

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7560061号
(P7560061)

(45)発行日 令和6年10月2日(2024.10.2)

(24)登録日 令和6年9月24日(2024.9.24)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	38/06 (2006.01)	A 6 1 K	38/06
A 6 1 P	3/06 (2006.01)	A 6 1 P	3/06
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10 1 0 1
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 2 1
		請求項の数 10 (全108頁) 最終頁に続く	
(21)出願番号	特願2021-531620(P2021-531620)	(73)特許権者	521061726
(86)(22)出願日	令和1年8月9日(2019.8.9)		ダイアピン・セラピューティクス・リミ
(65)公表番号	特表2021-534243(P2021-534243 A)		テッド・ライアビリティ・カンパニー
(43)公表日	令和3年12月9日(2021.12.9)		Diapin Therapeutic
(86)国際出願番号	PCT/US2019/046052		s, L L C
(87)国際公開番号	WO2020/033919		アメリカ合衆国 4 8 1 6 7 ミシガン州ノ
(87)国際公開日	令和2年2月13日(2020.2.13)		ースビル、ウエスト・セブン・マイル・
審査請求日	令和4年8月8日(2022.8.8)		ロード 4 3 3 3 4、スウィート 1 0 0
(31)優先権主張番号	62/717,546	(73)特許権者	509009692
(32)優先日	平成30年8月10日(2018.8.10)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニヴァシテ
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		ィ オブ ミシガン
前置審査			アメリカ合衆国 4 8 1 0 9 ミシガン州
			アナーバー ヒューロン パークウェイ
			1 6 0 0 ビルディング 5 2 0 セカンド
			フロア
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 トリペプチドならびに代謝性、心臓血管性及び炎症性障害の治療

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

G l y - G l y - L e uまたはG l y - G l y - d L e uから選択される少なくとも1個のトリペプチドまたはその薬学的に許容される塩を含む、肝疾患または高脂血症の処置に使用するための医薬組成物であって、肝疾患が非アルコール性脂肪性肝疾患（N A F L D）または非アルコール性脂肪性肝炎（N A S H）である、医薬組成物。

【請求項 2】

肝疾患が非アルコール性脂肪性肝疾患（N A F L D）であり、該組成物が肝臓トリグリセリドレベルを有意に低下させるまたは肝臓総コレステロールレベルを有意に低下させる、請求項 1 の医薬組成物。

【請求項 3】

肝疾患により引き起こされる動脈硬化症を予防、減少または改善する、請求項 1 の医薬組成物。

【請求項 4】

肝臓の脂質の酸化または利用の増強、血中のトリグリセリドレベルの低下または血中のコレステロールレベルの低下をもたらし、ここで、肝臓の脂質の酸化が増加され、トリグリセリドレベル、高コレステロール血症またはこの何れかの組み合わせが改善される、請求項 1 の医薬組成物。

【請求項 5】

血漿トリグリセリドおよび／または血漿 L D L レベルの低下、主要心血管イベント（M

A C E) の発生の減少または一次心血管事象の予防、遅延または重症度を軽減するための血漿脂質特性の治療がもたらされる、請求項 1 の医薬組成物。

【請求項 6】

血漿総コレステロール、血漿 L D L コレステロール、非 H D L - コレステロール、V L D L - コレステロールまたはこれらの組み合わせを低減する、請求項 5 の医薬組成物。

【請求項 7】

肝線維症を軽減する、請求項 1 の医薬組成物。

【請求項 8】

非アルコール性脂肪性肝疾患 (N A F L D) 活動性スコア (N A S) を安定化または低減する、請求項 1 の医薬組成物。

【請求項 9】

N A F L D 活動性スコア (N A S) の脂肪肝成分の進行遅延、安定化もしくは低減をする、N A S の小葉の炎症成分の進行遅延、安定化もしくは低減をするまたは N A S の肝細胞バルーニング成分の進行遅延、安定化もしくは低減をするまたはこの何れかの組み合わせをもたらす、請求項 8 の医薬組成物。

【請求項 10】

コレステロール吸収阻害剤、P P A R α アゴニスト、A C E 阻害剤、カルシウムチャネル遮断薬、A R B、利尿剤、レニン、G L P - 1 またはその合成バリエーションまたはその合成バリエーション、メトホルミン、スルホニル尿素化合物、チアゾリジンジオン (T Z D)、S G L T 2 阻害剤、D P P - I V 阻害剤、H M G C o A レダクターゼ阻害剤、プロタンパク質転換酵素サブチリシン／ケキシン 9 型 (P C S K 9) 阻害剤、エゼチミブ、ゲムフィブロジル、フェノフィブラート、クロフィブラート、ベザフィブラート、ペマフィブラート、ゲムカベン (C I - 1027)、ベンペド酸 (E T C - 1002)、A C C 阻害剤、A p o C - I I I 阻害剤、A C L 阻害剤、処方魚油、C E T P 阻害剤、抗線維化剤およびそれらの組み合わせから選択される治療剤を含む第 2 の治療薬と共投与される、請求項 1 ～ 9 の何れかの使用のための医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2018 年 8 月 10 日に出願された米国特許出願第 62 / 717, 546 号の優先権を主張する。前述の出願の内容全体が、本明細書に援用される。

【背景技術】

【0002】

「非アルコール性脂肪性肝疾患 (N A F L D) は、世界中、特に西欧諸国でますます一般的になっている。米国では、これは慢性肝疾患の最も一般的な形態であり、推定 8000 万～1 億人が罹患している。非アルコール性脂肪性肝疾患は、アルコールをほとんどまたはまったく飲まない人々に影響を与える様々な肝疾患の総称である。名前が示すように、非アルコール性脂肪性肝疾患の主な特徴は、肝細胞に多量の脂肪が蓄積されることである。肝臓に脂肪が含まれていることは正常である。しかしながら、肝臓の重量の 5%～10% 超が脂肪である場合、その状態は脂肪肝 (脂肪症) と呼ばれる。

【0003】

N A F L D のより重症な形態は、非アルコール性脂肪性肝炎 (N A S H) と呼ばれる。N A S H は、肝臓を腫れさせ、損傷を与える。N A S H は、過体重すなわち肥満であるか、または糖尿病、高コレステロールもしくは高トリグリセリドもしくは炎症状態を有する人に発症する傾向がある。この疾患の潜在的に重度な形態である N A S H は、肝細胞のバルーニングと肝臓の炎症を特徴とし、これらは瘢痕化と不可逆的な損傷に進行し得る。

【発明の概要】

【0004】

本開示の第 1 の態様は、炎症性疾患、代謝疾患及び／または心血管疾患の治療方法を提供し、方法は、治療有効量のグリシンまたはグリシン含有トリペプチド分子を、1 つ以上

10

20

30

40

50

の炎症性疾患、代謝疾患及び／または心血管疾患を有する対象に投与することを含む。様々な実施形態において、グリシン含有トリペプチド分子は、DT-190 (Gly-Gly-Leu) 及びDT-110 (Gly-Gly-dLeu) のうちの1つ以上を含み得る。様々な実施形態において、代謝疾患とは、代謝のエラー、代謝の不均衡、または最適ではない代謝が生じる、特定された障害の群を指す。本明細書に記載の代謝疾患には、代謝の調節を通じて治療することができる疾患も含まれるが、疾患自体は、特定の代謝欠損によって引き起こされるものであっても、そうでなくてもよい。そのような代謝疾患は、例えば、グルコース及び脂肪酸の酸化経路を含み得る。「代謝障害」または「代謝疾患」とは、代謝機能の変化または妨害を特徴とする病態を指す。「代謝性」及び「代謝」は、当技術分野で周知の用語であり、一般的に、生きている生物内で生じる全範囲の生化学的プロセスを含む。代謝疾患及び心血管疾患として、肥満、糖尿病、アテローム性動脈硬化症、メタボリックシンドローム、脂質異常症、冠動脈心疾患、冠動脈疾患、動脈硬化症、アテローム血栓性脳卒中、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)、高脂肪酸血症もしくはメタボリックシンドローム、またはそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。脂質異常症は高脂血症であり得る。高脂血症は、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、または高コレステロール血症と高トリグリセリド血症の両方であり得る。NAFLDは、脂肪肝または脂肪性肝炎であり得る。糖尿病は、2型糖尿病または脂質異常症を伴う2型糖尿病であり得る。様々な実施形態において、グルコース調節不全及び／または体内、循環内または例えば肝臓などの様々な器官内への脂質の蓄積に関連する代謝疾患、ならびにそれらから生じる病理学的続発症、例えば、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)、高血糖症、前糖尿病、糖尿病 (I型及びII型)、肥満、インスリン抵抗性、メタボリックシンドローム及び糖尿病性脂質異常症に適用可能な方法を本明細書に提示する。

【0005】

代謝性の疾患、障害または病態は、多数の身体的症状を特徴とし得る。代謝性の疾患、障害または病態と関連する当業者に公知の任意の症状は、グリシントリペプチド分子及び本明細書に記載の方法を用いて、予防、治療、改善され得るか、さもなければ調節され得る。特定の実施形態では、症状は、多尿の生成 (多尿)、過度の渇き及び流体摂取の増加 (多飲)、霧視、原因不明の体重減少及び嗜眠のいずれかで有り得るが、これらに限定されない。

【0006】

特定の実施形態では、炎症性疾患、障害または病態として、大動脈弁狭窄症、冠動脈疾患 (CAD)、アルツハイマー病、及び血栓塞栓性疾患、障害または病態が挙げられるが、これらに限定されない。特定の血栓塞栓性疾患、障害または病態として、脳卒中、血栓症、心筋梗塞、及び末梢血管疾患が挙げられるが、これらに限定されない。

【0007】

特定の実施形態では、本明細書に記載のグリシンまたはグリシントリペプチド分子の使用は、炎症性疾患、障害または病態の生理学的マーカーまたは表現型を調節する。例えば、化合物を動物に投与することにより、それらの動物における炎症性サイトカインまたは他の炎症性マーカーレベルを、未処理の動物に比べて低下させることができる。特定の実施形態では、生理学的マーカーまたは表現型の調節は、化合物による肝臓DAGの阻害、グルコース低下、及び血漿LDLレベルの低下と関連し得る。

【0008】

特定の実施形態では、炎症性の疾患、障害または病態の生理学的マーカーを定量化することができる。例えば、サイトカインレベルは、当技術分野で公知の標準的な試験によって測定し、定量化することができる。そのようなマーカーについて、特定の実施形態では、マーカーを、少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%、またはこれらの値のいずれか2つによって定義される範

10

20

30

40

50

囲で減少させることができる。

【0009】

また、本明細書において、それを必要とする対象における疾患、障害または病態に関連する症状を、予防、治療または改善するための方法を提供する。特定の実施形態では、炎症性の疾患、障害または病態に関連する症状の発症率を低下させるための方法を提供する。特定の実施形態では、炎症性の疾患、障害または病態に関連する症状の重症度を低下させるための方法を提供する。そのような実施形態では、方法は、治療有効量のグリシンもしくはグリシントリペプチド分子、またはその薬学的に許容される塩を、それを必要とする個体に投与することを含む。

【0010】

特定の実施形態は、それを必要とする対象における代謝性、心血管性及び炎症性の疾患、特にコレステロール異常、トリグリセリド及びグルコース関連の疾患、障害、及び病態を含む障害を、予防、治療、遅延、進行の鈍化及び／または改善するための組成物及び方法を提供する。特定の実施形態は、それを必要とする対象におけるトリグリセリド及び総コレステロール関連の疾患、障害、及び病態を、予防、治療、遅延、進行を鈍化及び／または改善するための組成物及び方法を提供する。特定の実施形態では、そのような疾患、障害、及び病態には、炎症性、心血管性及び／または代謝性の疾患、障害、及び病態が含まれる。特定のそのような心血管性の疾患、障害または病態として、大動脈弁狭窄症、動脈瘤（例えば、腹部大動脈弁狭窄症）、アングナ、不整脈、アテローム性動脈硬化症、脳血管疾患、冠動脈疾患、冠動脈心疾患、脂質異常症、高コレステロール血症、高脂質血症、高血圧、高トリグリセリド血症、心筋梗塞、末梢血管疾患（例えば、末梢動脈疾患、末梢動脈閉塞性疾患）、網膜血管閉塞、または脳卒中が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、代謝性の疾患、障害または病態として、高血糖、前糖尿病、糖尿病（Ⅰ型及びⅡ型）、肥満、インスリン抵抗性、メタボリックシンドローム及び糖尿病性脂質異常症が挙げられるが、これらに限定されない。特定のそのような炎症性の疾患、障害または病態として、大動脈弁狭窄症、冠動脈疾患（CAD）、アルツハイマー病、及び血栓塞栓性の疾患、障害または病態が挙げられるが、これらに限定されない。特定の血栓塞栓性の疾患、障害または病態として、脳卒中、血栓症（例えば、静脈血栓塞栓症）、心筋梗塞、及び末梢血管疾患が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態は、特に肝疾患に関連する場合、ブドウ糖感受性ならびに全身性の炎症及び線維症を、予防、治療、遅延、進行を鈍化及び／または改善することに加えて、抑制性ミトコンドリア／ペルオキシソーム脂肪酸β酸化（FAO）を伴う食事性高脂血症及び脂肪性肝炎を、予防、治療、遅延、進行を鈍化及び／または改善するための組成物及び方法を提供する。

【0011】

本開示の第1の態様の一実施形態は、グリシンまたはDT-109（Gly-Gly-Leu）の投与を含む、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）を治療するための方法を提供する。本開示の第1の態様の別の実施形態は、グリシンまたはDT-109（Gly-Gly-Leu）の投与を含む、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）を治療するための方法を提供する。本開示の第1の態様の別の実施形態は、DT-110（Gly-Gly-dLeu）の投与を含む、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）を治療するための方法を提供する。本開示の第1の態様の一実施形態は、グリシンまたはDT-110（Gly-Gly-dLeu）の投与を含む、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）を治療するための方法を提供する。これらのトリペプチドは、場合により、本明細書に記載するような二次治療薬と組み合わせて投与することができる。

【0012】

本開示の第2の態様は、選択されたトリペプチドまたはその薬学的に許容される塩を投与することを含む、患者の線維症を軽減するための方法を提供する。本開示の第2の態様の一実施形態は、グリシンまたはDT-109（Gly-Gly-Leu）の投与を含む、患者の線維症を軽減するための方法を提供する。本開示の第2の態様の別の実施形態は、グリシンまたはDT-110（Gly-Gly-dLeu）の投与を含む、患者の線維

10

20

30

40

50

症を軽減するための方法を提供する。これらのトリペプチドは、場合により、スタチンと併用して投与することができる。

【0013】

本開示の第3の態様は、それを必要とする対象に、1つ以上のトリペプチド分子またはその薬学的に許容される塩を投与することを含む、脂肪肝を治療する方法を提供する。第3の態様の一実施形態では、方法は、肝脂質中のトリグリセリドレベルを低下させるか、または肝脂質中の総コレステロールレベルを低下させた。

【0014】

本開示の第4の態様は、選択されたトリペプチド、場合によりスタチン、及び使用説明書を含む、NAFLDまたはNASHを有する対象を治療するためのキットを提供する。キットの一実施形態では、キットは、有効量のグリシンまたはDT-109 (Gly-Gly-Leu)、場合によりスタチン、及び使用説明書を含む。別の実施形態では、キットは、グリシンまたは(DT-110 (Gly-Gly-dLeu)、場合によりスタチン、及び使用説明書を含む。さらに別のキットでは、キットは、グリシンまたはDT-109 (Gly-Gly-Leu) 及び／または(DT-110 (Gly-Gly-dLeu)、場合によりスタチン、及び使用説明書を含む。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】実験計画(図1A)、研究全体の平均食物摂取量(図2B)、エンドポイント体重(図1C)、ベースラインからエンドポイントまでの体重の総増加(図1D) (B~Dに関して $n=8\sim10$)、エンドポイントでの腹腔の全体的な形態(図1E)、血漿グリシン含有トリペプチド分子レベル(図1F) ($n=6\sim8$)。* $p<0.05$; ** $p<0.01$ 対WD+H₂O。

【図2】急性OGTT(マウスにグルコースと、治療薬または対照として水を与えた)(図2A)、慢性OGTT(マウスにグルコースのみを与えた)(図2B)、水または治療薬存在下で、強制経口投与する前(強制経口投与前)及び30分後(強制経口投与後)に測定した非空腹時血糖値(図2C)、エンドポイント血糖値(6時間の絶食後)(図2D)。グルコース取り込み及び糖新生を調節する肝遺伝子発現のqPCR分析(図2E)。($n=8\sim10$) * $p<0.05$; ** $p<0.01$ 、*** $p<0.001$ 対WD+H₂O; # $p<0.05$ 、### $p<0.001$ 対 強制経口投与前。

【図3】代表的な肝臓組織のH&Eスライド(図3A)であり、小滴性脂肪肝及び大滴性脂肪肝を、それぞれ、赤色及び黄色の矢印でマークする。肝脂質を抽出し、続いて(図3B) TG含有量、及び(図3C) TC含有量を定量化した、** $p<0.01$ 、*** $p<0.001$ 対WD+H₂O。

【図4】脂質酸化の経路を調節する肝遺伝子発現のqPCR分析(図4A及び図4B)、コレステロール恒常性を調節する肝遺伝子発現のqPCR分析(図4C) ($n=7\sim10$)。β-アクチンに対して正規化したABCG8存在量のウエスタンブロット分析及び定量化(図4D及び図4E) ($n=4\sim6$)。* $p<0.05$; ** $p<0.01$ 、*** $p<0.001$ 対WD+H₂O。

【図5】ベースライン(治療薬を含まないWD給餌の1週間)及びエンドポイント(治療薬または水対照を含むWD給餌の12週間後)での血漿TCレベル(図5A)。(図5B) TC、(図5C) LDL、(図5D) HDL、及び(図5E) TGのエンドポイント血漿レベル。6時間の絶食後に採血を実施した。(図5F) オイルレッドO染色によって視覚化した動脈硬化巣の分析、及び(図5G) 染色された大動脈の代表的な画像。($n=6\sim10$)。* $p<0.05$; ** $p<0.01$ 、*** $p<0.001$ 対WD+H₂O。

【図6】IL-6(図6A)、レジスチン(図6B)、及びMCP1(図6C)のエンドポイント血漿レベル。(図6D) 精巣上体脂肪組織(EAT)、及び(図6E) 皮下脂肪組織(SAT)における炎症性サイトカインのqPCR分析。($n=6\sim10$)。* $p<0.05$; ** $p<0.01$ 、*** $p<0.001$ 対WD+H₂O。

【図7A】肝臓における炎症性サイトカインのqPCR分析

【図7B】肝臓における代表的なF4/80免疫組織化学

【図7C】定量化。(n=7~10)。*p<0.05対WD+H₂O。

【図8】NASH食餌を与えたAGXT1^{-/-}マウスの血漿変化。HepG2細胞にsiCTLまたはsiAGXT1を形質移入した：(図8C)GAPDHと比較したAGXT1 mRNA (n=12)、(図8D)ローディング対照としてGAPDHを含むAGXT1タンパク質 (n=4)、及び(図8E)PAローディングの存在下または非存在下での細胞TG (200 μM, n=12)。(図8A)AGXT1遺伝子のエキソン1上のガイドRNA標的部位に下線が引かれており、PAMから3塩基離れた位置のA欠失がサンガーシーケンシング法によって確認された。(図8B)ウエスタンブロットによって確認されたAGXT1の欠損 (n=7)。AGXT1^{+/+}マウス及びAGXT1^{-/-}マウスにNASH食餌を12週間与えた (n=12)：血漿(図8L)TG、(図8M)TC、(図8N)AST、(図8O)ALT、及び(図8P)グリシン/シュウ酸比。データは平均±SDであり、全点とP値を示している。PA、パルミチン酸。CD給餌下では、AGXT1^{+/+}とAGXT1^{-/-}は同等である。AGXT1^{+/+}マウス及びAGXT1^{-/-}マウスに標準CDを12週間与えた (n=6)：(図8F)体重、(図8G)腹膜腔の肉眼的外観ならびにH&E及びORO染色を使用した組織学(スケールバー：H&Eについては50 μm、OROについては100 μm)、(図8H)肝臓重量、(図8I)体重(BW)に対する肝臓重量(LW)の比、(図8J)血漿AST、及び(図8K)血漿ALT。データは平均±SDであり、全点を示す。

【図9】グリシン系化合物。グリシンに構造的に類似した化合物を選択して、グリシン骨格の構造的、立体配座的、電子的及び立体的等価の修飾を評価した。(図9A)グリシン、(図9B)N-メチルグリシン、(図9C)N,N-ジメチルグリシン、(図9D)N,N,N-トリメチルグリシン、(図9E)グリコール酸、(図9F)グリシンアミド、(図9G)2-アミノ-N-メチルアセトアミド、(図9H)エタノールアミン、(図9I)2-オキソピペラジン、(図9J)モルホリン-2-オン、及び(図9K)(1H-テトラゾール-5-イル)メタナミン。

【図10】NAFLDにおけるグリシン生合成の障害。C57BL/6JマウスにCDまたはWDを12週間与えた (n=4~5)：(図10A)血漿TC、(図10B)肝臓組織学(スケールバー：H&E 50 μm、ORO 100 μm)、(図10C)肝臓TG、(図10D)肝臓TC、(図10E)CDと比較した血漿AA、(図10F)GAPDHと比較したグリシン生合成遺伝子の肝臓発現。(図10G)細胞TG、及び(図10H)200 μMのPAまたはエタノールを24時間ローディングしたHepG2細胞におけるAGXT1発現 (n=3~4)。C57BL/6JマウスにNASH食餌またはCDを24週間与えた (n=10)：(図10I)肝臓の形態、H&E及びシリウスレッドの組織学(スケールバー：50 μm)。(図10K)CDまたはNASHマウス由来の肝臓のRNA配列決定によるグリシン生合成遺伝子/経路の有意な下方制御(緑色)(n=3、log₂FC、log₂倍率変化)。(図10L)食事性NASHを有するマウスにおけるGAPDHと比較したAGXT1発現 (n=8)。(図10M)健康な患者とNASH患者に由来する肝臓マイクロアレイデータのメタ分析によるグリシン代謝遺伝子における有意な下方制御(緑色)または上方制御(赤色)。(図10N)移植ドナー由来の肝臓におけるAGXT1発現と総肝脂肪との間の相関 (n=206)。データは平均±SDであり、全点とP値を示している。NASHを有するマウスの肝臓の経路分析。CDまたはNASH食餌を24週間与えたマウスの肝臓のRNA配列決定後の経路分析 (n=3)。上方制御された差次的発現遺伝子(DEG)が豊富な経路を赤色でプロットし、一方、下方制御されたDEGが豊富な経路を緑色でプロットする。

【図11】AGXT1^{-/-}マウスにおける加速された食事性NASH。AGXT1^{+/+}マウス及びAGXT1^{-/-}マウスにNASH食餌を12週間与えた (n=12)：(図11A)腹腔の肉眼的な外観、及び肝臓組織学(スケールバー：H&E及びシリウスレッド50 μm、ORO 100 μm)、(図11B)肝臓重量/体重(LW/BW)比、(図11E)肝臓TG、(図11F)肝臓TC、(図11G)NAS、及び(図11H)線維症

10

20

30

40

50

スコア。データは平均±SDであり、全点とP値を示している。(図11J) AGXT1^{+/+}マウス及びAGXT1^{-/-}マウス由来の肝臓のRNA配列決定後の経路分析(n=4)。上方制御または下方制御されたDEGが豊富な経路を、それぞれ赤色または緑色でプロットする。(図11K) 25個のNASH関連DEGのヒートマップ。(図11L) qPCRによって確認されたFAO関連のDEG(n=10)、及び(図11M) ウエスタンブロット(n=4)。(図11N) 炎症及び(図11O) qPCRによって確認された線維症関連DEG(n=10)。データは平均±SEである。*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001対AGXT1^{+/+}。NASH食餌を与えたAGXT1^{-/-}マウスのNAFLD関連パラメータ。AGXT1^{+/+}マウス及びAGXT1^{-/-}マウスにNASH食餌を12週間与えた(n=12)：(図11C) 体重、(図11D) 肝臓重量、ならびに(図11I) H&Eベースの脂肪肝、肝細胞バルーン化及び小葉内炎症のスコアリング。データは平均±SDである。

10

【図12】グリシン欠乏症は、WD誘発性肥満を悪化させる。ApoE^{-/-}マウスに、CD、WD_{AA}+GlyまたはWD_{AA}-Glyを10週間給餌した(n=6)：(図12A) 血漿グリシン。NMRベースの体組成分析：(図12B) 体重、(図12C) 体脂肪(%)、及び(図12D) 除脂肪体重(%)。CLAMS分析：(図12E) 食物摂取、(図12F) 総活性、(図12G) 呼吸交換率(RER)、及び(図12H) エネルギー消費。(図12I) 血漿グリシントリペプチド分子、及び(図12J) 精巣上体組織及び皮下脂肪組織のH&E組織学(EAT及びSAT、スケールバー：100µm)。データは平均±SDであり、全点とP値を示している。

20

【図13】グリシン欠乏症は、WD誘発性の高脂血症とHSを悪化させる。ApoE^{-/-}マウスに、CD、WD_{AA}+GlyまたはWD_{AA}-Glyを10週間給餌した(n=6)：(図13A) 血漿TC、(図13B) 血漿TG、(図13C) 血漿LDL、(図13D) 血漿HDL、(図13E) 血漿グルコース、(図13F) H&E及びORO染色を使用した肝臓組織学(スケールバー：H&Eの場合は50µm、OROの場合は100µm)、(図13G) 肝臓TG、ならびに(図13H) 肝臓TC。データは平均±SDであり、全点とP値を示している。血漿グリシンと：(図13I) 血漿TC、(図13J) 血漿グルコース、及び(図13K) 肝臓TGとの間のスピアマン相関分析。

30

【図14】耐糖能に対するグリシン系化合物の効果。12時間の絶食後のC57BL/6JマウスにOGTTを実施した(n=6~8)。マウスに、グルコースのみ(2mg/g体重)、グルコースと0.5mg/g体重のグリシンまたは0.5mg/g体重のグリシン系化合物：(図14A) N-メチルグリシン、(図14B) N,N-ジメチルグリシン、(図14C) N,N,N-トリメチルグリシン、(図14D) グリコール酸、(図14E) DT-110、及び(図14F) DT-109を経口投与した。(図14G) マウスに、グルコースのみ(2mg/g体重)、グルコースとDT-109(0.5mg/g体重)または同等レベルの遊離ロイシンもしくはグリシン(それぞれ0.17または0.33mg/g体重)を経口投与した。データは平均±SEである。*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001対グルコース；#P<0.05対ロイシン。^P<0.05対グリシン。

【図15】DT-109の脂質低下作用。(図15A) ApoE^{-/-}マウスに標準WDを給餌し、DT-109(1mg/g体重/日)、同等レベルの遊離ロイシンもしくはグリシン(0.33または0.67mg/g体重)またはH₂Oを12週間経口投与した(n=8~10)。(図15B) 10週目に、12時間の絶食後にOGTTを実施した。マウスに、経口グルコースのみ(2mg/g体重)、グルコースと1mg/g体重のDT-109または同等レベルの遊離ロイシン(0.33mg/g体重)もしくはグリシン(0.67mg/g体重)を経口投与した。データは平均±SEである。**P<0.01、***P<0.001対H₂O；#P<0.05、##P<0.01、###P<0.001対ロイシン。(図15C) 非空腹時血糖を、DT-109、ロイシン、グリシンまたはH₂Oを用いた毎日の強制経口投与の30分前及び30分後に測定した。(図15D) エンドポイント体重。(図15E) 平均食物摂取量。(図15F) ベースライン(実験群への無

40

50

作為化前)及びエンドポイントでの血漿TC(データは平均±SEである)。エンドポイント血漿分析(n=6~8):(図15G)TC。(図15H)LDL。(図15I)HDL。(図15J)TG、及び(図15K)グリシントリペプチド分子。データは平均±SDであり、全点とP値を示している。(図15L)精巣上体組織及び皮下脂肪組織のH&E組織学(EAT及びSAT、スケールバー:100µm)。

【図16】グリシンまたはDT-109は、WD誘発性HSを予防する。エンドポイント肝臓分析(n=8~10):(図16A)腹腔の肉眼的的外観及びH&E及びOROを使用した組織学(スケールバー:H&Eの場合は50µm、OROの場合は100µm)、(図16B)肝臓TG、ならびに(図16C)肝臓TC。データは平均±SDであり、全点とP値を示している。(図16D)FAO及び炎症を調節する重要な遺伝子の、GAPDHと比較したqPCR分析。データは平均±SEである。*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001対WD+H₂O。

【図17】実験群への無作為化前のNASHの確認。C57BL/6Jマウスに、CD(n=11)またはNASH食餌(n=50)を12週間与えた。(図17B)血漿グルコース、TC、AST及びALTの分析のために顎下静脈から空腹時血液を採取した(データは平均±SDである)。マウスのサブセット(CD:n=3、NASH食餌 n=5)を殺処分して肝臓の病理を確認した:(図17C)肝臓-体重比(LW/BW)。(図17D)腹腔の肉眼的的外観及びH&E、ORO及びシリウスレッドを使用した組織学(スケールバー:H&E及びシリウスレッドの場合は50µm、OROの場合は100µm)、(図17F)脂肪肝、肝細胞バロニング及び小葉内炎症スコアの(図17E)合計としてのNAS。データは平均±SDであり、全点とP値を示している。(図17G)18週目に、12時間の絶食後にOGTTを実施した(n=8~9)。マウスに、グルコースのみ(2mg/g体重)、グルコースと0.5mg/g体重のDT-109または同等レベルの遊離ロイシン(0.17mg/g体重)、グリシン(0.33mg/g体重)またはH₂Oを経口投与した。データは、平均±SEである。*P<0.05、**P<0.01対CD+H₂O;##P<0.01、###P<0.001対NASH+H₂O;^^P<0.01対NASH+ロイシン。(図17H)DT-109、ロイシン、グリシン、またはH₂Oによる毎日の強制経口投与の30分前及び30分後の非空腹時血糖。データは平均±SDであり、全点とP値を示す。確立されたNASHを有するC57BL/6JマウスにおけるDT-109の代謝効果。C57BL/6Jマウスに、CDまたはNASH食餌を12週間給餌した。NASHの確認後、マウスを無作為化して、0.125もしくは0.5mg/g体重/日のDT-109または同等レベルのロイシンもしくはグリシン(0.17または0.33mg/g体重/日)またはH₂Oを、NASH食餌下で強制経口投与によりさらに12週間与えた。マウスにCDを給餌し、H₂Oを投与して対照とした(n=8~9)。(図17L)精巣上体組織及び皮下脂肪組織のH&E組織学(EAT及びSAT、スケールバー:100µm)。22~23週でのCLAMS分析:(図17M)食物摂取、(図17N)脂肪の酸化、(図17O)グルコースの酸化、(図17P)呼吸交換率(RER)、(図17Q)エネルギー支出、及び(図17R)総活性。データは平均±SDであり、全点とP値を示している。DT-109は、食事性NASHから保護する。(図17A)C57BL/6JマウスにCDまたはNASH食餌を12週間給餌した。NASHの確認後、マウスを無作為化して、0.125もしくは0.5mg/g/日のDT-109または同等レベルのロイシン、グリシン(0.17、0.33mg/g/日)またはH₂Oを、NASH食餌下で強制経口投与によりさらに12週間与えた。マウスにCDを給餌し、H₂Oを投与して対照とした(n=8~9)。22~23週でのNMRベースの体組成分析:(図17I)体重、(図17J)体脂肪(%),及び(図17K)除脂肪体重(%)。

【図18】エンドポイント血漿分析:(図18A)AST、(図18B)ALT、(図18C)ALP、(図18D)TG、及び(図18E)TC。(図18F)肉眼形態及びH&E組織学(スケールバー:50µm)。(図18G)LW/BW比。(図18I)NAS。データは平均±SDであり、全点とP値を示している。DT-109は、食事性N

10

20

30

40

50

A S Hから保護する。C 5 7 B L / 6 JマウスにC DまたはN A S H食餌を12週間給餌した。N A S Hの確認後、マウスを無作為化して、0.125もしくは0.5mg / g体重 / 日のD T - 1 0 9または同等レベルのロイシンもしくはグリシン (0.17または0.33mg / g体重 / 日) またはH₂Oを、N A S H食餌下で強制経口投与によりさらに12週間投与した。マウスにC Dを給餌し、H₂Oを投与して対照とした (n = 8 ~ 9)。(図18H) 肝臓重量、及び (図18J) 脂肪症、肝細胞バルーニング及び小葉内炎症のH & Eベースのスコアリング。データは平均 ± S Dである。N A Sと: (図18K) 血漿A S T、(図18L) 血漿A L T、及び (図18M) 血漿A L Pとの間のスピアマン相関分析。

【図19】グリシン系の治療薬は、N A S H食事性F A O障害を修正し、H Sを低減する。エンドポイントで採取した肝臓のR N A配列決定 (n = 4): (図19A) P C A、(図19B) C Dと比較した各群におけるD E G (緑色: 下方制御; 赤: 上方制御) のボルケーノプロット、(図19F) N A S H + H₂OとN A S H + 0.5mg / g / 日D T - 1 0 9を比較する経路分析。上方制御または下方制御されたD E Gが豊富な経路を、それぞれ赤色または緑色でプロットし、(図19G) 全実験群にわたる50個のN A S H関連D E Gのヒートマップ (log₂倍率変化対C D群)。(図19H) q P C Rを使用したF A O関連D E Gの検証 (n = 8 ~ 9)、データは平均 ± S Eであり、* P < 0.05、** P < 0.01、*** P < 0.001対C D; # P < 0.05、## P < 0.01、### P < 0.001対N A S H + H₂O、及び (図19I) ウェスタンブロット (n = 4)。

(図19K) O R O組織学 (スケールバー: 100 μm)、(図19L) 肝臓T G。(図19N) 肝臓D A G (n = 8 ~ 9)。データは平均 ± S Dであり、全点とP値を示している。D T - 1 0 9は、N A S H食事性トランスクリプトームの変化を逆転させる。C D群と比較したlog₂倍率変化によって決定される、全実験群にわたる上位50個のD E Gのヒートマップに基づく表現。各行は1つの遺伝子を表し、各列はC D群との1つの比較を表す。(n = 4)。C Dを給餌したマウスとN A S H食餌を給餌したマウスに由来する肝臓の経路分析。(図19D) 上方制御されたD E Gが濃縮された経路を赤色でプロットし、一方、下方制御されたD E Gが濃縮された経路を緑色でプロットしている。(図19E) C DまたはN A S Hマウス由来の肝臓のR N A配列決定によって分析するグリシン生合成遺伝子 / 経路の変化及び経路分析 (n = 4)。有意に下方制御された遺伝子 / 経路を緑色で強調表示する (log₂ F C、log₂倍率変化)。(図19J) F A O関連D E Gのq P C R検証 (n = 8 ~ 9)。データは平均 ± S Eである。* P < 0.05、** P < 0.01、*** P < 0.001対C D; # P < 0.05、## P < 0.01対N A S H + H₂O。(図19M) 肝臓T C (n = 8 ~ 9)。データは平均 ± S Dであり、全点とP値を示している。

【図20】肝線維症スコアと: (図20H) 血漿A S T、(図20I) 血漿A L T、及び (図20J) 血漿A L Pとの間のスピアマン相関分析。グリシン系の治療薬は、N A S H食事性の肝炎及び線維症を軽減する。(図20A) F 4 / 8 0免疫組織化学及びシリウスレッド組織学 (スケールバー: 50 μm)、(図20B) F 4 / 8 0陽性面積、(図20C) 血漿M C P - 1、及び (図20D) レジスチン。データは平均 ± S Dであり、全点とP値を示している (n = 6 ~ 9)。(図20E) 炎症関連D E Gのq P C R検証 (データは平均 ± S Eである、n = 8 ~ 9)。* P < 0.05、** P < 0.01、*** P < 0.001対C D; # P < 0.05、## P < 0.01、### P < 0.001対N A S H + H₂O。(図20F) シリウスレッド陽性面積。(図20G) 線維症スコア。(図20K) リン酸化S M A D 2のウェスタンブロット (S e r 4 6 5 / 4 6 7) 及び全S M A D 2。(図20L) 線維症関連D E Gのq P C R検証。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本明細書中で使用する場合: 「脂肪肝 (s t e a t o s i s)」は、肝臓における脂肪の蓄積である「脂肪肝 (f a t t y l i v e r)」と同義である。

【0017】

10

20

30

40

50

対象は哺乳類であってもよく、哺乳類は、例えば、実験動物またはヒトであってもよく、そしてヒト対象には、成人、青年及び小児の対象が含まれる。

【0018】

「脂肪肝 (steatosis)」及び「脂肪肝 (hepatic steatosis)」は、本明細書中では同じ意味で使用される。

【0019】

「血漿 (blood plasma)」及び「血漿 (plasma)」は、本明細書中では同じ意味で使用される。

【0020】

「血液 (blood)」及び「血漿 (plasma)」は、本明細書中では同じ意味で使用される。

10

【0021】

本明細書中では、西洋食を「WD」と略記する。

【0022】

本明細書中では、顔面静脈を「FV」と略記する。

【0023】

「TG」は、トリグリセリドの略語である。

【0024】

「TC」は、総コレステロールの略語である。

【0025】

「OGTT」は、経口グルコース負荷試験の略語である。

20

【0026】

本明細書中で使用する場合、文脈上明確な断りのない限り、単数形「a」、「an」及び「the」には、複数の指示対象が含まれる。

【0027】

「または」は、いくつかの場合では「と組み合わせて」を意味し得るため、AまたはBの投与は、Aの投与、Bの投与、またはAとBの投与であり得る。

【0028】

グリシン以外の一般的なアミノ酸はすべて、少なくとも1つのキラル炭素原子を含む。したがって、これらのアミノ酸は、L-異性体及びD-異性体と呼ばれる立体異性体のペアとして存在する。ほとんどの天然タンパク質及びペプチドは、L-異性型のみからなる。D-異性型アミノ酸は、ペプチドまたはタンパク質のコンフォメーションに影響を与える可能性があり、安定性の向上または活性の変化を招き得る。

30

【0029】

本明細書中で使用する場合、用語「薬学的に許容される塩」とは、妥当な医学的判断の正常な範囲内で、過度の毒性、刺激性、アレルギー応答などを起こさずに、ヒト及び下等動物の組織と接触させて使用することに適合するとともに、合理的な利益／リスク比を有する塩を指す。「薬学的に許容される塩」とは、レシピエントへの投与時に、本発明の化合物を直接的または間接的に提供することができる、本発明の化合物の任意の非毒性塩またはエステルの塩を意味する。薬学的に許容される塩は当技術分野で周知である。例えば、Bergeらは、薬学的に許容される塩をJ. Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19 (1977) に詳細に記載している。

40

【0030】

本発明のペプチドの送達に適した医薬組成物及びそれらの調製方法は、当業者には容易に明らかになるであろう。それらを調製するためのそのような組成物及び方法は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Md. (2000) に見出し得る。本発明のペプチドを、即放性及び／または放出調節性であるように製剤化してもよい。

50

【0031】

用語「治療する」（または「治療」もしくは「治療する」などの他の形態の単語）は、本明細書中では、本発明の組成物の投与が患者の病態を緩和し、及び／または病態に関連する特定の特性または事象を軽減、抑制、または排除することを意味するように用いられる。したがって、用語「治療」は、特に患者が病態を獲得する素因がある場合に患者における病態の発症を予防し；病態を軽減または抑制し；及び／または病態を改善または逆転させることを含む。本発明の方法が病態を予防することを目的とする限り、用語「予防する」は、病態が完全に阻止されることを必要としないことが理解される。むしろ、本明細書中で使用する場合、予防という用語は、病態の発症前に本発明の組成物の投与を行い得るように、病態に感受性のある集団を特定する当業者の能力を指す。この用語は、病態を完全に回避する必要があることを意味するものではない。

10

【0032】

本明細書中で使用する「有効量」とは、検出可能な治療効果を示すのに十分な本発明のグリシン含有トリペプチドの量を指す。この効果は、例えば、臨床状態の改善、または合併症の予防、軽減または改善によって検出される。患者に対する正確な有効量は、患者の体重、サイズ、及び健康状態；病態の性質及び程度；ならびに投与のために選択された治療薬または治療薬の組み合わせによって異なる。所与の状況に対する治療有効量は、臨床医の技術と判断の範囲内にある日常的な実験によって決定される。

【0033】

本明細書中で使用する場合、「代謝性及び／または心血管性及び／または炎症性の疾患」を有する対象を「特定すること」または「選択すること」とは、高コレステロール血症、高血糖症、高脂血症、高トリグリセリド血症、高血圧、インスリン抵抗性の増加、インスリン感受性の低下、正常体重超過、及び／または正常体脂肪含有量超過またはそれらの任意の組み合わせを含むがこれらに限定されない、代謝疾患、心血管疾患、全身性もしくは限局性炎症性疾患；またはメタボリックシンドロームであると診断されやすいかまたは診断されている対象を特定または選択すること；あるいは、代謝疾患、心血管疾患、またはメタボリックシンドロームの症状を有する対象を特定または選択することを意味する。そのような特定は、血清もしくは循環（血漿）コレステロールの測定、血清もしくは循環（血漿）血糖の測定、血清もしくは循環（血漿）トリグリセリドの測定、炎症性サイトカインもしくはコルチゾールの測定、血圧の測定、体脂肪含有量の測定、体重の測定などの標準的な臨床試験または評価を含むがこれらに限定されない任意の方法によって達成することができる。

20

30

【0034】

本明細書中で使用する場合、「グルコース」は、エネルギー源及び炎症性中間体として細胞によって使用される単糖である。「血漿グルコース」とは、血漿中に存在するグルコースを指す。

【0035】

本明細書中で使用する場合、「高密度リポタンパク質C」または「HDL-C」とは、高密度リポタンパク質粒子に付随するコレステロールを意味する。血清（または血漿）中のHDL-Cの濃度は、通常、mg/dLまたはnmol/Lで定量化される。「血清HDL-C」及び「血漿HDL-C」は、それぞれ血清及び血漿中のHDL-Cを意味する。

40

【0036】

本明細書中で使用する場合、「HMG-CoAレダクターゼ阻害剤」とは、アトルバスタチン、ロスバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン、プラバスタチン、及びシンバスタチンなどの酵素HMG-CoAレダクターゼの阻害によって作用する薬剤を意味する。

【0037】

本明細書中で使用する場合、「高コレステロール血症」とは、Expert Panel Report of the National Cholesterol Educational Program (NCEP) of Detection, Evaluation of Treatment of high cholesterol in adul

50

ts (Arch. Int. Med. (1988) 148, 36-39を参照のこと) のガイドラインによる、コレステロールまたは循環(血漿)コレステロール、LDL-コレステロール及びVLDL-コレステロールの上昇によって特徴付けられる病態を意味する。
【0038】

本明細書中で使用する場合、「高脂血症」または「高脂質血症」は、血清脂質または循環(血漿)脂質の上昇を特徴とする病態である。この病態は、異常に高い脂肪濃度を示す。循環血液中の脂質画分は、コレステロール、低密度リポタンパク質、超低密度リポタンパク質、カイロミクロン及びトリグリセリドである。高脂血症のフレドリックソン分類は、電気泳動または超遠心分離によって測定されるTG及びコレステロールリッチなリポタンパク質粒子のパターンに基づいており、高トリグリセリド血症などの高脂血症の主な原因を特徴付けるために一般的に使用される(Fredrickson and Lee, Circulation, 1965, 31:321-327; Fredrickson et al., New Eng J Med, 1967, 276(1):34-42)。

10

【0039】

本明細書中で使用する場合、「高トリグリセリド血症」とは、トリグリセリドレベルの上昇を特徴とする病態を意味する。その病因として、主要因(すなわち、遺伝的素因)及び二次的要因(他の遠因、例えば、糖尿病、メタボリックシンドローム/インスリン抵抗性、肥満、身体活動不能、喫煙、過剰のアルコール及び炭水化物過剰の食事)または最も多くの場合では、両方の組み合わせが挙げられる(Yuan et al., CMAJ, 2007, 176:1113-1120)。

20

【0040】

本発明の組成物及び方法を記載する前に、記載する特定のプロセス、組成物、または方法論は様々に異なり得るため、本発明はこれらに限定されないことを理解されたい。本明細書中で使用する専門用語は、特定のバージョンまたは実施形態を説明するためのものに過ぎず、本発明の範囲を限定することを意図するものではなく、添付の特許請求の範囲によってのみ限定されることも理解されたい。本明細書中で言及するすべての刊行物は、それらが本発明をサポートする範囲で、その全体が参照により援用される。

【0041】

代謝性、心血管性及び炎症性疾患の治療のためのグリシントリペプチド分子

【0042】

本開示の発明者は、肥満、糖尿病、脂質異常症、脂肪肝及びインスリン抵抗性症候群を含むがこれらに限定されない代謝性、心血管性及び/または炎症性疾患の予防的または治療的活性を示すグリシントリペプチド分子、またはそれらの薬学的に許容される塩を開発した。特定の実施形態では、代謝性または心血管性疾患として、肥満、糖尿病、アテローム性動脈硬化症、脂質異常症、冠動脈心疾患、冠動脈疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)、高脂血症もしくはメタボリックシンドローム、またはそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。脂質異常症は高脂血症であり得る。高脂血症は、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、または高コレステロール血症と高トリグリセリド血症の両方であり得る。NAFLDは、脂肪肝または脂肪性肝炎であり得る。糖尿病は、2型糖尿病または脂質異常症を伴う2型糖尿病であり得る。

30

40

【0043】

様々な実施形態において、DT-190グリシン含有トリペプチド分子のアミノ酸配列は、Gly-Gly-Leu-配列番号1である。DT-110グリシン含有トリペプチド分子のアミノ酸配列は、Gly-Gly-dLeu-配列番号2である。本発明のグリシントリペプチド分子はまた、DT-109及びDT-110の薬学的に許容される塩を含む。例として、金属塩、アンモニウム塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などが挙げられる。金属塩の好ましい例として、アルカリ金属塩、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩など；アルカリ土類金属塩、例えば、カルシウム塩、マグネシウム塩、バリウム塩など；アルミニウム塩などが挙げられる。有機塩基との塩の好ましい例として、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピ

50

コリン、2,6-ルチジン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、シクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルアミンN, N-ジベンジルエチレンジアミンとの塩などが挙げられる。無機酸との塩の好ましい例として、塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸との塩などが挙げられる。有機酸との塩の好ましい例として、ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、フタル酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸との塩などが挙げられる。上記の塩のうち、薬学的に許容される塩が好ましい。例えば、化合物が酸性官能基を有する場合、無機塩、例えば、アルカリ金属塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩など）、アルカリ土類金属塩（例えば、カルシウム塩、マグネシウム塩、バリウム塩など）など、アンモニウム塩など、及び化合物が塩基性官能基を有する場合、例えば、塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸などの無機酸との塩、または酢酸、フタル酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸などの有機酸との塩が好ましい。

10

【0044】

様々な実施形態において、グリシントリペプチド分子もまた、元の合形成態のプロドラッグとして合成及び／または投与してもよい。例えば、グリシントリペプチド分子、またはその薬学的に許容される塩は、プロドラッグ形態であってもよい。プロドラッグとは、生体内の生理的条件下で酵素や胃酸などによって反応してグリシン含有トリペプチド分子に変換される化合物、すなわち酵素による酸化、還元、加水分解などにより、グリシン含有トリペプチド分子またはその薬学的に許容される塩に変換される化合物；胃酸などによる加水分解などにより、グリシン含有トリペプチド分子に変換される化合物を指す。

20

【0045】

グリシン含有トリペプチド分子またはその薬学的に許容される塩のプロドラッグの例として、グリシン含有トリペプチド分子のアミノ基が、アシル化、アルキル化またはリン酸化されている化合物（例えば、グリシン含有トリペプチド分子のアミノ基が、エイコサノイル化、アラニル化、ペンチルアミノカルボニル化、（5-メチル-2-オキソ-1,3-ジオキサレン-4-イル）メトキシカルボニル化、テトラヒドロフラニル化、ピロリジルメチル化、ピバロイルオキシメチル化またはtert-ブチル化されている化合物など）；グリシン含有トリペプチド分子のヒドロキシ基が、アシル化、アルキル化、リン酸化またはホウ化されている化合物（例えば、グリシン含有トリペプチド分子のヒドロキシ基が、アセチル化、パルミトイル化、プロパノイル化、ピバロイル化、スクシニル化、フマリル化、アラニル化またはジメチルアミノメチルカルボニル化されている化合物など）；グリシン含有トリペプチド分子のカルボキシ基が、エステル化またはアミド化されている化合物（例えば、グリシン含有トリペプチド分子のカルボキシ基が、C1-6アルキルエステル化、フェニルエステル化、カルボキシメチルエステル化、ジメチルアミノメチルエステル化、ピバロイルオキシメチルエステル化、エトキシカルボニルオキシエチルエステル化、フタリジルエステル化、（5-メチル-2-オキソ-1,3-ジオキサレン-4-イル）メチルエステル化、シクロヘキシルオキシカルボニルエチルエステル化またはメチルアミド化されている化合物）などが挙げられる。とりわけ、グリシン含有トリペプチド分子のカルボキシ基が、メチル、エチル、tert-ブチルなどのC1-6アルキルでエステル化されている化合物が好ましくは使用される。これらの化合物は、それ自体が公知の方法によって、グリシン含有トリペプチド分子から生成することができる。

30

40

【0046】

グリシン含有トリペプチド分子またはその薬学的に許容される塩のプロドラッグはまた、例えば、IYAKUHIN no KAIHATSU (Development of Pharmaceuticals), Vol. 7, Design of Molecules, p. 163-198, Published by HIROKAWA SHOTEN (1990)に記載されている、生理的条件下でグリシン含有トリペプチド分子に変換されるプロドラッグであってもよい。

【0047】

50

例示的なグリシントリペプチド分子は、本明細書に記載の、及び当業者に公知のペプチド合成法に従って生成することができる3残基のアミノ酸ポリマーである。ペプチド合成法は、現在公知の方法、例えば、固相合成プロセス及び液相合成プロセスを使用してもよい。すなわち、目的のペプチド、例えばグリシントリペプチド分子、またはその薬学的に許容される塩は、所望の配列に従って、グリシントリペプチド分子を構成することができる部分ペプチドまたはアミノ酸、すなわち合成しようとするペプチドと残りの部分（2残基以上のアミノ酸によって構成され得る）の縮合の繰り返しによって生成することができる。所望の配列を有する生成物が保護基を有する場合、保護基を除去することにより目的のペプチドを生成することができる。公知の保護基の縮合法及び除去法の例として、以下の（1）～（5）に記載の方法が挙げられる。

10

【0048】

(1) M. Bodanszky and M. A. Ondetti: Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966)

【0049】

(2) Schroeder and Luebke: The Peptide, Academic Press, New York (1965)

【0050】

(3) Nobuo Izumiya, et al.: Peptide Gosei-no-Kiso to Jikken (Basics and experiments of peptide synthesis), published by Maruzen Co. (1975)

20

【0051】

(4) Haruaki Yajima and Shunpei Sakakibara: Seikagaku Jikken Koza (Biochemical Experiment) 1, Tanpakushitsu no Kagaku (Chemistry of Proteins) IV, 205 (1977)

【0052】

(5) Haruaki Yajima, ed.: Zoku Iyaku hin no Kaihatsu (A sequel to Development of Pharmaceuticals), Vol. 14, Peptide Synthesis, published by Hirokawa Shoten.

30

【0053】

グリシントリペプチド分子を使用した代謝性、心血管性及び／または全身性炎症性疾患の治療及び予防

【0054】

本明細書に記載及び例示のグリシン、もしくはトリペプチド分子を保有するグリシン、またはその薬学的に許容される塩を使用して、それを必要としている対象における1つ以上の代謝性、心血管性及び炎症性疾患を、予防及び／または治療することができる。本開示の目的に関して、「代謝疾患」とは、例えば、インスリン抵抗性、糖尿病、肥満、耐糖能障害、高血中コレステロール、高血糖症、脂質異常症及び高脂血症を含む、内分泌系の広範囲の疾患及び障害、ならびに肝疾患、例えば、NAFLD及びNASHを指す。本明細書に記載の代謝疾患には、代謝の調節を通じて治療することができる疾患も含まれるが、疾患自体は、特定の代謝欠損によって引き起こされるものであっても、そうでなくてもよい。そのような代謝疾患は、例えば、グルコース及び脂肪酸の酸化経路を含み得る。

40

【0055】

それを必要とする対象は、代謝疾患、及び／または心血管疾患、及び／または全身性炎症性疾患、またはこれらの疾患に関連する1つ以上の症状を経験している可能性のある哺乳類、好ましくはヒト、または飼育用哺乳類もしくは実験用哺乳類である。

【0056】

50

特定の実施形態では、特定の理論に拘泥することを望むものではないが、本発明のグリシンもしくはグリシントリペプチド分子、またはその薬学的に許容される塩を、代謝疾患、心血管疾患、及び慢性全身性炎症性疾患またはこれらの一般的な病態のいずれかに関するまたは関連する症状を有する対象への投与は、トリグリセリドレベル、コレステロールレベル、インスリン抵抗性、グルコースレベルまたはそれらの組み合わせを含む脂質レベルの低下をもたらすと考えられる。1つ以上のレベルを、独立して、5%、10%、20%、30%、35%、または40%以上低下させることができる。本発明のグリシントリペプチド分子またはその薬学的に許容される塩を投与することにより、インスリン感受性または肝臓インスリン感受性を改善することができる。本発明のグリシントリペプチド分子またはその薬学的に許容される塩を投与することにより、動脈硬化巣、肥満、グルコース、脂質、耐糖能、コレステロールの減少、またはインスリン感受性の改善またはそれらの任意の組み合わせをもたらすことができる。

10

【0057】

特定の実施形態は、代謝疾患または心血管疾患の1つ以上を、治療、改善、遅延または予防するための薬剤の製造において、本明細書に記載するように、グリシンまたはグリシントリペプチド分子、またはその薬学的に許容される塩の使用を提供する。

【0058】

特定の実施形態は、本明細書に記載の代謝疾患または心血管疾患の1つ以上を、治療、予防、または改善するためのキットを提供し、キットは：a) 本明細書に記載のグリシントリペプチド分子、またはその薬学的に許容される塩；及び場合によりb) 本明細書に記載のさらなる第2の治療薬または療法を含む。キットはさらに、グリシントリペプチド分子またはその薬学的に許容される塩を使用して、代謝疾患または心血管疾患の1つ以上を、治療、予防、または改善するためにキットを使用するための説明書またはラベルを含み得る。

20

【0059】

本発明のいくつかの実施形態では、グリシンまたはグリシントリペプチド分子、またはその薬学的に許容される塩は、強力なグルコース／脂質低下効果を有する。確立されたNASH、グリシントリペプチド分子、またはその薬学的に許容される塩を有するマウスにおいて、例えば、DT-109は、FAO経路を刺激することによって、脂肪性肝炎を軽減し、体組成を改善し、循環脂質を低下させ、肝酵素及び脂肪性肝炎を正常化または修正することができる。グリシントリペプチド分子、またはその薬学的に許容される塩は、抑制性NF- κ B及びTGF α /SMAD経路を阻害することにより、小葉／全身性の炎症及び肝線維症を予想外に低下または軽減させることが示されている。

30

【0060】

本明細書中で使用する場合、用語「脂質異常症」とは、異常なリポタンパク質代謝によって引き起こされる高脂血症、ならびに血中脂肪レベルの増加による高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、及び低HDLコレステロール血症を含む、異常な脂質状態を指す。本明細書中で使用する場合、用語「脂肪肝」とは、脂質代謝の障害のために脂肪が肝細胞に過剰に蓄積する病態を指す。脂肪肝は、狭心症、心筋梗塞、脳卒中、動脈硬化症、膵炎などの様々な病気を引き起こし得る。本明細書中で使用する場合、用語「糖尿病」とは、インスリンの相対的または絶対的な欠如を特徴とし、耐糖能障害をもたらす慢性疾患を指す。糖尿病という用語には、1型糖尿病、2型糖尿病及び遺伝性糖尿病などのあらゆる種類の糖尿病が含まれる。インスリン依存性糖尿病である1型糖尿病は、主に β 細胞の破壊に起因する。インスリン非依存性糖尿病である2型糖尿病は、食後のインスリン分泌不足またはインスリン抵抗性によって引き起こされる。本明細書中で使用する場合、用語「インスリン抵抗性」とは、インスリンが血糖を低下させる効果が低くなり、グルコースが細胞によって効果的に燃焼されない生理学的状態を指す。インスリン抵抗性が高いと、体がインスリンを過剰に産生し、高血圧または脂質異常症、及び心疾患、糖尿病などを招き得る。特に2型糖尿病では、筋肉及び脂肪組織は、インスリンの増加を認識しない。本明細書中で使用する場合、用語「インスリン抵抗性症候群」とは、インスリンの作用に

40

50

対する細胞の抵抗性、高インスリン血症、超低密度リポタンパク質（VLDL）及びトリグリセリドの増加、高密度リポタンパク質（HDL）の減少、高血圧症などを特徴とするインスリン抵抗性によって引き起こされる障害の組み合わせを指す。それは、心血管疾患及び2型糖尿病のリスク因子として認識されている（Reaven G M., Diabetes, 37: 1595-607 (1988)）。また、インスリン抵抗性は、高血圧、糖尿病、喫煙などの他のリスク因子とともに、酸化ストレスを増加させ、細胞内のシグナル伝達システムを変化させ、炎症反応を誘発し、アテローム性動脈硬化症を引き起こすことが知られている（Freeman B A et al., Lab. Invest. 47: 412-26 (1982), Kawamura M et al., J. Clin. Invest. 94: 771-8 (1994)）。

10

【0061】

本明細書中で使用する場合、用語「代謝疾患」とは、様々な心血管疾患及び2型糖尿病のリスク因子である代謝障害を含む一群の疾患を指す。これには、インスリン抵抗性とそれに関連する複雑で多様な代謝障害が含まれる。1988年、Reavenは、これらの障害の根底にある要因としてインスリン抵抗性を提案し、異常群をインスリン抵抗性症候群と名付けた。しかしながら、1998年に、世界保健機関（WHO）は、症状のすべての態様がインスリン抵抗性によって説明できないことから、メタボリックシンドロームまたは代謝疾患という用語を導入した。

【0062】

グリシントリペプチド分子またはその薬学的に許容される塩を活性薬剤として含む本開示の組成物は、様々な代謝疾患、及び／またはそれらの症状、例えば、肥満、糖尿病、高脂血症、非アルコール性脂肪肝、全身性炎症、及び／またはインスリン抵抗性症候群を改善する傾向を有する。本開示の組成物は、様々な活性を有する代謝疾患を予防または治療することができる。

20

【0063】

本明細書中で使用する場合の用語「高脂血症」とは、トリグリセリド及びコレステロールなどの脂質の代謝が不十分であることに起因する高レベルの血中脂質によって引き起こされる疾患を指す。より具体的には、高脂血症は、高コレステロール血症及び高トリグリセリド血症を含む、血中のトリグリセリド、LDLコレステロール、リン脂質、及び遊離脂肪酸などの脂質レベルの増加を特徴とする。

30

【0064】

好ましい実施形態によれば、本発明によって治療されるインスリン抵抗性症候群には、肥満、高血圧、アテローム性動脈硬化症、高脂血症、高インスリン血症、非アルコール性脂肪肝及び2型糖尿病が含まれる。

【0065】

好ましい実施形態によれば、本発明の組成物は、血中脂肪、肝臓脂肪または内臓脂肪のレベルを低下させる。用語「肝臓」または「内臓」は、臓器、組織及び細胞を包含するために用いられる。

【0066】

本発明によれば、本発明のグリシンもしくはグリシントリペプチド分子、またはその薬学的に許容される塩を含有する食事を与えられた対象では、肝臓重量が有意に減少し、血中及び肝臓組織内のトリグリセリドの脂質濃度及び総コレステロールが改善され、内臓脂肪の総重量が有意に減少した。

40

【0067】

より好ましい実施形態によれば、本発明によって減少する脂肪には、トリグリセリド、コレステロール、及び遊離脂肪酸が含まれる。

【0068】

より好ましい実施形態によれば、本発明によって減少する内臓脂肪には、精巣上体脂肪、腎周囲脂肪、腸間膜脂肪及び／または後腹膜脂肪が含まれる。

【0069】

50

好ましい実施形態によれば、本発明の組成物は、ALT（アラニンアミノトランスフェラーゼ）またはAST（アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ）の活性を低下させる。肝機能の指標としてのALTとASTは、肝臓の損傷時に血中濃度の上昇を示す酵素である。

【0070】

「非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）」は、世界中、特に西欧諸国でますます一般的になっている。米国では、これは慢性肝疾患の最も一般的な形態であり、推定8000万～1億人が罹患している。非アルコール性脂肪性肝疾患は、アルコールをほとんどまたはまったく飲まない人々に影響を与える様々な肝臓の病態の総称である。名前が示すように、非アルコール性脂肪性肝疾患の主な特徴は、肝細胞に多量の脂肪が蓄積されることである。肝臓に脂肪が含まれていることは正常である。しかしながら、肝臓の重量の5%～10%超が脂肪である場合、その状態は脂肪肝（脂肪症）と呼ばれる。

【0071】

NAFLDは、肥満、インスリン抵抗性、2型糖尿病、及び脂質異常症を含むメタボリックシンドロームの特徴と強く関連しており；NAFLDはこの症候群の肝症状と考えられている。

【0072】

小児NAFLDは現在、小児肝疾患の主要な形態である。研究によると、腹部肥満とインスリン抵抗性がNAFLDの発症の主な原因であると考えられている。肥満は世界中でますます一般的な問題になりつつあるため、NAFLDの有病率は同時に増加している。小児NAFLDで真に効果的であることが示されている唯一の治療法は、体重減少である。

【0073】

NAFLDのより重度の形態は、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）と呼ばれる。NASHは、肝臓を腫れさせ、損傷を与える。NASHは、過体重すなわち肥満であるか、または糖尿病、高コレステロールもしくは高トリグリセリドもしくはは炎症状態を有する人に発症する傾向がある。この疾患の潜在的に重度な形態であるNASHは、肝細胞のバリーニングと肝臓の炎症を特徴とし、これらは瘢痕化と不可逆的な損傷に進行し得る。この損傷は、アルコールの大量使用による損傷と類似している。巨視的及び微視的に、NASHは小葉及び／または門脈の炎症、様々な程度の線維症、肝細胞死及び病理学的血管新生を特徴とする。最も重症の場合、NASHは、肝硬変、肝細胞癌、及び肝不全に進行し得る。現在、NAFLDとNASHは、食事療法、インスリン抵抗性の治療、またはビタミンEもしくはDなどのビタミン投与によって治療されている。

【0074】

NAFLD活動スコア（NAS）は、Kleinerの基準に従って計算することができる（Kleiner DE, et al., Hepatology, 2005; 41: 1313）。NASスコア0～2はNASHと診断されず、NASスコア3～4はNASHと診断されないか、境界線上にあるか、または陽性とみなされ、NASスコア5～8は主にNASHと診断される。NASHの治療効果には、疾患の退行、安定化、または進行速度の低下が含まれる。NASHを有している可能性のある患者からの連続肝生検を、NASスコアの変化を評価するために使用し、病状の変化の指標として使用することができる。スコアの増加は進行を示唆し、スコアが変化しない場合は安定化を示唆し、一方、スコアの減少はNASHの回帰を示す。制御された臨床試験では、通常6か月～2年の期間にわたってプラセボと被験物質治療群との間のNASスコアの差異を評価し、その差異は、両方の群が進行している場合であっても、治療効果を示すものとなり得る。NASHにおける意味のある変化を示すために、通常、規定の点差が規制当局によって要求される。

【0075】

本発明はまた、それを必要とする対象に、脂肪肝を治療する1つ以上のトリペプチド分子またはその薬学的に許容される塩を投与することを含む、脂肪肝の治療方法を提供する。一実施形態では、トリペプチド分子は、肝脂質中のトリグリセリドレベルを低下させ、ロイシン陰性対照に対しては有意な影響を及ぼさなかった。別の実施形態では、トリペプ

チド分子は、肝脂質中の総コレステロールレベルを低下させ、ロイシン陰性対照に対しては有意な影響を及ぼさなかった。上記の実施形態のいずれか1つにおいて、トリペプチド分子は、G l y - G l y - L e u または G l y - G l y - d L e u である。

【0076】

本発明はまた、それを必要とする対象に、グリシンもしくは1つ以上のグリシントリペプチド分子またはその薬学的に許容される塩を投与し、それが与えるmRNAレベルへの効果を測定することを含む、肝臓の脂質酸化の増加方法もしくは増強方法、トリグリセリドレベルの低下方法、またはコレステロール蓄積の治療方法を提供し、その場合、肝脂質の酸化、トリグリセリドレベル、コレステロール蓄積、またはそれらの任意の組み合わせが、増強または治療される。

【0077】

肝脂質の酸化の増強方法、トリグリセリドレベルの低下方法、またはコレステロール蓄積の治療方法であって、それを必要とする対象に、グリシントリペプチド G l y - G l y - L e u もしくは G l y - G l y - d L e u またはその薬学的に許容される塩を投与し、それが与えるmRNAレベルへの効果を測定することを含み、その場合、肝脂質の酸化、トリグリセリドレベル、コレステロール蓄積、またはそれらの任意の組み合わせが、増強または処理される、治療方法。グリシン含有トリペプチド分子 G l y - G l y - L e u または G l y - G l y - d L e u が、ロイシン陰性対照からは影響を受けずに、肝脂質酸化の調節因子、AMPK α 1またはPPAR α の発現を有意に誘導した方法。トリペプチド分子 G l y - G l y - L e u または G l y - G l y - d L e u が、CPT1a、CACT、またはACADI（ミトコンドリアの β 酸化）またはPNPLA2を有意に上方制御することにより、トリグリセリドの加水分解を調節した方法。トリペプチド分子 G l y - G l y - L e u または G l y - G l y - d L e u が、ミトコンドリアの陰イオン担体UCP2を有意に上方制御することにより、トリグリセリドの加水分解を調節した方法。

【0078】

トリペプチド分子 G l y - G l y - L e u または G l y - G l y - d L e u が、ABC G5及びABC G8の発現を有意に増加させることにより、肝臓のコレステロール恒常性を調節した方法。

【0079】

1つ以上のトリペプチド分子またはその薬学的に許容される塩を、それを必要とする対象に投与して、対象の血漿トリグリセリド、血漿LDLレベル、または動脈硬化巣を低減することを含む、対象の血漿脂質特性の治療方法。

【0080】

それを必要とする対象に投与して、対象の血漿トリグリセリド、血漿LDLレベル、または動脈硬化巣を低減することを含む、対象の血漿脂質特性の治療方法であって、トリペプチド分子が、G l y - G l y - L e u もしくは G l y - G l y - d L e u またはその薬学的に許容される塩である、治療方法。G l y - G l y - L e u または G l y - G l y - d L e u が動脈硬化巣を低減する、方法。トリペプチド分子 G l y - G l y - L e u が、血漿総コレステロール、血漿LDL、またはそれらの組み合わせを低下させる、それを必要とする対象に投与することを含む、対象の血漿脂質特性の治療方法。

【0081】

本発明の方法の実施形態のいずれかにおいて、対象に、追加の脂質低下剤を投与してもよい。追加の脂質低下剤が、コレステロール吸収阻害剤、PCSK9阻害剤、PPAR α アゴニスト、フェノフィブラート、ACC阻害剤、ApoC-III阻害剤、ACL阻害剤、処方魚油、またはCETP阻害剤である、方法。いくつかの実施形態では、方法は、コレステロール吸収阻害剤である追加のコレステロール低下剤の投与を含む。コレステロール低下剤がコレステロール吸収阻害剤であり、コレステロール吸収阻害剤がエゼチミブである、方法。いくつかの実施形態では、コレステロール低下剤は、PCSK9阻害剤である。

【0082】

アテローム性動脈硬化症は、心臓から体の残りの部分に酸素と栄養素を運ぶ血管（動脈）が厚く硬くなる（動脈の硬化）場合に発症する。時として、これは器官及び組織への血流を制限する。アテローム性動脈硬化症は、心筋梗塞、冠動脈疾患、頸動脈疾患、頸動脈疾患、末梢動脈疾患、動脈瘤、及び慢性腎疾患を含む多くの合併症を引き起こし得る。

【0083】

心筋梗塞（心臓発作）は、心臓の一部への血流が減少または停止する場合に発症し、心筋に損傷を与える。一般的な症状は、胸部の中央もしくは左側の痛み、息切れ、吐き気、または、心不全、不整脈、心原性ショックもしくは心停止を引き起こし得る。

【0084】

冠動脈疾患は、アテローム性動脈硬化症が心臓に近い動脈を狭め、胸痛（狭心症）、心臓発作または心不全を引き起こし得る。

【0085】

頸動脈疾患は、アテローム性動脈硬化症が脳に近い動脈を狭め、一過性脳虚血発作（TIA）または脳卒中を引き起こし得る。症状には、腕もしくは脚の突然の痺れもしくは脱力感、片方の目の一時的な視力低下、または顔の筋肉の垂れ下がりなどが含まれる。

【0086】

末梢動脈疾患は、アテローム性動脈硬化症が腕または脚の動脈を狭める場合であり、これらの循環の問題は末梢動脈疾患と呼ばれる。これにより、暑さ及び寒さに対する感受性が低下し、火傷や凍傷のリスクが高まる。まれに、腕及び脚の血行不良が組織死（壊疽）を引き起こし得る。症状は、歩行時の脚の痛み（跛行）である。

【0087】

動脈瘤は、アテローム性動脈硬化症が深刻な合併症を引き起こす場合に発症する場合があります、それは体のどこにでも発症し得る。動脈瘤は動脈壁の膨らみであり、それは救急事態で有り得、破裂した場合は生命を脅かし得る。

【0088】

慢性腎疾患は、アテローム性動脈硬化症が動脈の狭窄を引き起こし、酸素化した血液の到達を腎臓が妨げることによって引き起こされ得る。時間が経つにつれて、これは老廃物を体外へ排出し続ける腎機能に影響を及ぼし得る。症状は、高血圧または腎不全である。

【0089】

本開示は、それを必要とする対象に、1つ以上のグリシントリペプチド分子、またはその薬学的に許容される塩を投与することによるアテローム性動脈硬化症の治療方法を提供し、その場合、グリシン含有トリペプチド分子の投与は、アテローム性動脈硬化症を治療する。一実施形態では、方法は、G l y - G l y - L e u 及び／または G l y - G l y - d L e u であるグリシン含有トリペプチド分子を対象に投与することによるアテローム性動脈硬化症の治療方法である。本開示はまた、アテローム性動脈硬化症の合併症を有する対象に、グリシン含有トリペプチド分子を投与して、心筋梗塞、冠動脈疾患、頸動脈疾患、頸動脈疾患、末梢動脈疾患、動脈硬化症、または慢性腎疾患を治療することによる、合併症の治療方法を提供する。一実施形態では、アテローム性動脈硬化症の合併症を有する対象に、G l y - G l y - L e u または G l y - G l y - d L e u であるグリシン含有トリペプチド分子を投与して、心筋梗塞、冠動脈疾患、頸動脈疾患、頸動脈疾患、末梢動脈疾患、動脈硬化症、または慢性腎疾患を治療することによる、合併症の治療方法。

【0090】

1つ以上のグリシントリペプチド分子またはその薬学的に許容される塩を、それを必要とする対象に投与することを含む、脂肪組織及び循環中の炎症の治療方法であって、トリペプチド分子の投与が、炎症をより少なくする、治療方法。

【0091】

G l y - G l y - L e u 及び／または G l y - G l y - d L e u、または対象にとって薬学的に許容される塩を、それを必要とする対象に投与することを含む、脂肪組織及び循環中の炎症の治療方法であって、循環中の炎症を、血漿 M C P 1 レベルを低下させることによって軽減する、治療方法。それを必要とする対象に G l y - G l y - L e u 及び／ま

10

20

30

40

50

たはG l y - G l y - d L e uを投与し、M C P 1 mRNAのレベルを低下させることを含み、脂肪組織の炎症が精巣上体脂肪組織（E A T）または皮下脂肪組織（S A T）に存在する、炎症の治療方法。

【0092】

グリシントリペプチド分子の血漿レベルを低下させるための対象の治療方法であって、それを必要とする対象に、1つ以上のトリペプチド分子またはその薬学的に許容される塩を投与することを含み、トリペプチド分子の投与が、血漿グリシントリペプチド分子のレベルを低下させる、治療方法。

【0093】

それを必要とする対象にトリペプチドG l y - G l y - L e uまたはG l y - G l y - d L e uを投与することを含む、グリシントリペプチド分子の血漿レベルを低下させるための対象の治療方法。

10

【0094】

それを必要とする対象に1つ以上のトリペプチド分子またはその薬学的に許容される塩を投与することを含む、食後グルコースをより低下させるための対象の治療方法。それを必要とする対象にグリシントリペプチドG l y - G l y - L e u及び／またはG l y - G l y - d L e uを投与することを含む、食後グルコースをより低下させるための対象の治療方法。

【0095】

それを必要とする対象にG l y - G l y - L e u及び／またはG l y - G l y - d L e uを投与することを含む、対象の治療方法であって、対象が肝疾患を有する、治療方法。

20

【0096】

それを必要とする対象にG l y - G l y - L e u及び／またはG l y - G l y - d L e uを投与することを含む、対象の治療方法であって、対象が肝疾患を有し、肝疾患が、非アルコール性脂肪性肝疾患（N A F L D）もしくは非アルコール性脂肪性肝炎（N A S H）、またはアルコール性脂肪肝である、治療方法。

【0097】

G l y - G l y - L e u及び／またはG l y - G l y - d L e u、またはその薬学的に許容される塩を含む治療有効量の組成物を対象に投与することを含む、対象におけるN A F D L活動性スコア（N A S）の安定化方法または低下方法。

30

【0098】

G l y - G l y - L e u及び／またはG l y - G l y - d L e u、またはその薬学的に許容される塩を含む治療有効量の組成物を対象に投与することを含む、対象におけるN A F D L活動性スコア（N A S）の安定化方法または低下方法であって、方法が、N A Sの脂肪肝成分の進行遅延、安定化、または低減することを含む、安定化方法または低下方法。N A Sの小葉の炎症成分の進行遅延、安定化、または低減することを含む、方法。N A Sの肝細胞バルーニング成分の進行遅延、安定化、または低減することを含む、方法。

【0099】

G l y - G l y - L e u及び／またはG l y - G l y - d L e u、またはその薬学的に許容される塩を含む治療有効量の組成物による治療の6か月後にN A Sが1.5ポイント以上異なる、N A F L D活性スコアを安定化または低下させる方法のいずれか1つに記載の方法。

40

【0100】

G l y - G l y - L e u及び／またはG l y - G l y - d L e u、またはその薬学的に許容される塩を含む治療有効量の組成物を対象に投与することを含む、それを必要とする対象における肝線維症の軽減方法。

【0101】

G l y - G l y - L e u及び／またはG l y - G l y - d L e u、またはその薬学的に許容される塩を含む治療有効量の組成物を対象に投与することを含む、それを必要とする対象における血漿フィブリノーゲンレベルの低減方法。

50

【0102】

対象に治療有効量のGly-Gly-Leu及び／またはGly-Gly-dLeu、またはその薬学的に許容される塩を含む組成物を投与する前に、対象のフィブリノーゲンレベルが300mg/dL超である、それを必要とする対象における血漿フィブリノーゲンレベルの低減方法。

【0103】

本発明の一実施形態は、DT-109、場合によりスタチン、及び使用説明書を含む、NAFLDを治療するためのキットである。本発明の別の実施形態は、DT-109、場合によりスタチン、及び使用説明書を含む、NASHを治療するためのキットである。本発明の一実施形態は、DT-110、場合によりスタチン、及び使用説明書を含む、NAFLDを治療するためのキットである。本発明の別の実施形態は、DT-110、場合によりスタチン、及び使用説明書を含む、NASHを治療するためのキットである。

10

【0104】

本発明は、DT-109もしくはDT-110またはその薬学的に許容される塩を投与することを含む、患者における肝線維症の軽減方法を提供する。一実施形態は、対象にDT-109またはDT-110を投与することを含む、それを必要とする対象における肝線維症の軽減方法である。別の実施形態は、対象にDT-109またはDT-110を投与することを含む、それを必要とする対象における肝線維症の軽減方法であり、その場合、対象はNASHを有する。

【0105】

フィブリノーゲン（第Ⅰ因子）は、血餅の形成に関与する哺乳類の糖タンパク質である。フィブリノーゲンは、血餅形成中にトロンビンによってフィブリンに変換される。フィブリノーゲンは肝細胞で合成される。したがって、フィブリノーゲンは多くの疾患の予後指標または血液マーカーであり得、病状の発症及び進行に影響を与えることにも役立ち得る。

20

【0106】

様々な実施形態において、哺乳類対象における高脂血症、脂肪肝、脂肪性肝炎、非アルコール性脂肪性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝炎、肥満、高血糖、メタボリックシンドローム、心血管疾患、及びアテローム性動脈硬化症のうちの少なくとも1つを治療するための方法は、それを必要とする対象に、グリシントリペプチド分子、またはその薬学的に許容される塩を投与することを含む。

30

【0107】

様々な実施形態において、グリシン含有トリペプチド分子は、肝脂質中のトリグリセリドレベルを有意に減少させ、ロイシン陰性対照に対して有意な影響を及ぼさない。

【0108】

様々な実施形態において、グリシン含有トリペプチド分子は、肝脂質中の総コレステロールレベルを有意に減少させ、ロイシン陰性対照に対して有意な影響を及ぼさない。

【0109】

様々な実施形態において、グリシン含有トリペプチド分子は、Gly-Gly-Leu、Gly-Gly-dLeu、またはその薬学的に許容される塩である。

40

【0110】

本開示は、それを必要とする対象における肝脂質の酸化または利用の増強方法、トリグリセリドレベルの低減方法、または高コレステロール血症の治療方法を提供する。方法は、それを必要とする対象に、グリシントリペプチド分子、またはその薬学的に許容される塩を投与することを含み、治療の結果として、肝脂質酸化、トリグリセリドレベル、高コレステロール血症またはそれらの任意の組み合わせが改善される。これらの実施形態の関連する態様では、グリシン含有トリペプチド分子は、Gly-Gly-Leu、Gly-Gly-dLeu、またはその薬学的に許容される塩である。

【0111】

これらの実施形態の関連する態様では、グリシン含有トリペプチド分子Gly-Gly

50

－Leu、Gly－Gly－dLeu、またはその薬学的に許容される塩は、ロイシン陰性対照からは影響を受けずに、肝脂質酸化の調節因子AMPK α 1またはPPAR α の発現を有意に誘導する。

【0112】

これらの実施形態の関連する態様では、グリシン含有トリペプチド分子Gly－Gly－Leu、Gly－Gly－dLeu、またはその薬学的に許容される塩は、CPT1a、CACT、またはACADI（ミトコンドリア β 酸化）またはPNPLA2を有意に上方制御することによってトリグリセリド加水分解を調節する。

【0113】

これらの実施形態の関連する態様では、グリシン含有トリペプチド分子Gly－Gly－Leu、Gly－Gly－dLeu、またはその薬学的に許容される塩は、ミトコンドリア陰イオン担体UCP2を有意に上方制御することによってトリグリセリド加水分解を調節する。

【0114】

これらの実施形態の関連する態様では、グリシン含有トリペプチド分子Gly－Gly－Leu、Gly－Gly－dLeu、またはその薬学的に許容される塩は、ABCG5及びABCG8の発現を有意に増加させることによって肝臓におけるコレステロール恒常性を調節する。

【0115】

これらの実施形態の関連する態様では、対象の血漿脂質特性は、それを必要とする対象にグリシントリペプチド分子、またはその薬学的に許容される塩を投与し、対象の血漿トリグリセリド、血漿LDLレベル、または動脈硬化巣を低減することを含む。これらの実施形態の関連する態様では、グリシン含有トリペプチド分子は、Gly－Gly－Leu、Gly－Gly－dLeu、またはその薬学的に許容される塩である。

【0116】

これらの実施形態の関連する態様では、Gly－Gly－Leu、Gly－Gly－dLeu、グリシントリペプチド分子またはその薬学的に許容される塩は、動脈硬化巣を低減する。

【0117】

これらの実施形態の関連する態様では、Gly－Gly－Leu、Gly－Gly－dLeu、またはその薬学的に許容される塩は、血漿総コレステロール、血漿LDLまたはそれらの組み合わせを低下させる。

【0118】

本開示は、そのような治療を必要とする対象の脂肪組織及び循環中の炎症の治療方法を提供する。方法は、それを必要とする対象に、グリシントリペプチド分子、またはその薬学的に許容される塩を投与することを含み、グリシン含有トリペプチド分子またはその薬学的に許容される塩の投与により、対象の脂肪組織及び循環中の炎症が軽減する。これらの実施形態の関連する態様では、Gly－Gly－Leu、Gly－Gly－dLeu、またはその薬学的に許容される塩を対象に投与することによって血漿MCP1レベルを低下させることにより、循環中の炎症は軽減される。これらの実施形態の関連する態様では、脂肪組織内の炎症は、精巣上体脂肪組織（EAT）または皮下脂肪組織（SAT）に存在し、MCP1 mRNAのレベルを低下させる。

【0119】

本開示は、それを必要とする対象におけるレプチンの血漿レベルを低下させる、対象の治療方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、それを必要とする対象に、グリシントリペプチド分子、またはその薬学的に許容される塩を投与することを含み、グリシン含有トリペプチド分子の投与は、血漿レプチンのレベルを低下させる。これらの実施形態の関連する態様では、Gly－Gly－Leu、Gly－Gly－dLeu、またはその薬学的に許容される塩を用いて治療を行う。

【0120】

10

20

30

40

50

本開示は、それを必要とする対象における食後グルコースを低下させる、対象の治療方法を提供する。方法は、それを必要とする対象に、グリシン含有トリペプチド分子またはその薬学的に許容される塩を投与することを含む。

【0121】

これらの実施形態の関連する態様では、対象の治療は、治療有効量のグリシントリペプチド分子、例えば、G l y - G l y - L e u、G l y - G l y - d L e u、またはその薬学的に許容される塩を投与することを含む。

【0122】

本開示は、肝疾患、例えば、肝臓が、N A F L D、N A S Hもしくはアルコール関連脂肪肝、肝硬変または肝臓炎などの肝疾患を例示する過剰なコレステロール、トリグリセリド、または他の脂質を有することを特徴とする肝疾患に罹患している、または発症する可能性がある対象の治療方法を提供する。方法は、それを必要とする対象に、G l y - G l y - L e u、G l y - G l y - d L e u、またはその薬学的に許容される塩を投与して、肝疾患を治療または予防することを含む。

【0123】

これらの実施形態の関連する態様では、肝疾患は、非アルコール性脂肪性肝疾患（N A F L D）もしくは非アルコール性脂肪性肝炎（N A S H）、またはアルコール性脂肪肝である。

【0124】

これらの実施形態の関連する態様では、本開示は、対象におけるN A F D L活動性スコア（N A S）の安定化方法または低減方法を提供し、方法は、対象に、アミノ酸配列：G l y - G l y - L e u、G l y - G l y - d L e uを有する治療有効量のグリシントリペプチド、またはその薬学的に許容される塩を投与することを含む。これらの実施形態の関連する態様では、方法は、N A Sの脂肪肝成分の進行を遅延させるか、安定化するか、または低減することを含む。これらの実施形態の関連する態様では、方法は、N A Sの小葉炎症成分の進行を遅延させるか、安定化するか、または低減することを含む。これらの実施形態の関連する態様では、方法は、N A Sの肝細胞バラーニング成分の進行を遅延させるか、安定化するか、または低減することを含む。これらの実施形態の関連する態様では、N A Sは、G l y - G l y - L e u、G l y - G l y - d L e u、またはその薬学的に許容される塩での6か月の治療後、少なくとも1.5ポイント異なる。

【0125】

本開示は、治療有効量のグリシントリペプチド分子：G l y - G l y - L e u、G l y - G l y - d L e u、またはその薬学的に許容される塩を対象に投与することを含む、それを必要とする対象における肝線維症の軽減方法を提供する。

【0126】

本開示は、アテローム性動脈硬化症の治療方法を提供し、方法は、それを必要とする対象に、治療有効量のグリシン含有トリペプチド分子またはその薬学的に許容される塩を投与することを含む。これらの実施形態の関連する態様では、グリシン含有トリペプチド分子は、G l y - G l y - L e u、G l y - G l y - d L e u、またはその薬学的に許容される塩である。

【0127】

本開示は、合併症を有する対象に、心筋梗塞、動脈硬化症、冠動脈疾患、頸動脈疾患、末梢動脈疾患、アテローム血栓性脳卒中、動脈瘤、または慢性腎疾患からなる群から選択される合併症を治療するための治療有効量のグリシン含有トリペプチド分子を投与することによる、アテローム性動脈硬化症の合併症の治療方法を提供する。

【0128】

本開示はまた、代謝疾患、心血管疾患及び炎症性疾患を治療するための二次治療薬と組み合わせたグリシン含有トリペプチド分子の投与による、そのような例示された代謝疾患、心血管疾患及び炎症性疾患の治療を包含する。いくつかの実施形態では、上記に開示した方法は：コレステロール吸収阻害剤、P C S K 9阻害剤、P P A R α アゴニスト、A C

10

20

30

40

50

E阻害剤、カルシウムチャネル遮断薬、ARB、レニン、GLP-1またはその合成バリエーション、インスリン、またはその合成バリエーション、メトホルミン、スルホニル尿素化合物、チアゾリジンジオン（TZD）、PCSK9阻害剤、SGLT2阻害剤、DPP-IV阻害剤、HMGCoAレダクターゼ阻害剤、プロタンパク質転換酵素サブチリシン／ケキシン9型（PCSK9）阻害剤、エゼチミブ、ゲムフィブロジル、フェノフィブラート、クロフィブラート、ベザフィブラート、ペマフィブラート、ゲムカベン（CI-1027）、ベンポド酸（ETC-1002）、ACC阻害剤、ApoC-III阻害剤、ACL阻害剤、処方魚油、CETP阻害剤、抗線維化剤、及びそれらの組み合わせから選択される、それを必要とする対象に第2の治療薬を投与することをさらに含む。

【0129】

特定の実施形態は、本明細書に記載の1つ以上の代謝疾患及び／または心血管疾患、及び／または炎症性疾患を、治療、予防、または改善するためのキットを提供し、キットは：a）本明細書に記載のグリシン含有トリペプチド分子；及び場合によりb）本明細書に記載のさらなる薬剤または療法を含む。キットはさらに、キットを使用して1つ以上の代謝疾患及び／または心血管疾患、及び／または炎症性疾患を、治療、予防、または改善するための説明書またはラベルを含み得る。これらの実施形態の関連する態様では、キットは、選択されたトリペプチド、場合によりスタチン、及び使用説明書を含む、NAFLDまたはNASHを有する対象を治療するためのキットである。これらの実施形態の関連する態様では、キットは、DT-109（Gly-Gly-Leu）及び／またはDT-110（Gly-Gly-dLeu）、場合によりスタチン、及び使用説明書を含む。これらの実施形態の関連する態様では、キットは、場合により、コレステロール吸収阻害剤、PCSK9阻害剤、PPAR α アゴニスト、ACE阻害剤、カルシウムチャネル遮断薬、ARB、レニン、GLP-1またはそれらの合成バリエーション、インスリン、またはその合成バリエーション、メトホルミン、スルホニル尿素化合物、チアゾリジンジオン（TZD）、PCSK9阻害剤、SGLT2阻害剤、DPP-IV阻害剤、スタチン、HMGCoAレダクターゼ阻害剤、（プロタンパク質転換酵素サブチリシン／ケキシン9型）、エゼチミブ、ゲムフィブロジル、フェノフィブラート、クロフィブラート、ベザフィブラート、ペマフィブラート、ゲムカベン、（CI-1027）、ベンポド酸（ETC-1002）、ACC阻害剤、ApoC-III阻害剤、ACL阻害剤、処方魚油、CETP阻害剤、抗線維化剤、及びそれらの組み合わせをさらに含む。これらの実施形態の関連する態様では、キットは、場合により、エゼチミブを含む。

【0130】

製剤

【0131】

本明細書中で使用する場合、用語「薬学的に許容される」とは、ヒトなどの動物で使用するために、連邦政府または州政府の規制当局によって承認されたか、または米国薬局方もしくは他の一般的に認められた薬局方に記載されていることを意味する。用語「担体」とは、投与するためにそれを用いて薬剤を製剤化する、希釈剤、アジュバント、賦形剤、安定剤、またはビヒクルを指す。医薬用担体は、無菌の液体、例えば、水、及び石油性、動物性、植物性または合成由来のものを含む油、例えば、ピーナッツ油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油などであり得る。医薬組成物を静脈内投与する場合、水は、一般的な担体である。生理食塩水及び水性デキストロース及びグリセロール溶液は、特に注射液のための液体担体として使用することができる。好適な医薬用賦形剤として、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、小麦粉、チョコレート、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥脱脂乳、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノールなどが挙げられる。組成物には、必要に応じて、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤を含有させることもできる。医薬組成物は、溶液、懸濁液、乳濁液、錠剤、丸薬、カプセル、散剤、徐放性製剤などの形態をとることができる。組成物はまた、トリグリセリドなどの従来の結合剤及び担体を用いて、坐剤として製剤化することもできる。

【0132】

本発明の医薬組成物は、グリシントリペプチド分子、またはその薬学的に許容される塩を、少なくとも1つの薬学的に許容される賦形剤、担体、または希釈剤と混合して含む。薬学的に許容される組成物は、例えば、化合物のpH、浸透圧、粘度、透明度、色、等張性、臭気、無菌性、安定性、溶解速度もしくは放出速度、吸着または浸透を、改変、維持または保存するための1つ以上の製剤物質を含有する。適切な製剤物質として、アミノ酸（グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジンなど）；抗菌剤；抗酸化剤（アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウムなど）；緩衝剤（ホウ酸塩、重炭酸塩、トリスHCl、クエン酸塩、リン酸塩、その他の有機酸など）；増量剤（マンニトールまたはグリシンなど）、キレート剤（エチレンジアミン四酢酸（EDTA）など）；錯化剤（カフェイン、ポリビニルピロリドン、βシクロデキストリンまたはヒドロキシプロピルβシクロデキストリンなど）；充填剤；単糖；二糖及び他の炭水化物（グルコース、マンノース、またはデキストリンなど）；タンパク質（血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンなど）；着色剤；香料及び希釈剤；乳化剤；親水性ポリマー（ポリビニルピロリドンなど）；低分子量ポリペプチド；塩形成対イオン（ナトリウムなど）；防腐剤（塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸または過酸化水素など）；溶媒（グリセリン、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールなど）；糖アルコール（マンニトールまたはソルビトールなど）；懸濁剤；界面活性剤または湿潤剤（プルロニック、PEG、ソルビタンエステル、ポリソルベート、例えば、ポリソルベート20、ポリソルベート80、トリトン、トロメタミン、レシチン、コレステロール、チロキサバルなど）；安定性向上剤（スクロースまたはソルビトール）；等張性強化剤（アルカリ金属ハロゲン化物（一態様では、塩化ナトリウムまたは塩化カリウム、マンニトールソルビトール）；送達ビヒクル；希釈剤；賦形剤及び／または医薬用アジュバントが挙げられるが、これらに限定されない。（Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990）。

【0133】

本発明の一態様では、グリシン含有トリペプチド分子を、10mMグルタミン酸、2%グリシン、1%スクロース、及び0.01%ポリソルベート20、pH4.25からなる製剤緩衝剤で調製された凍結乾燥ケーキを含有する、単回使用専用のガラスバイアルとして供給する。ある量の無菌希釈剤、例えば、無菌等張食塩水または水、例えば、0.5mL～約10mL、例えば、2.2mLの無菌水で再構成すると、ケーキから1g/mL～約100g/mLの濃度のグリシントリペプチド分子が得られる。グリシン含有トリペプチド分子は、管理された条件下で安全な場所に保管する。単回使用バイアルをいったん再構成したら、薬剤を直ちに投与する（再構成後3時間以内）。注射の前に、被験薬を室温（15～30℃）に到達させることができる。

【0134】

用量及び投与

【0135】

本明細書中で使用する「用量」は、一般的に、1日1回投与し得るか、または1日数回投与し得る活性成分の用量に等しい（例えば、単位用量は、所望の日用量の一部である）。様々な実施形態において、様々な用量及び投与レジメンを、本明細書に開示するグリシンまたはグリシン含有トリペプチド分子に適用する。例えば、本発明において有用な用量は、対象の体重に基づく計算で、5mg/Kg～2,000mg/Kg、または30mg/Kg～1,500mg/Kg、または40mg/Kg～1,250mg/Kg、または50mg/Kg～1,000mg/Kg、または60mg/Kg～5,000mg/Kgである。本明細書中で使用する用語「単位用量」とは、所定量の活性化合物を含む離散量の治療用組成物を示すために使用され得る。活性成分の量は、一般的に、1日1回投与し得るか、または1日数回投与し得る活性成分の用量に等しい（例えば、単位用量は、所望

の日用量の一部である)。単位用量はまた、1日総用量を示すと捉えてもよく、それは、1日1回投与し得るか、またはそのような用量の便利な分数として投与し得る(例えば、単位用量は、例えば、投与量の半分または3分の1などの分数のきざみ幅で与えられ得る1日総用量である)。

【0136】

本明細書中で使用する場合、用語「開始日用量」とは、以前にグリシントリペプチド分子の滴定レジメンを受けたことがなく、グリシン含有トリペプチド分子治療を開始する患者に投与または処方する1日あたりのグリシン含有トリペプチド分子の量を指す。この量は、複数の単位用量または単一の単位用量で、日中の単一の時間で、または日中の複数回で投与することができる。

【0137】

いくつかの実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子の量は、約1mg/kg/日～約10,000mg/kg/日、約1mg/kg/日～約1,000mg/kg/日、約0.1mg/kg/日～約1,000mg/kg/日、1mg/kg/日～約1,000mg/kg/日、約1,000mg/kg/日～約10,000mg/kg/日、または約1mg/kg/日～約500mg/kg/日であり得る。いくつかの実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子の量は、約3mg/kg/日～約70mg/kg/日であり得る。いくつかの実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子の量は、約7mg/kg/日～約40mg/kg/日であり得る。いくつかの実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子の量は、約3mg/kg/日～約50mg/kg/日であり得る。

【0138】

いくつかの実施形態では、用量は、1000mg/日～100g/日、より好ましくは1000mg/日～75g/日であり得る。組成物中のグリシン含有トリペプチド分子の量は、好ましくは、約50mg～約100g、約100mg～約90g、約500mg～約75g、約600mg～約80g、約700mg～約75gであり得る。いくつかの実施形態では、組成物中のグリシン含有トリペプチド分子の量は、約100mg～約1,000g、約200mg～約500g、約300mg～約100g、約400mg～約75g、約500mg～約50g、約750mg～約25g、約1,000mg～約50g、または1000mg～約25gであり得る。

【0139】

いくつかの実施形態では、投与するグリシン含有トリペプチド分子の治療有効量は、約100mg～約200gである。この用量は、1日1回の用量として投与してもよく、または1日を通して投与するいくつかの用量、例えば、1日あたり1～5回の用量、好ましくは2回または3回の用量に分割してもよい。いくつかの実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子の量は、約250mg～約100gである。いくつかの実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子の量は、約500mg～約90gである。いくつかの実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子の量は、約750mg～約75gである。いくつかの実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子の量は、約1000mg～約50gである。いくつかの実施形態では、組成物は、経口投与に好適である。いくつかの実施形態では、組成物は、固体の経口剤形である。

【0140】

組成物は、グリシン含有トリペプチド分子について、少なくとも99.5%、好ましくは少なくとも99.6%、好ましくは少なくとも99.7%、好ましくは少なくとも99.8%、好ましくは少なくとも99.9%、好ましくは少なくとも99.95%、またはより好ましくは少なくとも99.99%のキラル純度を有し得る。いくつかの実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子について、キラル純度は100%である。いくつかの実施形態では、組成物は、グリシン含有トリペプチド分子について、99.9%以上のキラル純度を有する。いくつかの実施形態では、組成物は、グリシン含有トリペプチド分子について、99.95%以上のキラル純度を有する。いくつかの実施形態では、組成物は、グリシン含有トリペプチド分子について、99.99%以上のキラル純度を有する。

【0141】

いくつかの実施形態では、組成物は、経口投与に好適である。いくつかの実施形態では、組成物は、固体の経口剤形である。いくつかの実施形態では、組成物はカプセルである。いくつかの実施形態では、組成物は錠剤である。いくつかの実施形態では、組成物を、経口溶液または非経口溶液として製剤化する。

【0142】

簡潔にするために本明細書中で別々に記載する、組成物中のグリシン含有トリペプチド分子の量、キラル純度、及び剤形の実施形態は、任意の適切な組み合わせで結合することができる。

【0143】

別の態様では、本発明は、グリシントリペプチド分子に対してキラル的に純粋であるグリシン含有トリペプチド分子を含む組成物に関する。いくつかの実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子の量は、対象の体重に基づく計算で、約5mg/Kg/日～5000mg/Kg/日、または5mg/Kg/日～約2,000mg/Kg/日、または30mg/Kg/日～1500mg/Kg/日、または40mg/Kg/日～1250mg/Kg/日、または50mg/Kg/日～1000mg/Kg/日、または60mg/Kg/日～500mg/Kg/日であり得る。いくつかの実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子の量は、約10mg/kg/日～約1000mg/kg/日であり得る。いくつかの実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子の量は、約7mg/kg/日～約900mg/kg/日であり得る。いくつかの実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子の量は、約5mg/kg/日～約800mg/kg/日であり得る。いくつかの実施形態では、用量は、10mg/日～5,000mg/日、より好ましくは100mg/日～2000mg/日であり得る。いくつかの実施形態では、組成物を、約500mg～約100g、約1,000mg～約75g、約1500mg～約50g、または約2000mg～約25gのグリシントリペプチド分子の用量で投与する。いくつかの実施形態では、組成物を、約250mg～約500g、約500mg～約250g、約750mg～約200g、約1,000mg～約100g、約1,250mg～約75g、約1,500mg～約50g、約2,000mg～約25g、または2,500mg～約20gの用量で投与する。いくつかの実施形態では、代謝疾患及び/または心血管疾患、及び/または炎症性疾患を予防または治療するために、それを必要とする対象に投与するグリシン含有トリペプチド分子の有効量は、約500mg～約200gの範囲であってもよい。この用量は、1日1回の用量として投与してもよく、または1日を通して投与するいくつかの用量、例えば、1日あたり1～5用量、好ましくは1日あたり2～3用量に分割してもよい。グリシン含有トリペプチド分子のこれらの用量は、好ましくは、97%以上の化学的純度及び99.6%以上、99.7%以上、99.8%以上、99.9%以上、好ましくは99.95%以上、より好ましくは99.99%以上の化学的純度を有する。好ましい実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を含む組成物は、グリシン含有トリペプチド分子に対して100%のキラル純度を有していてもよい。組成物には、さらに担体5を含ませてもよい。本発明の組成物は、経口的に、好ましくは固体経口用量として、より好ましくはカプセルまたは錠剤であり得る固体経口用量として投与してもよい。好ましい実施形態では、本発明の組成物を、経口投与用の錠剤として製剤化してもよい。

【0144】

別の態様では、本発明はさらに、治療有効量のグリシントリペプチド分子を含む組成物を提供する。組成物には、さらに薬学的に許容される担体を含ませてもよい。

【0145】

いくつかの実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子の治療有効量は、約1mg/kg/日～約10,000mg/kg/日、約5mg/kg/日～約5,000mg/kg/日、約20mg/kg/日～約1,000mg/kg/日、約30mg/kg/日～約1,000mg/kg/日、約50mg/kg/日～約10,000mg/kg/日、または約100mg/kg/日～約5,000mg/kg/日であり得る。

【0146】

いくつかの実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子の治療有効量は、約5 mg/kg/日～約5,000 mg/kg/日であり得る。いくつかの実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子の治療有効量は、約10 mg/kg/日～約4,000 mg/kg/日であり得る。いくつかの実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子の治療有効量は、約25 mg/kg/日～約2,000 mg/kg/日であり得る。いくつかの実施形態では、用量は、10 mg/日～1,000 g/日、より好ましくは500 mg/日～100 g/日であり得る。組成物中のグリシン含有トリペプチド分子の治療有効量は、好ましくは、約250 mg～約500 g、約500 mg～約400 g、約750 mg～約200 g、約1,000 mg～約100 gであり得る。いくつかの実施形態では、組成物中のグリシン含有トリペプチド分子の治療有効量は、約300 mg～約1,000 g、約500 mg～約500 g、約600 mg～約400 g、約700 mg～約300 g、約800 mg～約200 g、約900 mg～約150 g、または約1,000 mg～約100 gであり得る。いくつかの実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子の量は、約600 mg～約300 gである。この用量は、1日1回の用量として投与してもよく、または1日を通して投与するいくつかの用量、例えば、1日あたり1～5用量、好ましくは1日あたり2～3用量に分割してもよい。いくつかの実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子の治療有効量は、約500 mg～約350 gである。いくつかの実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子の治療有効量は、約750 mg～約250 gである。いくつかの実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子の治療有効量は、約1,000 mg～約150 gである。いくつかの実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子の治療有効量は、約1,500 mg～約100 gである。いくつかの実施形態では、組成物は、経口投与に好適である。いくつかの実施形態では、組成物は、固体の経口剤形である。いくつかの実施形態では、組成物は、液体の経口剤形である。いくつかの実施形態では、組成物は、液体の非経口剤形である。

10

20

【0147】

いくつかの実施形態では、組成物は、経口投与に好適である。いくつかの実施形態では、組成物は、固体の経口剤形である。いくつかの実施形態では、組成物はカプセルである。いくつかの実施形態では、組成物は錠剤である。

【0148】

別の態様では、対象の肝機能に対するグリシントリペプチド分子、またはその薬学的に許容される塩の有益な効果は、一態様では、肝脂質酸化、AMPK α 1、グルコキナーゼ、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 α 、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ 、PPAR γ コアクチベーター1、ピルビン酸キナーゼ、ステロール調節エレメント結合タンパク質1c、長鎖及び超長鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼまたはステアロイル-CoA脱飽和酵素のメッセンジャーRNAまたはタンパク質発現の好ましい変化に認められる。さらなる態様では、対象の肝機能に対するグリシントリペプチド分子、またはその薬学的に許容される塩の有益な効果は、ホスホエノイルピルビン酸キナーゼ、ミクロソーム転移タンパク質、アリアルアセトアミンデアセチラーゼ、アポリポタンパク質C2、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼII、またはホスホリパーゼD1のメッセンジャーRNAまたはタンパク質発現の改善に認められる。

30

40

【0149】

本発明のグリシントリペプチド分子、またはその薬学的に許容される塩は、任意の適切な経路によって投与してもよい。例えば、本発明の組成物は、経口、眼、皮内、腹腔内、鼻腔内、皮下、筋肉内または静脈内経路によって投与することができる。

【0150】

経口投与に適した製剤として、例えば、固体、半固体、及び液体系、例えば、錠剤；マルチ粒子もしくはナノ粒子、液体、または散剤を含有するソフトまたはハードカプセル；トローチ（液体で満たされたものを含む）；ガム；ゲル；高速分散剤形；フィルム；腔坐剤；スプレーが挙げられる。いくつかの実施形態では、本発明のペプチドを、ミクロスフ

50

エア、リポソーム、腸溶コーティングされた乾燥エマルジョンまたはナノ粒子を含むがこれらに限定されない当技術分野で公知の送達ビヒクルを使用して経口投与用に製剤化する。

【0151】

経口投与用の液体剤形として、薬学的に許容される乳濁剤、マイクロエマルジョン、溶液、懸濁剤、シロップ剤及びエリキシル剤が挙げられるが、これらに限定されない。活性ペプチドに加えて、液体剤形は、例えば、水または他の溶媒などの当技術分野において一般的に使用される不活性希釈剤、可溶化剤及び乳化剤、例えば、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、ジメチルホルムアミド、油類（特に、綿実油、ラッカセイ油、コーン油、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油、及びゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフルフリルアルコール、ポリエチレングリコール及び脂肪酸エステルソルビタン、ならびにそれらの混合物を含有し得る。不活性希釈剤以外に、経口組成物はまた、湿潤剤、乳化剤及び懸濁剤、甘味剤、香味剤、及び芳香剤などのアジュバントを含み得る。

【0152】

経口投与のための固体剤形には、カプセル剤、錠剤、丸剤、散剤、及び顆粒剤が含まれる。そのような固体剤形において、活性ペプチドを、クエン酸ナトリウムまたはリン酸二カルシウムなどの少なくとも1つの不活性な薬学的に許容される賦形剤または担体、及び／またはa) デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、及びケイ酸などの充填剤または増量剤、b) 例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロース、及びアカシアなどの結合剤、c) グリセロールなどの湿潤剤、d) 寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモデンプンまたはタピオカデンプン、アルギン酸、特定のケイ酸塩、及び炭酸ナトリウムなどの崩壊剤、e) パラフィンなどの溶解遅延剤、f) 第四級アンモニウム化合物などの吸収促進剤、g) 例えば、セチルアルコール及びモノステアリン酸グリセロールなどの湿潤剤、h) カオリン及びベントナイト粘土などの吸収剤、ならびにi) タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固形ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウムなどの滑沢剤、ならびにそれらの混合物と混合する。カプセル、錠剤及びピルの場合、剤形には緩衝剤も含ませてよい。活性化合物はまた、上述の1つ以上の賦形剤を含むマイクロカプセル化形態であり得る。類似した型の固形組成物はまた、ラクトースまたは乳糖、ならびに高分子量ポリエチレングリコール、ポロキサマーなどの賦形剤を使用して、軟質及び硬質充填ゼラチンカプセル中の充填剤として用いられ得る。錠剤、糖衣錠、カプセル、丸剤、及び顆粒の固形剤形は、コーティング及びシェル、例えば、腸溶コーティング及び医薬製剤分野で周知の他のコーティングを用いて調製することができる。注射可能な製剤、例えば、無菌の注射可能な水性または油性懸濁液は、適切な分散剤または湿潤剤及び懸濁剤を使用して、公知の技術に従って製剤化し得る。無菌の注射可能な製剤はまた、非毒性の非経口的に許容される希釈剤または溶媒中の無菌の注射可能な溶液、懸濁剤または乳濁液、例えば1,3-ブタンジオール中の溶液であり得る。利用し得る許容されるビヒクル及び溶媒として、水、リンゲル液、U.S.P. 及び等張塩化ナトリウム溶液が挙げられる。さらに、無菌の固定油が、溶媒または懸濁培地として慣習的に用いられる。この目的のために、合成モノグリセリドまたはジグリセリドを含む、任意のブランドの固定油を用いることができる。さらに、オレイン酸などの脂肪酸を、注射剤の調製において使用する。注射可能製剤を、例えば、細菌を保持するフィルターに通して濾過することにより、または使用前に無菌水または他の無菌注射可能培地に溶解または分散し得る無菌の固形組成物の形態で無菌剤を組み込むことによって、無菌化することができる。

【0153】

当業者であれば、治療的使用のために投与するグリシン含有トリペプチド分子ポリペプチドの量が様々に異なることを理解するであろう。一態様では、グリシントリペプチド分子、またはその薬学的に許容される塩を含有する組成物は、汚染因子を実質的に含まず、汚染レベルは0.02% (w/w) 未満である。患者への注射に適したグリシン含有トリ

10

20

30

40

50

ペプチド分子組成物は、例えば、精製されたグリシン含有トリペプチド分子及び安定化塩を含む凍結乾燥試料の薬理的に許容される希釈剤で再構成することによって調製される。グリシン含有トリペプチド分子組成物の投与は、本明細書で以下に詳細に論じるように、代替的に全身性または局所的であり、治療有効量のグリシン含有トリペプチド分子タンパク質組成物の投与を含む。

【0154】

併用治療及び組成物

【0155】

グリシントリペプチド分子、またはその薬学的に許容される塩を含有する組成物の送達のみに基づく治療に加えて、併用療法が特に企図されている。本発明に関して、グリシン含有トリペプチド分子療法は、代謝疾患、例えば脂肪肝疾患の治療に一般的に使用される他の薬剤と同様に併用することが企図される。

【0156】

様々な実施形態において、第2の治療薬（複数可）を、特に活性の相乗的増強のために、グリシントリペプチド分子と併用することができる。活性成分の併用投与は、患者への活性成分の別々の投与によって、または複数の活性成分を1つの医薬製剤中に存在させる組み合わせ製品の形態のいずれかによって行うことができる。二次治療薬は、単剤として使用する場合、承認された用量で投与することができ、または二次治療薬とグリシントリペプチド分子、またはその薬学的に許容される塩とを併用して投与する場合、その併用が、治療しようとする患者において治療効果のある結果を提供するように、最初に二次治療薬を治療有効濃度または治療有効濃度以下で投与してもよいと考えられる。

【0157】

本発明の方法及び組成物を使用して適切な治療結果を達成するために、グリシン含有トリペプチド分子及び少なくとも1つの他の治療薬（第2の治療薬（複数可））を含む組成物を提供してもよい。本発明において、第2の治療薬は、プラムリニチド、ペプチドYY（PYY）、エキセナチド、またはチアゾリジンジオンもしくはメトホルミン、またはグリメピリド、及びこれらの化合物のいずれかの類似体を含むがこれらに限定されないインスリン感作物質から選択され得ることが企図される。アテローム性動脈硬化症に関連する脂質異常症、糖尿病及び心血管疾患の制御に使用する他の二次治療薬は、当技術分野で周知であり、本発明のグリシン含有トリペプチド分子と併用してもよい。

【0158】

併用療法組成物は、代謝疾患、例えば：グルコース代謝異常、脂質異常症、例えば、コレステロールの増加（純粋または単独高コレステロール血症）、及び／またはトリグリセリド（TG）のみの増加（純粋または単独高トリグリセリド血症）、及び／またはコレステロールとTGの両方の増加（混合または複合高脂血症）、NAFLD、NASH、脂肪肝、肝炎症、末梢動脈疾患、冠動脈疾患、アテローム性動脈硬化症、全身性炎症、及びプラーク関連血栓症に関連する虚血性脳卒中を含む脂肪肝疾患のうちの1つ以上に関連する代謝疾患の治療において所望の治療結果を生じるのに有効な組み合わせ量で提供される。このプロセスは、それを必要とする対象に、治療有効量の本発明の第1の治療薬（すなわち、治療有効量のグリシントリペプチド分子、またはその薬学的に許容される塩を含む組成物）、及び場合により、第2の治療薬（複数可）または因子（複数可）を同時に投与することを含む。これは、両方の治療薬を含む単一の組成物または薬理的製剤を投与することによって、または2つの別個の組成物または製剤を同時に投与することによって達成され、その場合、一方の組成物が、グリシン含有トリペプチド分子治療組成物を含み、他方が第2の治療薬を含む。

【0159】

グリシン含有トリペプチド分子と併用する二次治療薬として有用な抗糖尿病薬として、インスリン及びインスリン誘導体、例えば、Lantus（登録商標）もしくはHMR1964もしくはLevemir（登録商標）（インスリンデテムル）またはWO2005005477に記載されている薬剤（Novo Nordisk）、速効型インスリン（

10

20

30

40

50

米国特許第6,221,633号を参照のこと）、吸入型インスリン、例えば、Exubera（登録商標）または経口インスリン、例えば、IN-105（Nobex）もしくはOral-lyn（商標）（Generex Biotechnology）、GLP-1誘導体及びGLP-1アゴニスト、例えば、エキセナチド、リラグルチドまたはNovo Nordisk A/SのWO98/08871、WO2005027978、WO2006037811もしくはWO2006037810、ZealandのWO01/04156、Beaufour-IpsenのWO00/34331に開示されている薬剤、プラムリンチド酢酸塩（Symlyn; Amylin Pharmaceuticals）、BIM-51077、PC-DAC-exendin-4（組換えヒトアルブミンに共有結合したエキセンディン-4類似体）、例えば、D. Chen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104 (2007) 943に記載されているアゴニスト、WO2006124529に記載されている薬剤、ならびに経口的に有効な血糖降下作用のある活性成分が挙げられる。

【0160】

抗糖尿病薬には、例えば、WO2006121860に記載されているグルコース依存性インスリン分泌性ポリペプチド（GIP）受容体のアゴニスト、ならびに血糖を制御し、II型糖尿病を含む糖尿病を治療するために使用するGLP-1及びGLP-2ならびにそれらの合成バリエーション及び変異体も含まれる。

【0161】

本明細書に開示するグリシン含有トリペプチド分子と併用するのに有用な例示的な二次治療薬として、経口的に有効な血糖降下活性成分、好ましくはスルホニル尿素、ビグアニジン、メグリチニド、オキサジアゾリジンジオン、チアゾリジンジオン、グルコシダーゼ阻害剤、グリコーゲンホスホリラーゼ阻害剤、グルカゴンアンタゴニスト、グルコキナーゼ活性化因子、フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ阻害剤、グルコーストランスporter 4（GLUT4）調節因子、グルタミン-フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ（GFAT）阻害剤、GLP-1アゴニスト、カリウムチャネルオプナー、例えば、ピナシジル、クロマカリム、ジアゾキシド、またはR. D. Carr et al., Diabetes 52, 2003, 2513-2518, J. B. Hansen et al., Current Medicinal Chemistry 11, 2004, 1595-1615, T. M. Tagmose et al., J. Med. Chem. 47, 2004, 3202-3211もしくはM. J. Coghlan et al., J. Med. Chem. 44, 2001, 1627-1653に記載されているもの、またはNovo Nordisk A/SのWO97/26265及びWO99/03861で開示されているもの、ジペプチジルペプチダーゼIV（DPP-IV）阻害剤、インスリン感作物質、糖新生及び／またはグリコーゲン分解の刺激に關与する肝酵素の阻害剤、グルコース取り込み、グルコース輸送及びグルコース再吸収の調節因子、11β-HSD 1阻害剤、タンパク質チロシンホスファターゼ1B（PTP1B）阻害剤、ナトリウム依存性グルコーストランスporter 1または2（SGLT1、SGLT2）調節因子、抗高脂血症活性成分及び抗脂質血症活性成分などの脂質代謝を変化させる化合物、食物摂取を減少させる化合物、熱発生を増加させる化合物、PPAR及びRXR調節因子ならびにβ細胞のATP依存性カリウムチャネルに作用する活性成分が挙げられ得る。

【0162】

本発明の一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、シンバスタチン、フルバスタチン、プラバスタチン、ロバスタチン、アトルバスタチン、セリバスタチン、ロスバスタチンまたはL-659699などのHMG Co Aレダクターゼ阻害剤と併用して投与する。

【0163】

本発明の一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、例えば、エゼチミブ、チケシド、パマケシド、FM-VP4（シトスタノール／カンパエステロールリン酸アスコルビル；Forbes Medi-Tech、WO2005042692、WO2005

10

20

30

40

50

005453)、MD-0727 (Microbia Inc., WO2005021497、WO2005021495) などのコレステロール吸収阻害剤、またはWO2002066464、WO2005000353 (Kotobuki Pharmaceutical Co. Ltd.)、もしくはWO2005044256もしくはWO2005062824 (Merck & Co.) もしくはWO2005061451及びWO2005061452 (AstraZeneca AB)、及びWO2006017257 (Phenomix) もしくはWO2005033100 (Lipideon Biotechnology AG) に記載されているか、またはWO2004097655、WO2004000805、WO2004000804、WO2004000803、WO2002050068、WO2002050060、WO2005047248、WO2006086562、WO2006102674、WO2006116499、WO2006121861、WO2006122186、WO2006122216、WO2006127893、WO2006137794、WO2006137796、WO2006137782、WO2006137793、WO2006137797、WO2006137795、WO2006137792、WO2006138163に記載されている化合物と併用して投与する。

10

【0164】

本発明の一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、エゼチミブとシンバスタチンの固定された組み合わせであるビトリン（商標）と併用して投与する。

【0165】

本発明の一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、エゼチミブとアトルバスタチンの固定された組み合わせと併用して投与する。

20

【0166】

本発明の一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、エゼチミブとフェノフィブラートの固定された組み合わせと併用して投与する。

【0167】

本発明のさらなる実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、フェノフィブラートとロスバスタチンの固定された組み合わせと併用して投与する。

【0168】

本発明の一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、フェノフィブラートとメトホルミンの固定された組み合わせであるSynordia（登録商標）と併用して投与する。

30

【0169】

本発明の一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、アポリポタンパク質B遺伝子を調節することができるアンチセンスオリゴヌクレオチドであるISIS-301012と併用して投与する。

【0170】

本発明の一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、例えば、ロシグリタゾン、ピオグリタゾン、JTT-501、GI262570、R-483、CS-011（リボグリタゾン）などのPPAR γ アゴニストと併用して投与する。

40

【0171】

本発明の一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、塩酸ピオグリタゾンと塩酸メトホルミンの固定された組み合わせであるCompetact（商標）と併用して投与する。

【0172】

本発明の一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、ピオグリタゾンとグリメピリドの固定された組み合わせであるTandemact（商標）と併用して投与する。

【0173】

本発明の一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、塩酸ピオグリタゾンと、例えば、TAK-536などのアンジオテンシンII受容体アンタゴニストとの固定され

50

た組み合わせと併用して投与する。

【0174】

本発明の一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、PPAR α アゴニスト、例えば、GW9578、GW-590735、K-111、LY-674、KRP-101、DRF-10945、LY-518674またはWO2001040207、WO2002096894、WO2005097076に記載されているものと併用して投与する。

【0175】

本発明の一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、混合PPAR α/γ アゴニスト、例えば、naveglitazar、LY-510929、ONO-5129、E-3030、AVE8042、AVE8134、AVE0847、CKD-501（硫酸ロベグリタゾン）、またはWO00/64888、WO00/64876、WO03/020269またはJ. P. Berger et al., TRENDS in Pharmacological Sciences 28 (5), 244-251, 2005に記載されているものと併用して投与する。

【0176】

本発明の一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、PPAR δ アゴニスト、例えば、GW-501516、またはWO2006059744、WO2006084176、WO2006029699、WO2007039172~WO2007039178に記載されているものと併用して投与する。

【0177】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、メタグリダセンまたはMBX-2044もしくは他の部分的PPAR γ アゴニスト/アンタゴニストと併用して投与する。

【0178】

本発明の一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、例えば、フェノフィブラート、クロフィブラートまたはベザフィブラートなどのフィブラート系薬剤と併用して投与する。

【0179】

本発明の一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、MTP阻害剤、例えば、インプリタピド、BMS-201038、R-103757、AS-1552133またはWO2005085226、WO2005121091、WO2006010423に記載されているものと併用して投与する。

【0180】

本発明の一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、CETP阻害剤、例えば、トルセトラピブもしくはJTT-705、またはWO2006002342、WO2006010422、WO2006012093、WO2006073973、WO2006072362、WO2006097169、WO2007041494に記載されているものと併用して投与する。

【0181】

本発明の一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、胆汁酸吸収阻害剤（例えば、米国特許第6,245,744号、米国特許第6,221,897号、またはWO00/61568を参照のこと）、例えば、HMR1741、またはDE102005033099.1及びDE102005033100.9、WO2007009655-56に記載されているものと併用して投与する。

【0182】

本発明の一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、例えば、コレステラミンまたはコレセバラムなどの高分子胆汁酸吸着剤と併用して投与する。

【0183】

本発明の一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、LDL受容体誘導物質（米国特許第6,342,512号を参照のこと）、例えば、HMR1171、HMR15

10

20

30

40

50

86、またはWO2005097738に記載されているものと併用して投与する。

【0184】

本発明の一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、例えば、WO2006072393に記載のABCA1発現エンハンサーと併用して投与する。

【0185】

本発明のさらなる実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、PCSK9（プロタンパク質転換酵素サブチリシン／ケキシン9型）阻害剤、例えば、エボロクマブ、インクリシラン、またはPCSK9に対するRNAi治療薬と併用して投与する。本発明のさらなる実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、PCSK9に対する抗体、例えば、アリロクマブ（Praluent）（2週間ごとに75～150mgを投与してもよい）；及びエボロクマブ（Repatha）（2週間ごとに140mg、または毎月420mg投与する）と併用して投与する。

10

【0186】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、Omacor（登録商標）（ ω -3脂肪酸；エイコサペンタエン酸とドコサヘキサエン酸の高濃度エチルエステル）と併用して投与する。

【0187】

本発明の一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、例えば、アバシミベまたはSMP-797などのACAT阻害剤と併用して投与する。

【0188】

本発明の一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、抗酸化剤、例えば、OPC-14117、プロブコール、トコフェロール、アスコルビン酸、 β -カロテンまたはセレンと併用して投与する。

20

【0189】

本発明の一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、ビタミン、例えば、ビタミンB6またはビタミンB12と併用して投与する。

【0190】

本発明の一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、リポタンパク質リパーゼ調節因子、例えば、イブロリピム（NO-1886）と併用して投与する。

【0191】

本発明の一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、ATPクエン酸リアーゼ阻害剤、例えば、SB-204990と併用して投与する。

30

【0192】

本発明の一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、スクアレンシンターゼ阻害剤、例えば、BMS-188494、TAK-475、またはWO2005077907、JP2007022943に記載されているものと併用して投与する。

【0193】

本発明の一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、リポタンパク質（a）アンタゴニスト、例えば、ゲムカベン（CI-1027）と併用して投与する。

【0194】

本発明の一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、GPR109Aのアゴニスト（HM74A受容体アゴニスト；NARアゴニスト（ニコチン酸受容体アゴニスト））、例えば、ニコチン酸またはMK-0524Aと組み合わせた徐放性ナイアシンまたはWO2006045565、WO2006045564、WO2006069242、WO2006124490、WO2006113150、WO2007017261、WO2007017262、WO2007017265、WO2007015744、WO2007027532に記載されている化合物と併用して投与する。

40

【0195】

本発明の別の実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、例えば、WO2006067531、WO2006067532に記載のGPR116のアゴニストと併用して

50

投与する。

【0196】

本発明の一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、リパーゼ阻害剤、例えば、オルリスタットまたはセチリスタット（ATL-962）と併用して投与する。

【0197】

本発明の一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、インスリンと併用して投与する。

【0198】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、例えば、トルブタミド、グリベンクラミド、グリピジド、グリクラジドまたはグリメピリドなどのスルホニル尿素と併用して投与する。

10

【0199】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、インスリン分泌を増強する物質、例えば、KCP-265（WO2003097064）またはWO2007026761に記載されているものと併用して投与する。

【0200】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、グルコース依存性インスリン分泌性受容体（GDIR）のアゴニスト、例えば、APD-668と併用して投与する。

【0201】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、ビグアニド、例えば、メトホルミンと併用して投与する。

20

【0202】

さらに別の実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、メグリチニド、例えば、レパグリニド、ナテグリニドまたはミチグリニドと併用して投与する。

【0203】

さらなる実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、ミチグリニドと、グリタゾン、例えば、塩酸ピオグリタゾン、もしくはマレイン酸ロシグリタゾンとの組み合わせ、またはグリタゾンとグリメピリドの組み合わせ、またはメトホルミン、またはそれらの組み合わせとともに投与する。

【0204】

さらなる実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、ミチグリニドと α -グルコシダーゼ阻害剤との組み合わせと共に投与する。

30

【0205】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、チアゾリジンジオン、例えば、トログリタゾン、シグリタゾン、ピオグリタゾン、ロシグリタゾン、またはDr. Reddy's Research FoundationのWO97/41097に開示されている化合物、特に、5-[4-[(3,4-ジヒドロ-3-メチル-4-オキソ-2-キナゾリニルメトキシ)-フェニル]メチル]-2,4-チアゾリジンジオンと併用して投与する。

【0206】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、 α -グルコシダーゼ阻害剤、例えば、ミグリトールまたはアカルボースと併用して投与する。

40

【0207】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、 β 細胞のATP依存性カリウムチャンネルに作用する活性成分、例えば、トルブタミド、グリベンクラミド、グリピジド、グリメピリドまたはレパグリニドと併用して投与する。

【0208】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、前述の化合物の2つ以上と併用して、例えば、スルホニル尿素とメトホルミン、スルホニル尿素とアカルボース、レパグリニドとメトホルミン、インスリンとスルホニル尿素、インスリンとメトホルミン、インス

50

リンとトログリタゾン、インスリンとロバスタチンなどと併用して投与する。

【0209】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、グリコーゲンホスホリラーゼ阻害剤、例えば、PSN-357もしくはFR-258900、またはWO2003084922、WO2004007455、WO2005073229-31もしくはWO2005067932に記載されているものと併用して投与する。

【0210】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、グルカゴン受容体アンタゴニスト、例えば、A-770077、NNC-25-2504、またはWO2004100875もしくはWO2005065680に記載されているものと併用して投与する。

10

【0211】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、グルコキナーゼの活性化因子、例えば、LY-2121260 (WO2004063179)、PSN-105、PSN-110、GKA-50、または、例えば、WO2004072031、WO2004072066、WO2005080360、WO2005044801、WO2006016194、WO2006058923、WO2006112549、WO2006125972、WO2007017549、WO2007017649、WO2007007910、WO2007007040~42、WO2007006760~61、WO2007006814、WO2007007886、WO2007028135、WO2007031739、WO2007041365、WO2007041366、WO2007037534、WO2007043638、WO2007053345、WO2007051846、WO2007051845、WO2007053765、WO2007051847に記載されているものと併用して投与する。

20

【0212】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、糖新生阻害剤、例えば、FR-225654と併用して投与する。

【0213】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ (FBPアーゼ) 阻害剤、例えば、CS-917 (MB-06322) もしくはMB-07803またはWO2006023515、WO2006104030、WO2007014619に記載されているものと併用して投与する。

30

【0214】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、グルコーストランスポーター4 (GLUT4) 調節因子、例えば、KST-48 (D.-O. Lee et al.: Arzneim.-Forsch. Drug Res. 54 (12), 835 (2004)) と併用して投与する。

【0215】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、例えば、WO2004101528に記載されているように、グルタミン-フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ (GFAT) 阻害剤と併用して投与する。

40

【0216】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、ジペプチジルペプチダーゼIV (DPP-IV) 阻害剤、例えば、ビルダグリブチン (LAF-237)、シタグリブチン (MK-0431)、リン酸シタグリブチン、サクサグリブチン (BMS-477118)、GSK-823093、PSN-9301、SYR-322、SYR-619、TA-6666、TS-021、GRC-8200、GW-825964X、KRP-104、DP-893、ABT-341、ABT-279もしくはその別の塩、またはWO2003074500、WO2003106456、WO2004037169、WO200450658、WO2005058901、WO2005012312、WO2005/012308、WO2006039325、WO2006058064、WO2006

50

015691、WO2006015701、WO2006015699、WO2006015700、WO2006018117、WO2006099943、WO2006099941、JP2006160733、WO2006071752、WO2006065826、WO2006078676、WO2006073167、WO2006068163、WO2006090915、WO2006104356、WO2006127530、WO2006111261、WO2007015767、WO2007024993、WO2007029086に記載されている化合物と併用して投与する。

【0217】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、シタグリプチンリン酸塩とメトホルミン塩酸塩の固定された組み合わせであるJanumet（商標）と併用して投与する。

【0218】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、11-β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ1（11β-HSD1）阻害剤、例えば、BVT-2733、JNJ-25918646、INCB-13739または、例えば、WO200190090~94、WO200343999、WO2004112782、WO200344000、WO200344009、WO2004112779、WO2004113310、WO2004103980、WO2004112784、WO2003065983、WO2003104207、WO2003104208、WO2004106294、WO2004011410、WO2004033427、WO2004041264、WO2004037251、WO2004056744、WO2004058730、WO2004065351、WO2004089367、WO2004089380、WO2004089470~71、WO2004089896、WO2005016877、WO2005097759、WO2006010546、WO2006012227、WO2006012173、WO2006017542、WO2006034804、WO2006040329、WO2006051662、WO2006048750、WO2006049952、WO2006048331、WO2006050908、WO2006024627、WO2006040329、WO2006066109、WO2006074244、WO2006078006、WO2006106423、WO2006132436、WO2006134481、WO2006134467、WO2006135795、WO2006136502、WO2006138695、WO2006133926、WO2007003521、WO2007007688、US2007066584、WO2007047625、WO2007051811、WO2007051810に記載されているものと併用して投与する。

【0219】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、例えば、WO200119830~31、WO200117516、WO2004506446、WO2005012295、WO2005116003、WO2005116003、WO2006007959、DE102004060542.4、WO2007009911、WO2007028145、WO2007081755に記載されているように、タンパク質チロシンホスファターゼ1B（PTP1B）阻害剤と併用して投与する。

【0220】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、ナトリウム依存性グルコース輸送体1または2（SGLT1、SGLT2）調節因子、例えば、KGA-2727、T-1095、SGL-0010、AVE2268、SAR7226及びセルグリフロジン、または、例えば、WO2004007517、WO200452903、WO200452902、PCT/EP2005/005959、WO2005085237、JP2004359630、WO2005121161、WO2006018150、WO2006035796、WO2006062224、WO2006058597、WO2006073197、WO2006080577、WO2006087997、WO2006108842、WO2007000445、WO2007014895、WO2007080

10

20

30

40

50

170もしくはA. L. Handlon in Expert Opin. Ther. Patents (2005) 15 (11), 1531-1540に記載されているものと併用して投与する。

【0221】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、GPR40の調節因子、例えば、WO2007013689、WO2007033002に記載されているものと併用して投与する。

【0222】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、GPR119bの調節因子、例えば、WO2004041274に記載されているものと併用して投与する。

【0223】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、GPR119の調節因子、例えば、WO2005061489 (PSN-632408)、WO2004065380、WO2007003960~62及びWO2007003964に記載されているものと併用して投与する。

【0224】

さらなる実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、GPR120の調節因子と併用して投与する。

【0225】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、例えば、WO2005073199、WO2006074957、WO2006087309、WO2006111321、WO2007042178に記載されているように、ホルモン感受性リパーゼ (HSL) 阻害剤及び／またはホスホリパーゼと併用して投与する。

【0226】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、アセチルCoAカルボキシラーゼ (ACC) 阻害剤、例えば、WO199946262、WO200372197、WO2003072197、WO2005044814、WO2005108370、JP2006131559、WO2007011809、WO2007011811、WO2007013691に記載されるものと併用して投与する。

【0227】

さらなる実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、キサンチンオキシドレダクターゼ (XOR) の調節因子と併用して投与する。

【0228】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) 阻害剤、例えば、WO2004074288に記載されているものと併用して投与する。

【0229】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、例えば、US2005222220、WO2005085230、WO2005111018、WO2003078403、WO2004022544、WO2003106410、WO2005058908、US2005038023、WO2005009997、US2005026984、WO2005000836、WO2004106343、EP1460075、WO2004014910、WO2003076442、WO2005087727またはWO2004046117に記載されているように、グリコーゲンシンターゼキナーゼ3β (GSK-3β) 阻害剤と併用して投与する。

【0230】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、例えば、WO2006072354に記載されているように、血清／グルココルチコイド調節キナーゼ (SGK) 阻害剤と併用して投与する。

【0231】

10

20

30

40

50

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、例えばWO2007035355に記載されているように、RUP3受容体のアゴニストと併用して投与する。

【0232】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、プロテインキナーゼCβ（PKCβ）阻害剤、例えば、ルボキシスタウリンと併用して投与する。

【0233】

別の実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、血管拡張性失調症変異（ATM）タンパク質キナーゼをコードする遺伝子の活性化因子、例えば、クロロキンと併用して投与する。

【0234】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、エンドセリンA受容体アンタゴニスト、例えば、アボセンタン（SPP-301）と併用して投与する。

【0235】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、例えば、WO2001000610、WO2001030774、WO2004022553またはWO2005097129に記載されているように、「I-κBキナーゼ」阻害剤（IKK阻害剤）と併用して投与する。

【0236】

一実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、例えば、WO2005090336、WO2006071609、WO2006135826に記載されているように、グルココルチコイド受容体（GR）の調節因子と併用して投与する。

【0237】

さらなる実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、CART調節因子と併用して投与する（“Cocaine-amphetamine-regulated transcript influences energy metabolism, anxiety and gastric emptying in mice” Asakawa, A. et al.: Hormone and Metabolic Research (2001), 33 (9), 554-558を参照のこと）；

【0238】

さらなる実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、NPYアンタゴニスト、例えば、ナフタレン-1-スルホン酸 {4-[(4-アミノキナゾリン-2-イルアミノ)メチル]シクロヘキシルメチル} アミド塩酸塩（CGP71683A）；L-152804などのNPY-5受容体アンタゴニスト、または、例えば、WO2006001318に記載されているもの；例えば、WO2007038942に記載されているようなNPY-4受容体アンタゴニスト；例えば、WO2007038943に記載されているようなNPY-2受容体アンタゴニスト；ペプチドYY3-36（PYY3-36）または類似の化合物、例えば、CJC-1682（Cys34を介してヒト血清アルブミンと結合したPYY3-36）、CJC-1643（in vivoで血清アルブミンに複合体化するPYY3-36誘導体）またはWO2005080424、WO2006095166に記載されているもの；WO2006096847に記載されているペプチドオベスタチン誘導体；CB1R（カンナビノイド受容体1）アンタゴニスト（例えば、リモナバン、SR147778、SLV-319、AVE-1625、MK-0364またはその塩）または、例えば、EP0656354、WO00/15609、WO2001/64632~64634、WO02/076949、WO2005080345、WO2005080328、WO2005080343、WO2005075450、WO2005080357、WO200170700、WO2003026647~48、WO200302776、WO2003040107、WO2003007887、WO2003027069、米国特許第6,509,367号、WO200132663、WO2003086288、WO2003087037、WO2004048317、WO2004058145、WO2003084930、WO2003084943、WO2004058

10

20

30

40

50

744、WO2004013120、WO2004029204、WO2004035566、WO2004058249、WO2004058255、WO2004058727、WO2004069838、US20040214837、US20040214855、US20040214856、WO2004096209、WO2004096763、WO2004096794、WO2005000809、WO2004099157、US20040266845、WO2004110453、WO2004108728、WO2004000817、WO2005000820、US20050009870、WO200500974、WO2004111033-34、WO200411038~39、WO2005016286、WO2005007111、WO2005007628、US20050054679、WO2005027837、WO2005028456、WO2005063761~62、WO2005061509、WO2005077897、WO2006047516、WO2006060461、WO2006067428、WO2006067443、WO2006087480、WO2006087476、WO2006100208、WO2006106054、WO2006111849、WO2006113704、WO2007009705、WO2007017124、WO2007017126、WO2007018459、WO2007016460、WO2007020502、WO2007026215、WO2007028849、WO2007031720、WO2007031721、WO2007036945、WO2007038045、WO2007039740、US20070015810、WO2007046548、WO2007047737、WO2007084319、WO2007084450に記載されている化合物) ; 例えば、WO2007001939、WO2007044215、WO2007047737に記載されているような、カンナビノイド受容体1／カンナビノイド受容体2 (CB1／CB2) 調節化合物 ; MC4アゴニスト (例えば、1-アミノ-1, 2, 3, 4-テトラヒドロナフタレン-2-カルボン酸 [2-(3a-ベンジル-2-メチル-3-オキソ-2, 3, 3a, 4, 6, 7-ヘキサヒドロピラゾロ [4, 3-c] ピリジン-5-イル) -1-(4-クロロフェニル) -2-オキソエチル] アミド ; (WO01/91752)) またはLB53280、LB53279、LB53278またはTHIQ、MB243、RY764、CHIR-785、PT-141またはWO2005060985、WO2005009950、WO2004087159、WO2004078717、WO2004078716、WO2004024720、US20050124652、WO2005051391、WO2004112793、WOUS20050222014、US20050176728、US20050164914、US20050124636、US20050130988、US20040167201、WO2004005324、WO2004037797、WO2005042516、WO2005040109、WO2005030797、US20040224901、WO200501921、WO200509184、WO2005000339、EP1460069、WO2005047253、WO2005047251、WO2005118573、EP1538159、WO2004072076、WO2004072077、WO2006021655~57、WO2007009894、WO2007015162、WO2007041061、WO2007041052に記載されているもの ; オレキシン受容体アンタゴニスト (例えば、1-(2-メチルベンゾオキサゾール-6-イル) -3-[1, 5] ナフチリジン-4-イル尿素塩酸塩 (SB-334867-A) または、例えば、WO200196302、WO200185693、WO2004085403、WO2005075458もしくはWO2006067224に記載されているもの) ; ヒスタミンH3受容体アゴニスト (例えば、3-シクロヘキシル-1-(4, 4-ジメチル-1, 4, 6, 7-テトラヒドロイミダゾ [4, 5-c] ピリジン-5-イル) -プロパン-1-オンシュウ酸塩 (WO00/63208) またはWO200064884、WO2005082893、WO2006107661、WO2007003804、WO2007016496、WO2007020213に記載されているもの) ; ヒスタミンH1／ヒスタミンH3調節因子、例えばベタヒス

10

20

30

40

50

チン及びその二塩酸塩；CRFアンタゴニスト（例えば、[2-メチル-9-(2,4,6-トリメチルフェニル)-9H-1,3,9-トリアザフルオレン-4-イル]ジプロピラミン(WO00/66585)）；CRF BPアンタゴニスト（例えば、ウロコルチン）；ウロコルチンアゴニスト； β -3アドレナリン受容体のアゴニスト、例えば、1-(4-クロロ-3-メタンスルホニルメチルフェニル)-2-[2-(2,3-ジメチル-1H-インドール-6-イルオキシ)エチルアミノ]エタノール塩酸塩(WO01/83451)；またはSolabegron(GW-427353)もしくはN-5984(KRP-204)もしくはJP2006111553、WO2002038543、WO2007048840~843に記載されているもの；MSH(メラノサイト刺激ホルモン)アゴニスト；MCH(メラニン凝集ホルモン)受容体アンタゴニスト（例えば、NBI-845、A-761、A-665798、A-798、ATC-0175、T-226296、T-71、GW-803430またはWO2005085200、WO2005019240、WO2004011438、WO2004012648、WO2003015769、WO2004072025、WO2005070898、WO2005070925、WO2004039780、WO2004092181、WO2003033476、WO2002006245、WO2002089729、WO2002002744、WO2003004027、FR2868780、WO2006010446、WO2006038680、WO2006044293、WO2006044174、JP2006176443、WO2006018280、WO2006018279、WO2006118320、WO2006130075、WO2007018248、WO2007012661、WO2007029847、WO2007024004、WO2007039462、WO2007042660、WO2007042668、WO2007042669、US2007093508、US2007093509、WO2007048802、JP2007091649に記載されているような化合物）；CCK-Aアゴニスト（例えば、{2-[4-(4-クロロ-2,5-ジメトキシフェニル)-5-(2-シクロヘキシルエチル)チアゾール-2-イルカルバモイル]-5,7-ジメチルインドール-1-イル}酢酸トリフルオロ酢酸塩(WO99/15525)、SR-146131(WO0244150)もしくはSSR-125180またはWO2005116034に記載されているもの）；セルトニン作動性化合物とノルアドレナリン作動性化合物の混合物（例えば、WO00/71549）；5-HT受容体アゴニスト、例えば、1-(3-エチルベンゾフラン-7-イル)ピペラジンシュウ酸塩(WO01/09111)；混合ドーパミン/ノルエピネフリン/アセチルコリン再取り込み阻害剤（例えば、テソフェンシン）；5-HT_{2C}受容体アゴニスト（例えば、塩酸ロルカセリン(APD-356)、BVT-933またはWO200077010、WO20077001~02、WO2005019180、WO2003064423、WO200242304、WO2005035533、WO2005082859、WO2006077025、WO2006103511に記載されているもの）；5-HT₆受容体アンタゴニスト、例えば、E-6837もしくはBVT-74316または、例えば、WO2005058858、WO2007054257に記載されているもの；ボンベシン受容体アゴニスト(BRS-3アゴニスト)；ガラニン受容体アンタゴニスト；成長ホルモン（例えば、ヒト成長ホルモンまたはAOD-9604）；成長ホルモン放出化合物（第三級ブチル6-ベンジルオキシ-1-(2-ジイソプロピル-アミノエチルカルバモイル)-3,4-ジヒドロ-1H-イソキノリン-2-カルボキシレート(WO01/85695)）；成長ホルモン分泌促進物質受容体アンタゴニスト(グレリンアンタゴニスト)、例えば、A-778193またはWO2005030734に記載されているもの；TRHアゴニスト（例えば、EP0462884を参照のこと）；脱共役タンパク質2または3調節因子；レプチンアゴニスト（例えば、Lee, Daniel W.; Leinung, Matthew C.; Rozhayskaya-Arena, Marina; Grasso, Patricia. Leptin agonists as a potential approach to the treatment of obesity. Drugs

10

20

30

40

50

of the Future (2001), 26 (9), 873-881を参照のこと) ; DAアゴニスト (ブロモクリプチンまたはドブレキシ) ; リパーゼ / アミラーゼ阻害剤 (例えば、WO 00 / 40569) ; ジアシルグリセロール-O-アシルトランスフェラーゼ (DGAT) 阻害剤、例えば、BAY-74-4113、または例えば、US 2004 / 0224997、WO 2004094618、WO 200058491、WO 2005044250、WO 2005072740、JP 2005206492、WO 2005013907、WO 2006004200、WO 2006019020、WO 2006064189、WO 2006082952、WO 2006120125、WO 2006113919、WO 2006134317、WO 2007016538に記載されているもの ; 脂肪酸シンターゼ (FAS) 阻害剤、例えば、C75またはWO 2004005277に記載されているもの ; 例えば、WO 2007009236、WO 2007044085、WO 2007046867、WO 2007046868、WO 20070501124に記載されているステアロイル-CoA δ 9 脱飽和酵素 (SCD1) 阻害剤 ; オキシントモジュリン ; オレオイルエストロンもしくは甲状腺ホルモン受容体アゴニストまたは部分アゴニスト、例えば : KB-2115またはWO 20058279、WO 200172692、WO 200194293、WO 2003084915、WO 2004018421、WO 2005092316、WO 2007003419、WO 2007009913、WO 2007039125に記載されているものと併用して投与する。

【0239】

さらなる実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、 $\alpha 4-\beta 2$ ニコチン性アセチルコリン受容体の部分アゴニストである酒石酸バレニクリンと併用して投与する。

【0240】

さらなる実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、トロダスクエミンと併用して投与する。

【0241】

さらなる実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、SIRT1酵素の調節因子と併用して投与する。

【0242】

さらなる実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、デキサメタミンまたはアンフェタミンと併用して投与する。

【0243】

さらなる実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、フェンフルラミンまたはデクスフェンフルラミンと併用して投与する。

【0244】

さらなる実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、シブトラミンと併用して投与する。

【0245】

さらなる実施形態では、グリシン含有トリペプチド分子を、マジンドールまたはフェンテルミンと併用して投与する。

【0246】

あるいは、数分〜数週間の範囲の間隔で、グリシン含有トリペプチド分子のポリペプチド治療の前または後に、二次薬剤治療を行う。第2の治療薬及びグリシン含有トリペプチド分子を別々に投与する実施形態では、通常、各送達の時間の間に有意な期限切れが生じないようにすると考えられ、その結果、第2の薬剤とグリシン含有トリペプチド分子は、それでも組み合わせの効果を有利に発揮することができるであろう。そのような場合、互いに約12〜24時間以内に、そして一態様では、互いに約6〜12時間以内に両方のモダリティを投与し、わずかに約12時間の遅延時間が最も好ましいと考えられる。いくつかの状況では、治療のための期間を有意に延長させ、しかしながら、それぞれの投与の間に数日間 (2、3、4、5、6または7日間) 〜数週間 (1、2、3、4、5、6、7または8週間) を経過させることが望ましい。

【0247】

いくつかの実施形態では、代謝疾患、例えば脂肪肝疾患の治療方法は、グリシン含有トリペプチド分子と第2の治療薬、例えば、ACC阻害剤、ApoC-III阻害剤、ACL阻害剤、処方魚油、またはCETP阻害剤を投与することを含み得る。

【0248】

グリシン含有トリペプチド分子発現構築物またはペプチドの患者への全身性送達は、治療上有効な組成物を送達して疾患の即時の臨床症状を打ち消すための非常に効率的な方法である。あるいは、グリシン含有トリペプチド分子及び／または第2の治療薬の局所送達は特定の状況において適切である。

【0249】

本発明はさらに、本発明の組成物を哺乳類に投与する方法を提供する。一態様では、哺乳類はヒトである。治療的に使用する組成物の有効量は、例えば、治療の状況及び目的に依存するであろう。したがって、当業者であれば、治療のための適切な用量レベルが、送達する分子、組成物を使用している適応症、投与経路、及びサイズ（体重、体表面または臓器のサイズ）ならびに患者の状態（年齢及び全般的な健康状態）に部分的に依存して様々に異なることを理解するであろう。したがって、臨床医は、最適な治療効果を得るために、用量を滴定し、投与経路を変更してもよい。

【0250】

一態様では、グリシン含有トリペプチド分子、またはその薬学的に許容される塩を含む組成物を哺乳類に送達するためのレジメンは、日用量で、またはより長いまたはより短い間隔、例えば、隔日、週2回、週1回、月1回、半年に1回、または1日2回または3回での同等の用量で与えられる、5mg/Kg~2000mg/Kg、または30mg/Kg~1500mg/Kg、または40mg/Kg~1250mg/Kg、または50mg/Kg~1000mg/Kg、または60mg/Kg~5000mg/Kgの投与を含むであろう。投与は、経口、静脈内、皮下、鼻腔内、吸入、経皮、経粘膜、または本明細書で論じる他の任意の経路によるものであってもよい。

【0251】

さらなる態様では、グリシン含有トリペプチド分子を、本明細書中で指定する用量で皮下注射によって投与する。しかしながら、グリシン含有トリペプチド分子は、本明細書で論じられ、当技術分野で公知の方法のいずれかによって投与してもよい。さらなる態様では、単一部位での注射は、2.0mlの最大許容量を有する。より高濃度のグリシン含有トリペプチド分子が必要な場合、グリシン含有トリペプチド分子を複数の部位に注射するか、またはより多くの用量で注射してもよいと考えられる。別の態様では、グリシン含有トリペプチド分子を、毎日ほぼ同じ時間に投与する。しかしながら、送達のための代替の時間は、本発明に含まれる。

【0252】

医薬組成物はまた、非経口送達のために選択することができる。あるいは、組成物は、吸入のために、または経口などの消化管を介した送達のために選択してもよい。そのような薬学的に許容される組成物の調製は、当業者の技術の範囲内である。

【0253】

一実施形態では、医薬組成物を、吸入用に製剤化してもよい。例えば、グリシン含有トリペプチド分子組成物を、吸入用の乾燥粉末として製剤化してもよい。医薬組成物吸入溶液はまた、エアロゾル送達のための噴射剤と共に製剤化してもよい。さらに別の実施形態では、溶液を噴霧してもよい。肺投与については、PCT出願第PCT/US94/001875号にさらに記載されており、これは、化学的に修飾されたタンパク質の肺送達について記載している。

【0254】

特定の製剤を経口投与してもよいこともまた、企図される。本発明の一実施形態では、この方法で投与するグリシン含有トリペプチド分子組成物は、錠剤及びカプセルなどの固体剤形の配合に通常使用する担体の有無にかかわらず、製剤化することができる。例えば

10

20

30

40

50

、カプセルを、胃腸管内でアベイラビリティが最大化され、事前の全身性分解が最小化される時点において製剤の活性部分を放出するように設計してもよい。組成物の吸収を促進するために、追加の薬剤を含ませることができる。希釈剤、香料、低融点ワックス、植物油、潤滑剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤、及び結合剤も使用してもよい。

【0255】

別のグリシン含有トリペプチド分子組成物は、錠剤の製造に適した非毒性の賦形剤との混合物中に有効量のグリシン含有トリペプチド分子を含み得る。錠剤を無菌水または他の適切なビヒクルに溶解することにより、溶液を単位剤形で調製することができる。適切な賦形剤として、不活性希釈剤、例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウムもしくは重炭酸ナトリウム、ラクトース、またはリン酸カルシウム；または結合剤、例えば、デンプン、ゼラチン、もしくはアカシア；または潤滑剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、もしくはタルクが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0256】

持続または制御送達製剤中の組成物を含む製剤を含む、追加的なグリシン含有トリペプチド分子組成物は、当業者には明らかであろう。リポソームまたはミセル担体、生体侵食性微粒子または多孔質ビーズ及びデポー注射などの他の様々な持続または制御送達手段を製剤化するための技術もまた、当業者に公知である。

【0257】

投与の頻度は、使用する製剤中のグリシン含有トリペプチド分子組成物の薬物動態パラメータに依存するであろう。通常、臨床医は、所望の効果を達成する用量に達するまで、組成物を投与する。したがって、組成物は、単回投与として、または期間にわたって2回以上の投与（同量の所望の分子を含む場合も含まない場合もある）として、または移植デバイスまたはカテーテルを介した連続注入として投与してもよい。適切な用量のさらなる改良は、当業者によって日常的に行われ、当業者によって日常的に実行されるタスクの範囲内にある。適切な用量反応データを使用することにより、適切な用量を確認してもよい。

20

【0258】

本明細書に開示する投与経路に加えて、静脈内、腹腔内、脳内（実質内）、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、門脈内、病変内経路、関節内、腫瘍内、脳脊髄、直腸内及び結腸、局所、結膜下、膀胱内、腔内、硬膜外、肋内、皮膚内、吸入、経皮、経漿液、頬内、経口、鼻腔内、口腔または他の体腔内溶解、気道への点滴注入、気道からのガス注入、血管、腫瘍、器官などへの注射、及び哺乳類の体内の空洞への注射または沈着などであるがこれらに限定されない任意の様式で、哺乳類に本発明の組成物を治療のために導入することができる。

30

【0259】

あるいは、またはさらに、所望の分子を吸収させるか、またはカプセル化した膜、スポンジ、または別の適切な物質の移植を介して、組成物を局所的に投与してもよい。移植デバイスを使用する場合、デバイスを任意の適切な組織または器官に移植してもよく、そして所望の分子の送達を、拡散、徐放ボラス、または連続投与を介して行ってもよい。

【0260】

いくつかの場合では、*ex vivo*方式で組成物を使用することが望ましい場合がある。そのような場合、患者から取り出した細胞、組織、または器官を、組成物に曝露し、その後、細胞、組織及び／または器官を患者に移植して戻す。

40

【0261】

本発明の組成物の投与は、例えば、連続注入、ボラス注射、間欠注入、吸入、またはこれらの方法の組み合わせを含むいくつかの標準的な方法のいずれかを使用して実施することができる。例えば、使用することができる投与の様式には、継続的な静脈内注入が含まれる。そのようなアプローチでは、本発明の組成物の注入用量は、例えば、 $0.001 \sim 0.5 \text{ mg/kg}$ 体重/時間、より好ましくは $0.01 \sim 0.2 \text{ mg/kg}$ /時間、最も好ましくは $0.03 \sim 0.1 \text{ mg/kg}$ /時間、例えば、 $1 \sim 100$ 、 $10 \sim 100$ 、または約 12 、 24 、 48 、 72 、 84 もしくは 96 時間の間に薬剤を注入する。本発

50

明の組成物の注入は、必要に応じて、ボーラス注射を先行させることができる。そのようなボーラス注射は、約0.001～約10mg/kgの範囲の用量で投与する。本発明の組成物の用量及び注入期間には変動が生じ得るが、これも本発明に含まれる。

【0262】

単回ボーラス注射は、例えば、中枢アクセスラインまたは末梢静脈ラインを介した静脈内注入によって、またはシリンジを使用した直接注射によって投与してもよい。そのような投与は、患者のエンドトキシン曝露リスクが短期的なものに過ぎず、したがって薬物の長期持続を必要としない場合に望ましい場合がある。例えば、この投与様式は、適切な場合、外科患者、例えば、心臓手術、例えば、冠動脈バイパス移植手術及び／または弁置換手術を受けている患者において望ましい場合がある。これらの患者では、薬物の単回ボーラス注射は、手術前の4時間及び／または手術中にわたって投与することができる。（投与する薬物の量は、患者の体重及び状態に基づいており、熟練した医師によって決定されることに注意されたい。）当業者によって適切であると判断される、より短いまたはより長い投与期間を用いることができる。

10

【0263】

本発明のグリシントリペプチド分子またはその薬学的に許容される塩を、より長期間送達することが望ましい場合、間欠投与を実施することができる。これらの方法では、負荷用量を投与し、その後、(i)第2の負荷用量及び維持用量（もしくは複数回の用量）、または(ii)第2の負荷用量を伴わない、当業者によって適切であると判断される維持用量もしくは複数回の用量のいずれかを投与する。

20

【0264】

患者へのグリシントリペプチド分子またはその薬学的に許容される塩のさらなる送達を達成するために、化合物の維持用量（または複数の用量）を投与して、それにより患者の血中で化合物のレベルを維持することができる。維持用量は、負荷用量（複数可）よりも少ないレベルで、例えば、負荷用量の約1/6のレベルで投与することができる。維持用量で投与する特定の量は、化合物レベルが少なくとも維持されることを目的として、医療専門家によって決定され得る。維持用量は、例えば、12時間ごとに約2時間、24時間目から始めて、例えば、36、48、60、72、84、96、108、及び120時間目において継続して投与することができる。当然のことながら、維持用量は、この時間枠内の、医療専門家によって適切であると判断される任意の時点で停止することができる。

30

【0265】

上記の注入方法は、当技術分野で広く利用可能なカテーテル（例えば、末梢静脈、中枢静脈、または肺動脈カテーテル）及び関連製品（例えば、注入ポンプ及び注入チューブ）を使用して実施することができる。これらの方法で使用するカテーテル及び／またはチューブを選択する際に考慮すべき重要な1つの基準は、これらの製品の材料（またはこれらの製品のコーティング）が薬物のサイズに与える影響である。

【0266】

本発明の方法で 사용할 ことができる追加的なカテーテル関連製品は、薬物投与で使用するものと合致する条件下で、製品の材料が化合物のサイズを変えるかどうかを判定することによって特定することができる。さらに、最適な薬物サイズを維持しないカテーテルを患者が所定の位置にすでに有している場合、不適合なカテーテルの表面に薬液が接触しないように、適合性のある材料（例えば、ポリアミドポリマー）製であるか、適合性のあるコーティングを有するカテーテルインサートを使用することができる。化合物の溶液の流れに適応するのに十分な大きさの内径を維持しながら、既存のカテーテルに容易に挿入できるように十分に小さい外径を有するそのようなインサートを、既存のカテーテル内に配置し、チューブまたはシリンジに接続し、それを通して薬物を送達する。

40

【0267】

適切な投与頻度は、当業者によって決定することができ、1日あたり1回～数回投与することができる。本発明の組成物はまた、1日1回または1日おきに1回投与してもよい。急性投与の場合、通常、数時間または数日の期間で治療を実施し、一方、慢性治療は、

50

数週間、数か月間、または数年間も実施することができる。

【0268】

慢性投与及び急性投与のいずれにおいても、本明細書の他の場所に記載する製剤から作製することができる標準的な肝門脈投与製剤を使用することができる。この経路による投与は、いくつかの利点、例えば、グリシントリペプチド分子またはその薬学的に許容される塩をより高い局所濃度で所望の作用部位に投与することにより、作用の迅速な開始を提供する。治療部分がその所望の効果を発揮するためには、治療部分が、肝細胞に存在する受容体などのその生理学的標的と物理的に接触している必要がある。部位特異的な薬物送達には、そのような相互作用が肝臓の所望の解剖学的位置でのみ起こることを保証し；したがって、以下の基準を満たす必要がある：(i) 胃及び腸などの解剖学的障壁を越えることができる必要がある、(ii) アシアロ糖タンパク質などの肝細胞に存在する受容体によって選択的に認識されるべきであり、(iii) 標的化のために外来的に送達したリガンドが、内在的に産生されたリガンドと競合すべきであり、(iv) 作成された送達系は、*in vivo*または*in vitro*のいずれかにおいて、肝細胞内で非毒性、生体適合性、生分解性、及び物理化学的に安定している必要がある、(v) 均一な洞様毛細血管分布を有しているべきであり、(vi) 治療量のグリシントリペプチド分子、またはその薬学的に許容される塩のみが肝細胞に放出されるように、制御可能かつ予測可能な薬物放出速度を有しているべきであり、(vii) 薬物放出が薬物分布に影響を与えるべきでなく、(viii) 胃、腸、及び体の他の部分を通過する際に最小限の薬物漏出を示すべきであり、(ix) グリシントリペプチド分子をカプセル化するために使用する担体が、毒性の徴候を与えることなく体から排除されなければならない、担体が病状の調節を誘発するべきでなく、(x) 最後に、グリシントリペプチド分子またはその薬学的に許容される塩の送達系の調製は、容易であり、適度にシンプルで、再現性があり、費用対効果が高くあるべきである。

【0269】

グリシントリペプチド分子、またはその薬学的に許容される塩は、肝臓組織送達を目的とした薬物送達系の一部として投与することができる。グリシン含有トリペプチド分子を肝臓特異的標的化部分に結合するための異なる方法には：(a) 予め形成されたナノキャリア上の標的化部分の結合、(b) ポストインサージョン法による標的化部分の結合、(c) アビジン／ビオチン複合体による標的化部分の結合、(d) ナノキャリア配合前の標的化部分の結合が含まれ得る。特定の肝細胞への本発明の組成物の送達において有用な、例示的な標的化部分及び担体は、Nidhi Mishra, et al., (2013) “Efficient Hepatic Delivery of Drugs: Novel Strategies and Their Significance”, BioMed Research International, BioMed Research International, Volume 2013に記載されており、その開示はその全体が参照により本明細書に援用される。

【0270】

本明細書に記載の特定のグリシントリペプチド分子及びその薬学的に許容される塩、組成物、及び方法を、特定の実施形態に従って具体的に記載してきたが、以下の実施例は、本明細書に記載の化合物を説明する役割のみを果たし、これを限定することを意図するものではない。本出願に記載の参考文献の各々は、その全体が参照により本明細書に援用される。

【実施例】

【0271】

方法

【0272】

動物実験手順

【0273】

動物実験の全手順は、ミシガン大学の動物実験委員会によって承認され (PRO000

08239)、同会のガイドラインに従って実施した。8週齢の雄のアポリポタンパク質E欠損(apoE-/-)マウス(B6.129P2-Apoetm1Unc/J、在庫番号:002052)をジャクソン研究所から入手した。マウスには西洋食(WD、脂肪由来カロリー42%、重量で0.2%コレステロール、Envigo TD.88137)を与えた。WD給餌の1週間後、顔面静脈から血液を注意深く採取して、総コレステロール(TC)のベースライン血漿レベルを測定した。次いで、マウスをWD給餌で維持し、無作為に5つの実験群に分け、以下の治療薬を、強制経口投与によって週6回、12週間投与した:1)WD+H₂O(ビヒクル対照として水を与えた);2)WD+Gly(0.67mg/gグリシン);3)WD+Leu(0.33mg/gロイシン);4)WD+DT-109(1mg/g DT-109=Gly-Gly-Leu);5)WD+DT-110(1mg/g DT-110=Gly-Gly-dLeu)。すべてのマウスを12時間の明/暗サイクルで維持し、食物と水を自由に摂取させた。体重と食物摂取量を、それぞれ、1週間ごとに、及び3週間ごとに測定した。

【0274】

OGTT及び非空腹時血糖

【0275】

10週目に、一晚絶食させた後に、2mg/gのグルコースを強制経口投与で投与することにより、経口グルコース負荷試験(OGTT)を実施した。治療の急性効果を評価するために、グリシン(0.67mg/g)、ロイシン(0.33mg/g)、DT-109またはDT-110(1mg/g)をグルコース溶液に添加し、強制経口投与により投与した。治療の慢性的効果を評価するために、マウスにグルコースのみを投与した。ベースラインの血糖値を、血糖値計とテストストリップ(NDC:0193-7308-50, Contour Next)を使用して、尾の先端から採血した後に測定した。次いで、マウスに、治療薬を含む(急性)か、または含まない(慢性)グルコースを投与し、血糖値を30分ごとに最大120分間測定した。非空腹時血糖値に対する治療の効果を評価するために、治療薬の強制経口投与による定期投与の前(強制経口投与前)に、及び30分後(強制経口投与後)に、尾の先端から血液を採取した。血糖値を、血糖値計とテストストリップ(NDC:0193-7308-50, Contour Next)を使用して測定した。

【0276】

血漿脂質、アディポカイン及びサイトカイン

【0277】

TC、トリグリセリド(TG)、低密度リポタンパク質コレステロール(LDL)、及び高密度リポタンパク質コレステロール(HDL)の血漿レベルを、ミシガン糖尿病研究センターの化学研究所(MDRC)のCobas Mira化学分析装置(Roche Diagnostics)により、製造元が提供するアッセイ試薬とプロトコルを使用して測定した。グリシントリペプチド分子、レジスチン、インターロイキン-6(IL-6)及び単球走化性タンパク質1(MCP1)の血漿レベルを、MDRCの化学研究所で、Luminex 200化学分析装置(Luminex Corporation)を使用して、製造元が提供するアッセイ試薬とプロトコル(Millipore Multiplex, MMHAG-44K)を使用して測定した。

【0278】

組織学的分析

【0279】

組織学的処理を、ミシガン大学獣医学実験施設(ULAM)内のIn Vivo Animal Core(IVAC)組織学研究所で実施した。ホルマリン固定組織を段階的アルコールで処理し、キシレンで除去した後、自動VIP5またはVIP6組織プロセッサ(TissueTek, Sakura-Americas)を使用して溶融パラフィン浸透させた。Histostar Embedding Station(Thermo Fisher Scientific)を使用してパラフィン包埋した後、組織をM35

5 S 回転式ミクロトーム (ThermoFisher Scientific) で $4\mu\text{m}$ の厚さに切片化し、スライドガラスにマウントした。脱パラフィンならびにキシレン及び段階的アルコールによる水和に続いて、ハリスヘマトキシリン (ThermoFisher Scientific、カタログ番号 842) を使用して、スライドをヘマトキシリン及びエオシン (H&E) について染色し、Clarifier (ThermoFisher Scientific、カタログ番号 7401) で分化させ、ブルーイング試薬 (ThermoFisher Scientific、カタログ番号 7301)、エオシン Y、アルコール性 (ThermoFisher Scientific、カタログ番号 832) で染色し、次いで脱水して段階的アルコール及びキシレンで除去し、Leica CV5030 自動カバースリッパーを使用し、マイクロマウント (Leica カタログ番号 3801731) を用いてカバーガラスで覆った。免疫組織化学染色を、IntelLiPATH FLX 自動免疫組織化学染色装置 (Biocare Medical、カタログ番号 IPS0001US) 上で実施したが、それには、内在性ペルオキシダーゼ及び非特異的結合のブロッキング、西洋ワサビペルオキシダーゼビオチンフリーポリマーに基づく市販検出系を用いた検出、ジアミノベンジジン色素原を用いた開示、ならびにヘマトキシリンによる核の対比染色が含まれていた。F4/80 (Bio-Rad ABD Serotec、カタログ番号 MCA497) に特異的なラットモノクローナル一次抗体 (クローン CI:A3-1) を、Da Vinci 希釈剤 (Biocare Medical、カタログ番号 PD900) 中で 1:400 に希釈し、60 分間インキュベートした後、それぞれ 10 分間及び 30 分間の、Rat-on-Mouse HRP ポリマー (Biocare Medical、カタログ番号 RT517) 2 段階プローブポリマーインキュベーションを使用して検出した。

【0280】

RNA 単離、逆転写及び定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR)

【0281】

QIAGEN の RNeasy キット (QIAGEN) を使用して、肝臓または脂肪組織試料から全 RNA を抽出した。SuperScript III とランダムプライマー (Invitrogen) を使用して RNA を cDNA に逆転写した。特定の転写レベルを、iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) と正規化 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 閾値サイクル法を使用したリアルタイム PCR システム (Bio-Rad) によって評価した。遺伝子発現レベルを、グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) に対して正規化した。qPCR に使用するプライマーペアは Integrated DNA Technologies から入手し、以下に列挙する：

10

20

30

40

50

【表 1】

遺伝子	フォワードプライマー：	配列番号	リバースプライマー：	配列番号
GLUT1	ACCTGCAGGAGATGAAAGAAGA G	3	CTCGAAGATGCTCGTTGAGTAG T	4
GLUT2	ATCCTACTTGGCCTATCTGCTG T	5	GGTGACATCCTCAGTTCCTCTT A	6
GLUT4	ACTAGCTGAGCTGAAGGATGAG A	7	ACTCGAAGATGCTGGTGAATA G	8
G6pc	CCTCCGGAAGTATTGTCTCATC	9	GTAGTGTCAAGGTGGACCCATT	10
PCK1	ATATGGTGGGAACCTCACTACTC G	11	AAGTTAGTCTTCCACAGGCAC T	12
FBP1	TGCCATCAATGAGTATCTCCAG	13	ACATAAGCTATGGGGTTGCACT	14
AMPK α 1	GTCAAAGCCGACCAATGATA	15	CGTACACGCCAAATAATAGGGT T	16
PPAR γ	GGAAGACCACTCGCATTCCTT	17	GTAATCAGCAACCATTGGGTCA	18
PPAR α	AACATCGAGTGTGAATATGTG G	19	CCGAATAGTTCGCCGAAAGAA	20
PGC1 α	ATCACGTTCAAGGTCACCCCTAC	21	TTCTGCTTCTGCCTCTCTCTCT	22
PGC1 β	GTACAGCTCATTCGCTACATGC	23	GGCCAGAAGTTCCTTAGGATA	24
CD36	TGCTGGAGCTGTTATTGGTG	25	TGGGTTTGCACATCAAGA	26
PNPLA2	TCCGTGGCTGTCTACTAAAGA	27	TGGGATATGATGACGTTCTCTC C	28
PNPLA3	CCATTAAAGAAACCGGTAGCAG	29	TGCTAGGGAGAGAAAGAAGGA A	30
CPT1a	AGATCAATCGGACCCTAGACAC	31	CAGCGAGTAGCGCATAGTCA	32
CPT2	CCTGCTCGCTCAGGATAAACA	33	GTGTCTTCAGAAACCGCACTG	34
CACT	CAACCACCAAGTTTGTCTGGA	35	CCCTCTCTCATAGAGTCTTCC G	36
ACAD	AGTGGTGCAGGCTTGGATTAC	37	ACTGAGGGCAAAACAGCCG	38
ACADm	AGGGTTTAGTTTGTGAGTTGACG G	39	CCCCGCTTTTGTCTATTTCCG	40
ACAD1	TGCCCTATATTGCCAATTACGG	41	CTATGGCACCGATACACTTGC	42
ACOX1	CGGCCACCTTCAATCCAGAG	43	CAAGTTCTCGA'TTCTCGACGG	44
UCP2	ATGGTTGGTTTCAAGGCCACA	45	TTGGCGGTATCCAGAGGGAA	46
LXR α	TGCCATCAGCATCTTCTCTG	47	GGCTCACCAGCTTCATTAGC	48
LXR β	CGCTACAACCACGAGACAGA	49	TGTTGATGGCGATAAGCAAG	50
SREBP2	TGGGAGAGTTCCTGTATTG	51	GATAATGGGACCTGGCTGAA	52
HMGCS	TTTGATGCAGCTGTTGAGG	53	CCACCTGTAGGTCTGGCATT	54
LDLR	TCCTGGAGATGTGATGGACA	55	GAGCCATCTAGGCAATCTCG	56
CYP7a1	CTAAAAGCCCAGCTACAGGAAA	57	GCTCTTTGAAAGGTGGTACAGG	58
ABCG5	CGTCCAGAACAACAGCTAA	59	GCAGCATCTGCCACTTATGA	60
ABCG8	AAGACGGGCTGTACACTGCT	61	AGGAGGACATGTGGAAGGTG	62
TNF α	CTGTGAAGGGAATGGGTGTT	63	GGTCACTGTCCCAGCATCTT	64
IL-6	TAGTCCTTCTACCCCAATTTC C	65	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC	66
MCP1	TTAAAAACCTGGATCGGAACCA A	67	GCATTAGCTTCAGATTTACGGG T	68
IL-10	CCTGGGTGAGAAGCTGAAGA	69	ACTCTTCACTGCTCCACTG	70
GAPDH	CTGCGACTTCAACAGCAACT	71	GAGTTGGGATAGGGCCTCTC	72

【0282】

肝脂質の抽出

【0283】

安楽死させたマウスから肝臓を迅速に取り出し、 -80°C に維持した。凍結肝臓試料（およそ100mg）をPBSでホモジナイズし、遠心分離（14,000RPM、20分）した。上清を回収し、Bio-Rad Bradfordアッセイによってタンパク質含有量を分析した。肝脂質の組成を評価するために、ヘキサン（ $\geq 99\%$ 、32293、Sigma-Aldrich）とイソプロパノール（ $\geq 99.5\%$ 、A426-4、Fisher Scientific）を3：2の比率（v：v）で使用して上清から脂質を抽出し、ヘキサン相を48時間蒸発させた。肝臓のTGまたはTCの量は、市販のキット（Wako Chemicals）を使用して分光光度法で測定した。データをタンパク質レベルに対して正規化し、 $\mu\text{g TG}$ または TC/mg タンパク質として表した。

【0284】

肝タンパク質抽出及びウエスタンブロッティング

【0285】

プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche Applied Science) を添加した放射性免疫沈降アッセイ溶解緩衝液 (RIPA 緩衝液、Thermo Scientific) を使用して組織抽出物を調製した。タンパク質を 10% ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分離し、ニトロセルロースメンブレン (Bio-Rad) に転写した。メンブレンを、5% 無脂肪乳を含有するトリス緩衝生理食塩水-Tween 20 (TBST) 中、室温で 1 時間ブロッキングし、一次抗体とともに 4℃ で一晩インキュベートした。以下の一次抗体を使用した：ウサギポリクローナル抗 ABCG8 (Santa Cruz Biotechnology、sc-30111、作業希釈 1:1000) 及びウサギポリクローナル抗 β アクチン (細胞シグナル伝達、4967S、作業希釈 1:3000)。TBST 洗浄後、メンブレンを二次抗体 (LI-COR Biotechnology、ロバ抗ウサギ IRDye 926-32213、926-68073、作業希釈 1:10000) とともに室温で 1 時間インキュベートした。TBST 洗浄後、Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences、バージョン 2.1) を使用して、バンドを視覚化し、定量化した。

10

【0286】

動脈硬化病変の分析

【0287】

採血後、マウスを心臓から 20 mL の生理食塩水で、続いて 20 mL の 37% ホルマリンで灌流した。マウスをホルマリンで固定し、大動脈樹全体を手術顕微鏡下で解剖した。次に、大動脈樹をオイルレッド O 溶液 (3.5:1 のメタノール:1N NaOH 中の 0.2% オイルレッド O (w/v)) で 50 分間染色し、続いて 70% エタノール中に 30 分間置いた。その後、大動脈樹を DDW 中に維持した。次いで、大動脈樹から付着している脂肪及び結合組織を取り除き、ベンネスはさみで縦方向に開いて動脈硬化病変を露出させた。大動脈樹全体の画像をデジタルカメラを使用して取得し、総管腔表面積に対するオイルレッド O で染色された硬化巣の面積の割合を、Image J 分析ソフトウェアで定量化した (<http://imagej.nih.gov/ij/>)。

20

【0288】

統計解析

【0289】

データ解析には、SPSS 24.0 ソフトウェア (SPSS Inc. IBM) を使用した。データは、箱ひげ図または平均 $\pm$ SEM として示す。各研究に使用する動物の数は、各図面の凡例に指定する。データ解析には、一元配置分散分析 (ANOVA) とそれに続く Tukey 事後検定を使用した。差異は $p < 0.05$ で統計的に有意であるとみなした。

30

【0290】

結果

【0291】

実験 1 体重と脂肪症への影響

【0292】

実験計画を図 1A に示す。apoE^{-/-}マウスに西洋食 (WD) を 1 週間給餌した後、顔面静脈 (FV) から血液を採取して、TC のベースライン血漿レベルを測定した。次いで、マウスを WD 給餌で維持し、無作為に 5 つの実験群に分けて強制経口投与により以下の治療薬を週 6 回、12 週間投与した：1) WD + H₂O；2) WD + Gly (0.67 mg/g グリシン)；3) WD + Leu (0.33 mg/g ロイシン)；4) WD + DT-109 (1 mg/g DT-109)；5) WD + DT-110 (1 mg/g DT-110)。研究全体を通して、食物摂取量に有意差は認められなかった (図 1B)。エンドポイント測定により、グリシンを投与したマウスの体重が有意に減少したことが明らか

40

50

になり（12%、 $p < 0.05$ 、図1C）、一方、ベースラインからエンドポイントまでの体重の総増加は、グリシンまたはDT-109で治療したマウスにおいて有意に低かった（それぞれ、51%、 $p < 0.01$ または28%、 $p < 0.05$ 、図1D）。エンドポイントでの腹腔の肉眼的外観からは、対照マウス及びロイシン投与マウスにおいて肝臓の黄色がかった着色と内臓脂肪パッドの拡大が明らかとなり、これらは、グリシン、DT-109またはDT-110での治療によって減弱した（図1E）。したがって、グリシン含有トリペプチド分子の血漿レベルは、グリシン、DT-109またはDT-110を投与したマウスで有意に低かった（53%、62%または56%、 $p < 0.05$ 、図1F）。まとめると、これらの結果は、WD誘発性脂肪症に対するグリシン、DT-109、及び程度は低いDT-110の保護効果を示している。

【0293】

実験2 グルコース恒常性への影響

【0294】

WD給餌の10週目に、一晚絶食した後、OGTTを実施した。血糖値に対する治療の急性効果を決定するために、グリシン（0.67mg/g）、ロイシン（0.33mg/g）、DT-109またはDT-110（1mg/g）をグルコース溶液（2mg/g）に添加し、強制経口投与により投与した。図2Aに示すように、ベースラインにおいて、群間で血糖値に有意差は認められなかった。治療薬の有無にかかわらずグルコースの投与から30分後、すべての治療薬によって血糖値が著しく減少し、グリシンまたはDT-109について、最も有意な効果があった。後の時点（60～120分）で、血糖値は、グリシン、DT-109及びDT-110で処置したマウスで有意に減少したが、ロイシンでは減少しなかった。治療薬の慢性的影響を評価するために、WD給餌の11週目にOGTTを繰り返したが、この時はグルコース溶液に治療薬を加えなかった。治療薬を加えないグルコース負荷後の群間に有意差は認められなかった（図2B）。非空腹時血糖値に対する治療薬の効果を評価するために、強制経口投与による治療薬の定期投与前（強制経口投与前）及び30分後（強制経口投与後）に血液を採取した。対照マウスと比較して、強制経口投与前の血糖値は全群で有意に低かった。しかしながら、水またはロイシンによる強制経口投与が血糖値の上昇傾向をもたらした一方で、グリシン、DT-109またはDT-110による強制経口投与は血糖値を有意に低下させた（それぞれ、10%、 $p < 0.05$ 、21%、 $p < 0.01$ または13%、 $p < 0.05$ 、図2C）。最後に、エンドポイントのグルコースレベル（6時間の絶食後）は、グリシンまたはDT-109で処置したマウスで有意に低かった（それぞれ、41%、 $p < 0.01$ または30%、 $p < 0.05$ 、図2D）。肝臓の遺伝子発現の解析により、グルコース取り込みを調節する遺伝子（GLUT1、GLUT2及びGLUT4）は、糖新生を調節する遺伝子（G6pc、PCK1及びFBP1）の発現に有意な変化を生じさせずに、グリシン処置によって上方制御されることが明らかになった。GLUT1発現はまた、DT-110で処置したマウス由来の肝臓において著しく誘導された（図2E）。まとめると、これらの結果は、グリシン、DT-109及びDT-110の顕著な食後血糖降下特性を示している。

【0295】

実験3 肝脂質代謝への影響

【0296】

肝臓試料のH&E染色により、対照マウス及びロイシン投与マウスにおいて顕著な小滴性及び大滴性脂肪肝が明らかとなった。重要なことに、グリシン、DT-109またはDT-110による処置は、WD誘発性脂肪肝を無効化した（図3A）。したがって、肝脂質の抽出とそれに続くTG及びTC含有量の定量化により、グリシン、DT-109またはDT-110による処置が、肝TG（それぞれ、74%、73%または68%、 $p < 0.01$ 、図3B）及び肝TC（それぞれ、76%、71%、 $p < 0.01$ 、または63%、 $p < 0.01$ 、図3C）を有意に低下させ、ロイシン投与については有意な影響がないことが明らかになった。

【0297】

実験4 次に、肝臓でのTG、脂肪酸及びコレステロールの蓄積を調節する遺伝子の発現を評価し、脂肪肝に対する観察された効果を説明した。興味深いことに、グリシン、DT-109またはDT-110での処置は、肝脂質酸化の主要制御因子であるAMPK α 1及びPPAR α の発現を有意に誘導したが、ロイシンでは誘導されなかった(図4A)。したがって、TG加水分解(PNPLA2)、ミトコンドリア β 酸化(CPT1a、CACT、ACADI)、及びミトコンドリア陰イオン担体UCP2を調節する主要な標的遺伝子は、グリシン、DT-109またはDT-110で処置したマウスの肝臓において有意に上方制御された(図4A、図4B)。肝臓のコレステロール恒常性を調節する遺伝子に関しては、グリシン、DT-109またはDT-110による処置により、コレステロールの胆汁への排泄の主要な調節因子であるABCG5及びABCG8の発現が有意に増加した。DT-110で処置したマウスの肝臓においてLDLRの有意な上方制御が認められ、グリシン及びDT-109処置についても同様の傾向が認められた(図4C)。グリシン、DT-109またはDT-110で処置したマウスの肝臓におけるABCG8の過剰発現が、ウエスタンブロットによって確認された(図4D及び図4E)。全体として、これらの結果は、脂質酸化及びコレステロールの胆汁への抽出を調節する遺伝子の過剰発現に関連して、WD誘発性脂肪肝に対するグリシン、DT-109及びDT-110の強力な保護効果を強く示している。

【0298】

実験5 血漿脂質特性及びアテローム性動脈硬化症への影響

【0299】

実験群に無作為化する前に、WD給餌の1週間後にマウスから血液を採取して、ベースラインの血漿TCレベルを測定した。治療薬または水対照を含むWD給餌の12週間後に、エンドポイントで血漿TCを再度測定した。図5Aに示すように、血漿TCの時間依存的な増加は、グリシンまたはDT-109での処置によって有意に減弱され、DT-110処置についても同様の傾向であったが、ロイシン処置についてはそうではなかった。したがって、TC及びLDLのエンドポイント血漿レベルは、グリシンまたはDT-109で処置したマウスにおいて有意に低下し(それぞれ、TC:19%、 $p < 0.05$ または25%、 $p < 0.01$; LDL:30%、それぞれ、 $p < 0.01$ または36%、 $p < 0.01$)、DT-110処置についても同様の傾向であった(図5B、図5C)。興味深いことに、血漿HDLレベルは、グリシンで処置したマウスにおいて有意に低かった(35%、 $p < 0.05$)が、DT-109処置では保持された(図5D)。血漿TGレベルの有意な変化は認められなかった(図5E)。最後に、オイルレッドO染色によるenface大動脈病変の解析により、グリシン、DT-109またはDT-110で処置したマウスの全動脈硬化巣の有意な減少が明らかになった(それぞれ、48%、 $p < 0.01$ 、62%、 $p < 0.001$ または49%、 $p < 0.01$ 、図5F、図5G)が、ロイシンで処置したマウスではそうではなかった。

【0300】

実験6 全身性、肝臓、脂肪組織の炎症への影響

【0301】

炎症はNAFLDとアテローム性動脈硬化症の両方の病因に重要な役割を果たしているため、次に炎症性サイトカインとアディポカインの血漿レベルを評価した。IL-6とレジスチンの血漿レベルについて群間で有意な変化は認められなかったが(図6A、図6B)、MCP1レベルは、グリシン、DT-109またはDT-110で処置したマウスにおいて有意に低下した(図6C)。精巣上体脂肪組織(EAT)及び皮下脂肪組織(SAT)における遺伝子発現の解析により、すべての処置でEATにおいてTNF α が有意に下方制御され、DT-110で最も有意な効果が得られたことが明らかになった(図6D)。より低いMCP1血漿レベルに従って、EAR及びSATの両方におけるMCP1発現は、グリシン、DT-109またはDT-110での処置によって有意に抑制されたが、ロイシンでは抑制されなかった(図6D、図6E)。最後に、グリシンは肝臓でのMCP1発現を抑制したが(DT-109でも同様の傾向、図7A)、免疫組織化学による判

10

20

30

40

50

定で、組織 F 4 / 8 0 に有意な変化は認められなかった（図 7 B、図 7 C）。全体として、これらの結果は、主に脂肪組織及び循環における M C P 1 の抑制に関連するグリシン、D T - 1 0 9 及び D T - 1 1 0 に対するいくつかの抗炎症効果を示唆している。

【 0 3 0 2 】

実施例 x N A F L D に対するグリシン系の治療薬

【 0 3 0 3 】

A. 序文

【 0 3 0 4 】

最も一般的な慢性肝疾患である N A F L D は、世界中の人口の 2 5 % に影響を及ぼす。N A F L D は、脂肪肝（H S）、線維症の進行に伴う肝細胞の損傷と小葉の炎症を特徴とする N A S H、及び肝不全または肝細胞癌を招き得る硬変症に至るまで、様々な肝病変を包含する。N A F L D 患者では、肥満、2 型糖尿病（T 2 D）、メタボリックシンドローム（M e t S）及び脂質異常症を含む心血管代謝の併存症が一般的である。肝臓特有の死亡率とは別に、心血管疾患は、特に N A S H に罹患している N A F L D 患者の主要な死因である。N A F L D の世界的な負担と医薬品開発における多大な努力にもかかわらず、これまでのところ承認された治療法は存在しない。

【 0 3 0 5 】

特にメタボロミクスと腸内細菌叢における最近の進歩により、N A F L D の病因についての理解が深まり、新規治療標的が示唆されている。脂質と炭水化物の異常な代謝が N A F L D に関係していることが知られている一方で、最近のメタボロミクスに基づく研究からは、特定のアミノ酸（A A）の代謝の調節不全が N A F L D の病因に役割を果たしていることが示されている。特に、ほとんどの循環 A A が N A F L D 患者において増加する一方で、グリシンレベルは低下する。循環グリシンレベルは、H S、肝細胞バルーニング、及び小葉炎症のレベルと負の相関がある。血漿グリシンは、既知のバイオマーカー（例えば、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（A S T）及び P N P L A 3 遺伝子型）とともに、N A S H の予測モデルに最近含められた。血漿グリシンが低いと、肥満、2 型糖尿病、M e t S、冠動脈性心疾患及び心筋梗塞の有病率が高くなり、血漿グリシンが高いと、脂質特性が良好になる（表 S 1 に要約）。

【 0 3 0 6 】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 S 1。循環グリシンの低下と NAFLD 及び心血管代謝疾患とを関連付ける以前の臨床的エビデンス

心血管代謝疾患	N人のヒト対象	循環グリシンの結果 (本文中の参照)
NAFLD	トレーニングデータセット： 健常者1535人 対 NAFLD465人 検証データセット： 健常者1661人 対 NAFLD499人	NAFLD患者では、AAの大部分が増加する一方で、グリシンは低下した。
NAFLD	86 (様々な程度の脂肪肝)	グリシンは脂肪肝のレベルと負の相関があった。
NAFLD	健常者20人 対 NAFLD44人	グリシンはNAFLD患者で低下し、肝細胞バロoning及び小葉炎症と負の相関があった。
肥満	痩せ型67人 対 肥満74人	肥満患者では、様々なAAが増加した一方でグリシンは低下した。
T2D	8,000人の対象を含むメタ分析(T2D 1940人)	グリシンは、前糖尿病及びT2Dに逆相関している。
MetS (肥満及び脂質異常症)	472(集団研究)	グリシンは、腹囲、血漿TG、及びMetSと負の相関があり、HDL-Cとは正の相関があった。
AMI (肥満、T2D及び脂質異常症)	4109(疑似安定狭心症)	グリシンは、AMIのリスクと逆相関し、肥満の有病率の低下、T2D、及び好ましい脂質特性(高HDL-C及び高apoA1、低TG)と正の相関があった。
CHD	11,147(CHD 2053人)	グリシンは、CHD及びMIの低リスクと相関していた。

【0307】

非必須AAとして、グリシンは主に肝臓でいくつかの前駆体から合成される。これらの反応は、セリンから(セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ、SHMT)、スレオニンから(スレオニンデヒドロゲナーゼ、TDH)、コリンからサルコシンを介して(コリンデヒドロゲナーゼ、CHDH;サルコシンデヒドロゲナーゼ、SARDH)のグリシン形成、及びアラニンからグリオキシレート(AGXT)へのグリシン形成を促進する重要な酵素によって触媒される。グリシンは、核酸、ヘム、グルタチオンなどの必須分子を生成するために複数の経路で利用される。NAFLDまたはT2Dでは、グリシンの利用可能性が限られているため、グルタチオン合成が減少し、これは栄養素補充後に回復する。この抗酸化作用を超えて、グリシンは脂質代謝とグルコース代謝において二重の利点を有する。グリシンの摂取は、膵臓のβ細胞からのインスリン分泌の刺激によって部分的に、血糖値を低下させる。遺伝的肥満/糖尿病KK-A^yマウスにおいて、食餌性グリシン

は耐糖能を改善し、循環TGとアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）を低下させ、その一方でHSと炎症性浸潤を減弱させた。スクロースを給餌したラットでは、グリシンは、腹腔内脂肪、血漿TGを低下させ、肝ミトコンドリアのFAOマーカーを増加させた。それにもかかわらず、ヒトの疾患と正確な投与を完全に模倣するモデルを適用した、NAFLDにおけるグリシンの役割の包括的な調査は追求されていない。

【0308】

NAFLDの負担、利用可能な治療法の欠如、及び循環グリシンの低下をNAFLDの重症度に関連付ける一貫した報告を考慮すると、NAFLDにおけるグリシン代謝をよりよく理解するための強力な理論的根拠が存在し、それは新規治療法につながり得る。本明細書において、ヒト及びマウスのNAFLDにおいて、グリシン生合成遺伝子、主にAGXT1の抑制を特定した。グリシンの利用可能性を制限するための遺伝的アプローチ（AGXT1^{-/-}）及び食事療法的アプローチを適用することにより、高脂血症及び脂肪性肝炎の悪化が認められた。脂質／グルコース二重低下特性を有するグリシン系化合物を探索し、肝FAOを調節することによって食事性NAASHからマウスを強力に保護するDTR109を同定した。

【0309】

B. 略号：

【0310】

AA、アミノ酸；ACAA、アセチル-CoAアシルトランスフェラーゼ；ACAD、アシル-CoAデヒドロゲナーゼ；ACOT、アシル-CoAチオエステラーゼ；ACOX、アシル-CoAオキシダーゼ；ACSL、アシルCoAシンテターゼ長鎖；ACSM、アシルCoAシンテターゼ中鎖；AGXT、アラニン-グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ；ALP、アルカリホスファターゼ；ALT、アラニンアミノトランスフェラーゼ；ApoE、アポリポタンパク質E；AST、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ；CACT、カルニチン／アシルカルニチントランスロカーゼ；Cas9、CRISPR関連タンパク質9；CCL、C-Cモチーフケモカインリガンド；CCR、C-Cモチーフケモカイン受容体；CD、固形飼料；CHD、冠動脈心疾患；CLAMS、包括的実験動物モニタリングシステム；CPT、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ；CRISPR、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート；DAG、ジアシルグリセロール；DAO、D-アミノ酸オキシダーゼ；DEG、差次的発現遺伝子；ECI、エノイル-CoAδイソメラーゼ；FA、脂肪酸；FAO、脂肪酸β酸化；HADH、ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ；HS、脂肪肝；LDA、線形判別分析；LEfSe、線形判別分析の効果量；MCP-1、単球走化性タンパク質1；MetS、メタボリックシンドローム；NAFLD、非アルコール性脂肪性肝疾患；NAASH、非アルコール性脂肪性肝炎；NF-κB、活性化B細胞の核因子κ軽鎖エンハンサー；NMR、核磁気共鳴；OGTT、経口グルコース負荷試験；ORO、オイルレッドO；PGC1α、PPARGコアクチベーター1α（PPARGC1A）；PNPLA、パタチン様ホスホリパーゼドメイン含有タンパク質；PPAR、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体；RER、呼吸交換率；SARDH、サルコシンデヒドロゲナーゼ；SERPINE、セリンペプチダーゼ阻害剤クレードE；SHMT、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ；T2D、2型糖尿病；TC、総コレステロール；TDH、スレオニンデヒドロゲナーゼ；TG、トリグリセリド；TGFBF、形質転換増殖因子β受容体；TGFβ、トランスフォーミング増殖因子β；TIMP、メタロプロテアーゼの組織阻害剤；TLR、toll様受容体；TNF、腫瘍壊死因子；TNFRSF、TNF受容体スーパーファミリー；WD、西洋食。

【0311】

C. 転写産物特性：

【0312】

RNA配列決定データは、NCBIのSRAまたはGEO（登録番号：PRJNA556537またはGSE126204）に登録されている。メタゲノミクス配列決定データ

10

20

30

40

50

は、NCBIのSRA（登録番号：PRJNA544728）に登録されている。

【0313】

D. 背景及び目的

【0314】

脂肪性肝炎（NAFH）を含む非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）の有病率は、世界中で増加しているが、承認された薬物療法は存在しない。循環グリシンの低下がNAFLD患者において一貫して報告されているが、原因となるグリシンの役割とその治療可能性は不明なままである。NAFLDにおけるグリシン代謝を研究するために遺伝的及び食事療法的戦略を適用し、グリシン系の治療法を評価した。

【0315】

E. 方法：

【0316】

NAFLDを用いてヒトとマウスの肝臓でトランスクリプトミクスを行い、グリシン合成遺伝子、主にアラニン-グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ1（AGXT1）の抑制を明らかにした。CRISPR/Cas9を使用してAGXT1^{-/-}マウスを生成し、グリシン改質型食餌を開発した。グルコース/脂質低下特性を有するグリシン系化合物を探索し、高脂血症/NAFLDのマウスモデルにおいて治療的使用を試験した。血漿脂質、肝酵素及びサイトカインを分析した。組織学、脂質定量化、RNA配列決定、qPCR及びイムノブロットングを使用して肝臓を研究した。NMRベースの体組成とエネルギー代謝を、間接熱量測定法を使用して評価した。腸内細菌叢を、16Sメタゲノム配列決定を使用して研究した。

【0317】

F. 結果：

【0318】

グリシンの利用可能性を制限するための遺伝的アプローチ（AGXT1^{-/-}）及び食事療法的アプローチは、食事性高脂血症及び脂肪性肝炎を悪化させ、基礎経路として、ミトコンドリア/ペルオキシソーム脂肪酸β酸化（FAO）を抑制し、炎症を増強した。強力なグルコース/脂質低減効果を有するグリシン系のトリペプチドを同定した（gly-gly-leu-DT-109）。NAFHが確立されたマウスでは、DT-109は、FAO経路を刺激することにより、体組成を改善し、循環脂質、肝酵素、及び脂肪性肝炎を減少させた。DT-109は、NF-κB及びTGFβ/SMAD経路を抑制することにより、小葉/全身性の炎症及び線維症を軽減した。細菌属*Clostridium sensu stricto*は、NAFLDの重症度と正の相関があり、DT-109によって減少したが、*Allestipes*は逆相関を示し、DT-109によって増加した。

【0319】

G. 方法

【0320】

(i) 動物実験手順

【0321】

動物実験の手順は、ミシガン大学（U-M）の動物実験委員会によって承認され（PRO000008239）、同会のガイドラインに従って実施した。7週齢のC57BL/6JマウスまたはapoE^{-/-}マウス（B6.129P2-Apoetm1Unc/J、ストック：002052）は、ジャクソン研究所から入手した。C57BL/6Jバックグラウンドを有するAGXT1^{-/-}マウスを、CRISPR/Cas9を使用し、AGXT1のエキソン1を標的とするガイドRNA：5'-GGGTCCGGGGCCCTCCAACC-3'を使用して生成した。8週齢の雄のC57BL/6J、apoE^{-/-}またはAGXT1^{-/-}マウスを、全体を通して使用し、自由に食餌を与えた：標準的な固形飼料（CD、LabDiet 5L0D、脂肪由来のカロリー13%）；高脂肪、高コレステロールの西洋食（WD、Envigo TD. 88137、42%脂肪分）；グリシンを含むかまたは含まないAA規定のWD（Envigo-Teklad Custom

10

20

30

40

50

D i e t sで開発、表 S 2) : W D A A + G l y (T D . 1 7 0 5 2 5) または W D A A - G l y (T D . 1 7 0 5 2 6) ; 高脂肪、高コレステロール、高フルクトースの N A S H 食餌 (R e s e a r c h D i e t s D 1 7 0 1 0 1 0 3 、 4 0 % 脂肪分) 、マウスで N A S H が強力に誘導されることを確認した。必要に応じて、マウスにグリシン (S i g m a - A l d r i c h G 5 4 1 7) 、ロイシン (S i g m a - A l d r i c h L 8 9 1 2) 、もしくは D T - 1 0 9 (C S B i o) を 0 . 1 2 5 ~ 1 m g / g 体重 / 日で、または対照として H₂O を強制経口投与した。

【 0 3 2 2 】

【表 3】

表 S 2. グリシンを含むかまたは含まないアミノ酸で規定された WD の組成 (W D_{AA} + / - G l y)

選択した栄養情報	CD	WD _{AA} +Gly	WD _{AA} -Gly
タンパク質(kcalの%)	28.2	22.4	22.5
糖質(kcalの%)	59.1	35.4	35.2
脂肪(kcalの%)	12.6	42.2	42.3
カロリー密度(kcal/g)	3.3	4.5	4.5
スクロース(g/kg)	150.0	345.5	345.5
マルトデキストリン(g/kg)	100.0	20.0	20.2
無水乳脂肪(g/kg)	37.2	210.0	210.0
コレステロール(g/kg)	0	1.5	1.5
L-アラニン(g/kg)	14.4	14.4	14.4
L-アルギニン(g/kg)	15.7	15.7	15.7
L-アスパラギン(g/kg)	5.3	5.3	8.1
L-アスパラギン酸(g/kg)	28.1	28.1	33.8
L-システイン(g/kg)	3.9	3.9	3.9
L-グルタミン酸(g/kg)	47.4	47.4	47.7
L-グルタミン(g/kg)	28.7	28.7	31.8
グリシン(g/kg)	12.8	12.8	0
L-ヒスチジン(g/kg)	8.4	8.4	8.4
L-イソロイシン(g/kg)	10.6	10.6	10.6
L-ロイシン(g/kg)	18.9	18.9	18.9
L-リジン(g/kg)	18.5	18.5	18.5
L-メチオニン(g/kg)	5.9	5.9	5.9
L-フェニルアラニン(g/kg)	11.1	11.1	11.1
L-プロリン(g/kg)	14.7	14.7	19.6
L-セリン(g/kg)	11.8	11.8	11.8
L-スレオニン(g/kg)	9.7	9.7	9.7
L-トリプトファン(g/kg)	2.8	2.8	2.8
L-チロシン(g/kg)	7.7	7.7	7.7
L-バリン(g/kg)	11.6	11.6	11.6
タウリン(g/kg)	0.3	0.3	0.3
セルロース(g/kg)	50.0	50.0	50.0
Mineral mix(79055)(g/kg)	13.4	13.4	13.4
リン酸カルシウム(g/kg)	21.8	21.8	21.8
炭酸カルシウム(g/kg)	8.3	8.3	8.3
Vitamin Mix(40060)	10.0	10.0	10.0

【 0 3 2 3 】

(i i) ヒトのデータ

【0324】

グリシン生合成を駆動する差次的発現遺伝子 (DEG) を、2つの公開された肝臓マイクロアレイデータセットを使用して解析した: 1) 104人のNASH患者と44人の健常者対照に由来するGSE83452、2) 24人のNASH患者と24人の健常者肥満対照に由来するGSE61260。共変量として年齢、性別、及びBMIを使用した線形回帰モデルを使用し、NASHに関連する重要なグリシン生合成遺伝子を特定した。統計的検出力を高めるために、等効果モデルを使用して2つの研究のメタ解析をさらに実施した。以前に公開したマイクロアレイデータ (GSE26106、 $n=206$ 肝移植ドナー) を使用して、遺伝子発現レベルと肝脂肪含有量との相関関係を試験した。

【0325】

(iii) 組織学及び免疫組織化学

【0326】

すべての組織学的手順を、組織学研究所のU-M In Vivo Animal Coreによって実施した。技術者を、実験群に対して盲検化した。H&E染色またはシリウスレッド染色を使用して、NAFLD活動性 (NAS) または線維症をスコアリングした。

【0327】

(iv) グリシン系化合物の同定

【0328】

グリシンに構造的に類似した化合物を選択して、グリシン骨格の構造的、立体配座的、電子的及び立体的等価の修飾を評価した。SciFinder (C) により検索を実施し、商用利用可能かどうかを判断した。経口LD₅₀ > 1 mg/gを有する水溶性化合物を、マウスへの経口投与に適していると定義した。

【0329】

(v) RNA配列決定

【0330】

ライブラリの調製と配列決定は、NovaSeq 6000シーケンシングシステム (Illumina) 上でU-M DNA Sequencing Coreによって実施した。記載のように、RNA配列決定及び経路分析を行った。

【0331】

(vi) 包括的実験動物モニタリングシステム (CLAMS)

【0332】

核磁気共鳴 (NMR) ベースの分析装置 (Minispec LF90II; Bruker Optics) を使用して、U-M Animal Phenotyping Coreで体組成を評価した。酸素消費量 (VO₂)、二酸化炭素産生量 (VCO₂)、及び運動能を、CLAMS (Columbus Instruments) を使用して測定した。呼吸交換率 (RER) は、VCO₂/VO₂である。

【0333】

(vii) 糞便マイクロバイーム分析

【0334】

糞便DNA抽出、16S rRNAのV4領域に特異的なプライマーを使用した増幅、線形判別分析 (LDA) 効果量 (LEfSe) 法を使用した腸内細菌叢の特性評価、及び疾患パラメータとの相関解析を、前述のように実施した。

【0335】

(viii) 統計解析

【0336】

GraphPad Prism 7.0を用いて、統計解析を行った。特に明記しない限り、値は全点を示す平均±SDとして表す。全データを、正規性及び等分散について試験した。合格した場合、2つの群を比較するためにスチューデントt検定を、または2つより多くの群間で比較するために一元配置ANOVAと、それに続いてボンフェローニ事後検定を使用した。さもないと、ノンパラメトリック検定 (Mann-Whitney

10

20

30

40

50

UまたはKruskal-Wallis)を使用した。P値<0.05を、統計上有意であるとみなした。

【0337】

(ix) CRISPR/Cas9を使用したAGXT1-/-マウスの生成

【0338】

CRISPR/Cas9を使用して、C57BL/6JバックグラウンドのAGXT1-/-マウスを生成した。AGXT1遺伝子のエキソン1のガイドRNA標的部位は5'-GGGTCCGGGGCCCTCCAACC-3'であった。以下のプライマーを使用してジェノタイピングを実施した：フォワード：5'-ACACCTCCACTGTCTCTGTC-3'、リバース：5'-GGTCAGATCTGCCTGCTACC-3'。以下のプライマーを使用するサンダーシーケンシング：5'-GCAGAGCTAGCTGGGAATG-3'により、プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM、図8A)から3塩基離れた位置でのA欠失を確認した。ORFのAA53の後のフレームシフト変異により、中途での終止コドンが導入され、ウエスタンブロットによってAGXT1が存在しないことが確認された(図8B)。CRISPRを使用して評価したところ、CRISPRオフターゲット効果は検出されなかった。

【0339】

(x) ヒトのデータ

【0340】

NASH患者において差次的に発現するグリシン生合成遺伝子を、2つの公開データセットを使用して解析した。第1の研究は、104人のNASH患者と44人の正常対照(GSE83452)から得られた肝臓マイクロアレイデータからなる。線形回帰を使用して、遺伝子発現レベルとNASHとの相関性を試験した。年齢と性別を共変量として調整した。第2のデータセットには、24人のNASH患者と24人の健常者肥満対照(GSE61260)から収集した肝臓マイクロアレイデータが含まれている。同様に、年齢、性別、BMIを共変量として線形回帰モデルを使用して、NASHに関連する有意なグリシン生合成遺伝子を同定した。統計的検出力を高め、結果を比較するために、metafor Rパッケージを使用して、等効果モデルを使用して2つの研究のメタ解析をさらに実施した。Benjamini-Hochberg調整したp値<0.05及びCochranのQ不均一性検定のp値>0.05を有する遺伝子を有意であるとみなした。

【0341】

肝移植ドナー(n=206)から収集した、以前に公開したマイクロアレイデータ(GSE26106)を使用して、遺伝子発現レベルと肝脂肪含有量の相関関係を試験した。組織解剖、サンプル除外、及びマイクロアレイデータの生成を、前述のように実施した。ドナー肝臓の肝脂肪含有量を、以前に記載したように、有機溶媒(ヘキサン/イソプロパノール 3:2)を使用して定量化した。抽出した総脂肪含有量を、総タンパク質濃度に対して正規化し、その後の解析のためにlog10スケールに変換した。ピアソン相関を使用して、グリシン生合成遺伝子の発現と相関する肝脂肪の有意性を決定した。

【0342】

(xi) NAFLD活動性及び線維症の組織学、免疫組織化学及びスコアリング

【0343】

組織学的手順は、ミシガン大学のIn Vivo Animal Core (IVAC) 組織学研究所で、実験群に対して盲検化した技術者によって実施した。ホルマリン固定組織を段階的アルコールで処理し、キシレンで除去した後、自動VIP5またはVIP6組織プロセッサ(TissueTek, Sakura-Americas)を使用して溶解パラフィンに浸透させた。Histostar Embedding Station (ThermoFisher Scientific)を使用して、組織をM355S回転式ミクロトーム(ThermoFisher Scientific)で4µmの厚さに切片化し、スライドガラスにマウントした。スライドを、ヘマトキシリン及びエオシン(H&E, ThermoFisher Scientific)について染色した。シリウ

10

20

30

40

50

スレッド染色では、スライドを0.2リンモリブデン酸で3分間処理し、ピクリン酸で飽和させた0.1%シリウスレッド (Rowley Biochemical Inc.) に90分間移した後、0.01N塩酸に3分間移した。

【0344】

H&E染色を使用してNAFLD活動性をスコアリングした。脂肪肝を、0~3でスコアリングした (0:<5%脂肪肝; 1:5~33%; 2:34~66%; 3:>67%)。肝細胞バラーニングは、0~2でスコアリングした (0:正常肝細胞、1:正常サイズだが細胞質が薄い、2:薄く肥大化した肝細胞、少なくとも2倍)。小葉の炎症は、20×でカウントした炎症の病巣に基づいて0~2でスコアリングした (0:なし、1:病巣が2つ未満; 2:病巣が2つ以上)。NAFLD活動性スコア (NAS) は、脂肪肝、肝細胞バラーニング、及び小葉炎症スコアの合計として計算した。シリウスレッド染色を使用して、肝線維症を0~4でスコアリングした (0:線維症なし; 1:類洞周囲または門脈線維症; 2:類洞周囲及び門脈線維症; 3:架橋形成線維症; 4:肝硬変)。

【0345】

オイルレッドO (ORO) 染色には、凍結切片処理を使用した。ホルマリン固定肝臓試料を20%スクロース中、4℃で一晩凍結保護し、ブロッティングした後、O.C.T.コンパウンド (Tissue-Tek、カタログ番号4583) 中で液体窒素による急速凍結を行い、凍結切片化の準備ができるまで-80℃で保存した。切片化の前に、凍結ブロックを約-20℃まで上昇させ、次いでCryotome SME (Thermo-Shandon、カタログ番号77200227) 上で、5µmで切片化した。染色時まで、スライドを-80℃で保存した。染色する前に、肝臓のスライドを30分間解凍して室温に戻した。スライドを10%中性緩衝ホルマリンで20分間後固定し、DDWでリンスし、60%イソプロパノールでリンスした後、ORO-イソプロパノール染色液 (Rowley Biochemical Inc., H-503-1B) 中に5分間静置した。次いで、スライドを60%イソプロパノールでリンスし、続いてDDWを3回交換した。次いで、スライドに対し、ハリスヘマトキシリンで核の対比染色を行い、Aqua-Mount (Lerner Laboratories、カタログ番号13800) 水性封入剤に封入した。

【0346】

免疫組織化学染色を、IntelliPATH FLX自動免疫組織化学染色装置 (Biocare Medical) 上で実施し、内在性ペルオキシダーゼ及び非特異的結合のブロッキング、その後に西洋ワサビペルオキシダーゼビオチンフリーポリマーに基づく市販検出系を用いた検出、ジアミノベンジジン色素原を用いた開示、ならびにヘマトキシリンによる核の対比染色を行った。F4/80 (Bio-Rad ABD Serotec、カタログ番号MCA497) に特異的なラットモノクローナル一次抗体 (クローンCI:A3-1) を、DaVinci希釈剤 (Biocare Medical、カタログ番号PD900) 中で1:400に希釈し、60分間インキュベートした後、それぞれ10分間及び30分間の、Rat-on-Mouse HRPポリマー (Biocare Medical、カタログ番号RT517) 2段階プローブポリマーインキュベーションを使用して検出した。

【0347】

(xii) 血漿分析

【0348】

ミシガン糖尿病研究センター (MDRC) の化学研究所または当社の研究所で、Cobas Mira化学分析装置 (Roche Diagnostics) を使用し、市販のキット (Wako Chemicals 999-02601及び994-02891) を使用して、製造元が提供する試薬とプロトコルを用いて完全な血漿脂質特性 (TC、TG、LDL、及びHDL) を測定した。MDRCのLuminex 200プラットフォーム (Luminex) でMultiplex Assay (MMHMAG-44K、Millipore) を使用して、血漿グリシン含有トリペプチド分子及びレジスチンを測定し

10

20

30

40

50

た。マウスCCL2/JE/MCP-1 Quantikine ELISAキット (R&D Systems) を用いて血漿MCP-1を測定した。ALT、AST、及びALPの臨床化学アッセイを、ミシガン大学IVACにより、Liasys 330化学分析装置 (AMS Diagnostics) で、製造元が提供する試薬とプロトコールを使用して実施した。シュウ酸塩アッセイキット (Abcam、ab196990) を使用して血漿シュウ酸塩を測定した。血糖値計とテストストリップ (NDC: 0193-7308-50、Contour Next) を使用して血漿グルコースを測定した。血漿AA分析を、ミシガン大学Metabolomics Coreによって実施した。EZ Faast Amino Acids Analysisキット (Phenomenex) の指示に従って、20 μ Lの血漿を誘導体化し、GC-MS分析用に調製した。簡潔に述べると、試料をカラムクリーンアップにかけ、GCオートサンプラーバイアルに移した。次いで、試料を誘導体化し、穏やかな窒素流下、室温で乾燥させ、以下のパラメータを使用して、Agilent 69890N GC-5975 MS検出器でGC分析のために再懸濁した：ZB-AAA 10mカラム (Phenomenex) 上で流速1.1 mL/分のHeガスとともに1:15のスプリット比で1 μ Lの試料を注入した。GCオーブンの初期温度は110℃であり、毎分30℃ずつ上昇させて320℃とした。注入口温度は250℃であり、MSソース温度とMS quad温度はそれぞれ230℃と150℃であった。Mass Hunter 定量分析バージョンB.07.00を使用してデータを処理した。代謝産物を、最も近い同位体で標識した内部標準に正規化し、5つの標準の2回の繰り返し注入を使用して定量化し、各標準について80%超の精度を有する線形検量線を作成した。ピーク面積は、群間の差異分析に使用した。

【0349】

(xiii) 定量的リアルタイムPCR分析

【0350】

QIAGENのRNeasyキット (QIAGEN) を使用して、マウス肝臓試料から全RNAを抽出した。SuperScript IIIとランダムプライマー (Invitrogen) を使用してRNAをcDNAに逆転写した。特定の転写レベルを、iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) と正規化 $\Delta\Delta C_t$ 閾値サイクル法を使用したリアルタイムPCRシステム (Bio-Rad) によって評価した。遺伝子発現レベルを、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) に対して正規化した。qPCRに使用するプライマーペアはIntegrated DNA Technologiesから入手し、表S3に列挙する。

【0351】

10

20

30

40

50

【表 4 - 1】

表 S 3. qPCR 分析に使用するプライマー

遺伝子	フォワードプライマー	配列番号	リバースプライマー	配列番号
<i>Mus musculus</i>				
アラニン-グリオキシル酸 アミノトランスフェラーゼ (AGXT1)	AAGGCATCCAGTATGTGTT CCA	73	TTCCGGTTAGAAAGGAGT CCC	74
アラニン-グリオキシル酸 アミノトランスフェラーゼ 2(AGXT2)	TCACCTGAGAAATACCAGT CCC	75	CAAAGAGCCACTCCATGT GTC	76
セリンヒドロキシメチルト ランスフェラーゼ1(SHMT1)	GGATGATAATGGGGCGTAT CTCA	77	GTC'TTGTGGGT'TGTAGTG GTC	78
セリンヒドロキシメチルト ランスフェラーゼ2(SHMT2)	ATGCCCTATAAGCTCAATC CCC	79	TCTCATGCGTGCATAGTC AATG	80
コリンデヒドロゲナーゼ(C HDH)	TGAGCTGGGTGCCAATATG TA	81	CGAAGCCCTCCTGTTGGA A	82
サルコシンデヒドロゲナー ゼ(SARDH)	GAGAGCGACTGACCTCTGG	83	CCGTGTGTGAGCCAAAAG C	84
スレオニンデヒドロゲナー ゼ (TDH)	CTGGCTGTTTCACTACAGT GC	85	GGAGAGGTAGGTCCAAAG GC	86
ペルオキシソーム増殖因子 活性化受容体 α (PPAR α)	AACATCGAGTGTCGAATAT GTGG	87	CCGAATAGTTCGCCGAAA GAA	88
アシル-CoAオキシダーゼ1(ACOX1)	CCGCCACCTTCAATCCAGA G	89	CAAGTTCTCGATT'TCTCGA CGG	90
ヒドロキシアシル-CoA オキシダーゼ2(ACOX2)	ACCTCGGTGTAAAGCACAA AGT	91	GAGGTTT'TGTCAGTGGTG ATGA	92
アセチル-CoAオキシダーゼ2(ACOX2)	AGTCCCCCTACTGTGTCAG AAA	93	CCATCTCCTCATTGAAGT AGCC	94
エノイル-CoAオキシダーゼ1(EC11)	TGCTGTGACTACAGGGTTA TGG	95	GATCCTCAGGTACCACCT CATC	96
エノイル-CoAオキシダーゼ2(EC12)	ACTACTGCAGTGGGAATGA CCT	97	ATAGTCCCAGAAGGGTGA CAGA	98
アシルCoAシンテターゼ長 鎖1(ACSL1)	GAGCAATGATCACTCACCA AAA	99	TC'TTAGCTCCATGACACA GCAT	100

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

アシルCoAチオエステラーゼ3 (ACOT3)	GCTCAGTCACCCTCAGGTA A	101	AAGTTTCCGCCGATGTTG GA	102
アシルCoAチオエステラーゼ4 (ACOT4)	ACATCCAAAGGTAAAAGGC CCA	103	TCCACTGAATGCAGAGCC ATT	104
Nudix型モチーフ19(NUDT19)	GCACCACCACAGTTCTATG AAA	105	TAAGGACTTTGCCTTCCTT CAC	106
アシルCoAシンテターゼ中鎖5(ACSM5)	TGACAGCGAAGGATCTCAA GTA	107	GAGTTCTCGGAAATTGAT CCAG	108
Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells 1, p105(NFKB1)	GGTATGGCTACTCGAACTA CGG	109	TTTCCTTCTCAGGGAGAG TCAG	110
Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells 2, p49/p100(NFKB2)	GAGGTTTCGGTTCTATGAGG ATG	111	CTCTGCACTTCCTCCTTG TCTT	112
トリ細網内皮症ウイルス(v-rel)がん遺伝子関連B(RELB)	ATCCTCTCTGAGCCTGTCT ACG	113	CACATCAGCTTGAGAGAA GTCG	114
腫瘍壊死因子(TNF α)	CTGTGAAGGAATGGGTGT T	115	GGTCACTGTCCAGCATC TT	116
腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー9(TNFRSF9)	GTTTTGCTCCTCTACCCAC AAC	117	CTTAAGCACAGACCTTCC GTCT	118
C-Cモチーフケモカインリガンド2(CCL2)	TTAAAAACCTGGATCGGAA CCAA	119	GCATTAGCTTCAGATTTAC GGGT	120
C-Cモチーフケモカインリガンド5(CCL5)	ATATGGCTCGGACACCACT C	121	CCACTTCTTCTCTGGGTT GG	122
C-Cモチーフケモカイン受容体2(CCR2)	GATGATGGTGAGCCTTGTC ATA	123	AGTGAGCCCAGAATGGTA ATGT	124
C-Cモチーフケモカイン受容体5(CCR5)	ACCCTGTCATCTATGCCTT TGT	125	GTGGATCGGGTATAGACT GAGC	126
Toll様受容体2(TLR2)	CGGCTGCAAGAGCTCTATA TTT	127	TGGCGTCTCCATAGTAAA GGAT	128
Toll様受容体4(TLR4)	CAGCACTCTTGATTGCAGT TTC	129	CATTCACCAAGAACTGCT TCTG	130
CD86抗原(CD86)	TCTTGCTGATCTCAGATGC TGT	131	CGTACAGAACCAACTTTT GCTG	132
トランスフォーミング増殖因子 β 1(TGFB1)	TGCGCTTGCAAGATTA A	133	CTGCCGTACAACTCCAGT GA	134

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

トランスフォーミング増殖因子 β 2(TGFB2)	CTAATGTTGTTGCCCTCCT ACAG	135	GCACAGAAGTTAGCATTG TACCC	136
トランスフォーミング増殖因子 β 受容体1(TGFBR1)	GGACCATTGTGTTACAAGA AAGC	137	CATGGCGTAACATTACAG TCTGA	138
トランスフォーミング増殖因子 β 受容体2(TGFBR2)	TCCTAGTGAAGAACGACTT GACC	139	TACCAGAGCCATGGAGTA GACAT	140
I型コラーゲン α 1(COL1A1)	TGAACGTGACCAAAAACCA A	141	GCAGAAAAGGCAGCATT GG	142
I型コラーゲン α 2(COL1A2)	AGGCAGGTCTGGGCTTTAT T	143	CGTATCCACAAAGCTGAG CA	144
III型コラーゲン α 1(COL3A1)	CTGTGAATCATGTCCAAC GGT	145	GATCCAGGATGTCCAGAA GAAC	146
IV型コラーゲン α 1(COL4A1)	CAGGCATAGTCAGACAACA GATG	147	TGGACAGCCAGTAAGAGT AGTCG	148
IV型コラーゲン α 2(COL4A2)	CCCATCTGACATCACACTT GTT	149	CCTCTGCTTCCTTTCTGTC CTA	150
組織性メタロプロテアーゼ阻害因子1(TIMPI)	ATTCAAGGCTGTGGGAAAT G	151	CTCAGAGTACGCCAGGGA AC	152
組織性メタロプロテアーゼ阻害因子2(TIMPI2)	AGAAGAAGAGCCTGAACCA CAG	153	GGTCCTCGATGTCAAGAA ACTC	154
セリン(またはシステイン)ペプチダーゼ阻害剤、クレードE、メンバー1(SERPINE1)	GTAGCACAGGCACTGCAAAA A	155	ATCACTTGGCCCATGAAG AG	156
ペルオキシソーム増殖活性化受容体、 γ 、コアクチベーター1 α (PGC1 α)	ATCACGTTCAAGGTCACCC TAC	157	TTCTGCTTCTGCCTCTCTC TCT	158
アシル-CoAシンターゼ、中鎖(ACADM)	CTGTGATTCTTGCTGGAAA TGA	159	GCCGTTGATAACATACTC GTCA	160
アシル-CoAシンターゼ、長鎖(ACADL)	CTATATTGCGAATTACGGC ACA	161	ACACCTTGCTTCCATTGA GAAT	162

10

20

30

40

50

【表 4 - 4】

アシルコエンザイムAデヒドロゲナーゼ、極長鎖(ACADVL)	GCAGATGAGTGCATCCAAA TAA	163	TGAGTTCCTTTTCCTTTGTG CAT	164
ヒドロキシアシルコエンザイムAデヒドロゲナーゼ(HADH)	AACACGTCTTCTTTGCAGATCA	165	AATGAGGTATGGCACCAA GAGT	166
シトクロムP450、ファミリー4、サブファミリーa、ポリペプチド14(CYP4A14)	TATGTCCCTCTGATGGACGTTTG	167	CTGTTCCCTATCCTCCATTC TGG	168
ミトコンドリア カルニチン/アシルカルニチン トランスロカーゼ(CACT)	CAACCACCAAGTTTGTCTGGA	169	CCCTCTCTCATAAGAGTCTTCCG	170
カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ1a(CPT1a)	AGATCAATCGGACCCTAGACAC	171	CAGCGAGTAGCGCATAGTCA	172
グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)	CTGCGACTTCAACAGCAACT	173	GAGTTGGGATAGGGCCTCTC	174
Homo sapiens				
アラニン-グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ(AGXT1)	AGAGACATCGTCAGCTACGTCA	175	CAGGTCACAGCTTCTTCTTGG	176
グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)	ACAACCTTTGGTATCGTGGAAGG	177	GCCATCACGCCACAGTTTC	178

【0352】

(xiv) RNA配列決定及びデータ解析

【0353】

上記のように、マウス肝臓試料から全RNAを抽出した。ライブラリの調製と配列決定を、ミシガン大学のDNA Sequencing Coreによって実施した。Tape Station (Agilent, Santa Clara, CA) を使用してRNAの品質を評価した。全試料のRNA integrity number (RIN) は>8.5であった。Poly (A) mRNA Magnetic Isolationモジュール (NEB、E7490L) を備えたIllumina用NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prepキット (NEB、E7760L) 及びIllumina Unique dual用NEBNext Multiplex Oligo (NEB、E6440L) を使用して試料を調製し、10ng~1μgの全RNAをmRNAポリA精製に供した。次いで、mRNAを断片化し、逆転写酵素とdUTPミックスを使用して第1鎖cDNAにコピーした。試料を末端修復し、dA-ターミネーション工程を経て、NEBNextアダプターをライゲーションした。産物を精製し、PCRで濃縮して、最終的なcDNAライブラリを作成した。最終的なライブラリは、Tape Station (Agilent)、及びIllumina配列決定プラットフォーム用のKapaライブラリ定量化キット (Kapa Biosystems、KK4835) を使用したqPCRによって品質と量をチェックした。NovaSeq6000配列決定システム (Illumina) でライブラリをペアエンドシーケンシングした。

【0354】

生のFastqファイルの品質を、FastQC v0.11.8でチェックした(<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>)。Trimmomatic v.0.35を使用して、パラメータ:SLIDINGWINDOW:4:20 MINLEN:25を使用して低品質の読み取り結果をトリミングした。12 結果として得られた高品質の読み取り結果を、HISAT2 v.2.1.0を使用してマウス参照ゲノム(GRCm38.90)にマッピングした。13 GRCm38.90ゲノムアノテーションに基づくHTSeq-counts v0.6.0を使用して、遺伝子レベルの定量化を実施した。14 次いで、RパッケージDESeq2を使用して、有意な差次的発現遺伝子を同定した。15 調整後のP値が0.05未満であり、絶対倍率変化が2より大きい遺伝子を、有意な差次的発現遺伝子(DEG)とみなした。次いで、上方制御されたDEGと下方制御されたDEGを、clusterProfilerパッケージを使用して有意に濃縮されたKEGG経路についてそれぞれ分析した。16 濃縮の有意性は、右側フィッシャー直接検定とそれに続くBenjamini-Hochberg多重検定調整によって判定した。
【0355】

(xv) 肝脂質分析

【0356】

安楽死させたマウスから肝臓を迅速に取り出し、液体窒素で急速凍結し、-80℃に維持した。凍結肝臓試料(100mg)をPBSでホモジナイズし、遠心分離(14,000RPM、20分)した。上清を回収し、Bio-Rad Bradfordアッセイを用いてタンパク質含有量を分析した。肝脂質の組成を評価するために、ヘキサン(≥99%、Sigma-Aldrich 32293)とイソプロパノール(≥99.5%、Fisher Scientific A426-4)を3:2の比率(v:v)で使用して上清から脂質を抽出し、ヘキサン相を48時間蒸発させた。肝臓のTGまたはTCの量は、市販のキット(Wako Chemicals 999-02601及び994-02891)を使用して分光光度法で測定した。ELISAキット(Aviva Systems Biology、OKEH02607)を使用し、製造元の指示に従って肝臓ジアシルグリセロール(DAG)を測定した。肝臓のTG、TC、及びDAGデータを、タンパク質レベルに対して正規化した。

【0357】

(xvi) ウエスタンブロット分析

【0358】

肝臓試料を、プロテアーゼ/ホスファターゼ阻害剤カクテル(Roche Applied Science)を添加した放射性免疫沈降アッセイ溶解緩衝液(RIPA緩衝液、Thermo Scientific)中に溶解した。タンパク質を10%ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で分離し、ニトロセルロースメンブレン(Bio-Rad)に転写した。メンブレンを、5%無脂肪乳を含有するトリス緩衝生理食塩水-Tween20(TBST)中、室温で1時間ブロッキングし、一次抗体とともに4℃で一晩インキュベートした。以下の一次抗体を使用した:AGXT1(Santa Cruz Biotechnology sc-517388、1:500)、HADHA(Proteintech 10758-1-AP、1:1000)、ACAA2(ABclonal A15778、1:500)、ホスホ-SMAD2(Ser465/467、細胞シグナル伝達、#3108S;1:1000)、SMAD2(Cell Signaling Technology、#5339S;1:1000)、GAPDH(Santa Cruz Biotechnology sc-365062;1:2000)、またはβアクチン(Cell Signaling Technology #3700)。メンブレンをTBSTで洗浄した後、IRDye標識二次抗体(LI-COR Biosciences、1:10000)とともに室温で1時間インキュベートした。TBST洗浄後、Odyssey Infrared Imaging System(LI-COR Biosciences、バージョン2.1)を使用して、

バンドを視覚化し、定量化した。

【0359】

(xvii) グリシン系化合物の同定

【0360】

グリシンに構造的に類似した化合物を、グリシン骨格への構造的、立体配座的、電子的及び立体的等価の修飾を評価する目的で選択した(図9A)。SciFinder(C)により検索を実施し、商用利用可能かどうかを判断した。N-メチルグリシン(図9B)、N,N-ジメチルグリシン(図9C)、及びN,N,N-トリメチルグリシン(図9D)により、グリシンのアミン部分の様々なメチル化の程度を調べ、グリコール酸(図9E)により、アミンからアルコールへの置換を評価した。酸性領域Wxの改変

10

【0361】

グリシンアミド(図9F)、2-アミノ-N-メチルアセトアミド(図9G)、及びエタノールアミン(図9H)で調べる前に、2-オキシピペラジン(図9I)及びモルホリン-2-オン(図9J)により、立体配座が制限された類似体を調べた。(1H-テトラゾール-5-イル)メタンアミン(図9K)により、酸の等価体置換を調べた。

【0362】

(xviii) 経口グルコース負荷試験(OGTT)

【0363】

12時間の絶食後にOGTTを実施した。指定の用量(0.17~1mg/g体重)のロイシン、グリシン、DT-109または他のグリシン系化合物を含有するグルコース(2mg/g体重)の強制経口投与の0、15、30、60、及び120分後に尾の先端から血液試料を採取した。血糖値計とテストストリップ(Contour Next)を使用して血糖値を測定した。

20

【0364】

(xix) 体組成及び包括的実験動物モニタリングシステム(CLAMs)

【0365】

すべての測定は、ミシガン大学のAnimal Phenotyping Coreによって実施した。体脂肪、除脂肪体重、及び遊離体液を、核磁気共鳴(NMR)ベースの分析装置(Minispec LF90II; Bruker Optics)を使用して測定した。分析装置を、製造元が推奨する参照試料を使用して毎日チェックする。最小限の拘束でマウスを個別に測定管に入れた。酸素消費量(VO₂)、二酸化炭素産生量(VCO₂)、及び運動能を、光学ビーム活性モニタリング装置を備えた集積開放型回路熱量計であるCLAMs(Columbus Instruments)を使用して測定した。測定前にマウスの体重を測定し、密閉チャンバー(7.9"×4"×5")に個別に入れ、食物と水を自由に摂取させた。研究は、20~23°C、12時間-12時間の明暗サイクル(6:00PM~6:00AM)に設定した実験室で実施した。測定は48時間継続して実施した。この間、動物にはチャンバー内にある給餌装置と飲用装置を介して食物と水を供給した。各チャンバーのVO₂とVCO₂は、10分間隔で5秒間連続してサンプリングし、運動能は、X及びZ次元で毎秒記録した。チャンバーを通る空気の流速は、静止状態で酸素差が0.3%前後に維持されるように調整した。呼吸交換率(RER)は、VCO₂/VO₂として計算した。総エネルギー消費量、グルコース酸化及び脂肪酸化は、VO₂、VCO₂、及びタンパク質分解の値に基づいて計算した。

30

40

【0366】

(xx) 糞便マイクロバイーム分析

【0367】

腸内細菌叢の全ゲノムDNAを、QIAamp DNA Stool Miniキット(51540、Qiagen)を使用して、製造元の指示に従って糞便試料から抽出した。DNAを、前述のように群集解析用に調製した。17 簡潔に述べると、16S rRNA遺伝子のV4領域に特異的なバーコード付きデュアルインデックスプライマーを使用してDNAを増幅した。18 PCR反応は5µLの4µM等モルプライマーセット、0.1

50

5 μ LのAccuPrimeTaq DNA High Fidelity ポリメラーゼ、2 μ Lの10 $\times$ AccuPrime PCR緩衝液II (Thermo Fisher Scientific 12346094)、11.85 μ LのPCRグレードの水、及び1 μ LのDNAテンプレートからなる。PCR条件は、95 $^{\circ}$ Cで2分間、続いて95 $^{\circ}$ Cで20秒間、55 $^{\circ}$ Cで15秒間、72 $^{\circ}$ Cで5分間を30サイクル、続いて72 $^{\circ}$ Cで10分間であった。各PCR反応は、SequalPrep Normalization Plateキット (Thermo Fisher Scientific A1051001) を使用して正規化した。正規化した反応物をプールし、Illuminaプラットフォーム用のKapa Biosystems Library qPCR MasterMix (ROX Low) Quantificationキット (KK4873) を使用して定量した。Agilent Bioanalyzerを使用し、高感度DNA分析キット (5067-4626) を使用してアンプリコンライブラリのサイズを確認した (約399 bp)。次いで、プールしたアンプリコンライブラリを、Illumina MiSeq NANOプラットフォーム (ミシガン大学微生物システム分子生物学研究所) 上で標準プロトコールに従って配列決定した。

【0368】

DNA配列決定データをSOPに従ってMothurを使用して処理し、主に α 及び β 多様性ベースの分析に焦点を合わせた。配列をトリミングしてプライマーとバーコードを削除し、品質をフィルタリングし、前述のようにキメラをチェックした。各サンプルの合計3565の配列を、さらなる統計解析に使用した。トリミングしたDNA配列を、平均隣接アプローチを使用してクラスター化し、97%の配列類似性カットオフ (3%の配列相違) で操作的分類単位 (OTU) を形成した。Clearcutプログラムを使用して系統樹を構築した。 β 多様性の測定には、OTUベースのアプローチを使用した。上位107個のOTUの相対存在量 (>1%) の値のlog₂スケーリングを使用して、全サンプルにわたる各OTUの相対存在量のヒートマップを生成した。分子ANOVA統計解析を実施して、サンプリング群全体のコミュニティ間の構造的類似性の有意性を判定した。UniFrac分析を使用して、加重 (WUnF) 及び非加重 (UWUnF) UniFracメトリックを推定した。制約付き順序RDA (冗長性分析) を計算し、環境変数の有意性をフォワードセレクション分析によってチェックした。腸内細菌叢を区別する微生物の特徴の特性評価を、統計的有意性と生物学的関連性の両方を強調するバイオマーカー発見のための線形判別分析 (LDA) 効果量 (LEfSe) 法 (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/lefse/>) を使用して実行した。それに応じて、RのPhyloseqパッケージを使用して主成分分析 (PCA) をプロットした。変化した細菌属の変化と肝臓または血漿のNAFLD関連パラメータとの相関を、ノンパラメトリックスピアマン検定を使用して計算した。

【0369】

(xxi) in vitro 研究

【0370】

アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関 (ATCC) からHepG2ヒト肝癌細胞株入手し、10%ウシ胎仔血清 (FBS、Sigma-Aldrich) 及び1%ペニシリン-ストレプトマイシン (Pen-Strep、Gibco) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM、Gibco) 中、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で培養した。いくつかの実験では、FBSを含まないが0.1%BSAを添加したDMEM中に、細胞をパルミチン酸 (PA、200 μ M、Sigma-Aldrich P0500) とともにロードした。AGXT1を標的とするsiRNA (siAGXT1: GCAAGGAUAUGUAC CAGAUtt、siRNA ID s1190) 及び非標的siRNA対照 (siCTL、siRNA ID AM4611) はAmbionから入手した。Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を使用し、製造元のプロトコールに従って、Opti-MEM還元血清培地 (Gibco) 中、HepG2細胞に20nMのsiAGXT1またはsiCTLを形質移入した。RNAの単離、タンパク質または脂質の

抽出は、形質移入の48時間後に実施した。QIAGENのRNeasyキット(QIAGEN)を使用して、HepG2細胞から全RNAを精製した。表S3に列挙されているヒトプライマーペアを使用してqPCR分析を上記のように実行した。プロテアーゼ／ホスファターゼ阻害剤カクテル(Roche Applied Science)を添加したRIPA緩衝液(Thermo Scientific)を使用して、細胞を溶解した。上記のようにウエスタンブロットを使用して、AGXT1タンパク質の存在量を評価した。ヘキサン：イソプロパノールを3：2の比率で用いて、細胞からの細胞脂質の抽出を行い、ヘキサン相を48時間蒸発させた。プレート内の残りの細胞を0.1M NaOHで24時間破碎し、Bradfordタンパク質アッセイ(Bio-Rad)を使用して細胞タンパク質を測定するためにアリコートを採用した。細胞のTGまたはTCの含有量を、市販のキット(Wako Chemicals)を使用して分光光度法で測定した。細胞のTG及びTCデータをタンパク質レベルに対して正規化し、 $\mu\text{g TG}$ または TC/mg タンパク質として表した。

10

【0371】

H. 結果

【0372】

(i) マウス及びヒトNAFLDにおけるグリシン生合成障害

【0373】

グリシン代謝の変化がNAFLDの発症に寄与するかどうかを試験するために、最初に、WDによって誘発されたHSを有するC57BL/6Jを研究した。WD給餌の12週間後、高コレステロール血症(図10A)ならびにH&E染色及びオイルレッドO(ORO)染色によって確認されるHS、ならびに肝TG及び総コレステロール(TC)の定量化を明らかにした(図10B~D)。標的化メタボロミクスにより、すべてのAAの中で、血漿グリシンが最も有意に低下し、その前駆体であるセリン、スレオニン、及びアラニンが著しく増加したことが明らかになり(図10E)、このことからグリシン生合成の障害が示された。したがって、次に、グリシン形成を駆動する遺伝子の発現を研究した。HSを有するマウスにおいて、主要なグリシン生合成遺伝子が下方制御され、その中でも、AGXT1が最も有意に抑制されたことを見出した(図10F)。さらに、AGXT1は、パルミチン酸(PA)によって誘導されるTG蓄積によりHepG2細胞において著しく下方制御された(図10G、H)。

20

【0374】

同様のパターンがより重症のNAFLDで明らかであるかどうかを試験するために、24週間のNASH食餌の給餌によって誘発した進行性NASH及び線維症を有するマウスに由来する肝臓のRNA配列決定を実施した(図10I)。経路分析により、ケモカイン、NF- κ B、Toll様受容体(TLR)及びトランスフォーミング増殖因子 β (TGF β)シグナル伝達の上方向制御、ならびにFA分解及びペルオキシソーム増殖因子活性化受容体(PPAR)シグナル伝達の下方向制御を含む、NASHに関連する既知の経路の変化が明らかになった(図10J)。興味深いことに、グリシン、セリン、スレオニン及びグリオキシル酸の代謝を含む、AA生合成を調節する経路は、AGXT1抑制を含め、NASHにおいて有意に下方制御された($P=0.0009$ 、図10K)。食事性NASHを有するマウスの独立したコホートを使用して、AGXT1抑制をqPCRによって確認した(図10L)。

30

40

【0375】

グリシン生合成遺伝子がヒトNAFLDで同様に抑制されるかどうかを試験するために、NASH患者の肝臓のトランスクリプトミクスに基づいてメタ解析を実施した。NASHにおいて、AGXT1($\beta=-0.141$ 、 $P=0.0041$)及びAGXT2($\beta=-0.134$ 、 $P=0.0135$)が有意に下方制御されていたが、一方、グリシンからグリオキシル酸への分解を触媒するD-アミノ酸オキシダーゼ(DAO)は著しく上方向制御されていた($\beta=0.216$ 、 $P=0.0025$ 、図10M)ことを見出した。肝移植ドナーから得られた206サンプルの中で、AGXT1の発現が肝脂肪含有量と逆相関し

50

ていることを見出した ($r = -0.199$ 、 $P = 0.0044$ 、図10N)。興味深いことに、PPAR α (肝FAOの主要制御因子) の発現と肝脂肪含有量 ($r = -0.154$ 、 $P = 0.0275$) の間に同様の逆相関が認められたが、一方、脂肪性肝炎及び線維症の主要なプレーヤーであるC-Cモチーフケモカインリガンド5 (CCL5) とTGFB β の発現は、肝脂肪と正の相関があった (それぞれ、 $r = 0.185$ 、 $P = 0.0078$ 及び $r = 0.284$ 、 $P < 0.0001$ 、図示せず)。これらの結果は、グリシン合成遺伝子の抑制に関連して、NAFLDにおける循環グリシンの低下に関する最近の報告と一致しており、NAFLDにおけるAGXT1の役割を示唆している。

【0376】

(ii) AGXT1の喪失は、食事性高脂血症及びNASHを悪化させる

10

【0377】

肝細胞のペルオキシソームまたはミトコンドリアに局在する肝臓特異的遺伝子であるAGXT1の細胞脂質蓄積における潜在的な役割を研究するために、HepG2細胞においてAGXT1をノックダウンし、これによりPA誘導型TG蓄積が増強された (図8C~E)。in vivoでのAGXT1の喪失の影響を研究するために、CRISPR/Cas9を用いてAGXT1 $^{-/-}$ マウスを生成した (図8A、B)。CD給餌下では、以前に示したように、AGXT1 $^{-/-}$ 肝臓の組織学はAGXT1 $^{+/+}$ のそれと同等であったが、さらに、血漿肝酵素もまた同等であることがわかった (図8F~K)。しかしながら、NASH食餌での12週間後、AGXT1 $^{-/-}$ マウスでは、血漿TG、TC、AST及びALTが増加していた (図8L~O) が、グリシンとシュウ酸塩の比率は有意に低下していた (図8P)。腹腔の肉眼的外観からは、AGXT1 $^{-/-}$ マウスにおける、より肥大化し、黄色がかった着色が増強された肝臓が明らかになった (図11A)。体重に有意差は認められなかったが、肝臓重量は有意に増加していた (図11B、図11C、D)。肝脂質の定量化と組み合わせたH&E及びORO染色により、AGXT1 $^{-/-}$ マウスにおけるHSの増加が明らかとなり (図11A、E、F)、シリウスレッド染色により、線維症の増加が明らかとなった (図11A)。さらなる組織学的分析により、AGXT1 $^{-/-}$ マウスにおいてNAS及び線維症スコアが高いことが確認された (図11G、H、図11I)。

20

【0378】

AGXT1 $^{-/-}$ マウスにおける食事性NASHの加速の根本的なメカニズムを理解するために、AGXT1 $^{+/+}$ 及びAGXT1 $^{-/-}$ マウスに由来する肝臓のRNA配列決定とそれに続くqPCR検証を実施した。経路分析により、AGXT1 $^{-/-}$ マウスにおけるエネルギー代謝とFAO経路の抑制が明らかとなったが、一方、炎症誘発性経路は上方制御されていた (図11J)。ペルオキシソームを調節する遺伝子 (アシルCoAチオエステラーゼ3、ACOT3、アシルCoAシンテターゼ中鎖5、ACSM5、アシルCoAシンテターゼ長鎖1、ACSL1) 及びミトコンドリアFAO (ヒドロキシアシルCoAデヒドロゲナーゼ α 、HADHA、及びアセチルCoAアシルトランスフェラーゼ2、ACAA2) はAGXT1 $^{-/-}$ マウスにおいて有意に下方制御された (図11K~M、PPAR α についてはわずかではあるが、 $P = 0.0557$) が、一方、炎症誘発性シグナル伝達の調節因子をコードする遺伝子 (NFkB1/2、RELB、CCR2/5、及びTLR2/4)、サイトカイン (TNF α 及びCCL2)、線維形成 (TGFB1/2及びTGFB2) 及び細胞外マトリックス (ECM) リモデリング (COL1A2、COL4A2及びTIMP1) は有意に上方制御された (図11N、O)。したがって、肝臓特異的なグリシン合成遺伝子であるAGXT1は、NAFLDにおいて抑制され、その欠損は食事性NASHを加速する。

30

40

【0379】

(iii) グリシン欠乏症は、食事性高脂血症及びHSを悪化させる

【0380】

血漿グリシンレベルの低下はNAFLD及び心血管代謝疾患に関連し、より高いレベルは好ましい脂質特性に関連する。脂質異常症における食餌性グリシンの役割を調べるため

50

に、グリシンを含むかまたは含まないAA改質型WD ($WD_{AA} + Gly$ または $WD_{AA} - Gly$ 、表S2)を開発し、高脂血症アポE $^{-/-}$ マウスCD、 $WD_{AA} + Gly$ または $WD_{AA} - Gly$ に、10週間給餌した。 $WD_{AA} - Gly$ を給餌したマウスにおいて、血漿グリシンの有意な低下が認められた(図12A)。NMRベースの体組成とCLAMS分析により、 $WD_{AA} - Gly$ を給餌したマウスにおいて、体重及び脂肪の増加が示されたが、 $WD_{AA} + Gly$ を給餌したマウスでは示されず(図12B~D)、食物摂取、活動性またはエネルギー代謝には有意な変化がなかった(図12E~H)。したがって、血漿グリシン含有トリペプチド分子は、 $WD_{AAA} - Gly$ を給餌したマウスにおいて増加し(図12I)、脂肪細胞肥大の増加が、精巢上体脂肪組織及び皮下脂肪組織において認められた(EAT及びSAT、図12J)。 $WD_{AA} + Gly$ に比べて、 $WD_{AA} - Gly$ を給餌したマウスでは、血漿TC及びTGが増加していた(図13A~D)。 $WD_{AA} - Gly$ を給餌したマウスにおいて血漿グルコースの増加が認められたが、 $WD_{AA} + Gly$ を給餌したマウスでは認められなかった(図13E)。組織学及び脂質の定量化により、 $WD_{AA} - Gly$ 給餌後のHSの増加が明らかになった(図13F~H)。線形回帰分析により、血漿グリシンと血漿TC、グルコースまたは肝臓TGの個々のレベルの間に有意な逆相関が示された(図13I~K)。したがって、食事性グリシン欠乏症は、高脂血症マウスにおいて、高脂血症、高血糖症及びHSを悪化させる。

【0381】

(iv) DT-109: グルコース/脂質二重低下特性を有するグリシン系トリペプチド

【0382】

上記の発見を考慮して、グリシン系化合物が、グルコース/脂質二重低下効果を介した治療可能性を有し得ると推論した。したがって、アミノ基やカルボキシル基に様々な化学修飾を適用して、グリシンと構造的に類似した化合物を探索した。10の潜在的な化合物が同定され(図9A~K)、そのうちの4つは経口投与に適していた。慢性的なグリシンの補給(1mg/g/日)は、a po E $^{-/-}$ マウスにおいて循環TGを低下させ、肥満型C57BL/6マウスにおいて耐糖能を回復させ、脂肪減少を加速することを示した。ヒトでは、グルコースと一緒にグリシンを摂取すると、血漿グルコースの増加が>50%減弱した。グルコース低下効果を試験するために、グリシンまたはグリシン系化合物(0.5mg/g)を投与したC57BL/6Jマウスにおいて、経口グルコース負荷試験(OGTT)を実施した。試験した化合物のいずれも、グリシンよりも効率的に血糖の増加を減弱させることはなかった(図14A~D)。ヒトとマウスのグルコースを低下させると報告されている別のAAは、ロイシンである。発明者らの研究室の以前の研究では、ロイシンと組み合わせたグリシンのトリペプチド(gly-gly-leu)であるDT-109の深刻なグルコース低下効果が明らかになった。OGTTを使用して、DT-109またはそのD-異性体(gly-gly-D-leu、DT-110)を試験した。DT-110のグルコース低下効果はグリシンと同様であったが、DT-109は、特にその個々のAAの同等レベル(図14G)と比較した場合に、グリシンよりも効率的にグルコースを低下させた唯一の化合物であった(図14E、F)。

【0383】

脂質低下効果を試験するために、高脂血症のa po E $^{-/-}$ マウスに、WDを給餌するとともに、DT-109(1mg/g/日)、同等レベルのロイシン、グリシン、またはH₂Oを経口投与した(図15A)。10週間後、DT-109は、OGTTと非空腹時グルコースの両方で最も強力なグルコース低下効果を示した(図15B、C)。食物摂取量または体重に有意差は観察されなかった(図15D、E)。脂質特性分析により、DT-109で処置したマウスが、グリシン処置マウスで認められたHDLの低下を伴わずに、最も低いTC及びLDLを有していたこと(図15F~I)、ならびに血漿TGにおいて有意差を有していたこと(図15J)が示された。グリシンまたはDT-109は、EAT及びSATにおいてグリシン含有トリペプチド分子及び脂肪細胞肥大を減少させた(図15K、L)。組織学及び脂質の定量化により、グリシンまたはDT-109で処置した

10

20

30

40

50

がロイシンでは処置しなかったマウスの肝臓において、H Sの低下が明らかになった（図16A～C）。qPCR分析により、グリシンまたはDT-109で処置したマウスの肝臓においてFAOを調節する重要な遺伝子（PPAR α 、PNPLA2、カルニチン／アシルカルニチントランスロカーゼ、CACT、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ1a、CPT1a、及びアシル-CoAデヒドロゲナーゼ長鎖、ACADL）の上方制御ならびにTNF α の有意な変化を伴わないCCL2の下方制御が明らかになった（図16D）。したがって、DT-109は、グルコース／脂質二重低下特性を有し、高脂血症マウスにおけるWD誘発性H Sを予防する。

【0384】

(v) DT-109は、体組成を改善し、食事性NASHから保護する

10

【0385】

NASHに対するDT-109の治療可能性をさらに調べるために、進行性NAFLDをモデル化するための実験的アプローチを考案した（図17A）。NASH食餌を12週間給餌したC57BL/6Jマウスは、CDを給餌した場合と比較して、血漿グルコース、TC、AST、及びALTが増加していた（図17B）。マウスのサブセットを殺処分し、NASH食餌を給餌した後の肝臓重量の増加を確認した（図17C）。H&E及びORO組織学により、H S、肝細胞バルーン化及び炎症細胞の浸潤が明らかになったが、一方、シリウスレッド染色により、初期の線維症が確認された（図17D）。NASHを確認した後（図17D～F）、残りのマウスを無作為化し、NASH食餌下でさらに12週間、強制経口投与を介して、0.125mg/g/日もしくは0.5mg/g/日のDT-109、同等レベルのロイシン、グリシンまたはH₂Oを投与した。マウスには、CDを給餌し、対照としてH₂Oを投与した。

20

【0386】

18週目に、OGTT及び非空腹時グルコース測定により、0.5mg/g/日のDT-109で最も強力なグルコース低下効果が確認された（図17G、H）。体組成分析により、NASH食餌を給餌したすべてのマウスにおいて体重の増加が明らかになった（図17I）が、0.5mg/g/日のDT-109で処置したマウスは、H₂O対照と比較して、体脂肪が減少するとともに除脂肪体重が維持され（図17J、K）、さらにEAT及びSATにおいて脂肪細胞肥大が減少（図17L）し、食物摂取量には有意差がなかった（図17M）ことが示された。食事性肥満に対する代謝応答は、RERの低下を反映して、高脂肪対低炭水化物利用へのシフトを伴う。CLAMS分析では、NASH食餌を給餌したすべての群でRERが低下したが、0.5mg/g/日のDT-109で処置したマウスでは有意差が認められなかったことが明らかとなった（図17N～P）。エネルギー消費または活動に有意差は認められなかった（図17Q、R）。

30

【0387】

エンドポイントにおいて、NASH食餌を給餌したマウスで観察された血漿AST、ALT及びアルカリホスファターゼ（ALP）の増加は、グリシンまたはDT-109処置によって減弱された（図18A～C）。血漿TGは、グリシンまたはDT-109で処置したマウスで減少し（図18D）、TCは、0.5mg/g/日のDT-109で減少した（図18E）。したがって、NASH食餌誘発性肝腫大及び黄色がかった着色は、グリシンまたはDT-109での処置によって著しく減弱されたが、ロイシンでは減弱されず（図18F、G、図18H）、NASは0.5mg/g/日のDT-109で有意に減少した（図18I、図18J）。線形回帰分析により、AST、ALTまたはALPの個々のレベルとNASとの間に非常に有意な正の相関が示された（図18K～M）。

40

【0388】

(vi) DT-109はNASH食誘発性トランスクリプトーム変化を逆転させる：FAOの重要な役割

【0389】

グリシン系治療薬によって食事性NASHから保護されるメカニズムを調べるために、エンドポイントで回収した肝臓のRNA配列決定を実施した。主成分分析（PCA）によ

50

り、ロイシンで処置したNASH食餌のマウス由来の遺伝子発現特性は、H₂O対照とともにクラスター化し、グリシン及び0.125mg/g/日については中間的なパターンとなり、一方、0.5mg/g/日のDT-109はCDマウスの近くにクラスター化したことが明らかとなった(図19A)。ボルケーノプロット分析により、NASH食餌を給餌し、H₂Oまたはロイシンで処置したマウスにおける、CDと比較した主要なDEG変化(それぞれ3606または3145DEG)が確認され、この変化は、0.125mg/g/日または0.5mg/g/日のグリシンまたはDT-109で処置することによって著しく減少した(それぞれ、1300、1093または642DEG、図19B)。上位50DEGの分析は、DT-109(0.5mg/g/日)とCD群の類似性をさらに強く示している(図19C)。NASH食餌H₂O対照とCDとを比較するパスウェイ解析により、グリシン生合成及びグリオキシル酸代謝を調節する経路の抑制、ならびにエネルギー代謝経路及びFAO経路とともに、AGXT1、SHMT1及びSARDHの下方制御が確認された。対照的に、既知のNASH関連炎症促進性/線維症経路は上方制御された(図19D、E)。NASH食餌H₂O対照と0.5mg/g/日のDT-109との比較パスウェイ解析では、CDと同様のパターンが示され、DT-109が、根底にある経路におけるNASH食餌誘発性の変化を逆転させたことを示している(図19F)。NASH病因の主要な態様に関与する50個の遺伝子の分析(図19G)では、FAOを調節する重要な遺伝子(PPAR α 、PPARGコアクチベーター1 α)(PPARGC1A/PGC1 α)、アシルCoAオキシダーゼ1(ACOX1)、CPT2、ACADS/M/L、HADHA/B、及びACOT3/4)が、CDマウスにおいて過剰に出現し、H₂Oまたはロイシンで処置したNASHマウスにおいては抑制されたことが明らかとなった。qPCR及びウエスタンブロット分析によって確認されたように、これは、グリシンまたはDT-109、特に0.5mg/g/日での処置によって逆転した(図19H、I、図19J)。したがって、ORO及び脂質の定量化により、H₂Oまたはロイシンで処置したNASHマウスの肝臓に顕著なHSが確認され、これはグリシンまたはDT-109によって有意に減弱された(図19K~L、図19M)。特に、肝障害及びNASHを促進することが知られているジアシルグリセロール(DAG)は、0.5mg/g/日のDT-109によって有意に減少した(図19N)。したがって、グリシン系の治療薬は、FAOの障害を修正し、NASH食事性HS及び脂肪毒性脂質を低減する。

【0390】

(vii) DT-109は、NASH食事性の肝臓の炎症及び線維症を軽減する

【0391】

RNA配列分析により、グリシン系の治療薬による重要な炎症性経路/遺伝子の抑制が明らかとなり(図19F、G)、抗炎症の役割が示唆された。確かに、肝マクロファージの十分に確立されたマーカーであるF4/80についての免疫染色は、NASH食餌下でH₂Oまたはロイシンで処置したマウス由来の肝臓で有意に増加したが、グリシンまたはDT-109によって減弱された(図20A、B)。血漿中では、NASH患者の既知の炎症マーカーである単球走化性タンパク質1(MCP-1/CCL2)とレジスチンは、グリシンまたはDT-109で処置したマウスでは低かった(図20C、D)。したがって、RNA配列決定により、炎症誘発性シグナル伝達調節因子をコードする遺伝子(NFkB1/2、RELB、CCR1/2/5、TLR1/2/4、及びTNFRSF1A/9/12)及びサイトカイン(TNF α 及びCCL2/5)は、NASH食餌を給餌し、H₂Oまたはロイシンで処置したマウスでは上方制御され、グリシンまたはDT-109では減弱された(図19G)。これは、qPCR分析によって確認され、NFkB2、RELB及びTNF α は、グリシンまたはDT-109のいずれかによって有意に下方制御され、一方、CCL2、CCR2及びCCR5は、0.5mg/g/日のDT-109によってのみ下方制御された(図20E)。

【0392】

RNA配列決定はまた、TGF β シグナル伝達に関連する経路/遺伝子(TGFB1/2及びTGFB1/2)及びECMリモデリング(COL1A1/1A2/3A1/4

10

20

30

40

50

A1／4A2、TIMP1／2及びSERPINE1)が、NASH食餌によって上方制御され、グリシンまたはDT-109によって減弱されたことを示した(図19F、G)。実際、シリウスレッド及び線維症スコアリングに基づく組織学的分析では、NASH食事性肝線維症に対して、グリシンまたはDT-109が保護効果を有していたが、ロイシンは有していなかったことが明らかとなった(図20A、F、G)。線形回帰分析では、AST、ALTまたはALPの個々のレベルと線維症スコアとの間に非常に有意な正の相関が示され、グリシンまたはDT-109がNASH食事性肝障害を軽減することが示された(図20H、I、J)。グリシン系の治療薬がTGFβを介した肝線維症を軽減するかどうかを試験するために、次にSMADシグナル伝達を分析し、主にDT-109によるSMAD2のSer465／467のリン酸化の減少を発見した(図20K)。qPCR分析により、H₂Oまたはロイシンを投与したNASHマウス由来の肝臓において、TGFβ関連遺伝子が著しく上方制御され、それがDT-109によって減弱されたことが確認された(図20L)。したがって、HS及び脂肪毒性の低下と一致して、2つのグリシン系の治療薬は、NASH食事性脂肪性肝炎及び線維症を軽減する。

【0393】

I. 考察

【0394】

脂質及びグルコースの代謝異常はNAFLDの既知の特徴であるが、AA代謝の乱れはNASHに関係していることが示唆された。特に、循環グリシンの低下はNAFLD患者で一貫して報告されているが、グリシン低下の原因とその治療の可能性は不明なままである。本明細書では、グリシンの可用性を制限するための遺伝的アプローチ及び食事療法的アプローチを使用して、NAFLDの発症においてグリシンが原因となる役割を担っているエビデンスを提供する。NAFLDの潜在的なグリシン系治療薬の探索において、DT-109は、グルコース／脂質二重低下効果を有し、マウスを食事性NASHから強力に保護するものとして同定された。

【0395】

本明細書に提示する結果は、NAFLD患者に認められるグリシンレベルの低下が、肝臓のグリシン生合成遺伝子の抑制に関連していることを示している。特に、マウスとヒトの両方のNASHで、発明者らは、グリオキシル酸からグリシンへの変換を触媒するAGXT1の有意な抑制を見出し、AGXT1の発現がヒトの肝脂肪含有量と逆相関することを示した。NASH患者またはマウスモデルにおいてAGXT1が抑制されていることは報告されていたが、発明者らは、NAFLDにおいてAGXT1が原因となる役割を担っていることを初めて報告する。AGXT1の変異は、グリオキシル酸からグリシンへの変換障害、及び腎不全につながる過剰な肝臓シュウ酸塩産生によって引き起こされる原発性高シュウ酸尿症1型の原因である。興味深いことに、AGXT1^{-/-}マウス由来の肝臓のプロテオミクスにより、グルコースと脂質の代謝経路に有意な変化が示されたが、NASHにおけるAGXT1の役割はこれまで評価されてこなかった。CRISPR／Cas9を使用してAGXT1^{-/-}マウスを生成したが、このマウスは、NASH食餌での12週間後には、悪化した高脂血症とNASHを示していた。AGXT1^{-/-}マウスにおいて、FAO経路の抑制が特定され、この抑制が、今度は脂肪性肝炎及び線維症を促進する。

【0396】

さらに、食事療法を適用してグリシンの利用可能性を制限し、グリシンを含むかまたは含まないWDを給餌した高脂血症マウスの脂質特性とHSを比較した。グリシン欠乏WDを給餌したマウスで観察された脂肪症、高脂血症及びHSの増強は、様々なげっ歯類モデルで食餌性グリシンが脂肪減少を加速し、耐糖能を改善し、血漿脂質またはHSを減少させた以前の報告と一致している。興味深いことに、サンプルサイズが小さく、治療期間が短いにもかかわらず、グリシン前駆体であるセリンを補給した後、NAFLD患者においてHS及び血漿肝酵素の低下が認められた。脂肪性肝炎と線維症の共存を特徴とする進行性のNAFLDモデルを使用した徹底的な調査で、マウスにおいて0.33mg／g／日

10

20

30

40

50

の比較的低用量でグリシンを処置することによる保護効果を初めて報告する。

【0397】

グリシン系の化合物の探索中に、同定した化合物のいずれも、グリシンよりも効率的に血漿グルコースを低下させることはなかった。したがって、グリシンと、ヒトにおいてグルコースを低下させ、マウスにおいてHSを軽減することが報告されている別のAAであるロイシンとの組み合わせを試験した。特に、様々なT2Dモデルを適用して、発明者らの研究室は、遊離グリシン、ロイシンまたはそのジペプチドの組み合わせの効果を越える、トリペプチドgly-gly-leuの強力なグルコース低下効果を明らかにした。発明者らは、DT-109が、遺伝モデルと食事モデルを使用して、脂質特性、HS、及びNASHも改善することを初めて示した。同等レベルのロイシンで処置したマウスでは有意な効果は観察されなかったが、グリシン処置後に代謝の利点が明らかになった。それにもかかわらず、ロバストなグルコース低下、高脂血症マウスにおけるHDLレベルの維持、NASH食餌による体組成の変化の予防、肝臓DAGの低減、及びNASの有意な減少を含むいくつかの結果は、高用量のDT-109でのみ実証された。0.125mg/g/日の低用量のDT-109でも大きな利点が認められたことに留意すべきである。

【0398】

脂質過負荷はNASHの病因の中心である。遊離脂肪酸が、肝臓に過剰に供給される場合及び／またはFAOを介したそれらの排泄が損なわれている場合、それらは酸化ストレス及び脂肪性肝炎と線維症を促進する炎症促進性／線維形成性の経路を誘発する脂肪毒性種の基質として使用される。偏りのないトランスクリプトミクスを適用して、NASHマウス由来の肝臓において抑制された主要なFAO経路を同定し、これはDT-109によって逆転され、その後HSと脂肪毒性DAGが低減した。これは、グリシン系の治療薬が肝FAO障害を正常化し、HSと脂肪毒性を低下させ、それがNASHの進行を減弱させ得ることを示している。実際、脂肪性肝炎と線維症を特徴とするモデルを使用して、組織学的、トランスクリプトミクス及び血漿分析によって明らかのように、グリシンまたはDT-109が、NASH食事性の肝臓／全身性の炎症及び線維症を減弱することが見出された。また、以前の研究では、内毒素血症のマウスにおけるグリシンの抗炎症効果及び肝保護効果が報告された。T2D患者では、3か月間のグリシン処置(5g/日)が、ヘモグロビンA1cと血漿TNFR1を低下させた。

【0399】

まとめると、NAFLDにおけるグリシン代謝障害を特定した結果、グリシン系の治療薬が同定され、これは、肝臓のFAOを調節することによって実験的NAFLDにおいて有効であることが証明された。

さらに、本発明は次の態様を包含する。

1. 哺乳類対象における高脂血症、脂肪肝、脂肪性肝炎、非アルコール性脂肪性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝炎、肥満、高血糖、メタボリックシンドローム、心血管疾患、及びアテローム性動脈硬化症のうちの少なくとも1つの治療方法であって、それを必要とする対象に、治療有効量のグリシン、グリシン含有トリペプチド分子、またはその薬学的に許容される塩を投与することを含む、前記治療方法。
2. 前記グリシン含有トリペプチド分子が、肝臓トリグリセリドレベルを有意に低下させる、項1に記載の方法。
3. 前記グリシン含有トリペプチド分子が、肝臓総コレステロールレベルを有意に低下させる、項1に記載の方法。
4. 前記グリシン含有トリペプチド分子が、Gly-Gly-Leu、Gly-Gly-dLeu、またはその薬学的に許容される塩である、項1～3のいずれか一項に記載の方法。
5. グリシン含有トリペプチド分子、またはその薬学的に許容される塩を対象に投与することを含む、肝臓の脂質の酸化もしくは利用の増強方法、前記対象の血中のトリグリセリドレベルの低下方法、またはそれを必要とする高コレステロール血症の前記対象の血中のコレステロールレベルの低下方法であって、治療の結果として、肝臓の脂質酸化が増加し

、前記トリグリセリドレベル、前記高コレステロール血症またはそれらの任意の組み合わせが改善される、前記方法。

6. 前記グリシン含有トリペプチド分子が、G l y - G l y - L e u、G l y - G l y - d L e u、またはその薬学的に許容される塩である、項5に記載の方法。

7. 前記グリシン含有トリペプチド分子G l y - G l y - L e u、G l y - G l y - d L e u、またはその薬学的に許容される塩が、肝脂質酸化の調節因子AMP K α 1またはP P A R α の発現を有意に誘導する、項5または項6に記載の方法。

8. 前記グリシン含有トリペプチド分子G l y - G l y - L e u、G l y - G l y - d L e u、またはその薬学的に許容される塩が、C P T 1 a、C A C T、またはA C A D I (ミトコンドリア β 酸化)またはP N P L A 2を有意に上方制御することによって肝臓トリグリセリドレベルを低下させる、項5または項6に記載の方法。

10

9. 前記グリシン含有トリペプチド分子G l y - G l y - L e u、G l y - G l y - d L e u、またはその薬学的に許容される塩が、ミトコンドリア陰イオン担体U C P 2を有意に上方制御することによって肝臓トリグリセリドレベルを低下させる、項5または項6に記載の方法。

10. 前記グリシン含有トリペプチド分子G l y - G l y - L e u、G l y - G l y - d L e u、またはその薬学的に許容される塩が、A B C G 5及びA B C G 8の発現を有意に増加させることによって前記肝臓におけるコレステロール恒常性を調節する、項5または項6に記載の方法。

11. 血漿脂質特性の治療を必要とする対象に、グリシン含有トリペプチド分子、またはその薬学的に許容される塩を投与して、前記対象の血漿トリグリセリド、血漿L D Lレベルを低下させるか、アテローム性動脈硬化症の病変のさらなる進行を予防するか、または前記対象の動脈に存在するアテローム性動脈硬化症の病変を退行させ、M A C Eの発症を軽減し、一次心血管事象を予防し、遅延させるかもしくはその重症度を軽減する、前記対象の血漿脂質特性の治療方法。

20

12. 前記グリシン含有トリペプチド分子が、G l y - G l y - L e u、G l y - G l y - d L e u、またはその薬学的に許容される塩である、項11に記載の方法。

13. 前記G l y - G l y - L e u、G l y - G l y - d L e u、またはそれらの薬学的に許容される塩が、アテローム性動脈硬化症の病変を低減する、項11または12に記載の方法。

30

14. 前記G l y - G l y - L e u、G l y - G l y - d L e u、またはその薬学的に許容される塩が、血漿総コレステロール、血漿L D Lコレステロール、非H D Lコレステロール、V L D Lコレステロールまたはそれらの組み合わせを低下させる、項11または12に記載の方法。

15. 脂肪組織における炎症の治療方法及び循環中の炎症マーカーレベルの低減方法であって、それを必要とする対象に、グリシン含有トリペプチド分子、またはその薬学的に許容される塩を投与することを含み、前記グリシン含有トリペプチド分子またはその薬学的に許容される塩の投与により、前記対象の前記脂肪組織及び前記循環中の炎症マーカーを低減する、前記治療方法及び低減方法。

16. 前記循環中の前記炎症マーカーを、G l y - G l y - L e u、G l y - G l y - d L e u、またはその薬学的に許容される塩を前記対象に投与することによって血漿M C P 1レベルを低下させることにより低減する、項15に記載の方法。

40

17. 前記脂肪組織における炎症が、精巣上体脂肪組織(E A T)または皮下脂肪組織(S A T)に存在し、M C P 1 mRNAのレベルを低下させる、項15に記載の方法。

18. レプチンの血漿レベルを低下させるための治療を必要とする対象に、グリシン含有トリペプチド分子、またはその薬学的に許容される塩を投与することを含み、前記グリシン含有トリペプチド分子の投与が、血漿レプチンのレベルを低下させる、前記レプチンの血漿レベルを低下させるための対象の治療方法。

19. 前記治療を、G l y - G l y - L e u、G l y - G l y - d L e u、またはその薬学的に許容される塩を用いて行う、項18に記載の方法。

50

20. 治療を必要とする対象に $Gly-Gly-Leu$ 、 $Gly-Gly-dLeu$ 、またはその薬学的に許容される塩を投与することを含む、前記対象の治療方法であって、前記対象が肝疾患を有する、前記治療方法。

21. 前記肝疾患が、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) もしくは非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)、またはアルコール性脂肪肝である、項20に記載の方法。

22. $Gly-Gly-Leu$ 及び／または $Gly-Gly-dLeu$ 、またはその薬学的に許容される塩を対象に投与することを含む、前記対象における NAFLD 活動性スコア (NAS) の安定化方法または低減方法。

23. 前記方法が、NASの脂肪肝成分の進行を遅延させるか、安定化するか、または低減することを含む、項22に記載の方法。

24. 前記方法が、NASの小葉の炎症成分の進行遅延、安定化、または低減することを含む、項22～23のいずれか一項に記載の方法。

25. 前記方法が、NASの肝臓バルーニング成分の進行遅延、安定化、または低減することを含む、項22～24のいずれか一項に記載の方法。

26. NASが、 $Gly-Gly-Leu$ 、 $Gly-Gly-dLeu$ 、またはその薬学的に許容される塩での6か月の治療後、少なくとも1.5ポイント異なる、項22～25のいずれか一項に記載の方法。

27. 肝線維症の軽減を必要とする対象における前記肝線維症の軽減方法であって、 $Gly-Gly-Leu$ 、 $Gly-Gly-dLeu$ 、またはその薬学的に許容される塩を前記対象に投与することを含む、前記軽減方法。

28. アテローム性動脈硬化症の治療方法であって、前記方法が、それを必要とする対象に、治療有効量のグリシン含有トリペプチド分子またはその薬学的に許容される塩を投与することを含む、前記治療方法。

29. 前記グリシン含有トリペプチド分子が、 $Gly-Gly-Leu$ 、 $Gly-Gly-dLeu$ 、またはその薬学的に許容される塩である、項28に記載の方法。

30. 心筋梗塞、動脈硬化症、冠動脈疾患、頸動脈疾患、末梢動脈疾患、アテローム血栓性脳卒中、動脈瘤、または慢性腎疾患からなる群から選択されるアテローム性動脈硬化症の合併症を治療するためのグリシン含有トリペプチド分子を、前記合併症を有する対象に投与することによる、前記合併症の治療方法。

31. 前記グリシン含有トリペプチド分子が、 $Gly-Gly-Leu$ 、 $Gly-Gly-dLeu$ 、またはその薬学的に許容される塩である、項30に記載の方法。

32. 前記方法が、コレステロール吸収阻害剤、PCSK9阻害剤、PPAR α アゴニスト、ACE阻害剤、カルシウムチャネル遮断薬、ARB、利尿剤、レニン、GLP-1またはその合成バリエーション、インスリン、またはその合成バリエーション、メトホルミン、スルホニル尿素化合物、チアゾリジンジオン (TZD)、SGLT2阻害剤、DPP-IV阻害剤、HMGCoAレダクターゼ阻害剤、プロタンパク質転換酵素サブチリシン／ケキシン9型 (PCSK9) 阻害剤、エゼチミブ、ゲムフィブロジル、フェノフィブラート、クロフィブラート、ベザフィブラート、ペマフィブラート、ゲムカベン (CI-1027)、ベンポド酸 (ETC-1002)、ACC阻害剤、ApoC-III阻害剤、ACL阻害剤、処方魚油、CETP阻害剤、抗線維化剤、及びそれらの組み合わせを含む、第2の治療薬を、それを必要とする前記対象に投与することをさらに含む、項1～31のいずれか一項に記載の方法。

33. 選択されたトリペプチド、場合によりスタチン、及び使用説明書を含む、NAFLDまたはNASHを有する対象を治療するためのキット。

34. 前記キットが、DT-109 ($Gly-Gly-Leu$) 及び／または DT-110 ($Gly-Gly-dLeu$)、場合によりスタチン、及び使用説明書を含む、項30に記載のキット。

35. 前記キットが、場合により、コレステロール吸収阻害剤、PCSK9阻害剤、PPAR α アゴニスト、ACE阻害剤、カルシウムチャネル遮断薬、ARB、利尿剤、レニン、GLP-1またはその合成バリエーション、インスリン、またはその合成バリエーション、メト

10

20

30

40

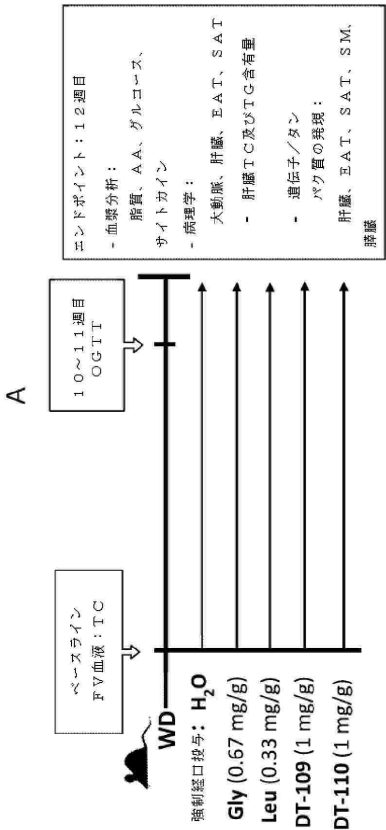
50

ホルミン、スルホニル尿素化合物、チアゾリジンジオン（TZD）、SGLT2阻害剤、DPP-IV阻害剤、HMGCoAレダクターゼ阻害剤、プロタンパク質転換酵素サブチリシン／ケキシン9型（PCSK9）阻害剤、エゼチミブ、ゲムフィブロジル、フェノフィブラート、クロフィブラート、ベザフィブラート、ペマフィブラート、ゲムカベン（CI-1027）、ベンポド酸（ETC-1002）、ACC阻害剤、ApoC-III阻害剤、ACL阻害剤、処方魚油、CETP阻害剤、抗線維化剤、及びそれらの組み合わせをさらに含む、項32または33に記載のキット。

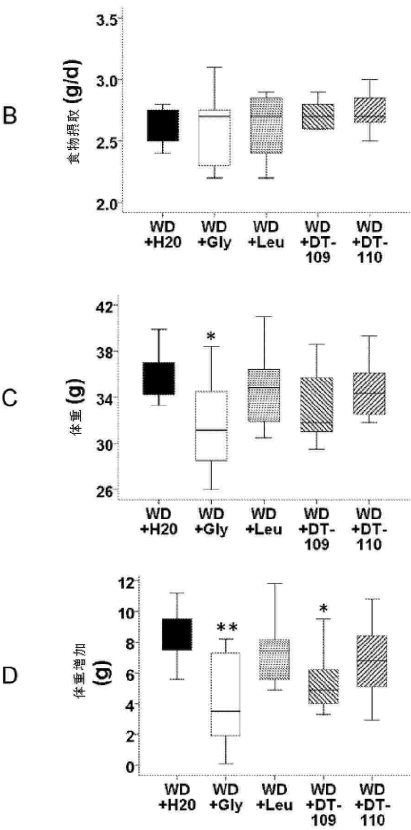
36. 前記キットが、場合によりエゼチミブを含む、項32または項33に記載のキット。

【図面】

【図1-1】



【図1-2】



10

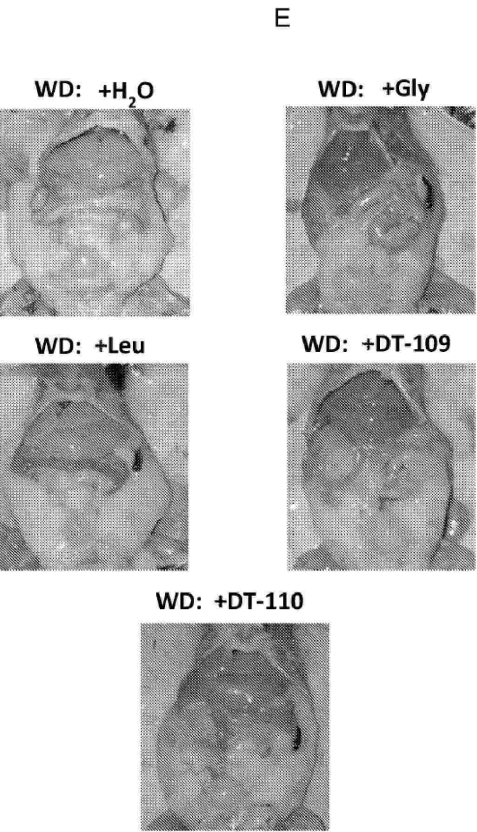
20

30

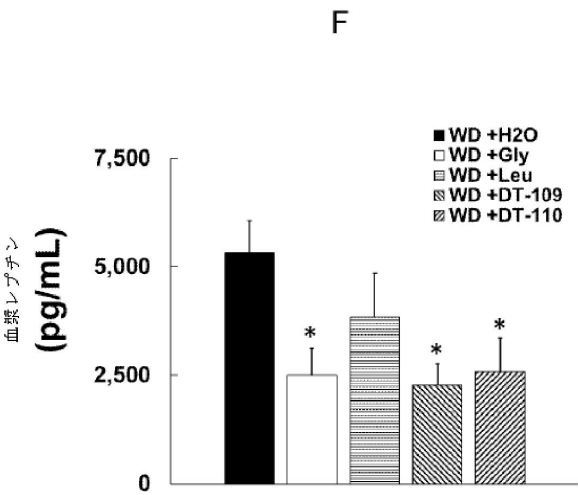
40

50

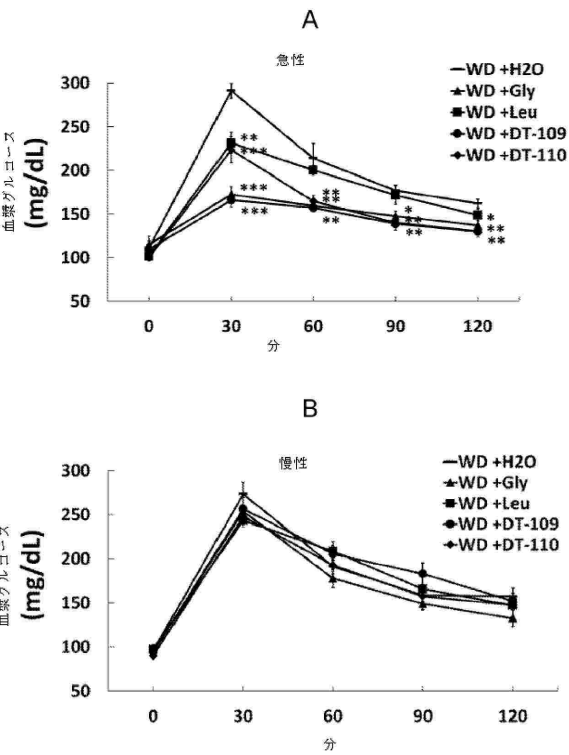
【図 1 - 3】



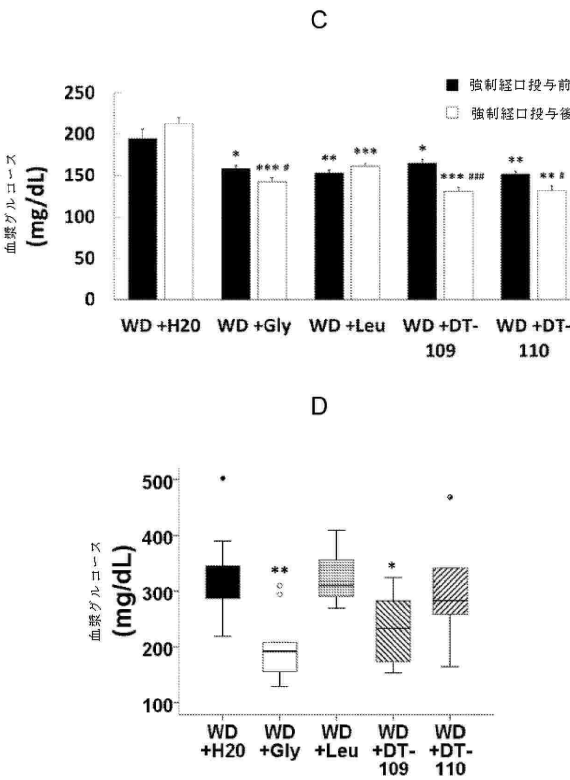
【図 1 - 4】



【図 2 - 1】



【図 2 - 2】



10

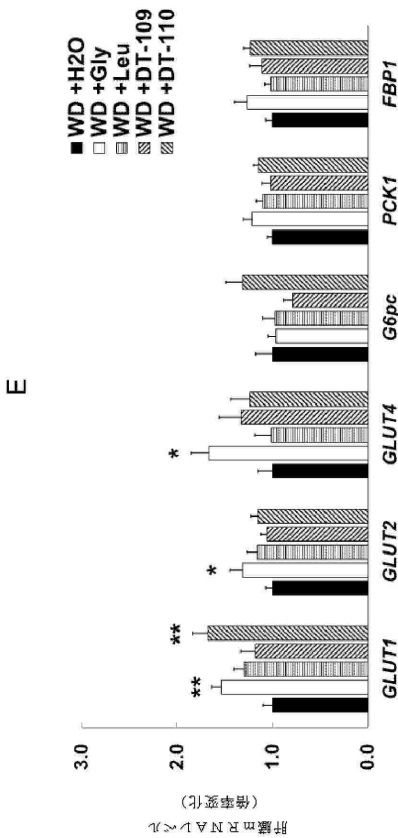
20

30

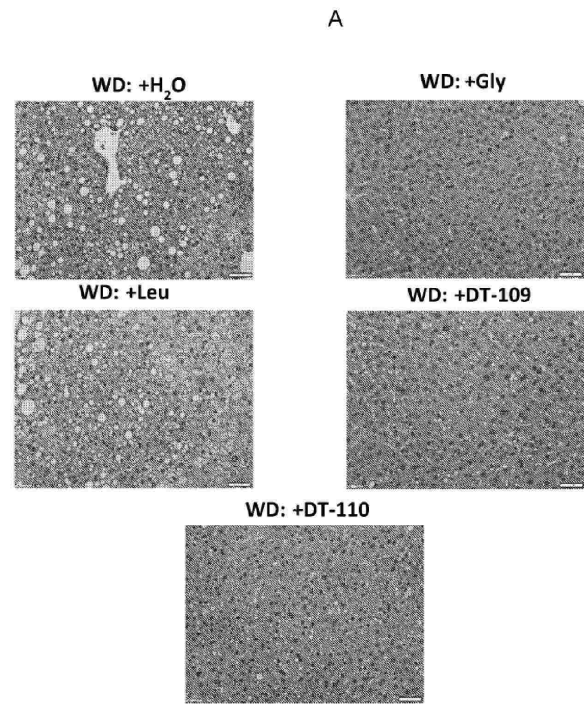
40

50

【図 2 - 3】



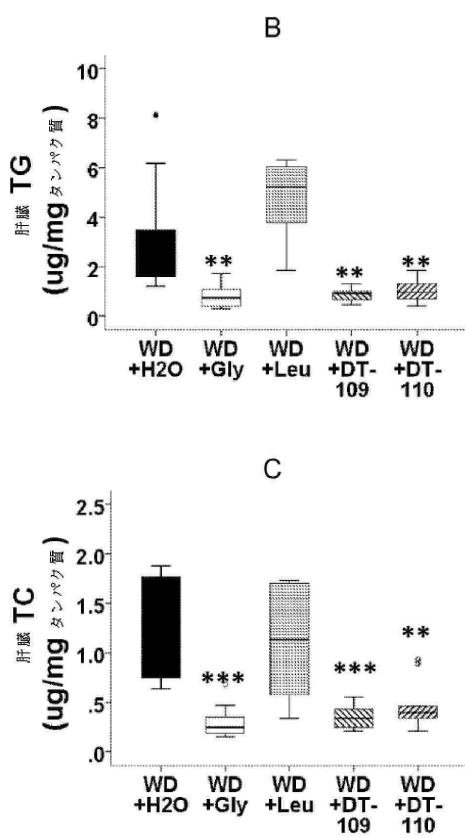
【図 3 - 1】



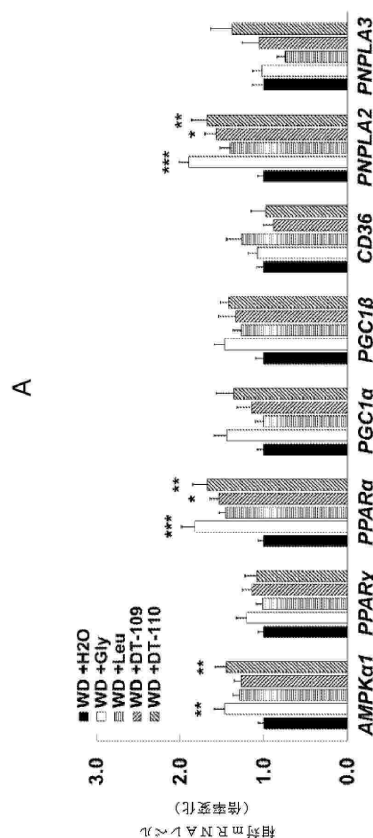
10

20

【図 3 - 2】



【図 4 - 1】

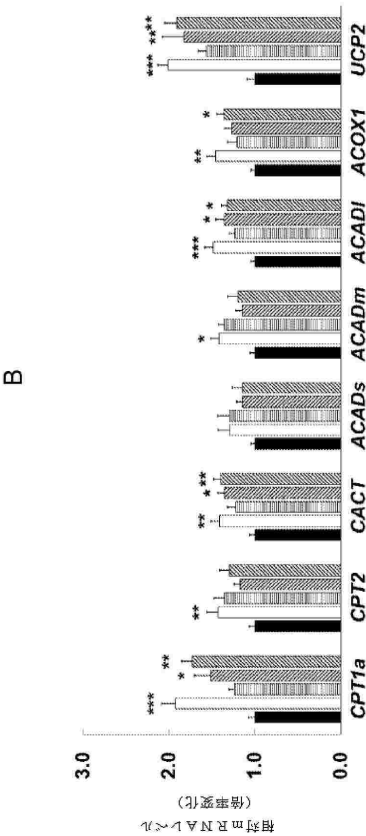


30

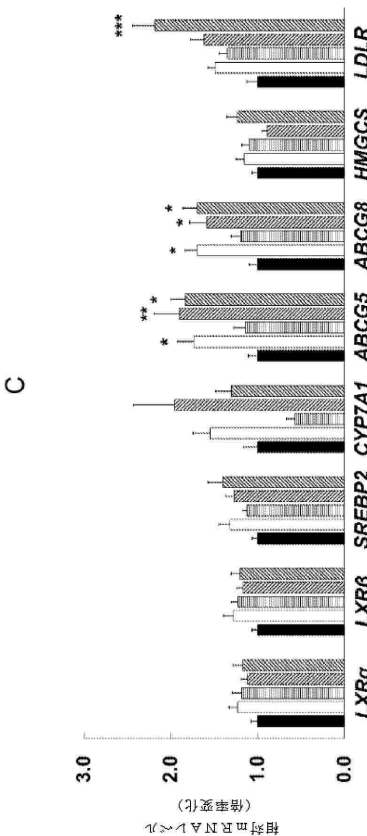
40

50

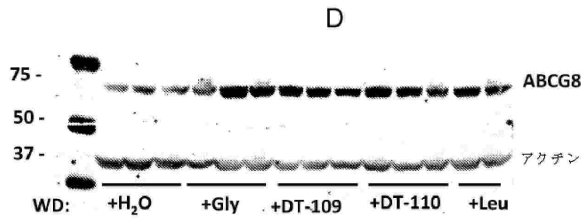
【図 4 - 2】



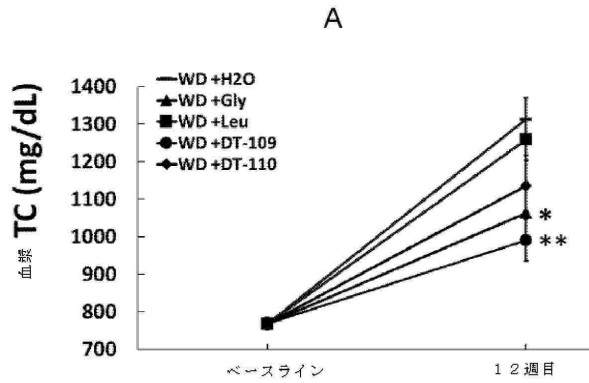
【図 4 - 3】



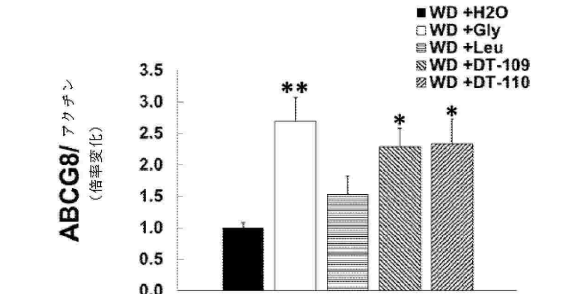
【図 4 - 4】



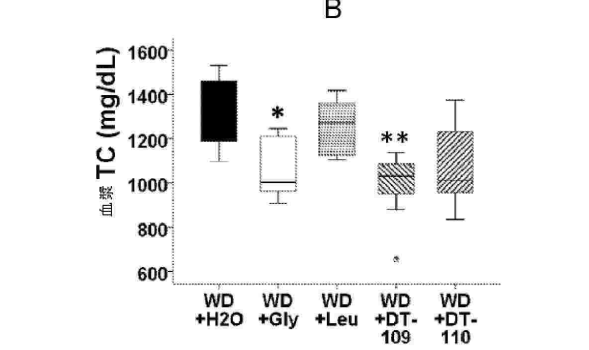
【図 5 - 1】



【図 5 - 2】



【図 5 - 3】



10

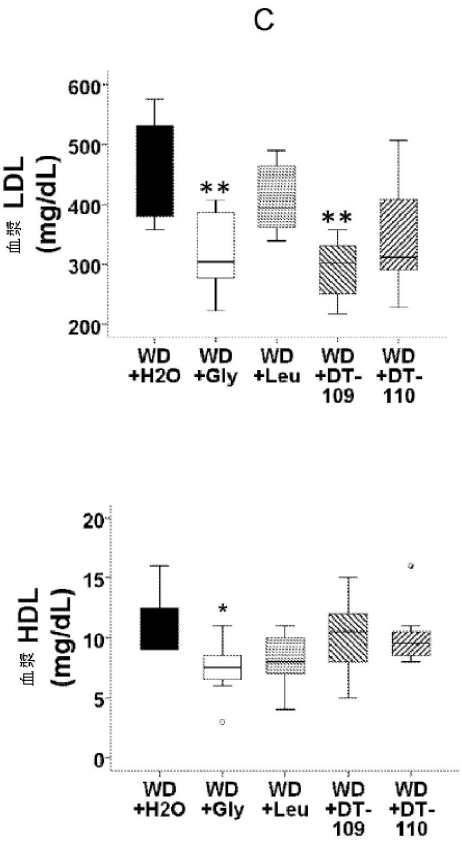
20

30

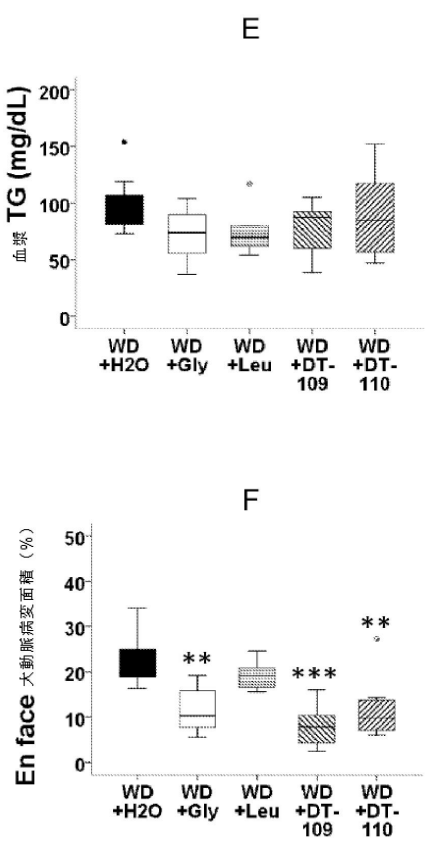
40

50

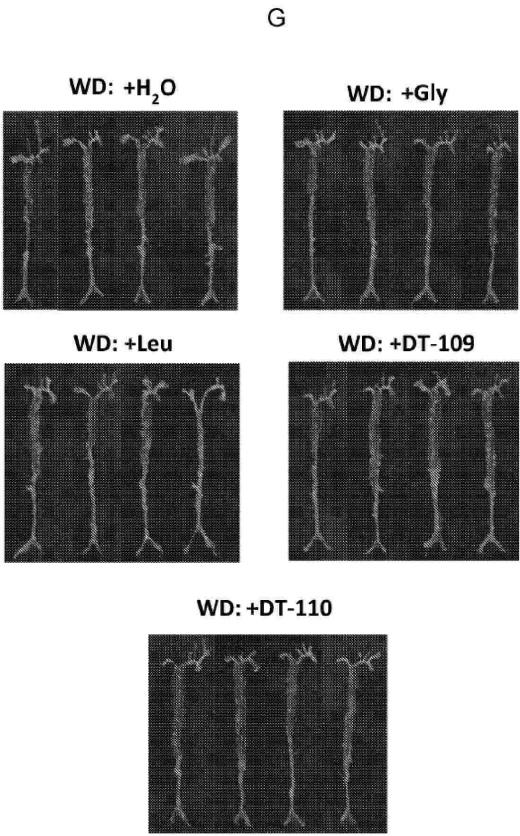
【図 5 - 2】



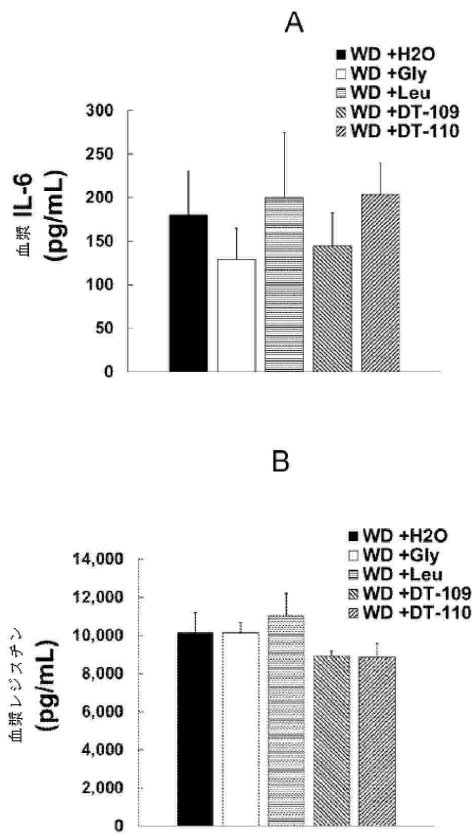
【図 5 - 3】



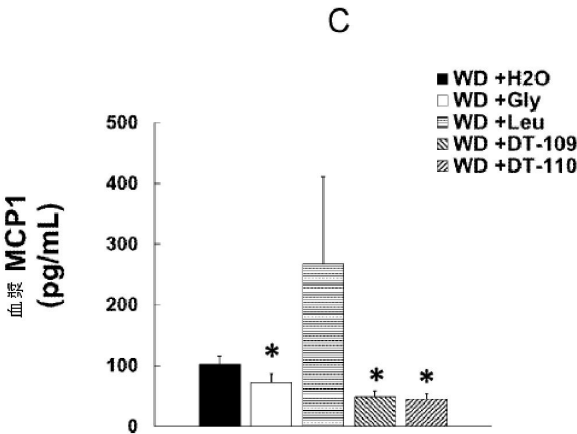
【図 5 - 4】



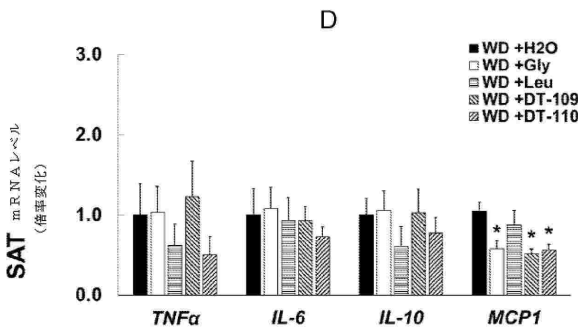
【図 6 - 1】



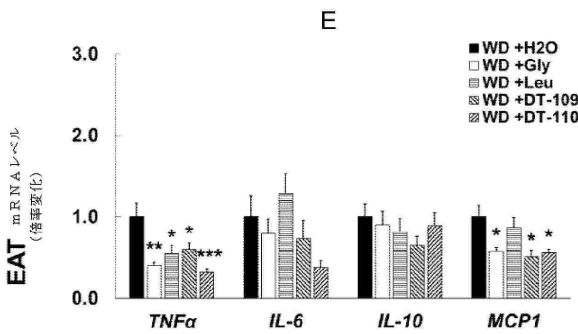
【図 6 - 2】



【図 6 - 3】

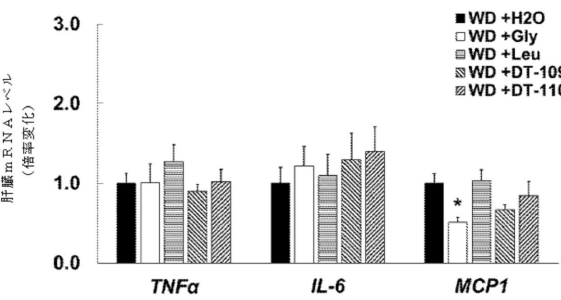


10

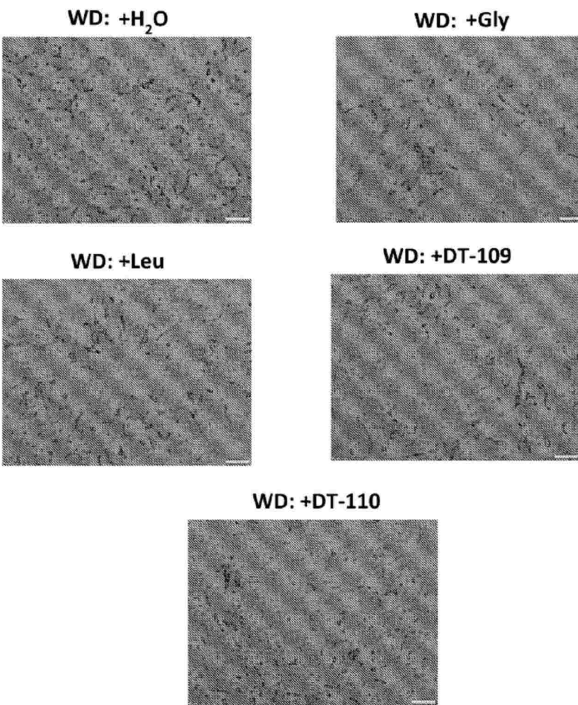


20

【図 7 A】



【図 7 B】

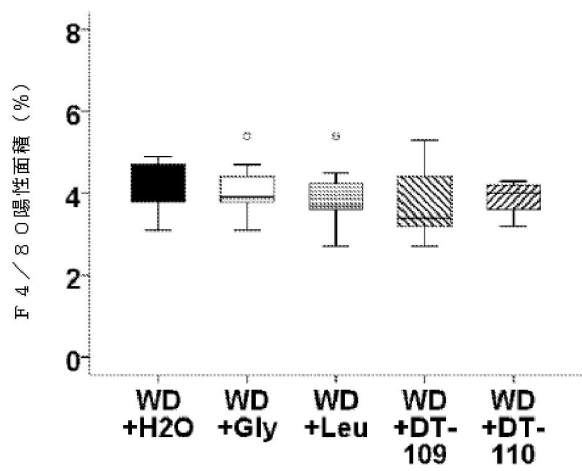


30

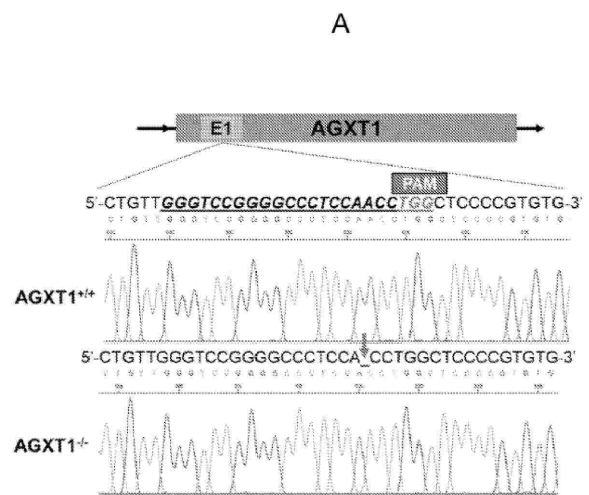
40

50

【図 7 C】



【図 8 - 1】



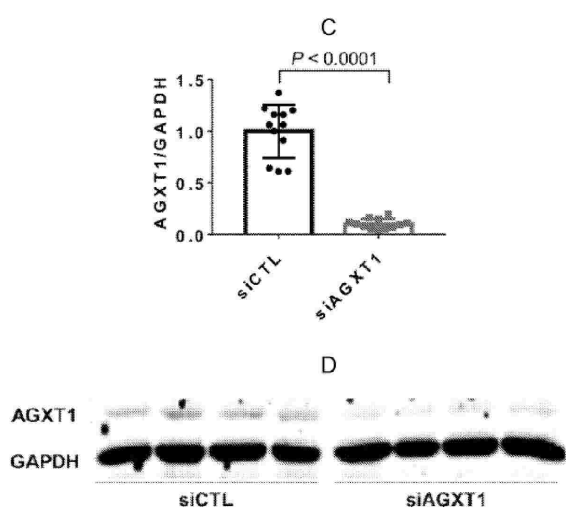
10

B

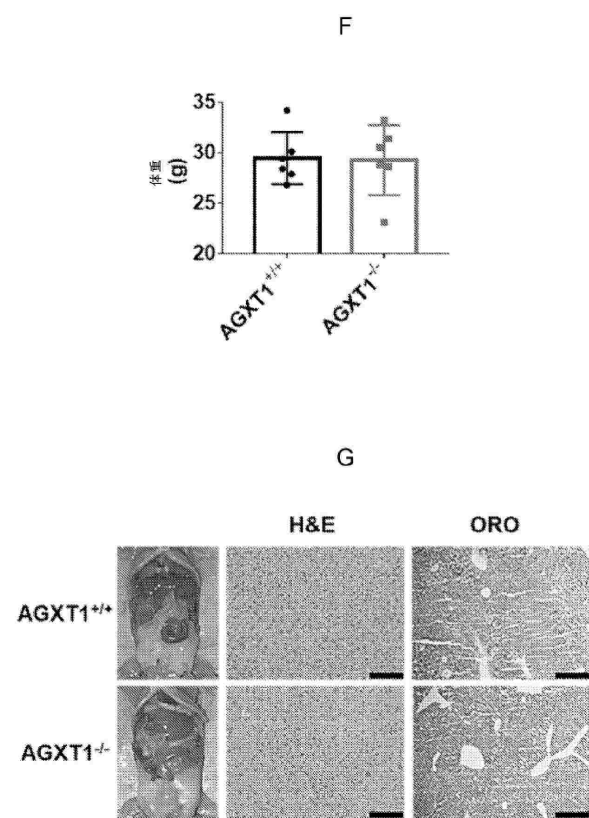


20

【図 8 - 2】



【図 8 - 3】

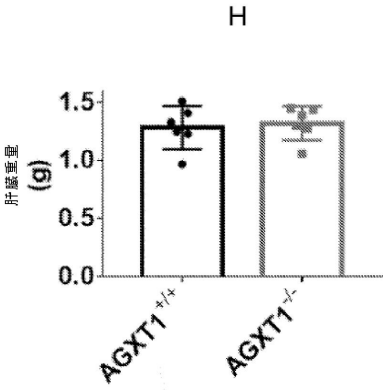


30

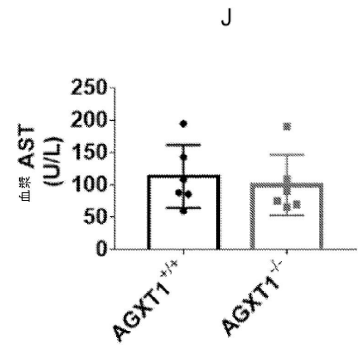
40

50

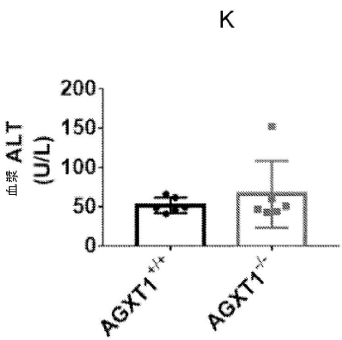
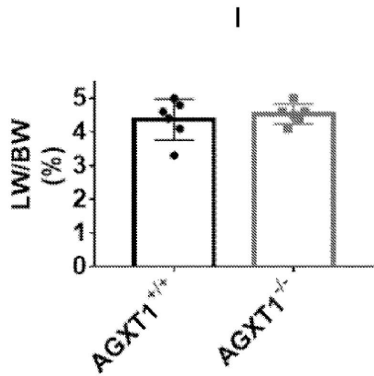
【図 8 - 4】



【図 8 - 5】

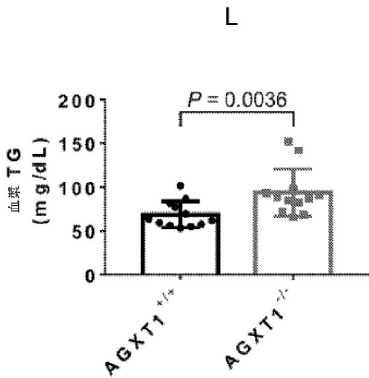


10

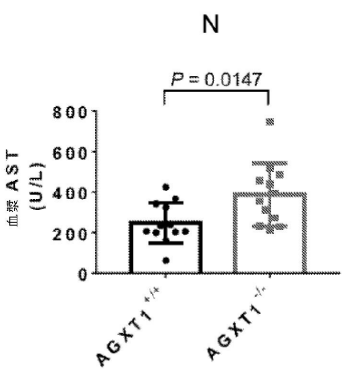


20

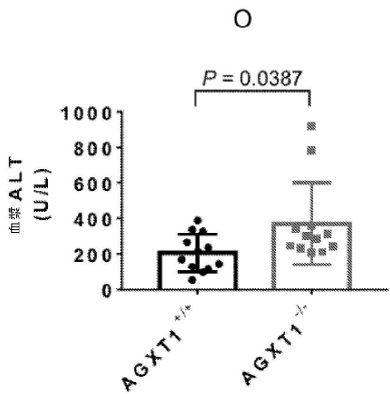
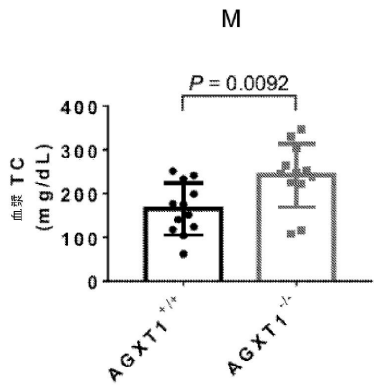
【図 8 - 6】



【図 8 - 7】



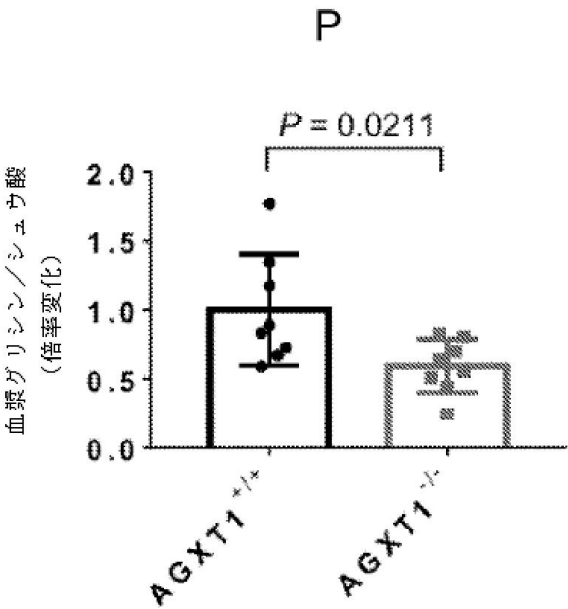
30



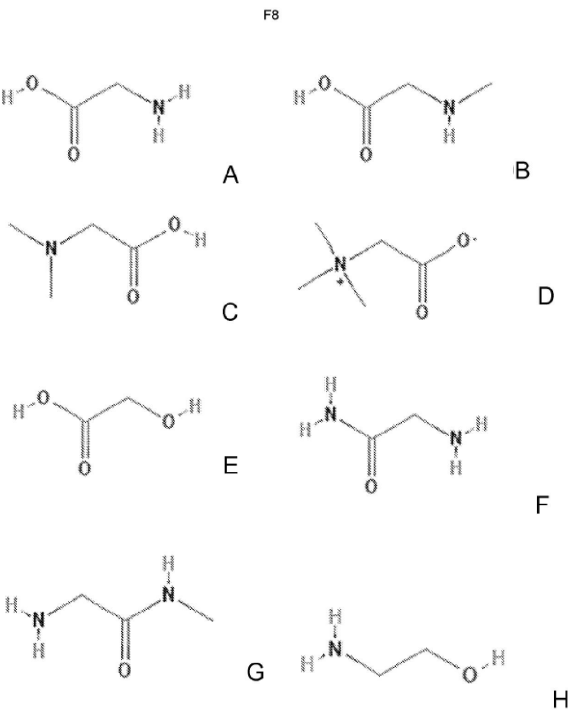
40

50

【図 8 - 8】



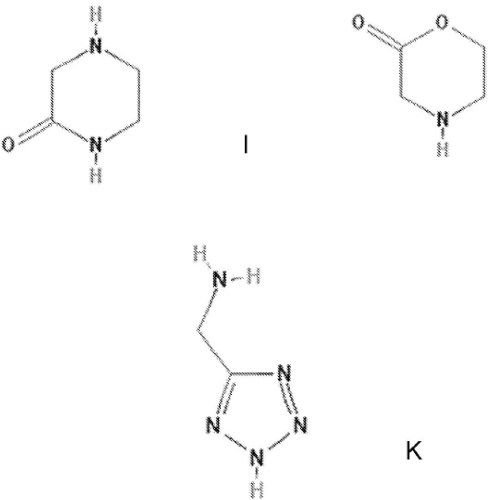
【図 9 - 1】



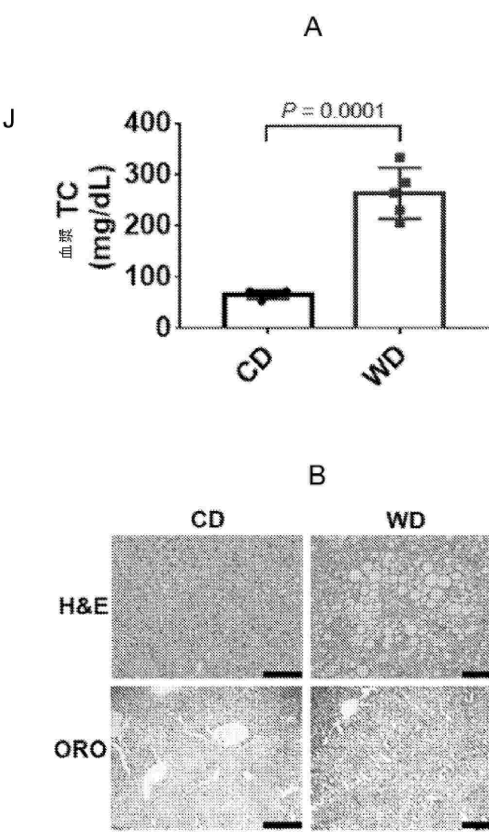
10

20

【図 9 - 2】



【図 10 - 1】

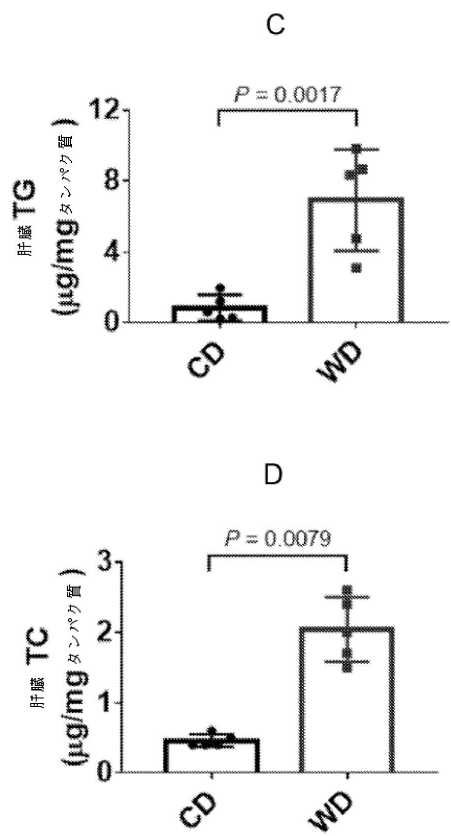


30

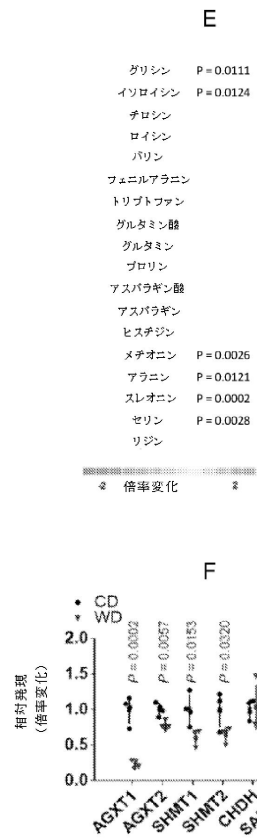
40

50

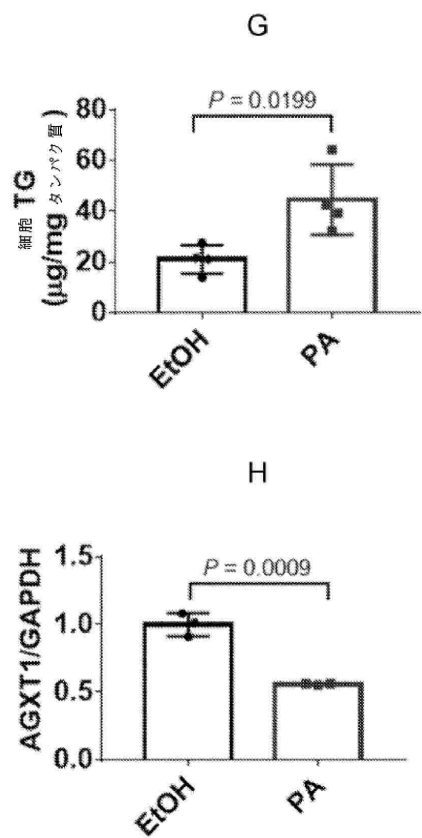
【図 1 0 - 2】



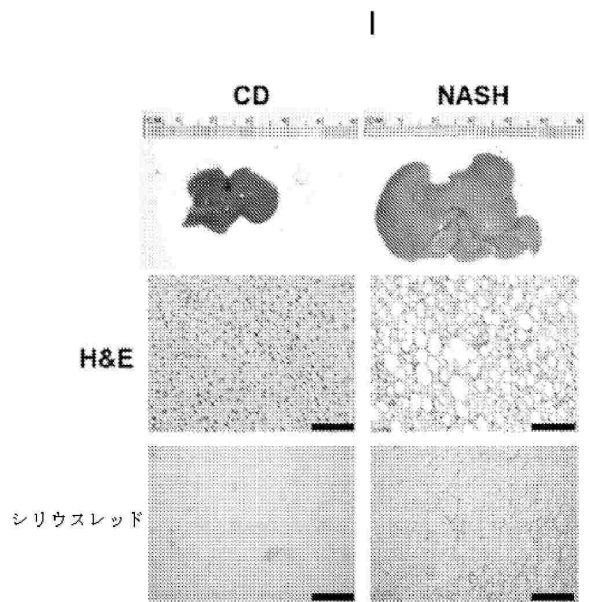
【図 1 0 - 3】



【図 1 0 - 4】



【図 1 0 - 5】



10

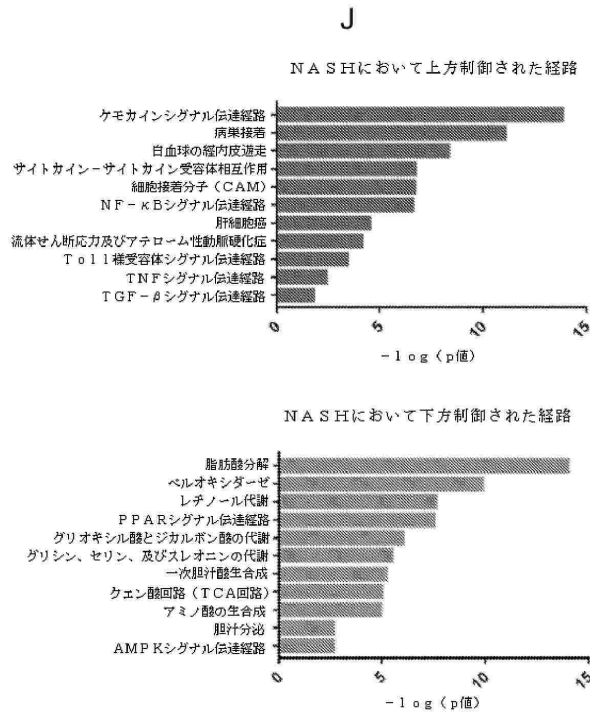
20

30

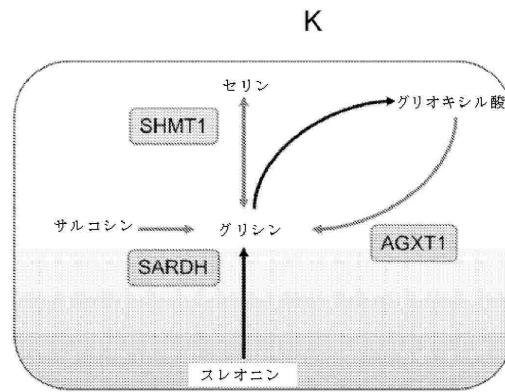
40

50

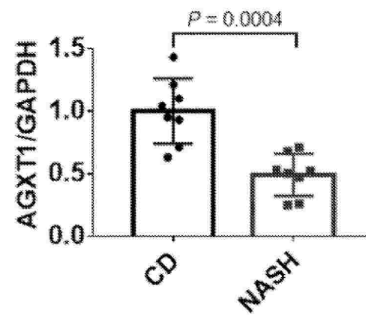
【図 10-6】



【図 10-7】

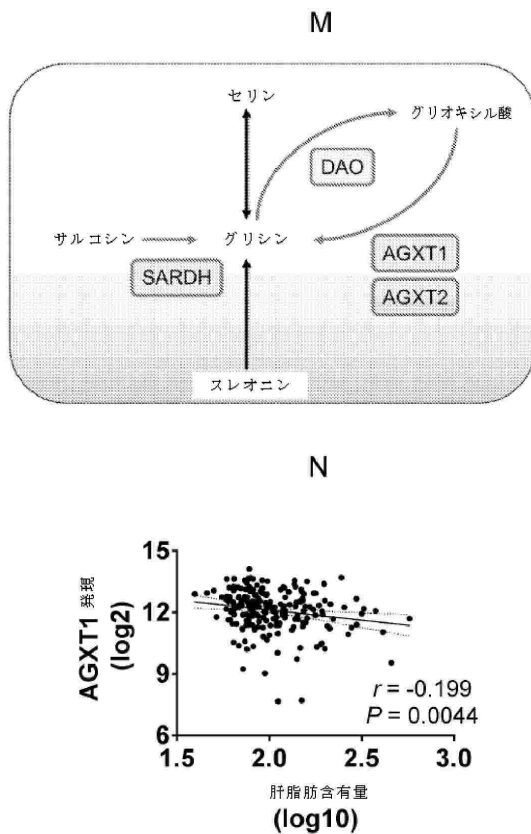


10

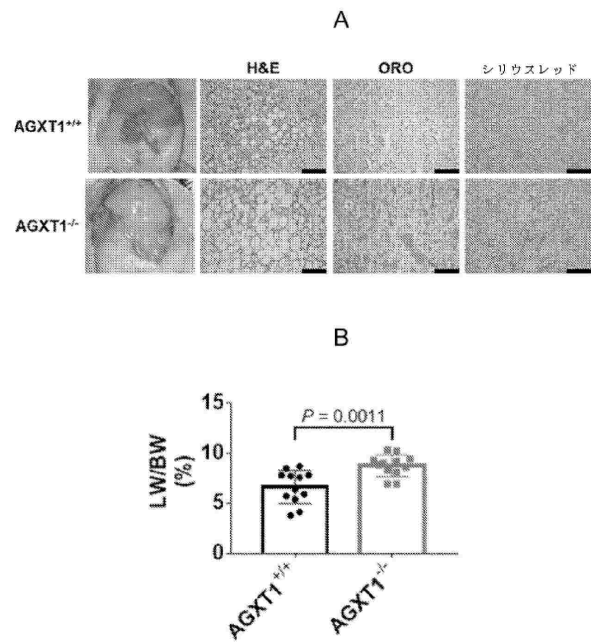
L

20

【図 10-8】



【図 11-1】

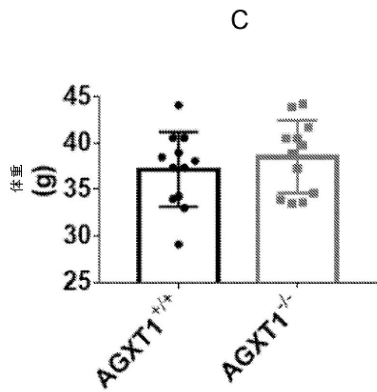


30

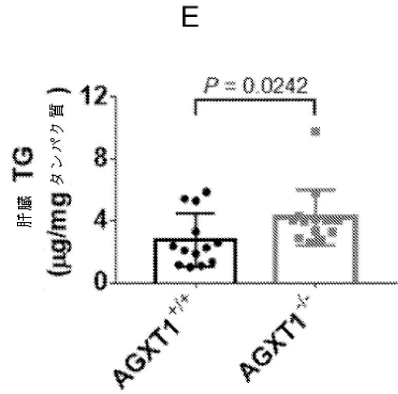
40

50

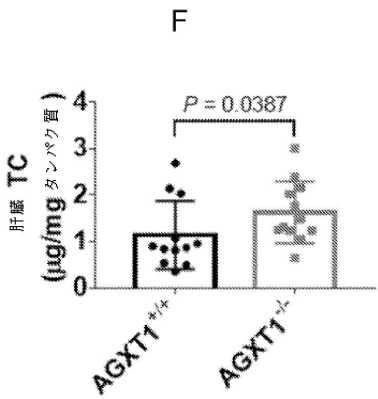
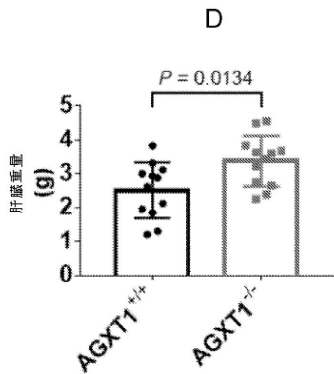
【図 1 1 - 2】



【図 1 1 - 3】

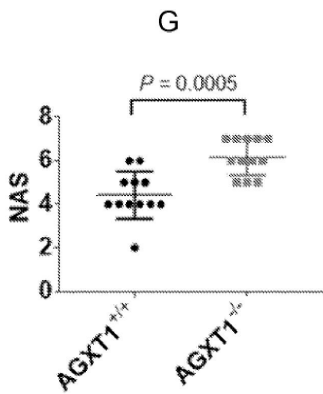


10



20

【図 1 1 - 4】

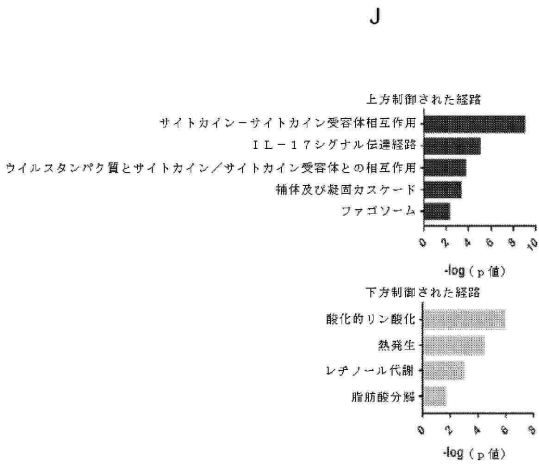
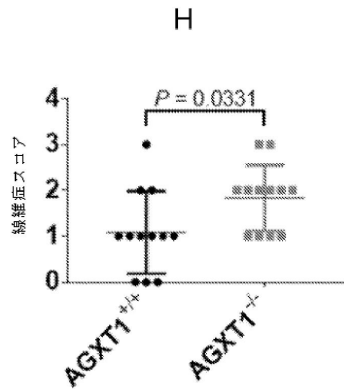


【図 1 1 - 5】

I

	AGXT1 ^{+/+}	AGXT1 ^{+/-}
脂肪肝	2.0 ± 0.6	2.8 ± 0.5
肝細胞バルーン化	1.8 ± 0.4	1.9 ± 0.3
小葉の炎症	0.6 ± 0.7	1.6 ± 0.7

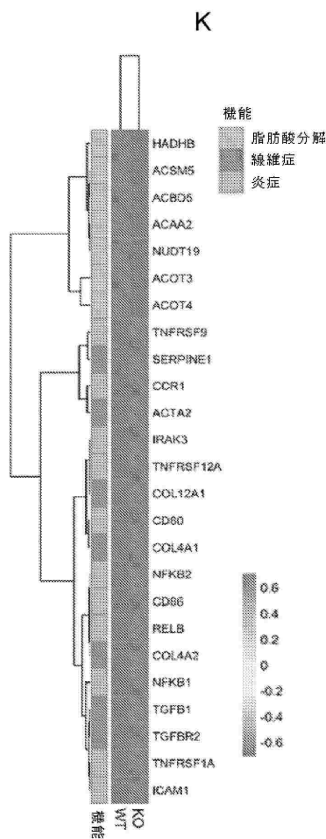
30



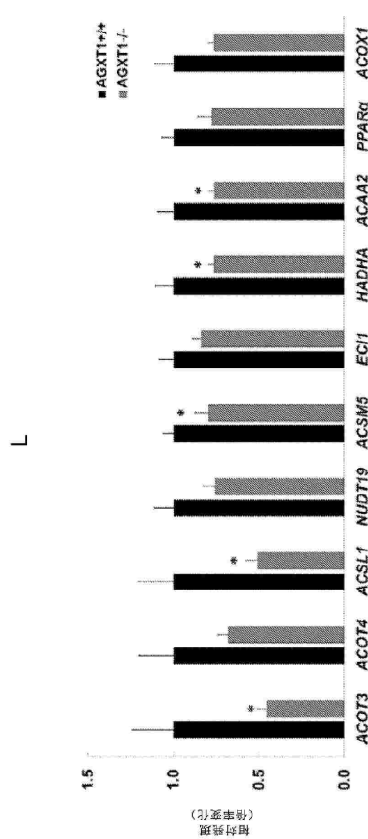
40

50

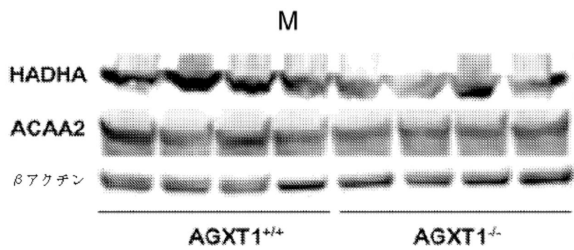
【図 1 1 - 6】



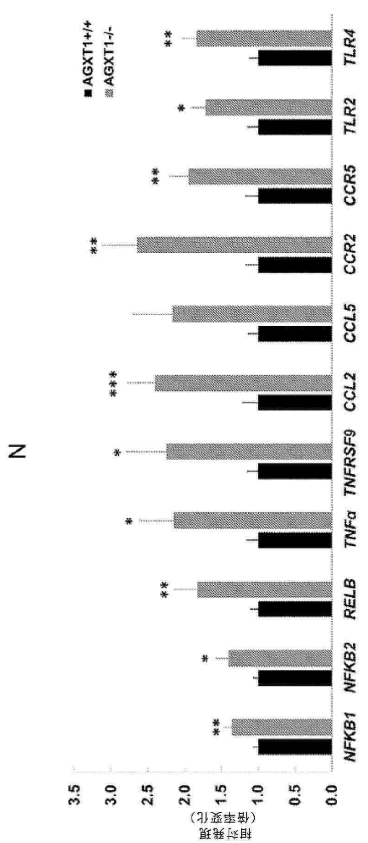
【図 1 1 - 7】



【図 1 1 - 8】



【図 1 1 - 9】



10

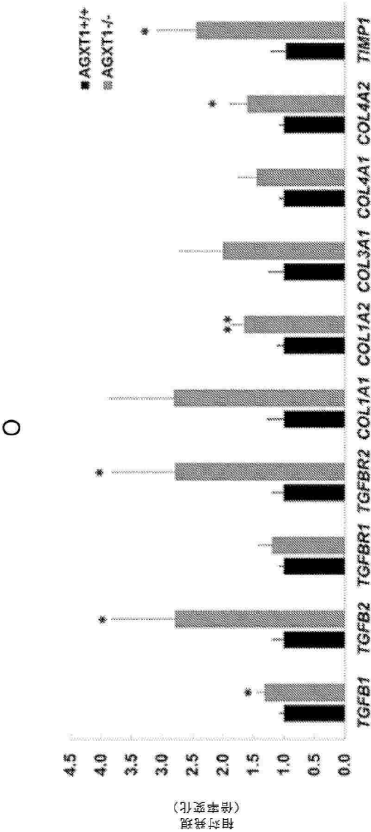
20

30

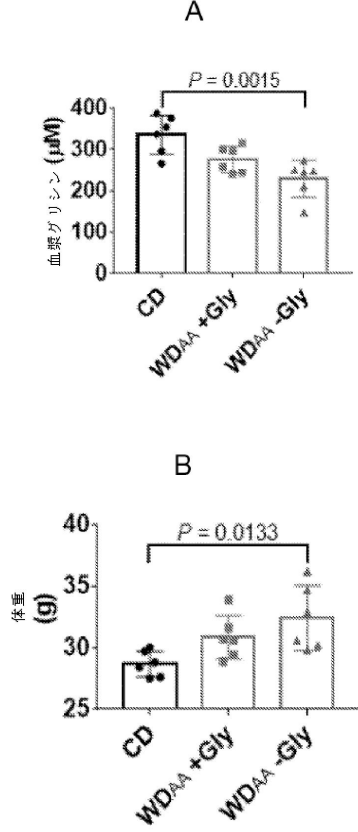
40

50

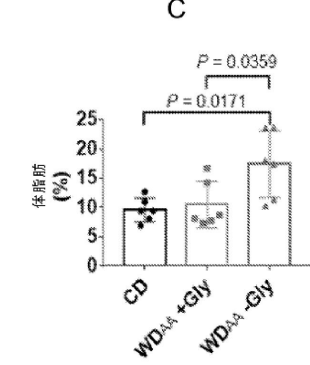
【図 1 1 - 1 0】



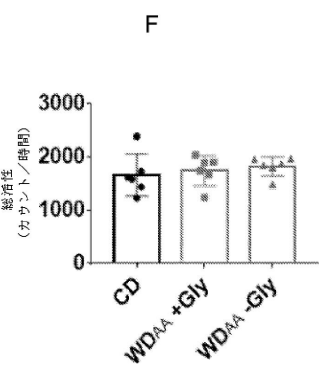
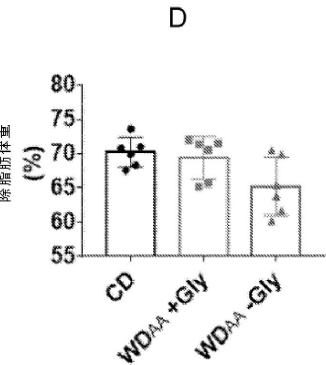
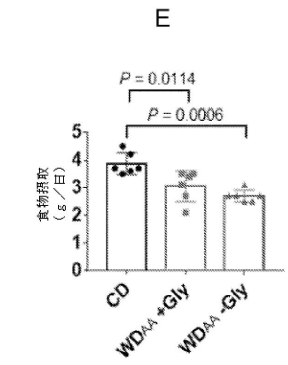
【図 1 2 - 1】



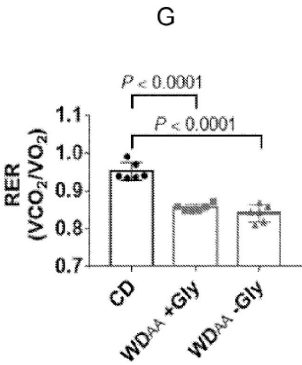
【図 1 2 - 2】



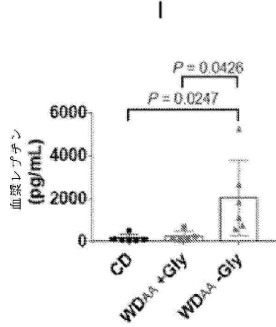
【図 1 2 - 3】



【図 1 2 - 4】

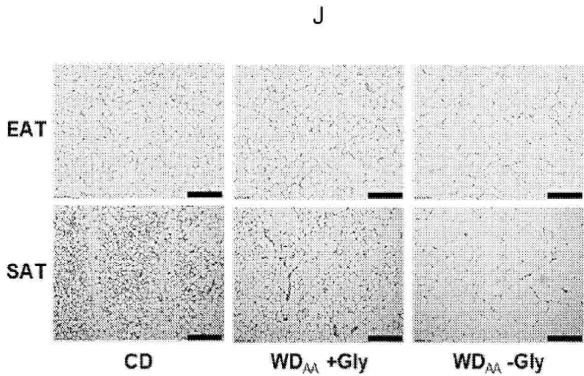
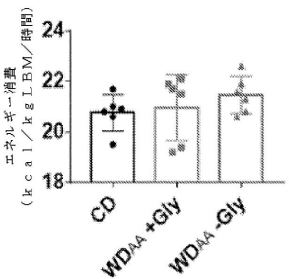


【図 1 2 - 5】



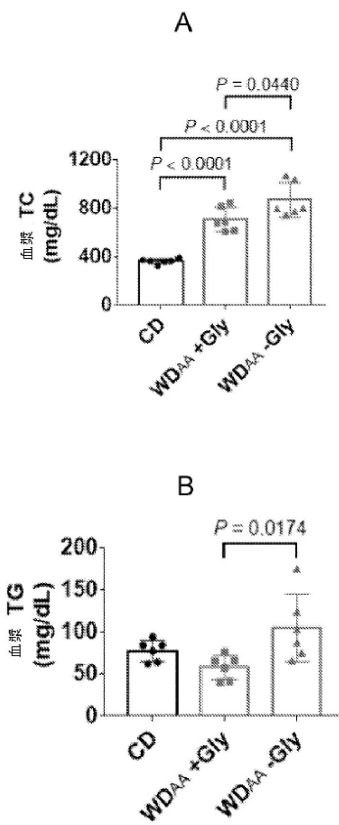
10

H

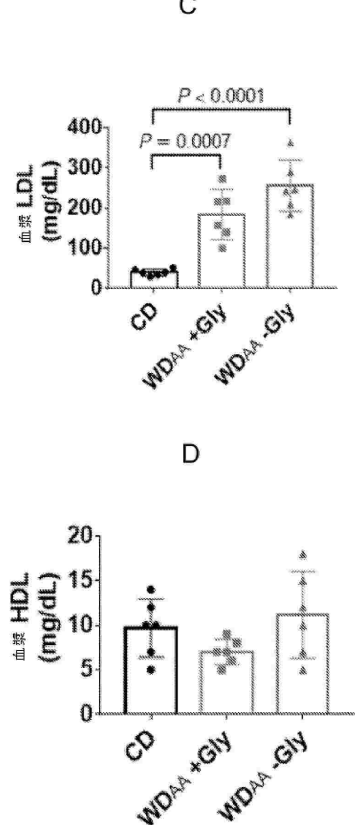


20

【図 1 3 - 1】



【図 1 3 - 2】

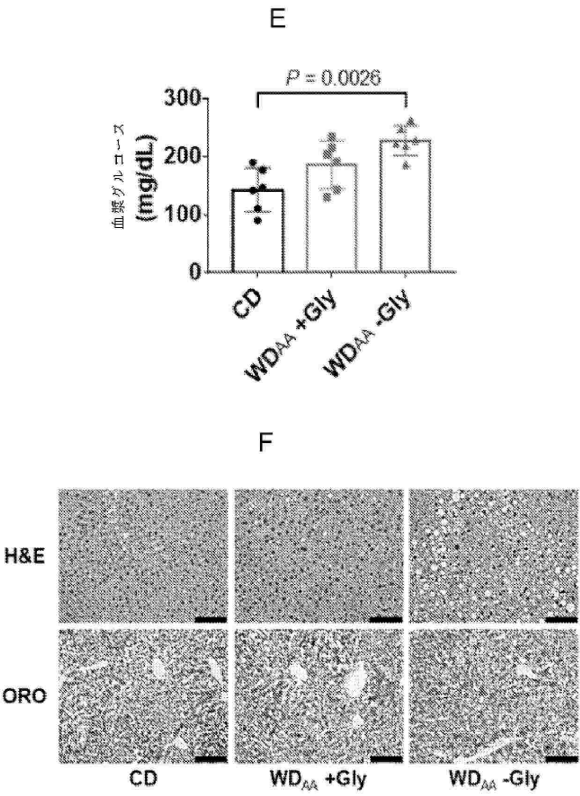


30

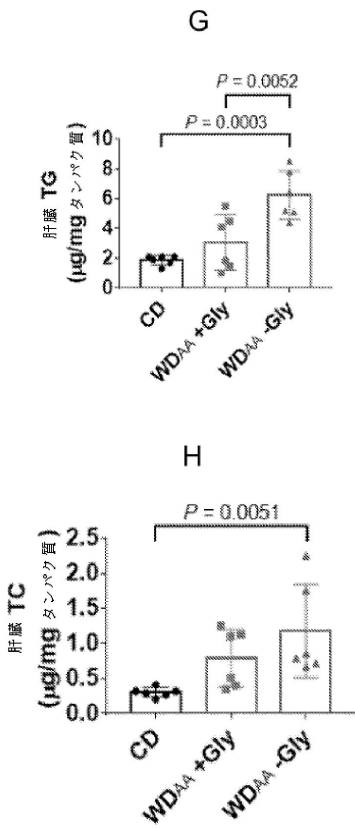
40

50

【図 1 3 - 3】



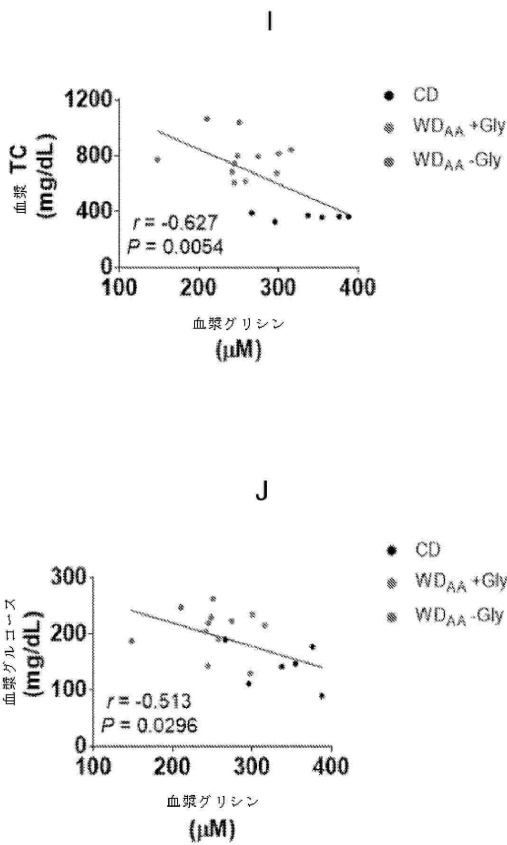
【図 1 3 - 4】



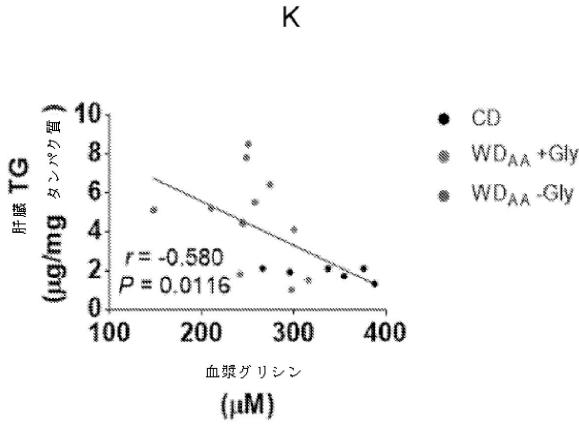
10

20

【図 1 3 - 5】



【図 1 3 - 6】

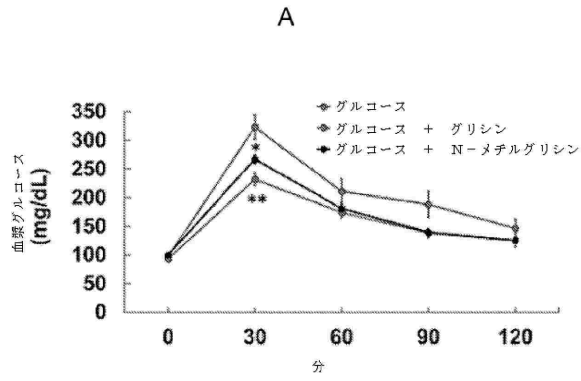


30

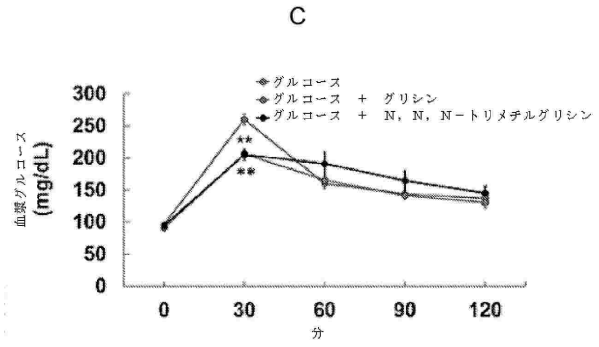
40

50

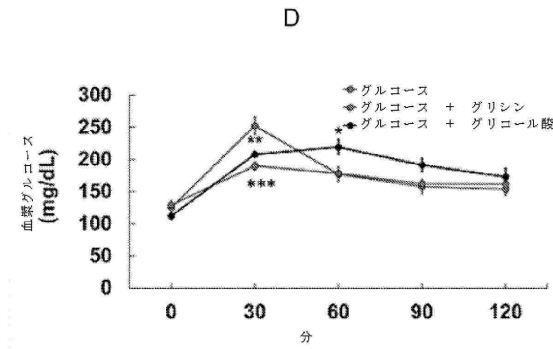
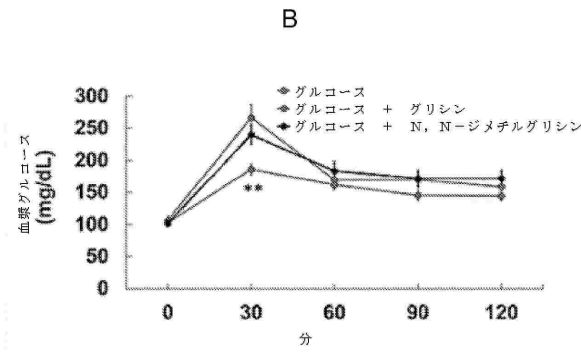
【図 1 4 - 1】



【図 1 4 - 2】

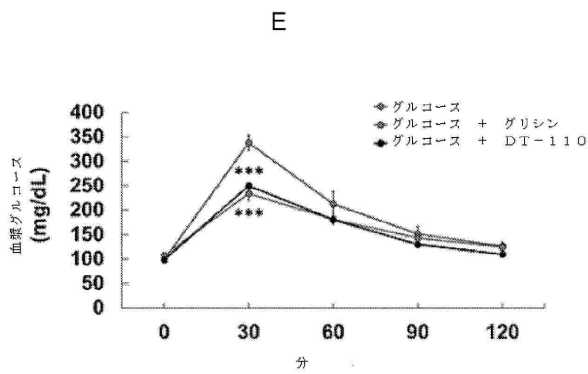


10

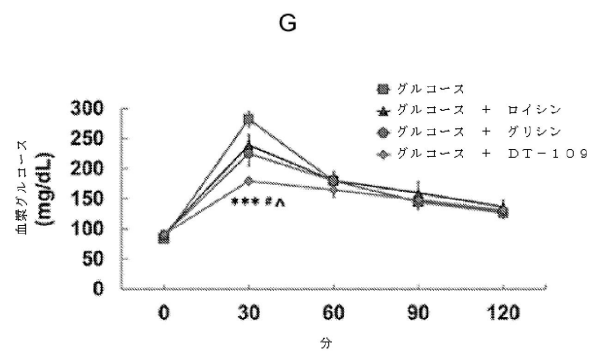


20

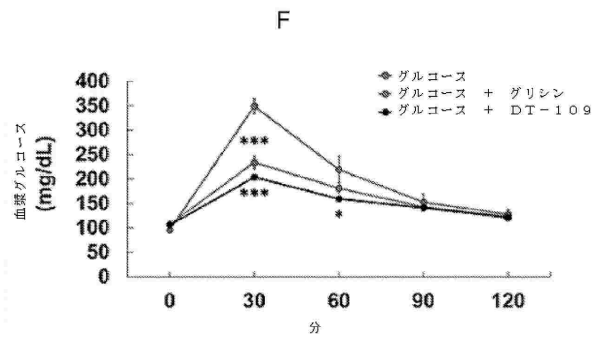
【図 1 4 - 3】



【図 1 4 - 4】



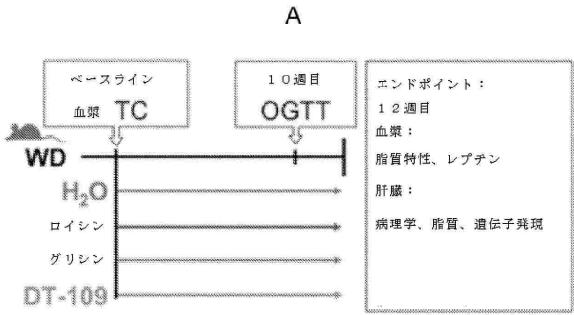
30



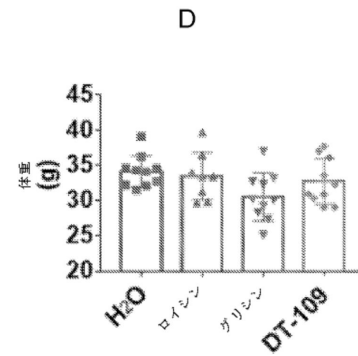
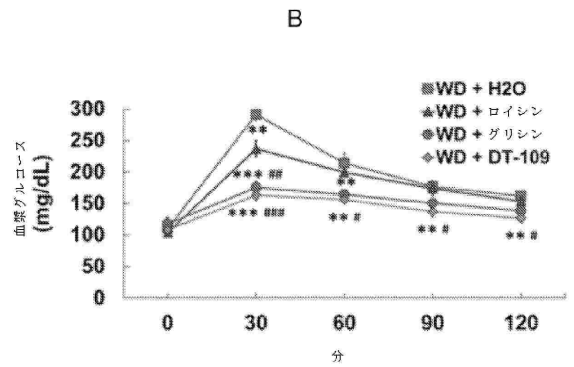
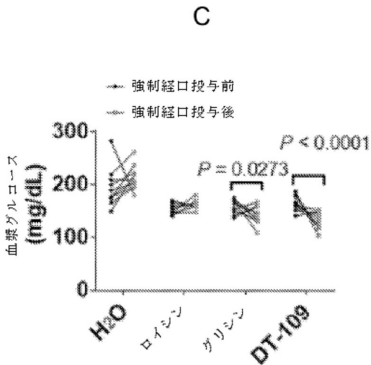
40

50

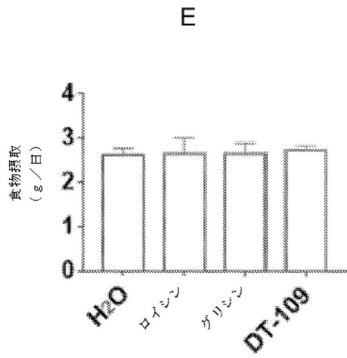
【図 1 5 - 1】



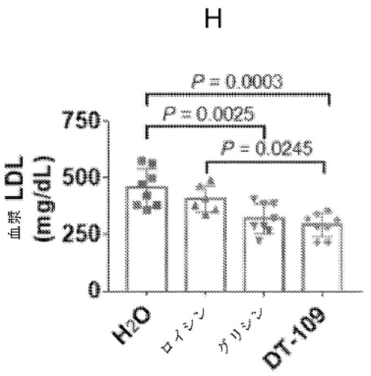
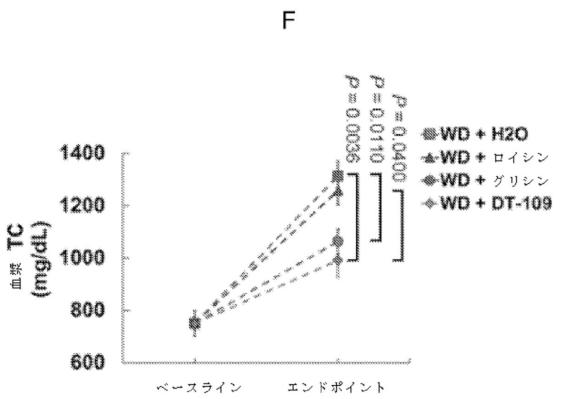
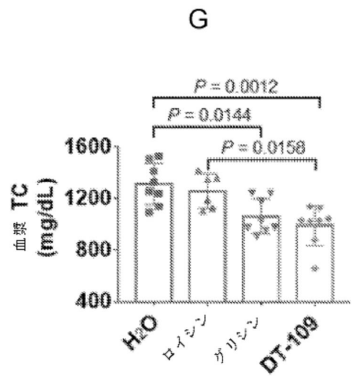
【図 1 5 - 2】



【図 1 5 - 3】



【図 1 5 - 4】



10

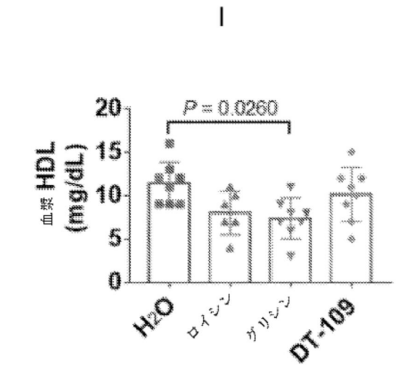
20

30

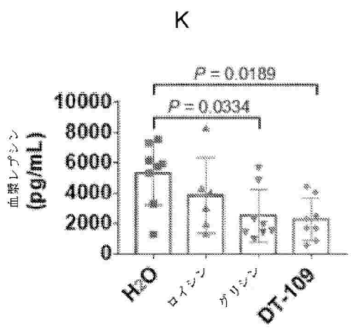
40

50

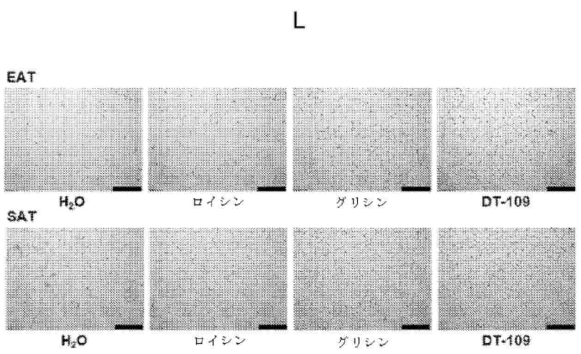
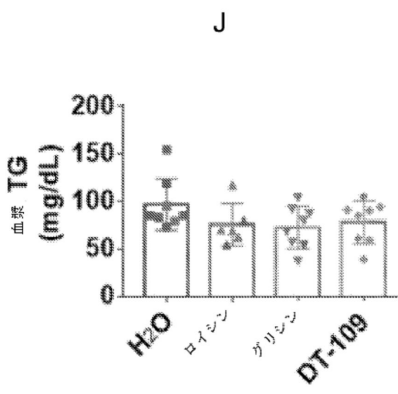
【図 1 5 - 5】



【図 1 5 - 6】

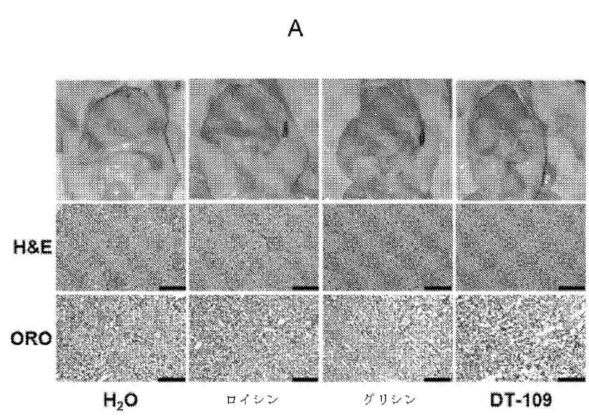


10

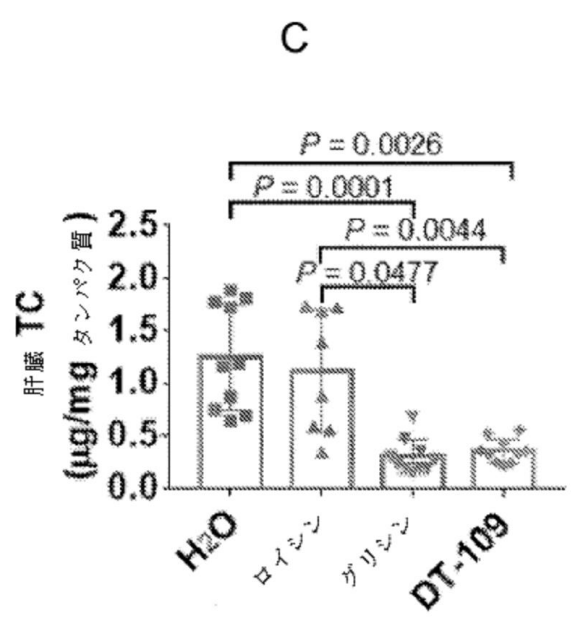


20

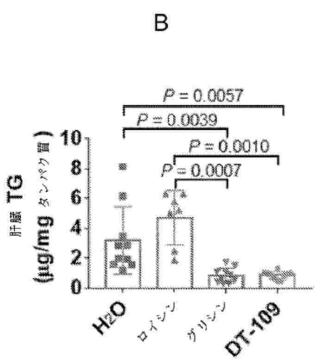
【図 1 6 - 1】



【図 1 6 - 2】



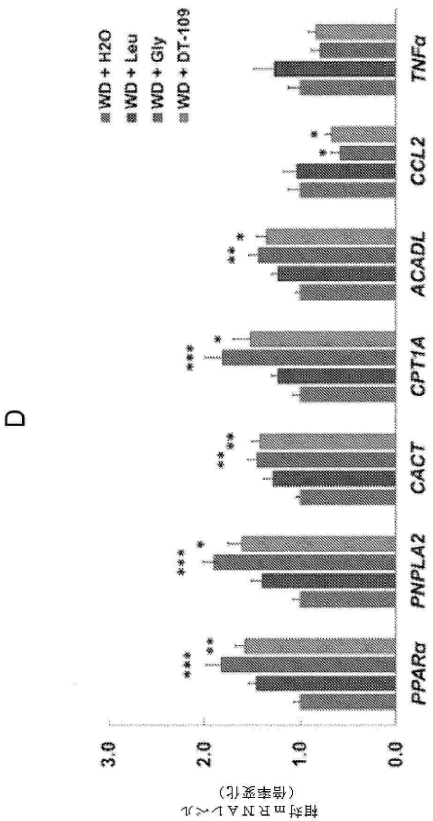
30



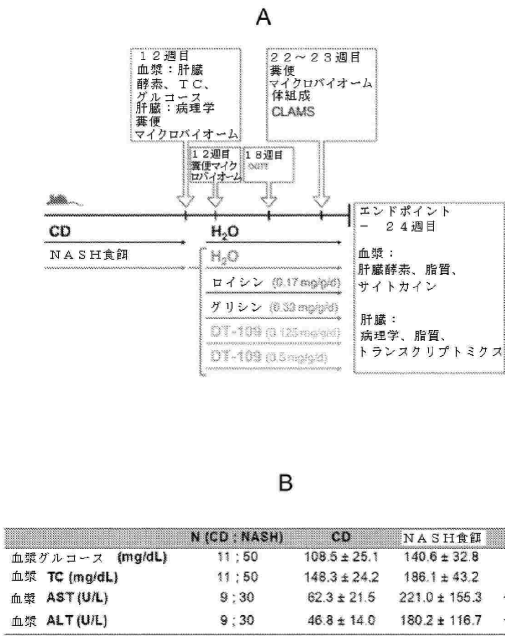
40

50

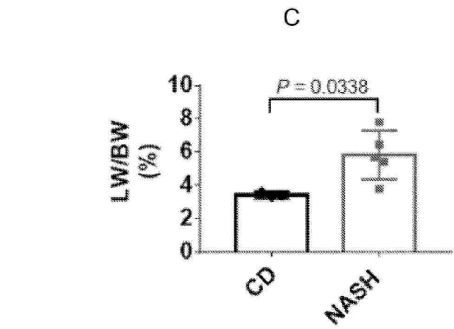
【図 1 6 - 3】



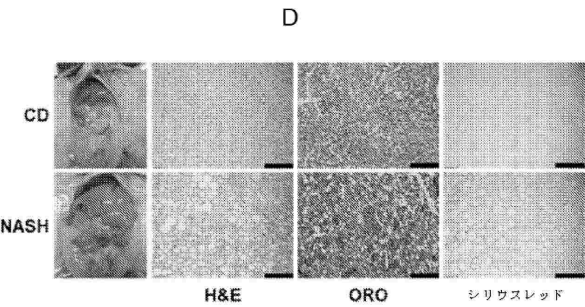
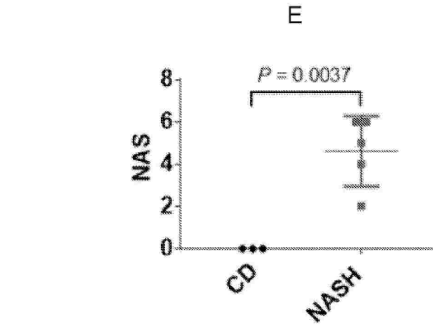
【図 1 7 - 1】



【図 1 7 - 2】



【図 1 7 - 3】



F

	N (CD : NASH)	CD	NASH食餌
脂肪肝	3 : 5	0.0 ± 0.0	2.2 ± 0.8
肝細胞バリーニング	3 : 5	0.0 ± 0.0	1.8 ± 0.4
小葉の炎症	3 : 5	0.0 ± 0.0	0.6 ± 0.5

10

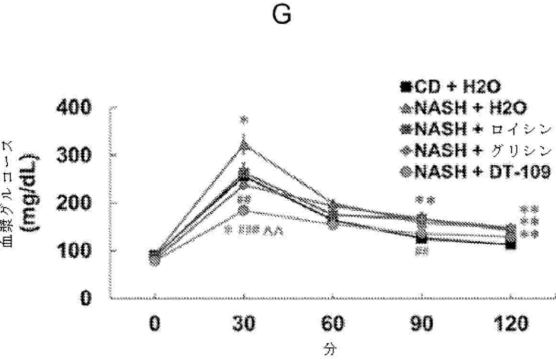
20

30

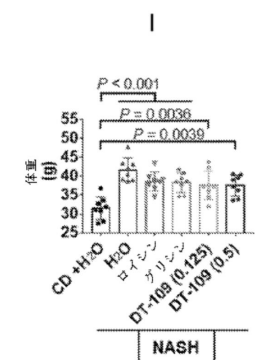
40

50

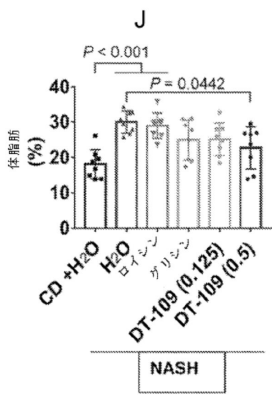
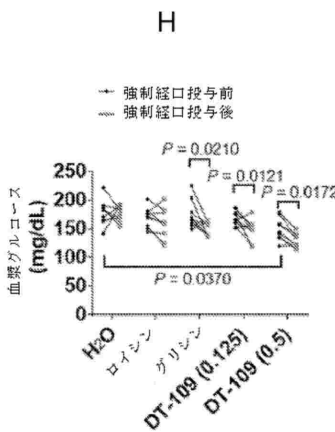
【図 17-4】



【図 17-5】

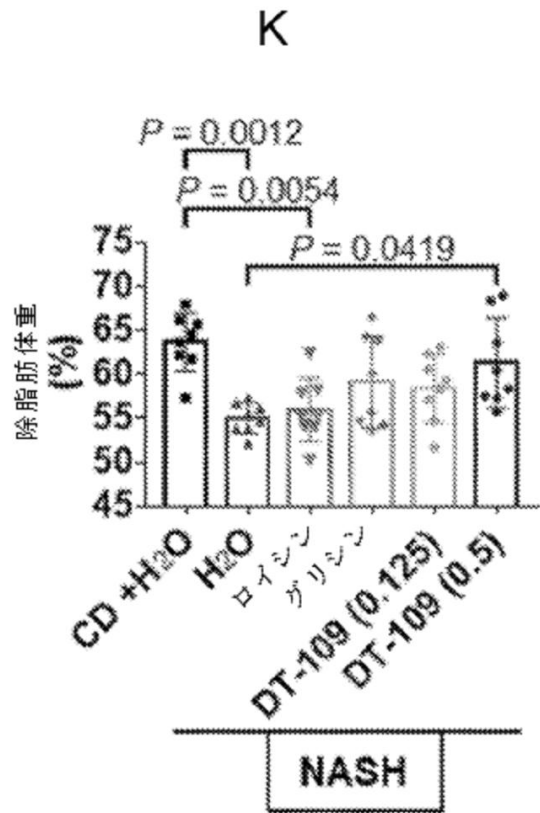


10

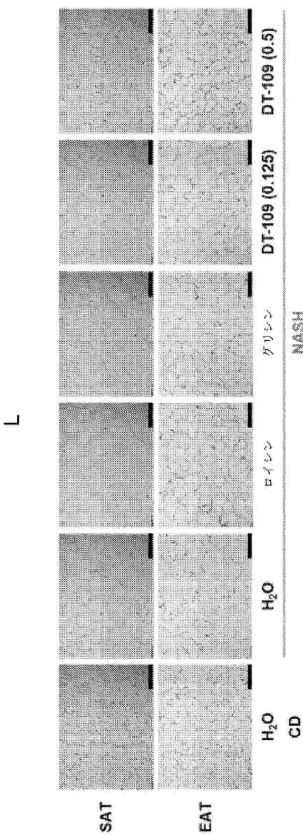


20

【図 17-6】



【図 17-7】

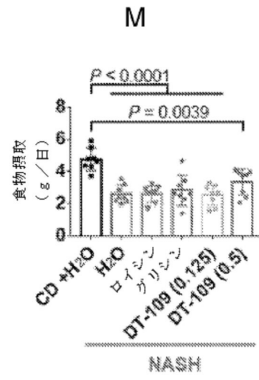


30

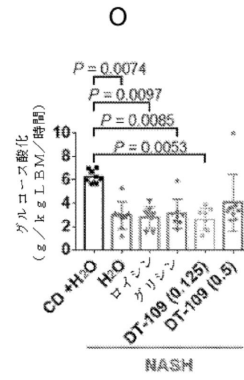
40

50

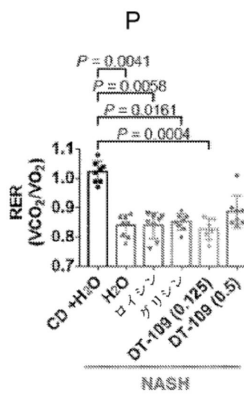
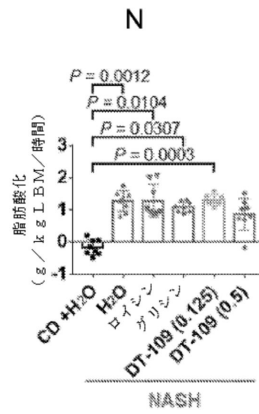
【図 17-8】



【図 17-9】

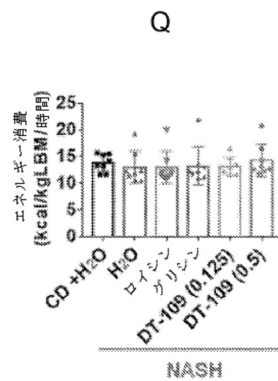


10

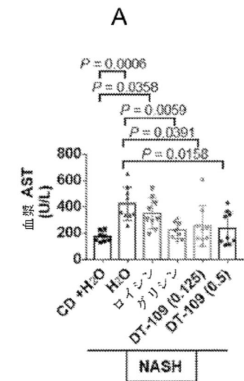


20

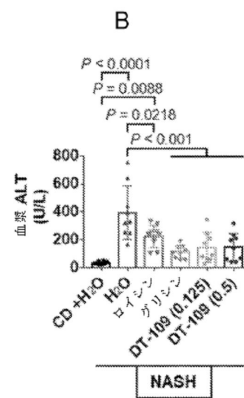
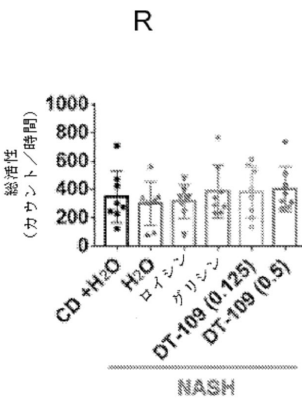
【図 17-10】



【図 18-1】



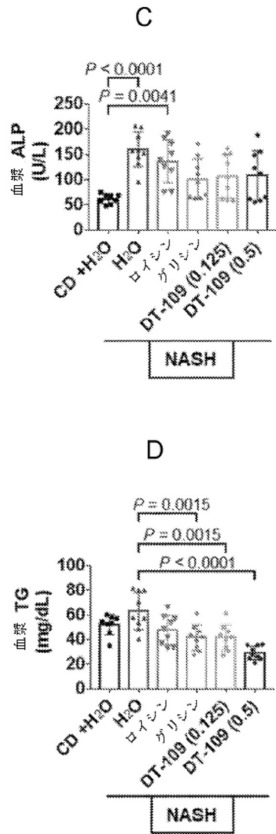
30



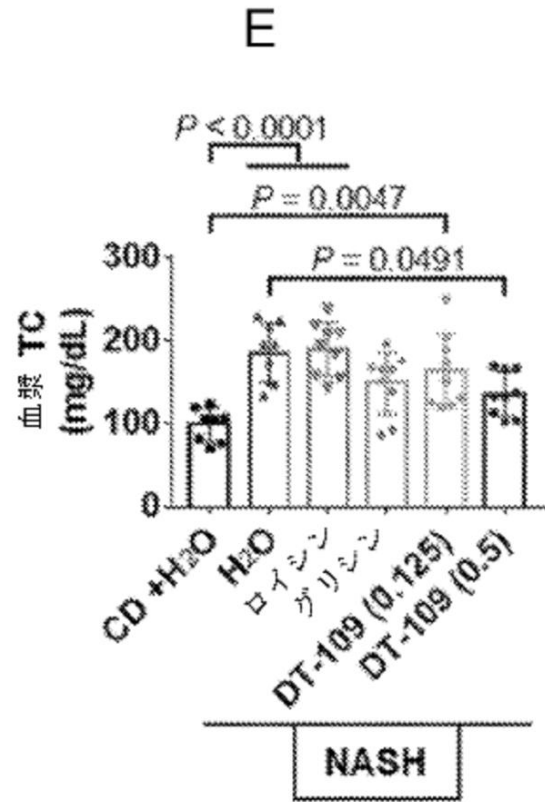
40

50

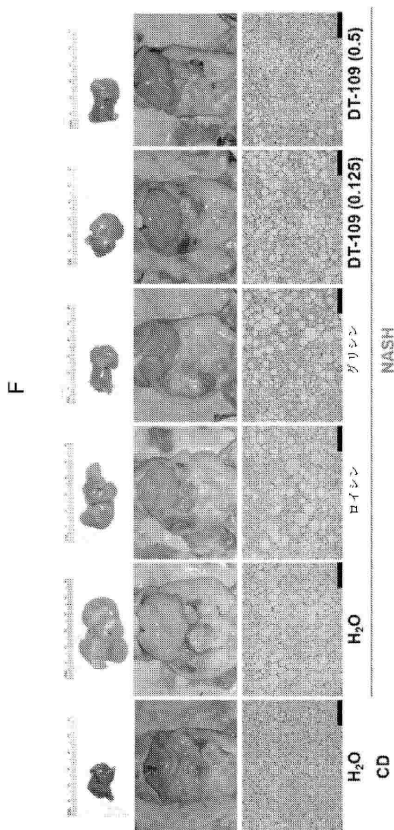
【図 18-2】



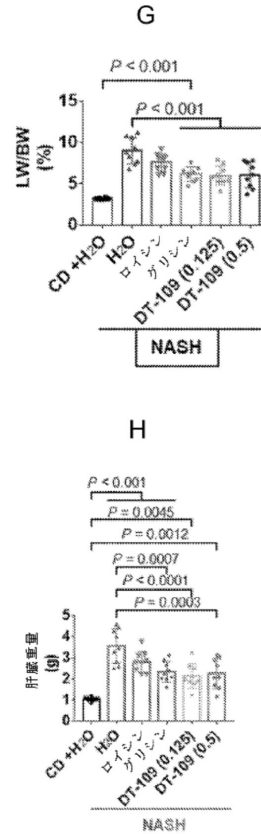
【図 18-3】



【図 18-4】



【図 18-5】



10

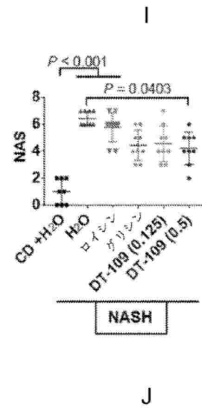
20

30

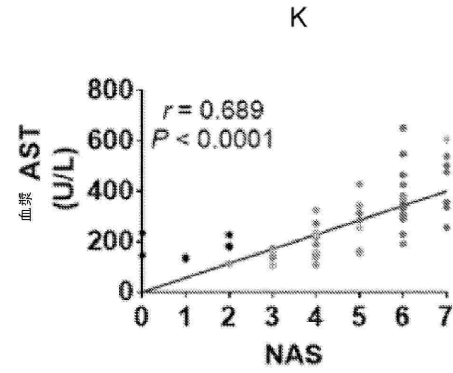
40

50

【図 18-6】



【図 18-7】

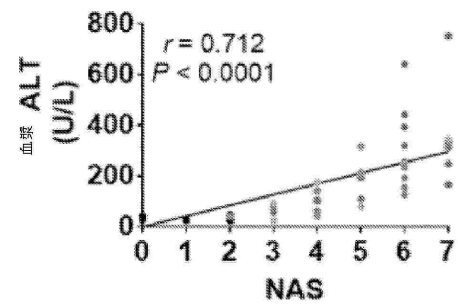


10

J

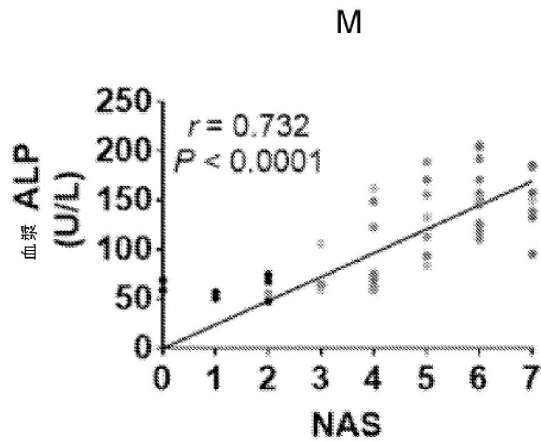
	脂肪肝	肝細胞バロoning	小葉の炎症	NAS
CD, H ₂ O	0.6 ± 0.5	0.4 ± 0.5	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.9
NASH, H ₂ O	2.9 ± 0.3	2.0 ± 0.0	1.6 ± 0.5	6.5 ± 0.5
NASH, ロイシン	2.6 ± 0.5	2.0 ± 0.0	1.2 ± 0.8	5.8 ± 1.0
NASH, グリシン	2.2 ± 0.7	1.9 ± 0.3	0.3 ± 0.7	4.4 ± 1.1
NASH, DT-109 (0.125)	2.1 ± 0.6	1.8 ± 0.4	0.7 ± 0.9	4.6 ± 1.3
NASH, DT-109 (0.5)	2.2 ± 0.8	1.9 ± 0.3	0.1 ± 0.3	4.2 ± 1.2

L

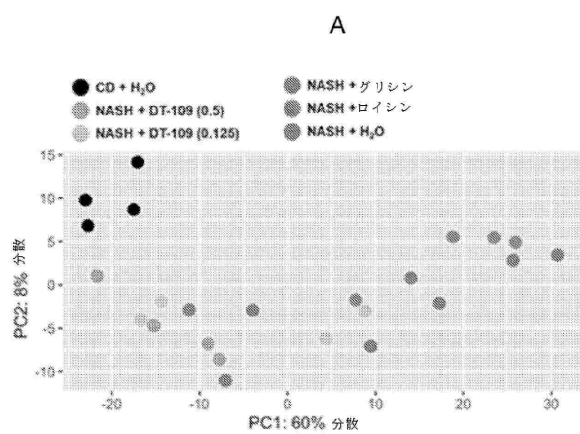


20

【図 18-8】



【図 19-1】

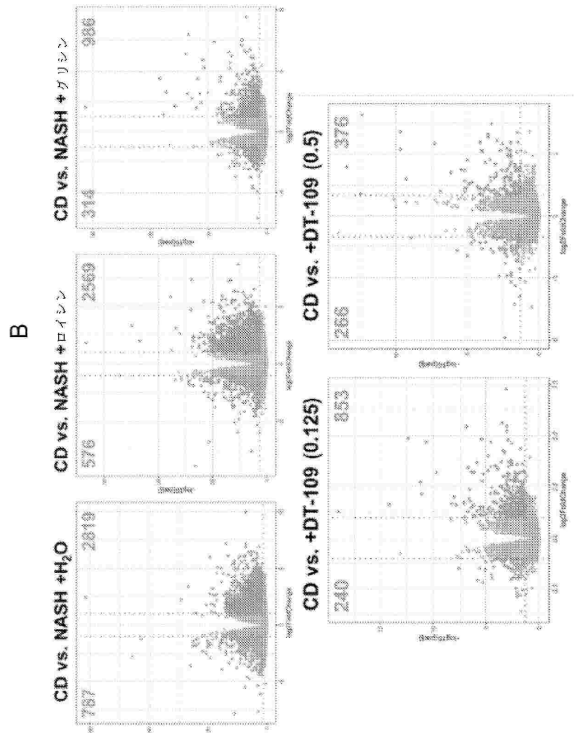


30

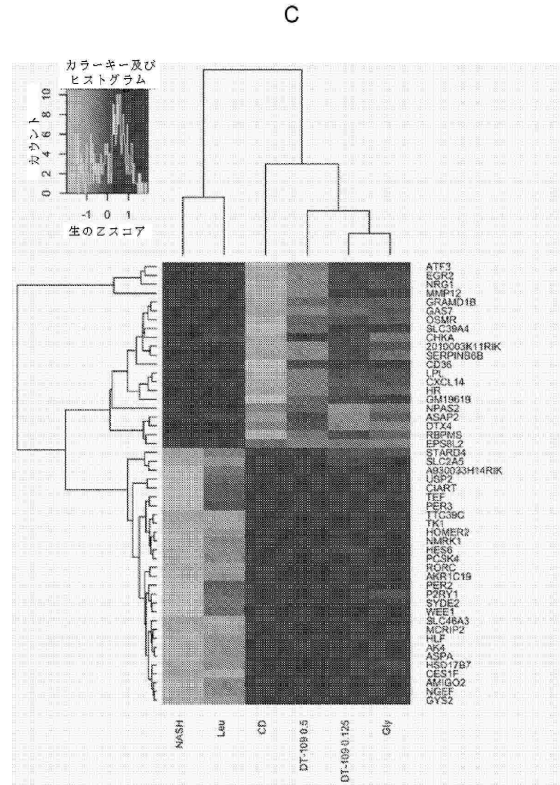
40

50

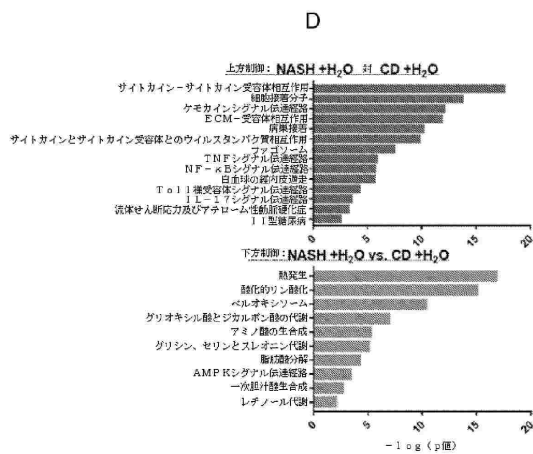
【図 19-2】



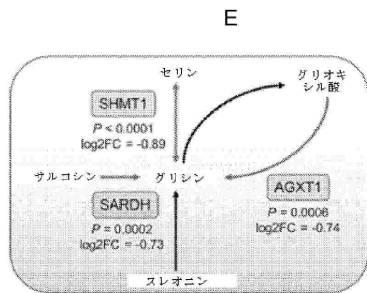
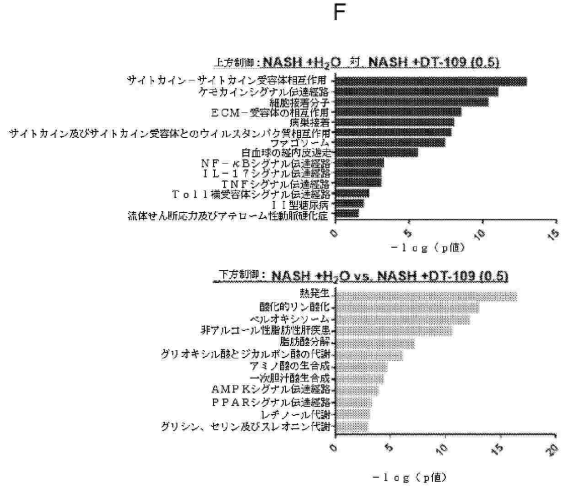
【図 19-3】



【図 19-4】



【図 19-5】



10

20

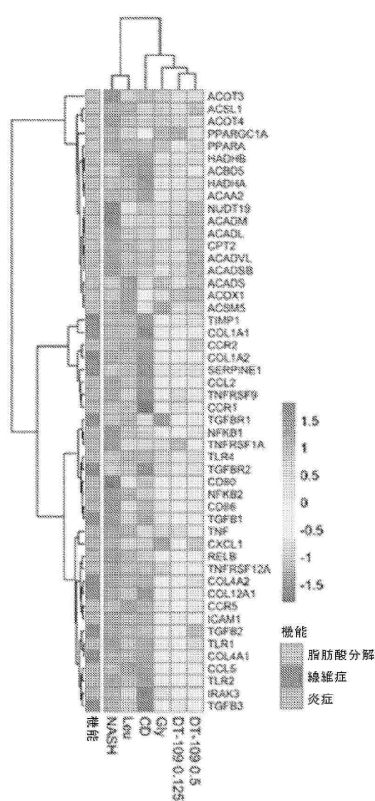
30

40

50

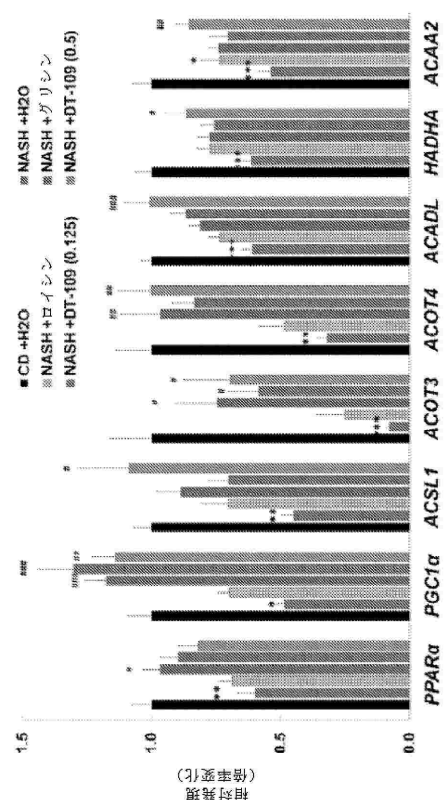
【圖 19-6】

G

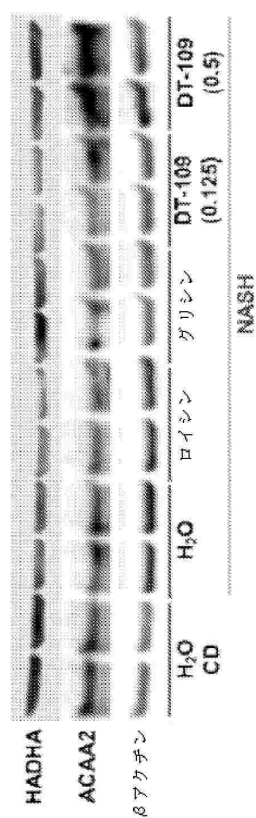


【圖 19-7】

II

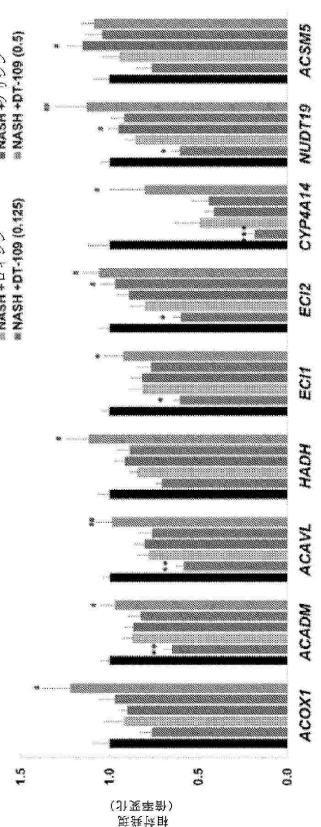


【圖 19-8】

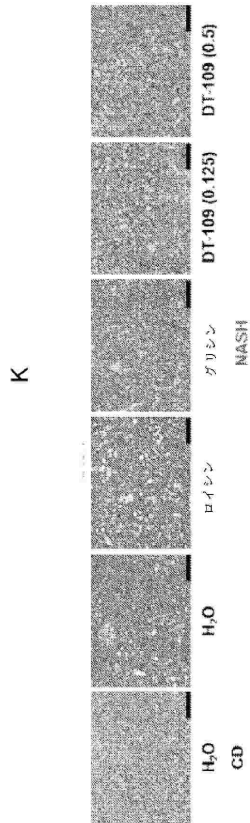


【圖 19-9】

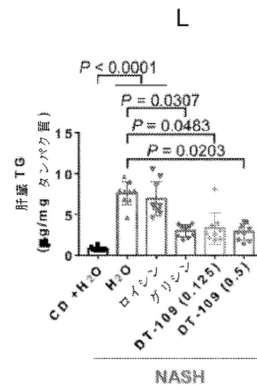
2



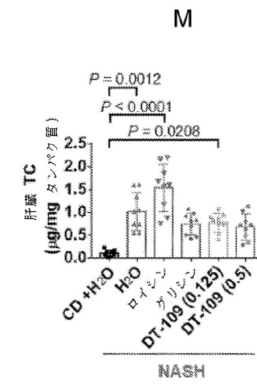
【図 19-10】



【図 19-11】

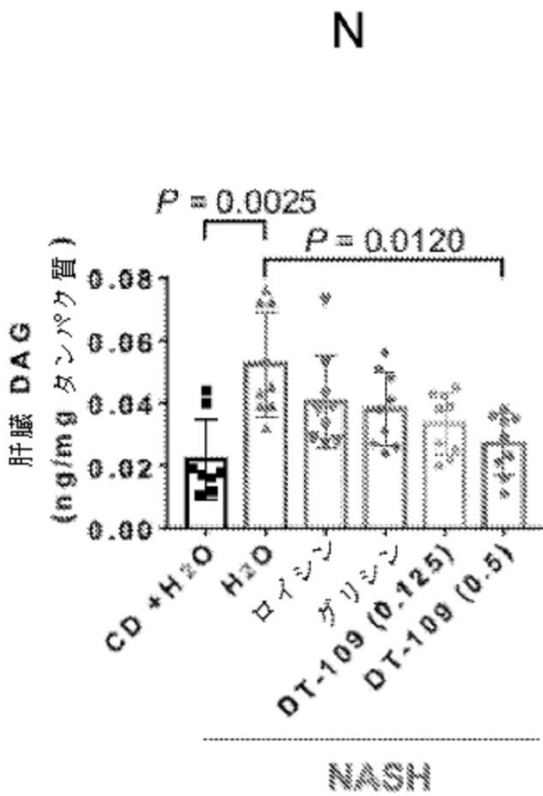


10

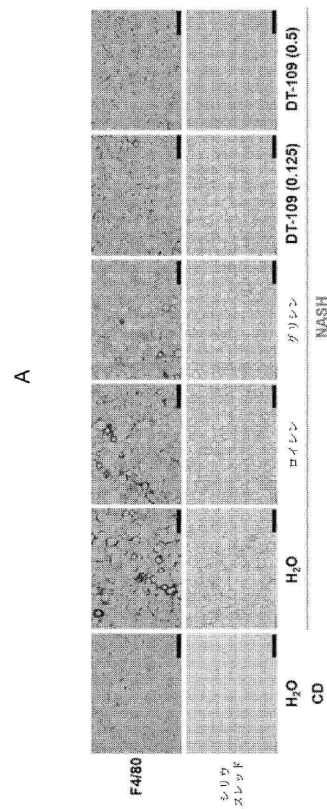


20

【図 19-12】



【図 20-1】

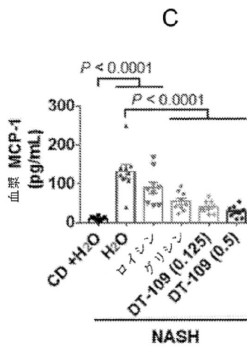
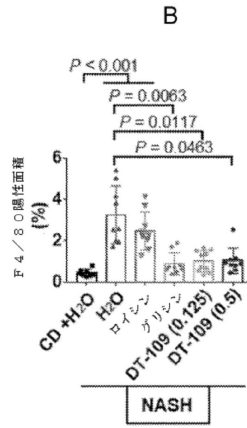


30

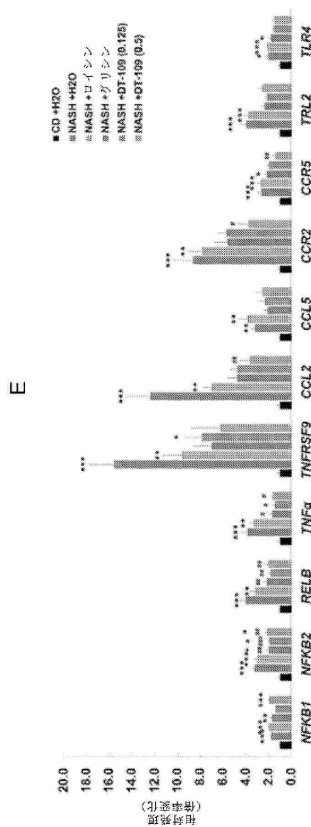
40

50

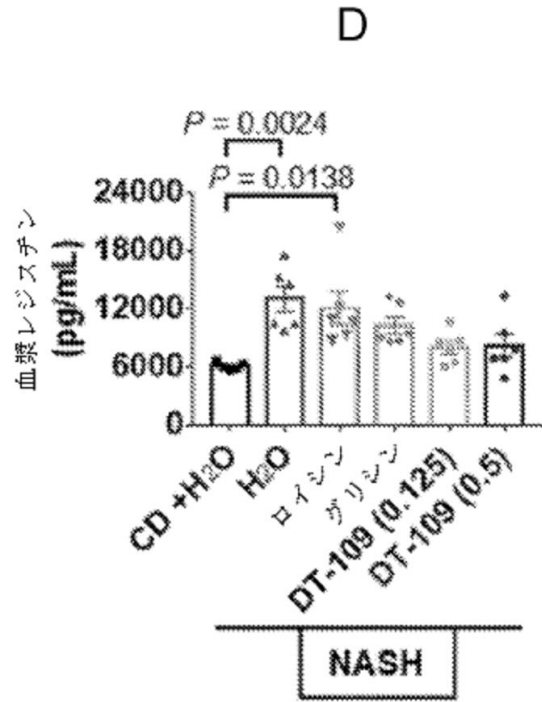
【図 20-2】



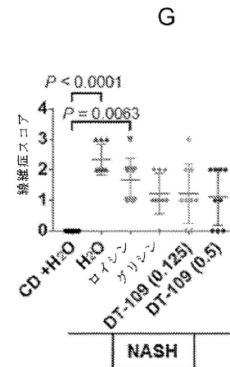
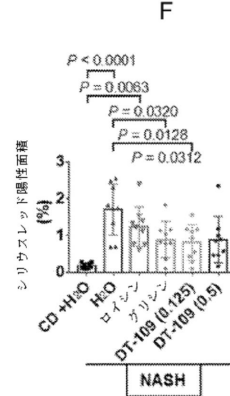
【図 20-4】



【図 20-3】



【図 20-5】



10

20

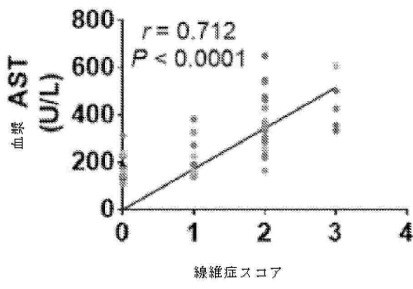
30

40

50

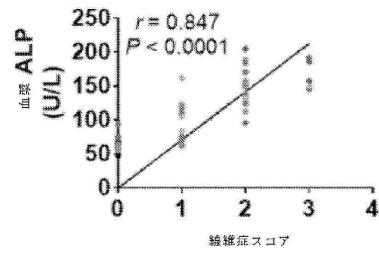
【図 20-6】

H



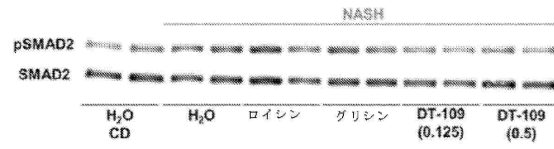
【図 20-7】

J



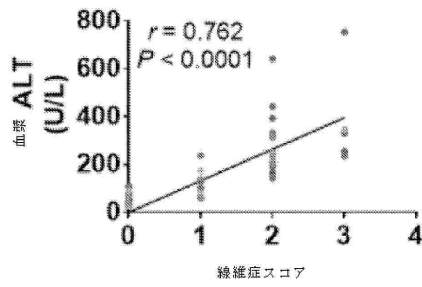
10

K



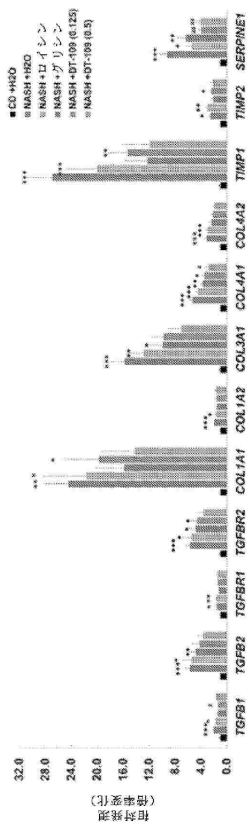
20

I



【図 20-8】

L



30

40

50

【配列表】
0007560061000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 K	38/48 (2006.01)	A 6 1 K	38/48
A 6 1 K	38/26 (2006.01)	A 6 1 K	38/26
A 6 1 K	38/28 (2006.01)	A 6 1 K	38/28
A 6 1 K	31/155 (2006.01)	A 6 1 K	31/155
A 6 1 K	31/64 (2006.01)	A 6 1 K	31/64
A 6 1 K	31/425 (2006.01)	A 6 1 K	31/425
A 6 1 K	31/397 (2006.01)	A 6 1 K	31/397
A 6 1 K	31/192 (2006.01)	A 6 1 K	31/192
A 6 1 K	31/216 (2006.01)	A 6 1 K	31/216
A 6 1 K	31/423 (2006.01)	A 6 1 K	31/423
A 6 1 K	31/194 (2006.01)	A 6 1 K	31/194
A 6 1 K	35/60 (2006.01)	A 6 1 K	35/60

(74)代理人 100145403

弁理士 山尾 憲人

(74)代理人 100156144

弁理士 落合 康

(72)発明者 オレン・ロム

アメリカ合衆国 4 8 1 0 9 - 2 5 9 0 ミシガン州アナーバー、フューロン・パークウェイ 1 6 0 0 番、セカンド・フロア、ザ・リージェンツ・オブ・ザ・ユニバーシティ・オブ・ミシガン内

(72)発明者 ジーフォン・ジャン

アメリカ合衆国 4 8 1 0 9 - 2 5 9 0 ミシガン州アナーバー、フューロン・パークウェイ 1 6 0 0 番、セカンド・フロア、ザ・リージェンツ・オブ・ザ・ユニバーシティ・オブ・ミシガン内

(72)発明者 イン・ジャオ

アメリカ合衆国 4 8 1 0 8 ミシガン州アナーバー、ボウルダー・ポンド・ドライブ 4 3 3 4 番

(72)発明者 ユーチン・ユージーン・チェン

アメリカ合衆国 4 8 1 0 9 - 2 5 9 0 ミシガン州アナーバー、フューロン・パークウェイ 1 6 0 0 番、セカンド・フロア、ザ・リージェンツ・オブ・ザ・ユニバーシティ・オブ・ミシガン内

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 特表 2 0 1 4 - 5 0 6 5 7 9 (J P , A)

国際公開第 0 3 / 0 7 4 0 7 1 (W O , A 1)

今 一義 他, 日本内科学会雑誌, 2014年, 第103巻第12号, pp.3118-3125

山田 信博, 日本内科学会雑誌, 1996年, 第85巻第4号, pp.519-524

ZHANG J. et al., PLOS ONE, 2013年, Volume 8 Issue 12, e83509

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K 3 8 / 0 6

A 6 1 P 3 / 0 6

A 6 1 P 1 / 1 6

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A P l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)