</i> June 2000, Vol. 20, pages 1595-1599.	1-20
A	ARITA, Y. Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Obesity. <i>Biochemical and Biophysical Research Communications.</i> January 1999, Vol. 257, No. 1, pages 79-83.	1-20
A	WO 00/26374 A2 (SANOFI-SYNTHELABO) 11 May 2000 (11.05.2000), page 24, lines 25-31.	5, 6, 11, 12, 14, 20
<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: *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.		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be regarded as novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone.		
B earlier application or patent published on or after the international filing date *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.		
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 *A* document member of the same patent family		
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 11 July 2002 (11.07.2002)	Date of mailing of the international search report 12 AUG 2002	
Name and mailing address of the ISA/US Comptroller of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20531 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Christine Eyles Telephone No. 703-308-1235	

フロントページの続き

(74)代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 キンケード, ポール ダブリュー.

アメリカ合衆国 オクラホマ 73116, ニコルズ ヒル, グレンブルック テラス 122
9

(72)発明者 ヨクタ, タカフミ

アメリカ合衆国 オクラホマ 73072, ノーマン, フッド コート 311

Fターム(参考) 4C084 AA01 AA02 BA44 CA36 MA28 MA55 MA56 MA63 NA14 ZA701

ZB211