

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6639389号
(P6639389)

(45) 発行日 令和2年2月5日 (2020. 2. 5)

(24) 登録日 令和2年1月7日 (2020. 1. 7)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K	14/585	(2006. 01)	C O 7 K	14/585	Z N A
A 6 1 K	38/23	(2006. 01)	A 6 1 K	38/23	
A 6 1 P	3/10	(2006. 01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	3/04	(2006. 01)	A 6 1 P	3/04	
A 6 1 P	19/02	(2006. 01)	A 6 1 P	19/02	

請求項の数 11 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-530131 (P2016-530131)
(86) (22) 出願日	平成26年11月10日 (2014. 11. 10)
(65) 公表番号	特表2016-538282 (P2016-538282A)
(43) 公表日	平成28年12月8日 (2016. 12. 8)
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/074207
(87) 国際公開番号	W02015/071229
(87) 国際公開日	平成27年5月21日 (2015. 5. 21)
審査請求日	平成29年9月20日 (2017. 9. 20)
(31) 優先権主張番号	1320112. 4
(32) 優先日	平成25年11月14日 (2013. 11. 14)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英国 (GB)
(31) 優先権主張番号	1414706. 0
(32) 優先日	平成26年8月19日 (2014. 8. 19)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英国 (GB)

(73) 特許権者	514112640
	キーバイオサイエンス・アクチエンゲゼル シャフト
	スイス国, ツェーハー - 6 3 7 0 シュタ ンス, シュピハーマット 3 0
(74) 代理人	100099623
	弁理士 奥山 尚一
(74) 代理人	100096769
	弁理士 有原 幸一
(74) 代理人	100107319
	弁理士 松島 鉄男
(74) 代理人	100114591
	弁理士 河村 英文
(74) 代理人	100125380
	弁理士 中村 綾子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 疾患および障害を処置するためのカルシトニン模倣体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 4 3 に示されるアミノ酸配列を有するペプチドであって、任意選択的に、各々、第 1 のアミノ酸の正の電荷を低減するために、その N 末端においてカルボキシル化されるか、または他の形で修飾されており、これとは独立に、任意選択的に、その C 末端においてアミド化されており、任意選択的に、各々の中の 1 位および 7 位のシステイン残基が、ともに α - アミノスベリン酸 (A s u) で置きかえられる、ペプチド。

【請求項 2】

配列番号 4 4 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載のペプチド。

【請求項 3】

腸内投与用に製剤化される、請求項 1 または 2 に記載のペプチド。

【請求項 4】

非経口投与用に製剤化される、請求項 1 または 2 に記載のペプチド。

【請求項 5】

注射用に製剤化される、請求項 4 に記載のペプチド。

【請求項 6】

経口投与用の担体と共に製剤化される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 7】

前記担体が、5 - C N A C、S N A D、または S N A C を含む、請求項 1 ~ 3 および 6

のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 8】

前記ペプチドが、コーティングされたクエン酸粒子を含む経口投与用の医薬組成物中に製剤化され、前記コーティングされたクエン酸粒子が、前記ペプチドの経口バイオアベイラビリティを増大させる、請求項 1 ~ 3、6 および 7 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 9】

医薬としての使用のための、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 10】

糖尿病（Ⅰ型および／またはⅡ型）、過剰体重、食物摂取過剰、メタボリック症候群、関節リウマチ、非アルコール性脂肪肝疾患、骨粗鬆症、または骨関節炎、血中グルコースレベルの調節不良、耐糖試験に対する応答の調節不良、または食物摂取の調節不良の治療における使用のための、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

10

【請求項 11】

メトフォルミンまたは別のインスリン増感剤による処置を伴う投与のためのペプチドである、請求項 9 または 10 に記載の、医薬としての使用のためのペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、カルシトニンの模倣体に関し、糖尿病（Ⅰ型およびⅡ型）、過剰体重、食物摂取過剰、およびメタボリック症候群が含まれるがこれらに限定されない多様な疾患および障害の処置、血中グルコースレベルの調節、耐糖試験に対する応答の調節、食物摂取の調節、骨粗鬆症の処置ならびに骨関節症の処置におけるそれらの医薬としての使用へと拡張される。

20

【背景技術】

【0002】

全世界には約 2 億 5 千万人の糖尿病患者が存在し、次の 20 年間で、その数は、倍増すると推測されている。この人口集団のうちの 90% 超は、2 型糖尿病（T2DM）を患っている。現在のところ、診断されているのは、T2DM に罹患しているか、または明らかに T2DM に先行する病期にある患者のうちの 50 ~ 60% に過ぎないと推定されている。

30

【0003】

T2DM とは、炭水化物代謝および脂肪代謝の異常を特徴とする異種性の疾患である。T2DM の原因は、多因子的であり、これらには、筋肉、肝臓、膵臓、および脂肪組織などの組織における β 細胞機能およびインスリン感受性に影響を及ぼす遺伝子的要素および環境的要素の両方が含まれる。結果として、インスリン分泌の障害が観察され、これには、β 細胞機能の進行性の低減および慢性のインスリン抵抗性が対応する。膵臓内分泌部が末梢におけるインスリン抵抗性を補正できないと、高血糖症および臨床的な糖尿病の発症がもたらされる。今日では、インスリンを介するグルコースの取込みに対する組織の抵抗性が、T2DM の主要な病態生理的決定因子として認識されている。

40

【0004】

最適な T2DM への介入の成功についての基準は、血中グルコースレベルの降下であり、これは、ピークグルコースレベルの低下およびクリアランスの急速化により記載される、血中グルコースレベルの長期的な降下および食物摂取後におけるグルコースレベルの上昇を耐容する能力の増大の両方でありうる。これらの状況はいずれも、β 細胞によるインスリンの産生量および機能に及ぼす歪みを低下させる。

【0005】

Ⅰ型糖尿病は、食物摂取に応答した、インスリンを産生する能力の喪失を特徴とし、その結果、血中グルコースを正常な生理学的レベルへと調節できないことを特徴とする。

【0006】

50

骨の物理的構造は、疾患および傷害を含めた多様な因子により損なわれうる。最も一般的な骨疾患のうちの1つは、骨粗鬆症であり、これは、骨量の低下および骨組織の構造的劣化を特徴とし、特に、股関節、脊椎、および手首の骨の脆弱性をもたらし、これらを骨折しやすくする。骨粗鬆症は、骨吸収の速度が骨の形成速度を超えるような平衡失調が存在する場合に発症する。有効量の、カルシトニンなどの抗吸収剤の投与は、骨の吸収を防止することが示されている。

【0007】

関節疾患、例えば、骨関節症（OA）、関節リウマチ（RA）、または若年性関節リウマチ（JRA）を含め、自己免疫反応から生じる炎症、例えば、ループス、強直性脊椎炎（AS）、または多発性硬化症（MS）を含めた炎症性疾患または変性疾患は、疼痛および関節の破壊に起因した実質的な運動の喪失をもたらしうる。関節内の骨を被覆し、緩衝する軟骨は、時間と共に分解され、これにより、2本の骨の直接的な接触を有害な程度にまでもたらし恐れがあり、これは、関節の運動時において、一方の骨の動きを他方の骨と比べて制限する場合もあり、かつ/または他方の骨による一方の骨の損傷を引き起こす場合もある。また、軟骨直下の軟骨下骨も分解しうる。有効量の、カルシトニンなどの抗吸収剤を投与することにより、骨の再吸収を防止しうる。

【0008】

WO2013/067357は、修飾アミノ酸配列を有する、天然カルシトニンの合成変異体であって、特性の改善をもたらすことを意図する合成変異体を開示している。

【0009】

カルシトニンは、広範にわたる種において高度に保存されている。天然の全長カルシトニンは、32アミノ酸の長さである。天然カルシトニンの例示的配列を、下記に示す（各場合に、配列は、C末端がアミド化されている（図示せず））。

【0010】

【表1】

サケ	CSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRTNTGSGTP 配列番号1
ウナギ	CSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRTDVGAGTP 配列番号2
ニワトリ	CASLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRTDVGAGTP 配列番号3
マウス	CGNLSTCMLGTYTQDLNKFHTFPQTSIGVEAP 配列番号13
ラット	CGNLSTCMLGTYTQDLNKFHTFPQTSIGVGAP 配列番号14
ウマ	CSNLSTCVLGTYTQDLNKFHTFPQTAIGVGAP 配列番号15
イヌ-1	CSNLSTCVLGTYSKDLNKFHTFSGIGFGAETP 配列番号16
イヌ-2	CSNLSTCVLGTYTQDLNKFHTFPQTAIGVGAP 配列番号17
ブタ	CSNLSTCVLSAYWRNLNKFHFRFSGMGFGPETP 配列番号18
ヒト	CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP 配列番号19

【0011】

多様な天然カルシトニンのアミノ酸配列と、WO2013/067357によるUGP302との比較は、以下の通りである。

【0012】

【表 2】

名称	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
サケカルシト ニン ¹	C	S	N	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	Y	P	R	T	N	T	G	S	G	T	P- NH ₂
ウナギカルシ トニン ²	C	S	N	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	Y	P	R	T	D	V	G	A	G	T	P- NH ₂
ニワトリカル シトニン ³	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	Y	P	R	T	D	V	G	A	G	T	P- NH ₂
UGP302 ⁴	Ac C	S	N	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	Y	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P- NH ₂

表1

【 0 0 1 3 】

¹配列番号1²配列番号2³配列番号3⁴配列番号4

10

20

30

40

50

本明細書では、WO 2013 / 067357 によるペプチドである UGP302 は、KBP - 042 という名称でも言及される。

【発明の概要】

【0014】

特性がなおさら改善されているカルシトニン類似体を開発すること、または、自然発生のカルシトニンの特性を、特に、CGRP受容体アゴニズムを消失させつつ、アミリンおよびカルシトニン受容体に対するアゴニズムの点について改善し、これにより、インビボにおける最適な有効性対安全性比を確保する、代替的な人工配列を少なくとももたらすカルシトニン類似体を開発することが持続的に必要とされている。

【0015】

関連するペプチド配列は、

【表 3】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
配列番号53	C	A	S	L	S	T	C	X ^a	L	G	X ^b	L	S	Q	X ^c	L	H	X ^d	L	Q	X ^e	X ^f	P	X ^g	T	D	V	G	A	N	A	X ^h
配列番号8	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	X ^c	L	H	R	L	Q	X ^e	X ^f	P	K	T	D	V	G	A	N	A	X ^h

表2

を含む。表中、独立に、X^aは、VまたはMであり；X^bは、KまたはRであり；X^cは

10

20

30

40

50

、DまたはEであり； X^d は、KまたはRであり； X^e は、TまたはSであり； X^f は、FまたはYであり； X^g は、KまたはRであり； X^h は、PまたはYであるが、Pが好ましい。

【 0 0 1 6 】

目的のもの以外のものを、以下の表に示す。

【表 4】

表2a

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
配列番号5	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	X ^c	L	H	R	L	Q	T	X ^e	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号6	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	X ^c	L	H	K	L	Q	T	X ^e	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号7 (KBP-056/057)	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	X ^c	L	H	K	L	Q	T	X ^e	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号8 (KBP-088/089)	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	X ^c	L	H	R	L	Q	T	X ^e	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号54	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	X ^c	L	H	R	L	Q	T	X ^e	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号55	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	X ^c	L	H	K	L	Q	T	X ^e	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号56	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	X ^c	L	H	K	L	Q	T	X ^e	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号57	C	S	N	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	X ^c	L	H	R	L	Q	T	X ^e	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号58 (KBP-017)	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	X ^c	L	H	K	L	Q	S	X ^e	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号59 (KBP-018)	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	X ^c	L	H	K	L	Q	T	X ^e	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P

表中、X^c は、DまたはEであり、X^e は独立に、FまたはYであり、各々、第1のA

10

20

30

40

50

ミノ酸の正の電荷を低減するために、そのN末端においてカルボキシル化するかまたは他の形で修飾することができ、これとは独立に、そのC末端においてアミド化することができ、各々の中の1位および7位のシステイン残基を、ともに α -アミノスベリン酸 (Asu) で置きかえることができる。

【 0 0 1 7 】

【表 5】

表2b

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
配列番号28 (KBP-011)	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	R	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号29	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号30 (KBP-018)	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号31 (KBP-088)	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号32	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号33	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号34	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号35 (KBP-021)	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号36	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号37	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号38 (KBP-056)	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号39	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号40	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号41	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号42 (KBP-057)	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
089 配列番号43	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号44	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号45	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号46	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号47	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号48	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号49	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号50	C	S	N	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号51	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号52	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号53	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号54	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号55	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号56	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	T	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号57	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号58	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号59	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号60	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号61	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号62	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号63	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号64	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号65	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号66	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	T	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号67	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号68	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号69	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号70	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号71	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号72	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号73	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号74 (KBP-017)	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号75	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号76	C	S	N	L	S	T	C	V	L	G	K	L	T	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号77 (KBP-019)	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P

【表 6】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
配列番号9 (KBP-011)	Acc	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	R	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P-NH ₂
配列番号78 (KBP-017)	Acc	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	D	L	H	K	L	Q	S	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P-NH ₂
配列番号79 (KBP-018)	Acc	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P-NH ₂
配列番号10 (KBP-023)	Acc	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P-NH ₂
配列番号11 (KBP-056)	Acc	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	D	L	H	K	L	Q	T	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P-NH ₂
配列番号80 (KBP-057)	Acc	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	D	L	H	K	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P-NH ₂
配列番号12 (KBP-088)	Acc	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	R	L	Q	T	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P-NH ₂
配列番号44 (KBP-089)	Acc	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P-NH ₂

表3

10

20

30

40

50

【表 7】

表 4a

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
配列番号45	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	X ^c	L	H	R	L	Q	T	X ^e	P	K	T	D	V	G	A	N	A	Y
配列番号46	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	X ^c	L	H	K	L	Q	T	X ^e	P	K	T	D	V	G	A	N	A	Y
配列番号47	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	X ^c	L	H	K	L	Q	T	X ^e	P	K	T	D	V	G	A	N	A	Y
配列番号48	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	X ^c	L	H	R	L	Q	T	X ^e	P	K	T	D	V	G	A	N	A	Y
配列番号49	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	X ^c	L	H	R	L	Q	T	X ^e	P	R	T	D	V	G	A	N	A	Y
配列番号50	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	X ^c	L	H	K	L	Q	T	X ^e	P	R	T	D	V	G	A	N	A	Y
配列番号51	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	X ^c	L	H	R	L	Q	T	X ^e	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号52	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	X ^c	L	H	K	L	Q	T	X ^e	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P

表中、X^cは、DまたはEであり、X^eは独立に、FまたはYである。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 0 】

【表 8】

表4b

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
配列番号20	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	R	L	Q	T	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	Y
配列番号21	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	Y
配列番号22	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	D	L	H	K	L	Q	T	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	Y
配列番号23	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	R	L	Q	T	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	Y
配列番号24	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	R	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	Y
配列番号25	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	Y
配列番号26	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	R	L	Q	T	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P
配列番号27	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P

10

20

30

40

50

【0021】

したがって、本発明は今般、表2aまたは表4aのアミノ酸配列のうちのいずれか1つを有するペプチドであって、各々、第1のアミノ酸の正の電荷を低減するために、そのN末端においてカルボキシル化するかまたは他の形で修飾することができ、それとは独立に、そのC末端においてアミド化することができ、かつ、各々の中の1位および7位のシステイン残基を、ともにα-アミノスベリン酸(A s u)で置きかえることができるペプチドを提供する。

【0022】

本発明は、表3のアミノ酸配列のうちのいずれか1つを有するペプチドを含む。

【0023】

本発明はまた、表2bまたは表4bのアミノ酸配列のうちのいずれか1つを有するペプチドであって、各々、第1のアミノ酸の正の電荷を低減するために、そのN末端においてカルボキシル化するかまたは他の形で修飾することができ、それとは独立に、そのC末端においてアミド化することができ、各々の中の1位および7位のシステイン残基を、ともにα-アミノスベリン酸(A s u)で置きかえすることができるペプチドも含む。

【0024】

どのアミノ酸が、受容体に媒介される応答の強力な活性化に必要とされるのかについて特に検討しながら、天然カルシトニンの、多数の32アミノ酸による類似体の活性について探索したところ、本発明者らは、11、15、18、22、24、30、および31と番号付けされたアミノ酸が、アミノ酸種類の点でより厳密であり、11に好ましい値はKまたはRであり、15にはDまたはEであり、18にはKまたはRであり、22にはYまたはFであり、24には、Rでもよいが、好ましくはKであり、30にはNであり、31にはAであることを見出した。

【0025】

ペプチドは、医薬としての投与用に製剤化することができ、腸内投与用に製剤化することもでき、非経口投与用に製剤化することもできる。好ましい処方物は、注射用処方物、好ましくは、皮下注射用処方物であるが、ペプチドは、任意選択で、経口投与用の担体と共に製剤化することができ、この場合、担体は、ペプチドの経口バイオアベイラビリティを増大させる。適切な担体は、5-CNAC、SNAD、またはSNACを含む担体を含む。

【0026】

任意選択で、ペプチドは、コーティングされたクエン酸粒子を含む経口投与用の医薬組成物中に製剤化され、この場合、コーティングされたクエン酸粒子は、ペプチドの経口バイオアベイラビリティを増大させる。

【0027】

本発明は、医薬としての使用のための本発明のペプチドを含む。ペプチドは、糖尿病(I型および/またはII型)、過剰体重、食物摂取過剰、メタボリック症候群、関節リウマチ、非アルコール性脂肪肝疾患、骨粗鬆症、または骨関節炎、血中グルコースレベルの調節不良、耐糖試験に対する応答の調節不良、または食物摂取の調節不良の処置における使用のためのペプチドでありうる。特に、ペプチドは、有害な程度に高い空腹時血中グルコースレベルを低下させるのに使用することもでき、有害な程度に高いHbA1cを低下させるのに使用することもでき、あるいは有害な程度に高度な耐糖試験に対する応答を低減するのに使用することもできる。

【0028】

一部の実施形態では、上記で論じたカルシトニン模倣体のN末端側を修飾して、最初のアミノ酸の正の電荷を低減する。例えば、アセチル、プロピオニル、またはスクシニル基で、システイン1を置換することができる。表3では、「Ac」とは、アセチル基修飾を指す。表3内の各「Ac」は、プロピオニル基修飾を指す「Pr」で置きかえることもでき、またはスクシニル基修飾を指す「Succ」で置きかえることもできる。「NH₂」とは、アミド化されたC末端カルボン酸基を指す。正の電荷を低減する代替的な手段には

、N末端におけるポリエチレングリコールベースのPEG化、またはグルタミン酸またはアスパラギン酸など、別のアミノ酸の付加が含まれるが、これらに限定されない。あるいは、リシン、グリシン、ホルミルグリシン、ロイシン、アラニン、アセチルアラニン、およびジアラニルが含まれるがこれらに限定されない他のアミノ酸を、上記で論じたペプチドのN末端へと付加することもできる。当業者により察知される通り、複数のシステイン残基を有するペプチドは、2つのこのようなシステイン残基の間でジスルフィド架橋を形成する頻度が高い。本明細書で提示される全てのこのようなペプチドは、場合によって、1または複数のこのようなジスルフィド架橋を、特に、Cys 1 ~ Cys 7 位に組み入れるものとして規定される。これを模倣すると、1位および7位におけるシステインは、 α -アミノスベリン酸連結で接合的に置きかえることができる。本明細書で開示される全てのペプチドであって、KBP-0##番号を有するペプチドは、このようなジスルフィド架橋を有する。

10

【0029】

本開示のカルシトニン模倣体は、遊離酸形態で存在しうるが、C末端のアミノ酸をアミド化することが好ましい。本出願者らは、このようなアミド化が、ペプチドの有効性および/またはバイオアベイラビリティに寄与しうることを予測する。本開示のカルシトニン模倣体のアミド化形を製造するのに好ましい技法は、公知の技法に従い、前駆体（所望のアミド化生成物のC末端のアミノ基の代わりにグリシンを有する）を、ペプチジルグリシン α -アミド化モノオキシゲナーゼの存在下で反応させることであり、ここで、前駆体は、例えば、US 4 708 934、ならびにEP 0 308 067号およびEP 0 382 403号において記載されている反応により、アミド化生成物へと転換される。

20

【0030】

組換えによる作製は、前駆体と、前駆体のサケカルシトニンへの転換を触媒する酵素との両方に好ましい。このような組換えによる作製は、前駆体のアミド化生成物への転換についてさらに記載する、Ray MV、Van Duyne P、Bertelsen AH、Jackson-Matthews DE、Sturmer AM、Merkler DJ、Consalvo AP、Young SD、Gilligan JP、Shields PPによる、Biotechnology、11巻（1993）、64~70ページにおいて論じられている。この文献で報告されている組換えによる生成物は、天然のサケカルシトニンと同一であり、溶液相および固相による化学的ペプチド合成を用いて作製されるサケカルシトニンとも同一である。

30

【0031】

アミド化生成物の作製はまた、US 7 445 911におけるConsalvoら；Millerら、US 2 006 / 029 2672；Rayら、2002、Protein Expression and Purification、26：249~259；およびMehta、2004年7月、Biopharm. International、44~46ページにより示される工程およびアミド化酵素を用いても達成することができる。

【0032】

好ましいアミド化ペプチドの作製は、例えば、E. coli内で、グリシン伸長前駆体を、グルタチオン-S-トランスフェラーゼとの可溶性の融合タンパク質として作製することにより進めることもでき、US 6 103 495において記載されている技法に従い、前駆体を直接発現させることにより進めることもできる。このようなグリシン伸長前駆体は、C末端を除き、所望のアミド化生成物と同一な分子構造を有する。（生成物が-X-X-NH₂で終結するのに対し、前駆体は-X-glyで終結し、Xは生成物のC末端アミノ酸残基である）。上記の刊行物において記載される α -アミド化酵素は、前駆体の生成物への転換を触媒する。この酵素は、上記で引用したBiotechnology and Biopharm.の論考において記載される通り、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞内の組換えにより作製されることが好ましい。

40

【0033】

本開示のペプチド活性薬剤の遊離酸形態も、「前駆体」上のC末端のグリシンを組み入

50

れないことを除き同様に作製することができ、この場合は、この前駆体が、代わりに最終ペプチド生成物であり、アミド化ステップを要しない。

【 0 0 3 4 】

別段に言明される場合を除き、本開示のカルシトニン模倣体の好ましい用量は、治療的目的および予防的目的のいずれについても同一である。所望の用量については、以下でより詳細に論じるが、投与方式に応じて異なる。

【 0 0 3 5 】

別段に言及される場合または文脈から明らかな場合を除き、本明細書における用量とは、医薬賦形剤、医薬希釈剤、医薬担体、または他の成分などのさらなる成分を組み入れることが望まれるが、これらにより影響されない活性化合物の重量を指す。ペプチド活性薬剤を送達するために一般に製薬業界で用いられる任意の剤形（カプセル、錠剤、注射など）が本明細書における使用に適し、製薬業界では、「賦形剤」、「希釈剤」、または「担体」という用語が、このような剤形内に有効成分と併せて組み入れることが典型的であるこのような非有効成分を包含する。好ましい経口剤形は、以下でより詳細に論じられているが、本開示の活性薬剤を投与する専一の方式であると考えられているわけではない。

【 0 0 3 6 】

本開示のカルシトニン模倣体を患者へと投与して、多数の疾患または障害を処置することができる。本明細書で用いられる「患者」という用語は、動物界に属する任意の生物を意味する。ある実施形態では、「患者」という用語が、脊椎動物、より好ましくは、ヒトを含めた哺乳動物を指す。

【 0 0 3 7 】

したがって、本開示は、I型糖尿病、II型糖尿病もしくはメタボリック症候群、肥満を処置する方法、または食欲減退を処置する方法、またはインスリン抵抗性を軽減する方法、または有害な程度に高い空腹時血清グルコースレベルを低減する方法、または有害な程度に高いピーク血清グルコースレベルを低減する方法、または有害な程度に高いピーク血清インスリンレベルを低減する方法、または有害な程度に大きな耐糖試験に対する応答を軽減する方法、または骨粗鬆症を処置する方法、または骨関節症を処置する方法におけるペプチドの使用を含む。

【 0 0 3 8 】

当技術分野では、体重、性別、年齢、および身長など、多数の因子に照らして正常な範囲の尺度が、数多く認識されている。本明細書で示される処置レジメンまたは防止レジメンを必要とする患者には、その体重が認識されている基準を超える患者、または、遺伝的因子、環境的因子、もしくは他の認識されている危険性因子に起因して、太り過ぎもしくは肥満となる危険性が一般的な人口集団より高い患者が含まれる。本開示に従い、カルシトニン模倣体を用いて、糖尿病を処置しうることが想定されており、そこでは、体重のコントロールが処置の一側面である。

【 0 0 3 9 】

ある実施形態では、方法が、前記状態を処置するために、それを必要とする患者へと、医薬として有効量の、本明細書で記載されるペプチドのうちのいずれか1つの腸内投与を包含する。

【 0 0 4 0 】

ある実施形態では、方法が、前記状態を処置するために、それを必要とする患者への、医薬として有効量の本明細書で記載されるペプチドのうちのいずれか1つの非経口投与を包含する。非経口投与（腹腔内注射、皮下注射、静脈内注射、皮内注射、または筋肉注射を含めた）のためには、例えば、本開示のペプチドの、ゴマ油もしくはラッカセイ油中または水性プロピレングリコール中の溶液を使用することができる。必要な場合、水溶液は、適切に緩衝処理し（8を超えるpHが好ましい）、液体の希釈剤をまず等張性にするものとする。これらの水溶液は、静脈内注射用に適する。油性溶液は、動脈内注射、筋肉内注射、および皮下注射用に適する。滅菌条件下におけるこれらの溶液全ての調製は、当業者に周知の標準的な製薬法により容易に達成される。非経口適用に適する調製物の例には

10

20

30

40

50

、溶液、好ましくは、油性溶液または水溶液のほか、懸濁液、エマルジョン、または坐剤を含めたインプラントが含まれる。ペプチドは、注射剤と共に一般に用いられる、滅菌の生理食塩液、または5%生理食塩液のデキストロース溶液など、流体の担体中に分散させるなど、複数回投与フォーマットの滅菌形態で製剤化することもでき、単回投与フォーマットの滅菌形態で製剤化することもできる。

【0041】

前記方法は、患者が前記状態を患っているかどうかを決定する予備的ステップ、および/または、例えば、各症例において、経口耐糖試験もしくは安静時血糖レベルの測定を実行して、前記処置が前記患者における状態を軽減するのにどの程度有効であるのかを決定する後続のステップを包含しうる。

10

【0042】

患者の体重に対するコントロールを改善する目的で、減量を行うかまたは体重増加を回避するためには、活性化化合物を、毎日少なくとも2回など毎日1回以上、例えば、毎日2~4回にわたり投与することが好ましい。活性化化合物の処方物は、このような投与スケジュールに適切な単位用量を含有しうる。活性化化合物は、糖尿病またはメタボリック症候群のための処置を受ける患者の体重をコントロールすることを視野に入れて投与することができる。

【0043】

経口腸溶性処方物は、口腔内に保持して、舌下経路または口腔内経路を介する血流への移動を可能とする処方物とは対照的に、胃の下方の腸におけるその後の放出と、したがって、門脈を介する肝臓への送達のために、嚥下により摂取される処方物である。

20

【0044】

本開示における使用に適する剤形には、錠剤、ミニタブレット、カプセル、顆粒、ペレット、粉末、発泡性固体、およびチュアブル固体処方物が含まれる。このような処方物には、好ましくは、加水分解されたゼラチンまたは低分子量のゼラチンであるゼラチンを組み入れることができる。このような処方物は、カルシトニンまたはその断片もしくはコンジュゲートと加水分解されたゼラチンまたは低分子量のゼラチンとを含む均質の水溶液を凍結乾燥させ、結果として得られる固体材料を、前記経口医薬処方物へとさらに加工することにより得ることができ、この場合、ゼラチンの平均分子量は1000~15000ドルトンでありうる。このような処方物には、本明細書で開示される5-CNACまたは他の化合物などの保護的担体化合物を組み入れることができる。

30

【0045】

錠剤およびカプセルなどの経口処方物が好ましいが、本開示における使用のための組成物は、シロップ、エリキシル剤など、および坐剤などの形態も取りうる。経口送達是一般に、簡便であり、比較的容易であり、一般に痛みがなく、他の送達方式と比べて、患者の服薬遵守の増大を結果としてもたらすので、選り抜きの送達経路である。しかし、消化管内で変化するpH、強力な消化酵素、および活性薬剤が不透過性である消化管膜などの生物学的障壁、化学的障壁、および物理的障壁は、カルシトニン様ペプチドの哺乳動物への経口送達を問題のあるものとしており、例えば、哺乳動物における甲状腺の傍濾胞細胞、および鳥類および魚類の鰓後腺により分泌される長鎖ポリペプチドホルモンであるカルシトニンの経口送達は元来、消化管におけるカルシトニンの安定性が不十分であることのほか、腸壁を介するカルシトニンの血流への輸送が容易に可能ではないことに少なくとも部分的に起因して、困難であることが判明していた。

40

【0046】

しかし、以下では、適切な経口処方物について記載する。

【0047】

<患者の処置>

ある実施形態では、本開示のカルシトニン模倣体を、患者における模倣体の血清レベルを、1ミリリットル当たり5ピコグラム~500ナノグラムの間、好ましくは、1ミリリットル当たり50ピコグラム~250ナノグラムの間、例えば1~100ナノグラムの間

50

で維持するのに十分な用量で投与する。血清レベルは、当技術分野で公知のラジオイムノアッセイ法により測定することができる。主治医は、患者の応答をモニタリングすることができ、次いで、個別の患者における代謝および応答を引き起こすように、用量をある程度変化させることができる。ほぼ同時的な放出は、本開示の全ての構成成分を、単一の丸薬またはカプセルとして投与することにより最も良好に達成される。しかし、本開示はまた、例えば、要請される量のカルシトニン模倣体を、それらが全ての成分の必要量を併せてもたらしように、併せて投与しうる2つ以上の錠剤またはカプセルに分けることも包含する。本明細書で用いられる「医薬組成物」には、所与の投与において、1または複数の錠剤またはカプセル（または他の剤形）が推奨されるのかどうかに関わらず、患者への特定の投与に適切な完全な用量が含まれるがこれらに限定されない。

10

【0048】

本開示のカルシトニン模倣体は、製品 *Unigene Enteripep*（登録商標）において使用される方法を用いて、経口投与用に製剤化することができる。これらには、米国特許第5,912,014号、米国特許第6,086,918号、米国特許第6,673,574号、米国特許第7,316,819号、米国特許第8,093,207号、および米国特許公開第2009/0317462号において記載されている方法が含まれうる。特に、これらには、化合物の、HIV-TATタンパク質のタンパク質形質導入ドメインなどの膜輸送体へのコンジュゲーション、1もしくは複数のプロテアーゼ阻害剤、および/またはコーティングされうるpH降下剤、および/または酸抵抗性保護媒体、および/または界面活性剤でありうる吸収増強剤を伴う共処方物の使用が含まれうる。

20

【0049】

ある実施形態では、本開示のカルシトニン模倣体は、米国特許公開第2009/0317462号において公知の形で、経口送達用に製剤化することが好ましい。本開示に従う1つの好ましい経口剤形を、以下の表5に示す。

【0050】

【表9】

表5:固体投与製剤の構成成分

活性薬剤または賦形剤	機能
配列番号1～配列番号8のうちの1つから選択されるカルシトニン模倣体	活性薬剤
コーティングされたクエン酸粒子	プロテアーゼ阻害剤
ラウロイルカルニチン	吸収増強剤
非イオン性ポリマー	サブコーティング
オイドラギットL30D-55	腸溶性コーティング

30

40

【0051】

ある実施形態では、本開示のカルシトニン模倣体を、適切な担体化合物との混合剤による腸内投与、とりわけ、経口投与用に製剤化することができる。適切な担体化合物には、米国特許第5,773,647号および米国特許第5,866,536号において記載される担体化合物が含まれ、中でも、5-CNAC（一般にその二ナトリウム塩としてのN-（5-クロロサリチロイル）-8-アミノカプリル酸）は、特に、有効である。他の好ましい担体または送達剤は、SNAD（10-（2-ヒドロキシベンズアミド）デカン酸のナトリウム塩）およびSNAC（N-（8-[2-ヒドロキシベンゾイル]アミノ）カプリル酸のナトリウム塩）である。ある実施形態では、本開示の医薬組成物が、送達有効量、

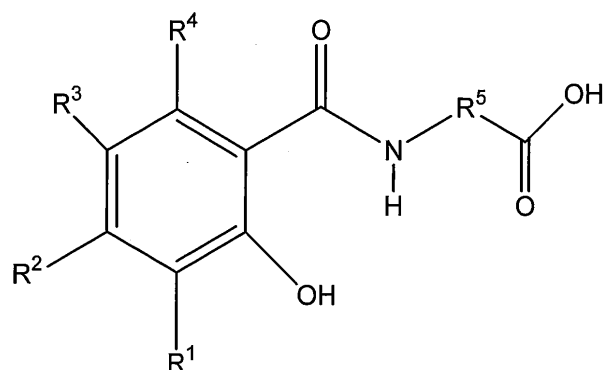
50

すなわち、化合物を送達して所望の効果をもたらすのに十分な量の、5 - C N A C などの担体を含む。一般に、5 - C N A C などの担体は、全組成物に対する重量で 2 . 5 % ~ 9 9 . 4 %、より好ましくは、全組成物に対する重量で 2 5 % ~ 5 0 % の量において存在させる。

【 0 0 5 2 】

加えて、W O 0 0 / 0 5 9 8 6 3 は、式 I

【 化 1 】



10

[式中、

R^1 、 R^2 、 R^3 、および R^4 は、独立に水素、-OH、-NR⁶R⁷、ハロゲン、C₁ ~ C₄ アルキル、または C₁ ~ C₄ アルコキシであり；

R^5 は、置換もしくは非置換の C₂ ~ C₁₆ アルキレン、置換もしくは非置換の C₂ ~ C₁₆ アルケニレン、置換もしくは非置換の C₁ ~ C₁₂ アルキル（アリーレン）、または置換もしくは非置換のアリール（C₁ ~ C₁₂ アルキレン）であり； R^6 および R^7 は、独立に水素、酸素、または C₁ ~ C₄ アルキルである]

の二ナトリウム塩；ならびに、カルシトニン、例えば、サケカルシトニンなど、活性薬剤の経口送達に特に効果的なものとしてのその水和物および溶媒和物についても開示しているが、これらは、本開示においても用いることができる。

【 0 0 5 3 】

W O 2 0 0 5 / 0 1 4 0 3 1 において記載される通り、場合により、微粉化 5 - C N A C を用いる腸溶性処方物が一般に好ましい場合がある。

【 0 0 5 4 】

化合物は、Bone Medical Limited の製品 Capsitonin において使用される方法を用いて、経口投与用に製剤化することができる。これらには、処方物 Access に組み込まれている方法が含まれる。より詳しく述べると、有効成分は、胃内の通過に耐えることが可能な腸溶性カプセルへと封入することができる。例えば、W O 0 2 / 0 2 8 4 3 6 において記載される通り、腸溶性カプセルは、活性化合物を、親水性の芳香族アルコールによる吸収増強剤と併せて含有する。公知の形において、腸溶性コーティングは、例えば、pH が 3 ~ 7 のとき、pH 感受性の形で透過性となりうる。W O 2 0 0 4 / 0 9 1 5 8 4 はまた、芳香族アルコール吸収増強剤を用いる適切な製剤

40

【 0 0 5 5 】

化合物は、製品 Oramed において見られる方法を用いて製剤化することができ、これには、W O 2 0 0 7 / 0 2 9 2 3 8 において見られるか、または U S 5 , 1 0 2 , 6 6 6 において記載されている、オメガ - 3 脂肪酸を伴う処方物が含まれる。

【 0 0 5 6 】

一般に、医薬として許容される塩（とりわけ、一ナトリウム塩または二ナトリウム塩）、溶媒和物（例えば、アルコール溶媒和物）、およびこれらの担体または送達剤の水和物を用いることができる。

【 0 0 5 7 】

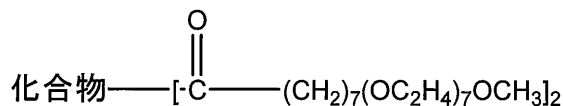
50

本開示に従う医薬組成物の経口投与は、例えば、毎日または毎週のペースで1回以上にわたり定期的に達成することもでき；間欠的に、例えば、1日または1週間にわたり定期的に達成することもでき；または周期的に、例えば、数日間または数週間にわたり定期的に投与した後で、投与しない期間を伴って達成することもできる。本明細書で開示される実施形態の医薬組成物の剤形は、任意の公知の形態であることが可能であり、例えば、液体剤形の場合もあり、固体剤形の場合もある。液体の剤形には、エマルジョン溶液、懸濁液、シロップ、およびエリキシル剤が含まれる。活性化化合物および5 - C N A Cなどの担体に加えて、液体の処方物にはまた、当技術分野において一般に用いられる可溶化剤、例えば、エタノール；綿実油、ヒマシ油、およびゴマ油などの油；保湿剤；乳化剤；懸濁剤；甘味剤；香味剤；および水などの溶媒など、不活性の賦形剤も含まれる。固体剤形には、それらの全てが当技術分野で周知の方法により調製される、カプセル、軟質ゲルカプセル、錠剤、カプレット、粉末、顆粒、または他の固体経口剤形が含まれる。医薬組成物はさらに、pH調整剤、防腐剤、香味剤、矯味剤、芳香剤、保湿剤、等張剤、着色剤、界面活性剤、可塑化剤、ステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤、流動補助剤、圧縮補助剤、可溶化剤、賦形剤、微晶質セルロース、例えば、F M C社により販売されているAvicel PH102などの希釈剤、またはこれらの任意の組合せが含まれるがこれらに限定されない添加剤も、通常使用される量で含む。他の添加剤には、リン酸緩衝塩、クエン酸、グリコール、および他の分散剤が含まれる。組成物にはまた、アクチノニンまたはエピアクチノニンおよびこれらの誘導体；アプロチニン、トラジロール、およびボーマンバーク阻害剤など、1または複数の酵素阻害剤も組み入れることができる。さらに、輸送阻害剤、すなわち、ケトプロフィン(Ketoprofen)などの[ρ]-糖タンパク質を、本開示の組成物中に存在させることができる。本開示の固体医薬組成物は、従来の方法により、例えば、活性化化合物、5 - C N A Cなどの担体、および他の任意の成分の混合物をブレンドし、練り上げ、カプセルへと充填するか、または、カプセルへと充填する代わりに、成形した後、さらに製錠または圧縮成形して、錠剤をもたらすことにより調製することができる。加えて、公知の方法により固体分散液を形成した後、さらに加工して錠剤またはカプセルを形成することもできる。本開示の医薬組成物中の成分は、固体剤形全体にわたり均質にまたは均一に混合することが好ましい。

【0058】

あるいは、活性化化合物は、US 2003 / 0069170において記載されているオリゴマー、例えば、

【化2】



でありうる前記担体とのコンジュゲートとして製剤化することもできる。

【0059】

このようなコンジュゲートは、US 2003 / 0069170において記載される通り、脂肪酸および胆汁塩と組み合わせて投与することができる。

【0060】

例えば、Mansoorらにおいて記載される通り、ポリエチレングリコール(PEG)とのコンジュゲートを用いることができる。

【0061】

あるいは、活性化化合物は、ニトロソ-N-アセチル-D, L-ペニシラミン(SNAP)およびカーボポール溶液と混合するか、またはタウロコール酸塩およびカーボポール溶液と混合して、粘膜付着性エマルジョンを形成することもできる。

【0062】

活性化化合物は、Pregoらにおいて開示されるキトサンナノカプセルへと投入するこ

とにより（場合によって、Prego Prego C、Torres D、Fernandez-Megia E、Novoa-Carballal R、Quinoa E、Alonso MJにおける通りにPEG修飾して）製剤化することもでき、Garcia-Fuentesらにおいて開示される、キトサンまたはPEGでコーティングされた脂質ナノ粒子へと投入することにより製剤化することもできる。この目的のためのキトサンナノ粒子は、Guggiらにおいて記載される通り、イミノチオラン修飾することができる。キトサンナノ粒子は、Dogruらにおいて記載される通り、水/油/水エマルジョン中に製剤化することができる。活性化化合物のバイオアベイラビリティは、SinkoらまたはSongらにおいて記載される通り、タウロデオキシコール酸またはラウロイルカルニチンを用いることにより増大させることができる。一般に、担体として適するナノ粒子は、de la Fuenteらにおいて論じられており、本開示において用いることができる。

10

【0063】

経口処方物に適する他の戦略には、Chiasma LtdによるWO2005/094785において記載されている一過性透過性増強剤（TPE）系の使用が含まれる。TPEでは、疎水性溶媒における固体の親水性粒子の油性懸濁液を用いて、薬物分子を好ましくない消化管（GI）環境による不活化から保護し、同時に、GI壁に対して、そのカージオ薬物分子の透過を誘導するように働きかける。

【0064】

US2008/0200563において記載される、粘膜上の排出ポンプの作用を阻害するためのグルタチオンまたは多数のチオール基を含有する化合物の使用もさらに含まれる。このような技法の実施例はまた、Caliceti, P., Salmaso, S., Walker, G., およびBernkop-Schnuerch, A. (2004), 「Development and インビボ evaluation of an oral insulin-PEG delivery system」、Eur. J. Pharm. Sci., 22, 315~323; Guggi, D., Krauland, A. H., およびBernkop-Schnuerch, A. (2003), 「Systemic peptide delivery via the stomach: インビボ evaluation of an oral dosage form for salmon calcitonin」、J. Control. Rel. 92, 125~135; およびBernkop-Schnuerch, A., Pinter, Y., Guggi, D., Kahlbacher, H., Schoffmann, G., Schuh, M., Schmerold, I., Del Curto, M. D., D'Antonio, M., Esposito, P., およびHuck, Ch. (2005) 「The use of thiolated polymers as carrier matrix in oral peptide delivery - Proof of concept」、J. Control. Release, 106, 26~33においても記載されている。

20

30

【0065】

活性化化合物は、医薬有効成分が、エマルジョン、マイクロエマルジョン、または懸濁液として可溶化される、WO2004/084870において記載されているシームレスのマイクロスフェア内に製剤化することもでき、ミニスフェアへと製剤化することもでき、従来のコーティング法または新規のコーティング法により様々にコーティングしうる。結果は、「あらかじめ可溶化された」形態における封入薬物であり、これは、経口投与されると、活性薬物の、消化管に沿った、特定の場所への、特定の速度における、所定の即時放出または持続放出をもたらす。基本的に、薬物のあらかじめの可溶化は、同時に透過性および薬物安定性を増強しながら、その動態プロファイルの予測可能性を増強する。

40

【0066】

US2009/0074824において記載される通り、キトサンでコーティングされたナノカプセルを使用することができる。ナノカプセルは、胃液の作用に対して安定であ

50

るので、この技法により投与される活性分子は、ナノカプセルの内部に保護される。加えて、この系の粘膜付着性特性は、腸壁への付着時間を延長する（これらの系の消化管の通過には、遅延が見られることが検証されている）ことから、活性分子のより有効な吸収を容易にする。

【0067】

T S R 1 I n c . により開発された方法を用いてもよい。これらの方法には、親水性可溶化法（H S T）が含まれるが、この場合には、正負両方の電荷を保有する天然由来のコラーゲン抽出物であるゼラチンにより、レシチンミセル中に含有される有効成分の粒子がコーティングされ、それらの凝集またはクラumpingが防止される。これは、極性相互作用を介して、疎水性薬物粒子の保湿性の改善を結果としてもたらす。加えて、両親媒性のレシチンにより、溶解用流体と粒子表面との間の表面張力が低減される。

10

【0068】

有効成分は、賦形剤としてのククルビツリルと共に製剤化することができる。

【0069】

あるいは、M e r r i o n P h a r m a c e u t i c a l s によるG I P E T法を使用して、U S 2 0 0 7 / 0 2 3 8 7 0 7 において記載される中間鎖脂肪酸もしくは中間鎖脂肪酸の誘導体、またはU S 7 2 6 8 2 1 4 において記載される膜移行ペプチドでありうる吸収増強剤と共に有効成分を含有する腸溶性コーティング錠剤を作製することもできる。

【0070】

20

制御放出剤形からなるG I R E S（商標）法を、経口投与用の薬物カプセル内に留置されるガス注入式パウチの内部で使用することができるが、この場合、カプセルが溶解すると、ガス発生系により、胃内でパウチが膨張する。臨床試験では、パウチが、胃内に16～24時間にわたり滞留することが示されている。

【0071】

あるいは、有効成分を、胃内の酵素的分解に耐えることを可能とする保護的修飾剤へとコンジュゲートし、その吸収を容易とすることもできる。有効成分は、単分散の短鎖メトキシポリエチレングリコール糖脂質誘導体と共有結合的にコンジュゲートし、これを、精製後に、乾燥医薬有効成分へと結晶化および凍結乾燥させることができる。このような方法は、U S 5 4 3 8 0 4 0 および www.biocoon.com において記載されている。

30

【0072】

有効成分を送達するためにはまた、肝指向性小胞（H D V）も使用することができる。H D Vは、有効成分を封入するリボソーム（150nmの直径）であって、それらの脂質二重層内にはまた、肝細胞ターゲティング分子も含有するリボソームからなりうる。ターゲティング分子は、封入された有効成分の肝細胞への送達を方向付け、したがって、効果をもたらすのに要請される有効成分は、比較的少量である。このような技法は、U S 2 0 0 9 / 0 0 8 7 4 7 9 において記載されており、さらに、www.diasome.com においても記載されている。

【0073】

40

有効成分は、中間鎖部分グリセリドと会合し、場合によって、インスリンとの関連でU S 2 0 0 2 / 0 1 1 5 5 9 2 において記載される、長鎖のP E G種と混合させた、アルコールと共溶媒とを含む、実質的に非水性の親水性溶媒をさらに含有する組成物へと組み込むことができる。

【0074】

あるいは、S h e n Z、M i t r a g o t r i S、P h a r m R e s .、2002年4月、19（4）：391～5、「I n t e s t i n a l p a t c h e s f o r o r a l d r u g d e l i v e r y」において記載されている腸内パッチも用いることができる。

【0075】

50

有効成分は、米国特許第 7 1 8 9 4 1 4 号において記載されている、疎水性ポリマーとブレンドしたハイドロゲルから形成される浸食性マトリックスへと組み込むことができる。

【 0 0 7 6 】

処置される成人ヒトに適する経口用量レベルは、0 . 0 5 ~ 5 m g、好ましくは約 0 . 1 ~ 2 . 5 m g の範囲でありうる。

【 0 0 7 7 】

患者の投与処置の頻度は、毎日 1 ~ 6 回、例えば、毎日 2 ~ 4 回でありうる。処置は、少なくとも 6 週間、好ましくは少なくとも 6 カ月間、好ましくは少なくとも 1 年間の長期にわたり維持されることが望ましく、場合によっては生涯にわたり維持されることが望ましい。

10

【 0 0 7 8 】

関与性の状態のための組合せ処置は、本開示に従う組成物と、1 または複数の他の治療剤の別個の投与とを用いて実行することができる。あるいは、組合せ投与のためには、本開示に従う組成物に、1 または複数の他の治療剤を組み込むことができる。

【 0 0 7 9 】

本開示に従う組合せ療法には、記載される活性化合物の、インスリン、G L P - 2、G L P - 1、G I P、もしくはアミリンとの組合せ、または一般に、他の抗糖尿病剤との組合せが含まれる。これにより、メトフォルミン、ブホルミン、およびフェンホルミンなどのビッグアニド、バラグリタゾン、ピオグリタゾン、リボグリタゾン、ロシグリタゾン、およびトログリタゾンなどの T Z D (P P A R)、アレグリタザール、ムラグリタザール、およびテサグリタザールなどの二重 P P A R アゴニストを含めたインスリン増感剤、またはカルブタミド、クロルプロパミド、グリクラジド、トルブタミド、トラザミド、グリピジド、グリベンクラミド、グリブリド、グリキドン、グリクロピラミド、およびグリメピリドなどのスルホニルウレア、ナテグリニド、レパグリニド、およびミチグリニドなどのメグリチニド / グリニド (K +)、エキセナチド、リラグルチド、およびアルビグルチドなどの G L P - 1 類似体、アログリプチン、リナグリプチン、サキサグリプチン、シタグリプチン、およびビルダグリプチンなどの D P P - 4 阻害剤を含めた分泌促進剤、(急速作用型) インスリンリスプロ、インスリンアスパルト、インスリングルリジン、(長時間作用型) インスリングルアルギン、インスリンデテミルなどのインスリン類似体もしくは特殊な処方物、吸入用のインスリンエクスベラおよび N P H インスリン、ならびにアカルボース、ミグリトール、およびボグリボースなどのアルファ - グルコシダーゼ阻害剤、プラムリンチドなどのアミリン類似体、デバグリフロジン、レモグリフロジン、およびセルグリフロジンなどの S G L T 2 阻害剤を含めた他の薬剤のほか、ベンフルオレックスおよびトルレスタットを含めたその他の薬剤を伴う共処方物を組み入れた組合せ療法を施すことができる。

20

30

【 0 0 8 0 】

さらなる組合せには、レプチンを伴う共投与または共処方物が含まれる。レプチン抵抗性は、2 型糖尿病の十分に確立された構成要素であるが、これまでのところ、レプチンの注射は、この状態を改善できていない。これに対し、アミリンに、レプチン感受性を改善することが可能であり、これにより、サケカルシトニン模倣体など、アミリン様の能力を伴う分子にも、レプチン感受性を改善することが可能であることを裏付ける証拠が存在する。アミリン / レプチンの組合せは、体重および食物摂取に対する相乗作用的効果を示しており、また、インスリン抵抗性も示している [K u s a k a b e T ら]。

40

【 0 0 8 1 】

以下の実施例では、本明細書で開示される実施形態が記載されるが、これらは、本開示を理解する一助となる目的で提示されるものであり、いかなる形であれ、その後に後続する特許請求の範囲において規定される本開示の範囲を限定するものとみなすべきではない。以下の実施例は、当業者に、記載される実施形態をどのようにして実施して用いるのかについての完全な開示および記載を与える目的で提示されるものであり、本開示の範囲を

50

限定することを意図するものでも、以下の実験が実施した全ての実験または唯一の実験であることを表すと意図するものでもない。用いられる数（例えば、量、温度など）に関する精度を確保するために努力を払ったが、ある程度の実験の誤差および偏差は免れないものとする。別段に示されない限り、比は重量比であり、分子量は重平均分子量であり、温度は摂氏度であり、圧力は大気圧または大気圧近傍である。

【0082】

結果は、以下の付属の図面に示す。

【図面の簡単な説明】

【0083】

【図1】表3のKBPのCTRに対する活性を示す生データを、sCTおよびUGP302 / KBP - 042と対比して、異なる時点において示す図である。 10

【図2】一定濃度の異なるリガンドによるCTRの活性化を、時間の関数として示す図である。

【図3】AMY-Rを発現する細胞株へと添加される場合の異なるリガンドについてのAMY-Rの用量応答活性化を示す図である。

【図4】CTR（左パネル）およびAMY-R（右パネル）を発現する細胞における被験化合物の競合的結合を、表内のpIC50の数字と共に示す図である。

【図5】CGRP-Rの用量応答活性化を、異なるリガンドについて示す図である。

【図6】KBP - 056の単回投与の食物摂取、体重、およびPPGに対する効果を示す図である。 20

【図7】UGP302 / KBP - 042、KBP - 023、KBP - 056およびKBP - 088による3週間にわたる処置のFPGおよびHbA1cに対する効果を示す図である。

【図8】I型コラーゲンの吸収（上パネル）およびII型コラーゲンの吸収（下パネル）に対するKBP化合物の効果を示す図である。

【図9】実施例7において得られる、肥満ラットにおける化合物KBP - 088の食物摂取に対する効果と、肥満ラットにおける化合物KBP - 089の食物摂取に対する効果との比較についての結果を示す図である。

【図10】短期にわたる食物摂取の測定値であって、実施例7において得られる本発明のペプチドKBP - 089と、公知のペプチドKBP - 042との比較における測定値を示す図である。 30

【図11】これらのペプチドについての、長期にわたる食物摂取の測定値（上パネル）および体重変化の測定値（下パネル）を示す図である。

【図12A - 12F】実施例1において、カルシトニン受容体（図12A、B、およびE）およびアミリン受容体（図DおよびE）に対する作用を介するcAMPの誘導について得られるさらなる結果を示す図であり、実施例7の食物摂取の測定値において得られるさらなる結果を示す（図12F）図である。

【0084】

【実施例】

以下の実施例では、以下の材料および方法を援用した。 40

【0085】

<細胞および細胞株>

カルシトニン受容体、アミリン受容体、およびCGRP受容体を発現させる以下の細胞株を購入し、製造元の指示書に従い培養した。

1. カルシトニン受容体（CTR）：Discoverx製のU2OS - CALC R（型番：93 - 0566C3）。

2. アミリン受容体（AMY-R）：Discoverx製のCHO - K1 CALC R + RAMP3（型番：93 - 0268C2）。

3. CGRP受容体（CGRP-R）：Discoverx製のCHO - K1 CALC R L + RAMP1（型番：93 - 0269C2）。 50

【0086】

独立のバイオアッセイにおいて、CTR細胞、AMY-R細胞、およびCGRP-R細胞を、表示の時点について、用量を増大させる、表3で同定されたsCT、UGP-302/KBP-042、またはKBP(0、0.001、0.01、0.1、1、10、および100nM)で処置した。

【実施例1】

【0087】

<β-アレスチンアッセイ>

PathHunter β-アレスチンGPCRアッセイとは、β-アレスチンと活性化GPCRとの相互作用を検出することにより、GPCRを活性化させるリガンドの能力を直接測定する全細胞機能アッセイである。アレスチンの動員は、Gタンパク質によるシグナル伝達から独立しているため、これらのアッセイは、強力で普遍的なスクリーニングおよびプロファイリングのプラットフォームであって、事実上任意のGiカップリング受容体、Gsカップリング受容体、またはGqカップリング受容体のために使用されうるプラットフォームをもたらす。

10

【0088】

このシステムでは、GPCRを、インフレイムで、低分子の酵素断片であるProLink(商標)と融合させ、β-アレスチンとβ-galの大型のN末端欠失突然変異体との融合タンパク質(酵素アクセプターまたはEAと呼ばれる)を安定的に発現する細胞内に共発現させた。GPCRの活性化は、β-アレスチンのProLinkでタグ付けされたGPCRへの結合を刺激し、2つの酵素断片の相補性を促す結果として、活性β-gal酵素の形成をもたらす。この相互作用は、化学発光性のPathHunter(登録商標)Detection Reagentを使用して測定されうる酵素活性の増大をもたらす。

20

【0089】

アッセイは、白色の384ウェルプレート(Greiner Bio-One; 784080)で実施した。細胞は、10μLの細胞型特異的培地中にウェル1つ当たりの細胞2500個で、実験の前日に播種した。GPCRによって媒介されるβ-アレスチン動員を定量化するため、PathHunter(商標)Detection Kit(93-0001; Discover X)を使用し、製造元の指示書に従い、アッセイを実施した。

30

【0090】

結果は、図1、2、および3に見られる。図1に見られる通り、これらのペプチドは活性が極めて類似するが、KBP-056は、時間の経過に伴いCTRを活性化させ、CTRの活性化を維持する優れた能力を示す。これは、個別のリガンドを、所与の1つの濃度について時間の関数としてプロットした図2に、なおよりよく例示されている。ここで、KBP-056は、カルシトニン受容体活性化の点で、他のペプチドより優れていることが明らかである。

【0091】

このクラスの分子の別の重要な特徴は、アミリン受容体であるAMY-Rを活性化する能力であり、図3に見られる通り、KBPは、この受容体を活性化することが完全に可能であり、KBP-088は、古典的なAMY-RアゴニストであるsCTより強力である。

40

【0092】

図のサブセットでは、β-アレスチンアッセイを使用して、受容体活性化の延長を評価した。これは、カルシトニン受容体(CTR): U2OS-CALCR(Discover X製、型番: 93-0566C3)細胞株を使用して行い、古典的な3時間にわたる産生とは対照的に、β-アレスチンの蓄積を、24、48、および72時間にわたり行い、次いで、解析した。

【0093】

50

本発明における使用のためのペプチドを、インビトロにおいてCTRおよびAMY-Rを活性化させるそれらの能力の点で、以下の通りに降順にランク付けした。

【0094】

【表10】

介入	4時間後	24時間後	48時間後	ランク (4時間後)	ランク (24時間後)	ランク (48時間後)
KBP-089	1.8	0.7	5.4	+	+	+
KBP-021	2.1	0.6	6.9	+	+	+
KBP-019	1.3	0.2	11.8	+	+	+
KBP-088	1.9	0.4	11.4	+	+	+
KBP-042*	2.2	1.2	14.3	+	+	0
nf-hCT*	2.7	15.9	15.9	+	0	0
媒体*	8.5	16.6	19.3	0	0	0

*比較

【実施例2】

【0095】

<競合リガンドの結合>

本実施例では、本発明者らは、被験化合物がカルシトニン受容体およびアミリン受容体に結合する相対的能力を裏付ける。β-アレスチン誘導実験に対応して、本発明者らは、CTRおよびAMY-Rを発現する細胞を使用して、競合リガンド結合実験を実施した。細胞上のリガンドの結合についての研究では、CTR細胞またはAMY-R細胞15,000個を、96ウェルプレート内に播種し、細胞を、0.1nMの¹²⁵IコンジュゲートscCTにより、用量を増大した非標識KBPの存在または非存在下で、37℃で60分間にわたり処置した。インキュベーションの後で、上清を除去し、細胞を200μlのPBS中で2回にわたり洗浄した。細胞は、RIPA緩衝液(30mMのNaCl、50mMのトリス-HCl、5mMのEDTA、1%のデオキシコール酸、10%のSDS、プロテアーゼ阻害剤タブレットミニ(1錠:10ml))を使用して溶解させ、溶解物も、γカウンター上の測定のために回収した。

【0096】

結果は、図4に見られる。まず、本発明者らは、全てのリガンドが、いずれの受容体にも強力に結合することを見出したが、アフィニティーの点で、KBP-088は、特に、AMY-R上では、他のリガンドより良好であった。

【実施例3】

【0097】

<CGRP受容体上で調べたβ-アレスチンの動員>

アミリン受容体を活性化させる能力を有するペプチドは、CGRP-Rを活性化させることが示されたが、この効果は、化合物の全体的効果に対して有害でありうるので、本発明者らは、KBPが、CGRP受容体を活性化させるのかどうかについて評価した。図5に見られる通り、サケカルシトニンと異なり、KBP化合物のうちのいずれも、CGRP-Rを活性化させなかった。

【実施例4】

【0098】

<体重についてのインビボ活性試験>

このクラスのペプチドのインビボ活性を確認するため、KBP-056が食物摂取、体重、および食後グルコースを、UGP302/KBP-042と比較して低減する能力についての急性試験を実行した。雄のSprague-Dawleyラットに高脂肪食餌を8週間にわたり施して、肥満を誘導し、次いで、体重1kg当たり5μgのKBP-056、UGP302/KBP-042、または媒体（生理食塩液）（群1つ当たり5匹ずつのラット）の単回皮下投与へと曝露し、食物摂取、体重、および血中グルコースに対する効果を評価した。血液は、投与の18時間後に、尾静脈から回収した。全血中グルコースレベルは、ACCU-CHEK（登録商標）Avia血中グルコースメーター（Roche Diagnostics、Rotkreuz、Switzerland）により決定した。

10

【0099】

図6に見られる通り、KBP-056は、食物摂取を18時間にわたり強力に低減したが、これはまた、有意な体重の減少にも顕示された。興味深いことに、体重の減少は、UGP302/KBP-042により引き起こされる体重の減少を超えると考えられる。最後に、食後グルコースレベルの顕著な低減が観察されたが、これにより、この新規のクラスのペプチドが、実質的なインビボ活性を示すことが確認される。

【実施例5】

【0100】

<空腹時血漿グルコースおよびHbA1cについてのインビボ活性試験>

ペプチドの効果を、血中グルコースレベルの調節との関係で評価するため、2型糖尿病についてのゴールドスタンダードモデルである雄ZDFラットを、3週間にわたり3つの最も有望なKBP（023、056、および088）および実対照薬（UGP302/KBP-042）で処置した。雄のZDF（fa/fa）ラットは、7週齢の時点で、Charles River Laboratories（Kisslegg、Deutschland）から得た。全ての動物は、Nordic Bioscienceの動物飼育施設において、一定温度（21~23℃）および相対湿度（55~65%）、Purina 5008ラット飼料（Brogaarden、Lyngby、Denmark）および水道水への自由アクセスを伴う12時間の明/暗周期で飼育した。動物を、8週齢の時点で、空腹時血中グルコースおよび空腹時体重に基づいて、各群ラット8匹ずつの5つの群へと無作為化し、毎日1回の皮下投与を行った（媒体（生理食塩液）、1日当たり体重1kg当たり5μgのUGP302/KBP-042、1日当たり体重1kg当たり5μgのKBP-023、1日当たり体重1kg当たり5μgのKBP-056、および1日当たり体重1kg当たり5μgのKBP-088）。動物を、のべ3週間にわたり処置して、ペプチドの空腹時血中グルコースに対する効果を評価した。血中グルコースは、Accu-Check（登録商標）Aviaモニタリングシステム（Roche Diagnostics、Rotkreuz、Switzerland）を使用してモニタリングし、HbA1cレベルは、DCA Vantage（商標）Analyzer（Siemens Healthcare Diagnostics、Deerfield、IL）によりモニタリングした。

20

30

【0101】

空腹時血中グルコースおよびHbA1cは、3週間後に評価したが、図7に見られる通り、KBP-056およびKBP-088のいずれも、FPGおよびHbA1cの低減に関して活性が高く、興味深いことに、KBP-056およびKBP-088は、UGP302/KBP-042より優れていると考えられたことから、また、インビトロデータでも見られるように、アミノ酸置換により有効性が改善されることが指し示される。

40

【実施例6】

【0102】

<KBP-056の骨吸収および軟骨分解に対する効果>

KBPおよび異なるカルシトニンと、サケカルシトニンについて周知の骨および軟骨に対する保護効果との関係という観点から、KBP-056の骨吸収（CTX-Iにより測

50

定される)および軟骨分解(C T X - I Iにより評価される)に対する効果を、H F Dを給餌された雄ラットにおいて解析した。図8に見られる通り、K B P - 0 5 6は、C T X - IおよびC T X - I Iの両方を、用量依存性的および時間依存的に低減し、投与の3時間後に、1日当たり体重1 k g当たり1 μ gを超える用量で、最大の障害に到達した。これにより、K B Pは、アミノ酸変化によらず、骨および軟骨に対するそれらの有益な効果を維持することが確認された。さらに、本発明者らは、他の試験におけるそれらの優越性に基つき、これらの効果も優れていると予測する。

【実施例7】

【0103】

< K B P - 0 8 8の肥満ラットにおける食物摂取に対する効果と、K B P 0 8 9の肥満ラットにおける食物摂取に対する効果との比較 >

ラットに14週間にわたり高脂肪食餌を与えてから、肥満を誘導する実験を行った。次いで、ラットを、7つの群(媒体(0.9%のNaCl)、K B P - 0 8 9(用量:体重1 k g当たり1.25、2.5、5 μ g)およびK B P - 0 8 8(用量:体重1 k g当たり1.25、2.5、5 μ g)へと無作為化した。ラットを一晩にわたり絶食させ、次いで、午前中に、皮下投与により、ペプチドまたは媒体の単回投与で処置した。食物摂取は、以下の間隔(0~4時間、4~24時間、および24~48時間)でモニタリングした。図9に見られる通り、K B P - 0 8 8およびK B P - 0 8 9のいずれも、4時間の間隔内に食物摂取の低減をもたらし、効果は、24時間後まで維持された。24~48時間の間の間隔では、K B P - 0 8 9だけが、食物摂取の低減をもたらしたことから、この分子は、K B P - 0 8 8よりも優れていることが指し示される。

【0104】

図12Fでは、本発明に従う、より広範なペプチドについても、類似の試験結果が示される。

【0105】

異なる時間間隔にわたり、異なるペプチドを伴う、さらなる同様の研究を企図し、その結果は、図10および図11に見られる。K B P 0 8 9が食物摂取を72時間にわたり抑制する能力を、対照としてのK B P 0 4 2の能力と比較し、その結果は、図10に見られる。

【0106】

K B P - 0 8 9の効力を、K B P - 0 4 2に照らしてさらに探索するために、肥満ラットに、1日当たり体重1 k g当たり2.5 μ gの投与量でK B P - 0 8 9またはK B P - 0 4 2を皮下注射により投与した。次いで、2つの対照群である、媒体およびカロリー制限群にも、食物摂取と独立の効果が観察されるのかどうかについて明らかにするために、K B P - 0 8 9群の食物摂取と合致させた食物摂取を施した。

【0107】

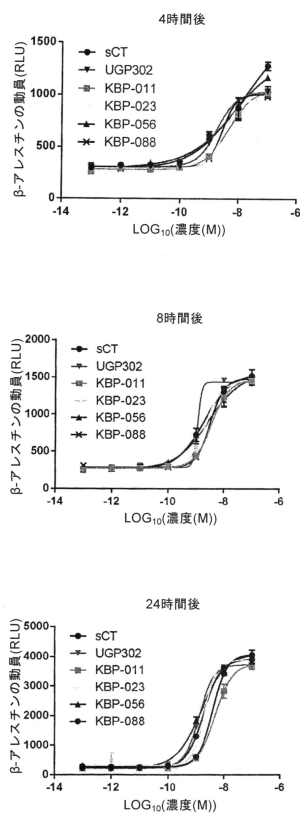
図11では、8週間にわたる処置期間中の食物摂取および体重に対するペプチドの効果を、それぞれ、上のパネルおよび下のパネルに示す。図に示すように、予測通り、いずれのペプチドも、当初は食物摂取を劇的に低減し、その後、その効果は低減され、食物摂取は徐々に正常化される。体重に対する効果を図11の下パネルに示すが、ここでは、いずれのペプチドも、実質的な体重の減少をもたらすことが明らかに示されるが、K B P - 0 8 9により導入される体重の減少は、K B P - 0 4 2により導入される体重の減少より大きいことから、優越性が示される。加えて、カロリーを制限された(ペアフィーディングされた)対照群、すなわち研究期間にわたりK B P - 0 8 9群と全く同じ量の食餌を施された対照群と、K B P - 0 8 9群とを比較すると、体重の低減は、食物摂取の制限だけでなく、他の効果によってももたらされることが明らかである。

【0108】

本明細書では、別段に明示的に指し示されない限りにおいて、「または」という語は、条件のうちの1つだけが満たされることを要請する作用子である「除外的なまたは」とは対照的に、言明された条件の一方または両方が満たされる場合に、真値を返す作用子の意

味で使用する。「～を含むこと (comprising)」という語は、「～からなること」を意味するのではなく、「～を含むこと (including)」の意味で使用する。上記で承認された全ての先行する教示は、参照により本明細書に組み込まれる。本明細書における、任意の先行する公表文献の承認は、それらの教示が、本明細書の日付現在において、オーストラリアまたは他の地域において、共通の一般的な知見であったことの容認または表示であると理解されるべきではない。

【図 1 a】



【図 1 b】

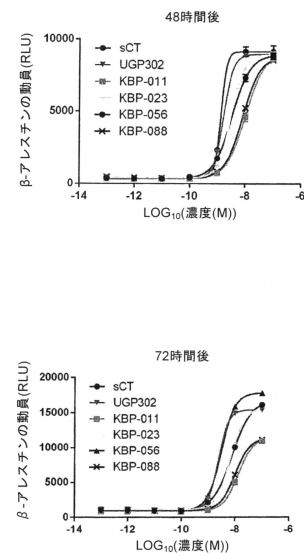


Figure 1 (Continued)

Figure 1

【図2】

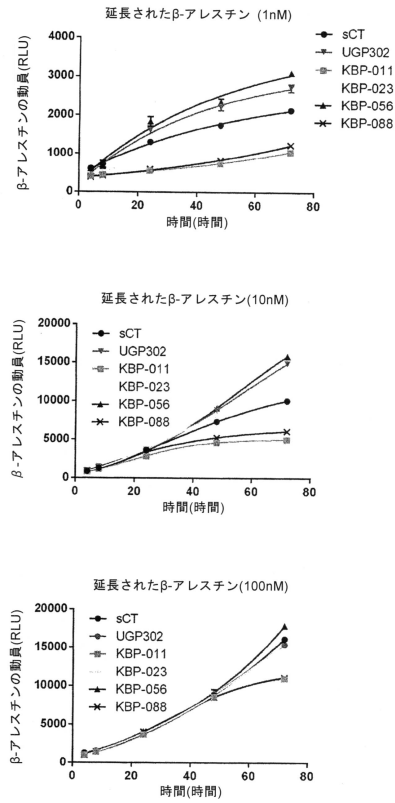


Figure 2

【図3】

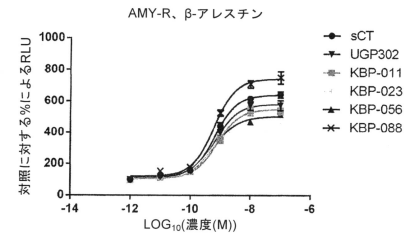


Figure 3

【図4】

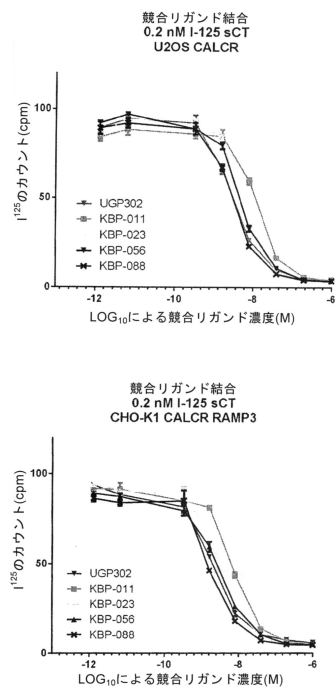


Figure 4

【図5】

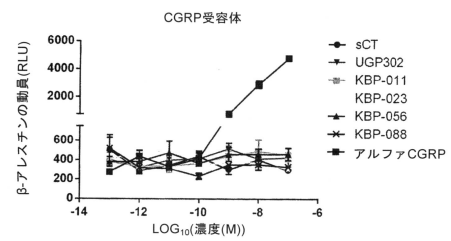


Figure 5

pIC50	UGP302	KBP-011	KBP-023	KBP-056	KBP-088
CTR	8.49	7.90	8.29	8.31	8.49
AMY-R	8.69	8.15	8.50	8.53	8.76

【図 6】

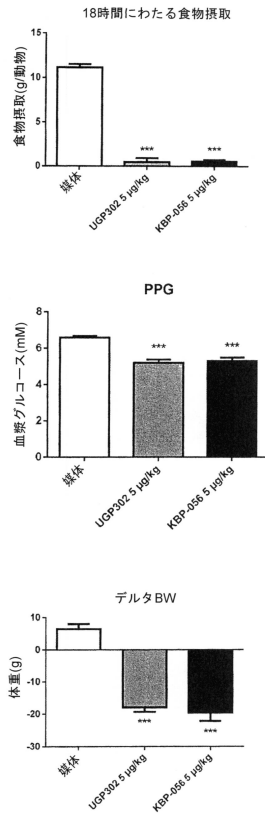


Figure 6

【図 7】

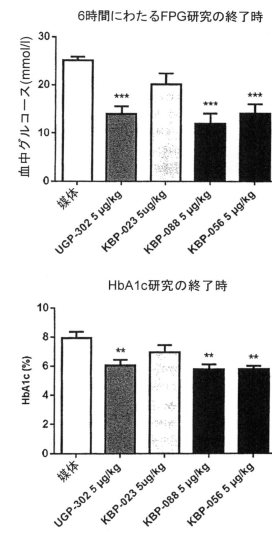


Figure 7

【図 8】

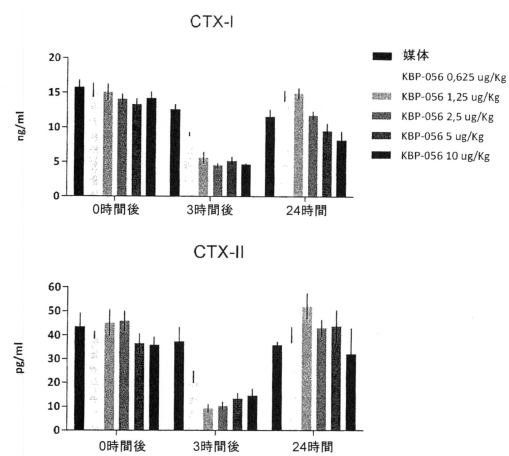


Figure 8

【図 9】

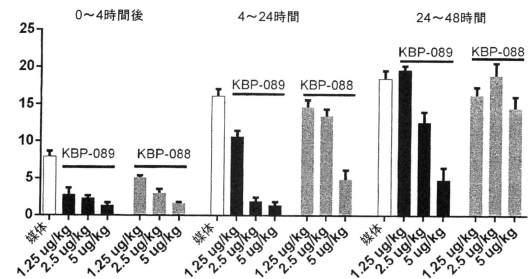


Figure 9

【図 10】

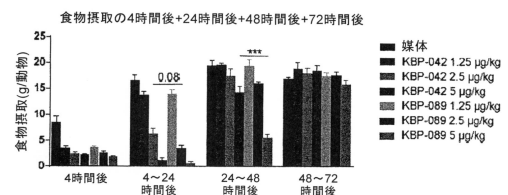


Figure 10

【図 1 1】

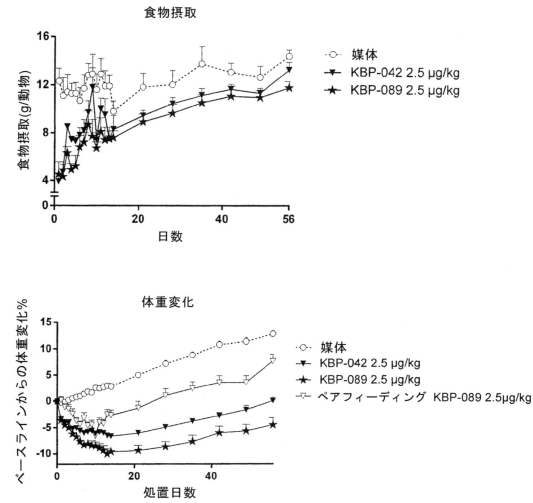


Figure 11

【図 1 2 A . 1 2 B】

A

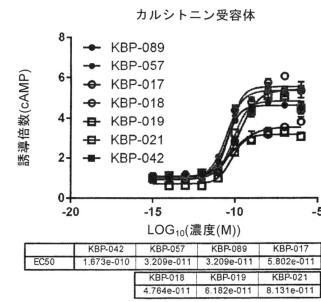


Figure 12A

B

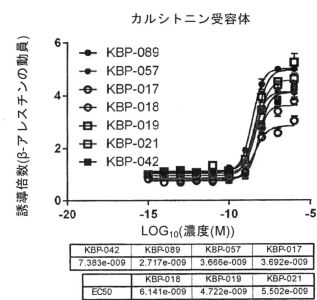


Figure 12B

【図 1 2 C . 1 2 D】

C

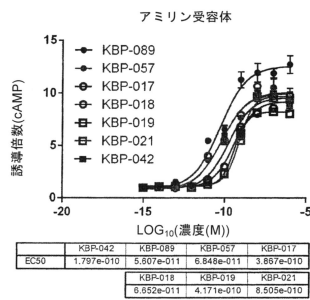


Figure 12C

D

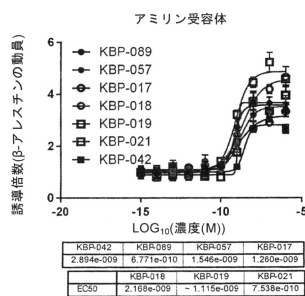


Figure 12D

【図 1 2 E . 1 2 F】

E

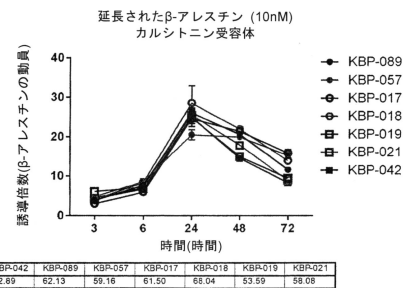


Figure 12E

F

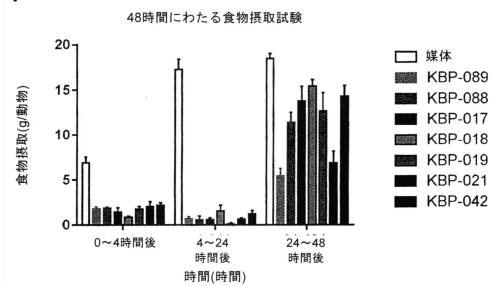


Figure 12F

【配列表】

0006639389000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00 1 0 1
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16
A 6 1 P	19/10 (2006.01)	A 6 1 P	19/10
A 6 1 P	3/00 (2006.01)	A 6 1 P	3/00
A 6 1 K	47/12 (2006.01)	A 6 1 K	47/12
A 6 1 K	47/16 (2006.01)	A 6 1 K	47/16

(74)代理人 100142996
弁理士 森本 聡二

(74)代理人 100166268
弁理士 田中 祐

(74)代理人 100170379
弁理士 徳本 浩一

(74)代理人 100179154
弁理士 児玉 真衣

(74)代理人 100180231
弁理士 水島 亜希子

(72)発明者 カルスダル, モルテン
デンマーク国, 2 1 0 0 コペンハーゲン オー・スラッシュ, エッケルスベリリスゲーゼ 1 3

(72)発明者 ヘンリクセン, キム
デンマーク国, 3 4 0 0 ヒレロズ, ディレハーヴェヴァイ 7 4

(72)発明者 アンドレアセン, キム・フィーツ
デンマーク国, 2 7 5 0 バレルプ, バルトルブヴァイ 1 0 4 s t . t v .

審査官 植原 克典

(56)参考文献 国際公開第2013/067357(WO, A1)
特開平03-240797(JP, A)
特開平04-149198(JP, A)
特開平11-130799(JP, A)
国際公開第2013/063332(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 4 / 5 8 5
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
CAplus/MEDLINE/REGISTRY/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)