

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012年8月23日(23.08.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/111852 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 45/00 (2006.01) A61P 19/06 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/054340
- (22) 国際出願日: 2012年2月16日(16.02.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-032389 2011年2月17日(17.02.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 帝人ファーマ株式会社(TEIJIN PHARMA LIMITED) [JP/JP]; 〒1000013 東京都千代田区霞が関三丁目2番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 石田 美幸 (ISHIDA, Miyuki) [JP/JP]; 〒1910065 東京都日野市旭が丘四丁目3番2号 帝人ファーマ株式会社東京研究センター内 Tokyo (JP). 東 由明(AZUMA, Yoshiaki) [JP/JP]; 〒1910065 東京都日野市旭が丘四丁目3番2号 帝人ファーマ株式会社東京研究センター内 Tokyo (JP). 原田 善史(HARADA, Yoshifumi) [JP/JP]; 〒1910065 東京都日野市旭が丘四丁

目3番2号 帝人ファーマ株式会社東京研究センター内 Tokyo (JP).

- (74) 代理人: 為山 太郎(TAMEYAMA, Taro); 〒1000013 東京都千代田区霞が関三丁目2番1号 株式会社 帝人知的財産センター内 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: THERAPEUTIC AGENT FOR VERTEBRAL BODY FRACTURE AND METHOD FOR EVALUATING SAME

(54) 発明の名称: 椎体骨折治療剤及びその評価方法

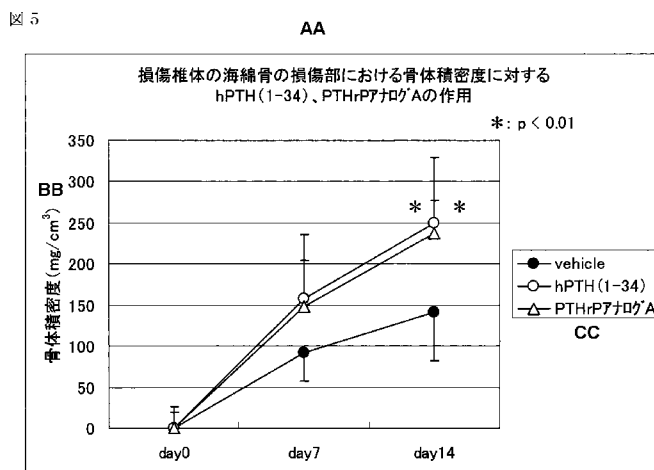


FIG. 5:
AA EFFECTS OF hPTH(1-34) AND PTHrP ANALOG A ON BONE VOLUME DENSITY IN DAMAGED REGION OF CANCELLOUS BONE OF DAMAGED VERTEBRAL BODY
BB BONE VOLUME DENSITY
CC PTHrP ANALOG A

(57) Abstract: The invention provides a therapeutic agent for vertebral body fracture, a therapeutic or prophylactic agent for pain due to vertebral body fracture, a prophylactic agent for vertebral body compression fracture, or a therapeutic or prophylactic agent for a movement disorder and/or a neurological disorder due to vertebral body fracture, each containing a PTH/PTHrP receptor agonist or a substance having an activity of inducing the production of PTH or PTHrP. Further, the invention can provide a method for evaluating a therapeutic agent for vertebral body fracture, including a step of surgically damaging the bone of the vertebral body in a nonhuman animal, a step of administering a test substance to the nonhuman animal, and a step of measuring recovery from the surgical damage of the bone of the vertebral body in the nonhuman animal or a sample derived from the nonhuman animal.

(57) 要約: 本発明は、PTH/PTHrP 受容体アゴニスト、又はPTH又はPTHrP産生を誘導する活性を有する物質を含有することによって、椎体骨折治療剤、椎体骨折に起因する疼痛の治療又は予防剤、椎体圧迫骨折予防剤、又は椎体骨折に起因する運動障害及び/又は神経障害の治療又は予防剤を提供する。また、本発明は、非ヒト動物に被検物質を投与する工程、及び当該非ヒト動物又はそれに由来する検体の椎体骨の外科的な損傷の回復を測定する工程、を含むことによって、椎体骨折治療剤の評価方法を提供することを可能とする。

ヒト動物の椎体骨に外科的な損傷を与える工程、当該非ヒト動物に被検物質を投与する工程、及び当該非ヒト動物又はそれに由来する検体の椎体骨の外科的な損傷の回復を測定する工程、を含むことによって、椎体骨折治療剤の評価方法を提供することを可能とする。



添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

明細書

発明の名称

椎体骨折治療剤及びその評価方法

5

技術分野

椎体骨折の治療効果を評価する新規動物モデルを開発し、それによって PTH / PTHrP 受容体アゴニスト、PTH又はPTHrP 産生を誘導する活性を有する物質が椎体骨折の治療効果を有することを見出した。従って、本発明は PTH / PTHrP 受容体アゴニスト、又は PTH又はPTHrP 産生を誘導する活性を有する物質を含有する椎体骨折治療剤に関する。また、本発明は椎体骨折の治療剤の効果及び安全性を非ヒト動物で初めて評価することを可能にした新規動物モデルとその評価方法に関する。

15

背景技術

椎体は骨折頻度が最も高い部位である（非特許文献 1）。椎体とは、「脊椎管の前方にある椎骨の主たる部分で、椎弓と区別される」（ステッドマン医学大辞典、改訂第 5 版、メジカルビュー社）、又は、「椎骨の前部を占める半円形の部分」（大辞林、第二版、三省堂）と説明される。従って、椎体骨折とは、脊椎を構成する椎骨における骨折のうち、通常は棘突起、横突起や関節突起などが存在する椎弓部分での骨折を含まず、半円柱状の形態を有する椎体部分における骨折のことをいう。

20

椎体骨折は、事故やスポーツ等での強い衝撃が原因となる場合もあるが、主に骨粗鬆症による骨の脆弱性の亢進、骨強度の低下を基盤として発生する脊椎椎体の圧迫型骨折であり、患者の QOL を大きく低下させる代表的な疾患の一つである（非特許文献 2、3）。骨の脆弱性が亢進すると、通常骨折を生じない程度の軽微な外力、

25

日常生活動作程度の弱いストレスが繰り返し加わることによって、骨の微細構造の損傷が生じ、骨構造が連続的に破断する。骨粗鬆症患者数の増加と共に、脊椎椎体の圧迫型骨折の発生頻度が増加しており、わが国の骨粗鬆症性椎体骨折の有病率は、女性では60歳代で7.6－14%、70歳代で37－45%と報告されている（非特許文献4、5、6）。

椎体骨折患者は他部位の骨折患者よりも生命予後が不良であることが分かっている。例えば、Fracture intervention trial (FIT) で得られたデータによると、臨床骨折発生後の死亡リスクは約2倍増加するが、その内訳は、大腿骨近位部骨折は6.7倍増加、椎体骨折は8.6倍増加であった（非特許文献7）。

椎体骨折は、受傷後に自覚症状がないものから腰背部の急性疼痛が強いものまで臨床症状が多様である。椎体骨折を治療する薬剤はなく、疼痛を伴う椎体の新鮮骨折に対しても、積極的な薬剤治療は行えない。従って、鎮痛剤を投与しながら数週間の安静臥床、更にギプス、硬性又は軟性コルセットなどの装具で外固定法を行い、数カ月間保存的に治療するのが一般的である。この際、一時的な入院加療を必要とする患者も多く、平均的な入院期間は42.6日と報告されている（非特許文献8）。特に、骨折部位の癒合が遅延した場合、偽関節を呈し頑固な慢性疼痛を生じたり、椎体変形が進行し下肢痛や遅発性神経麻痺を引き起こしたり、脊柱の変形により消化器系、呼吸器系に機能障害を来たしたりするため、患者のADLやQOLを著しく低下させる。

重度の椎体骨折に対する治療法として、保存療法に instrumentation を併用した椎体間固定による脊柱再建術がある。1990年代後半から米国を中心に急速に広がった骨折椎体に骨セメントを注入する椎体形成術や、バルーンを膨らませ骨折椎体の高さを復元し、後彎変形を矯正する kyphoplasty など、椎体内充填手術（vertebral augmentation surgery）が日本国内でも浸透してきている（非特許文

献 9)。しかしながら、外固定を行っても、椎体の楔状変形、脊椎後彎変形を遺残し良好な脊椎アライメントを維持できないことも多い。さらに保存療法にもかかわらず椎体圧潰や偽関節、遅発性神経障害の発症を完全に防ぎえないのが現状である（非特許文献 10）。

- 5 椎体骨折患者の QOL を高め生命予後を改善するには、椎体骨折を治療する新しい薬剤の開発が必要である。患者個人の利益のみならず、入院患者や寝たきり患者を減らし医療費を削減する社会的利益のためにも、椎体骨折を治療する新しい薬剤の開発は、積極的に取り組むべき課題である。

- 椎体骨折を治療する新しい薬剤を開発する上で大きな障害となっていることの一つに、非臨床で利用できる動物モデルがなく、薬剤の効果を非ヒト動物で検証できないことが挙げられる。動物を用いた一般的な骨折モデルはいくつか報告があるが、それらは、長骨骨幹の中央部、すなわち皮質骨の損傷に着目したモデルであり、椎体骨折で生じる海綿骨の微細構造の損傷を評価するモデルではない。例えば、一般的な骨折モデルであるラット大腿骨閉鎖骨折モデルは、その大腿骨骨幹の中央部に
10 ギロチンを落として大腿骨を骨折させ、その大腿骨の強度を評価するモデル（非特許文献 11）であるが、その損傷は、皮質骨の骨折であり、椎体骨折で生じる海綿骨の微細構造の損傷とはかけ離れている。また、本発明と同じように、歯科用ドリルで穴をあけることにより骨損傷を生じさせるラット大腿骨ドリリングモデルも、
15 大腿骨閉鎖骨折モデル同様、大腿骨骨幹の中央部、すなわち大腿骨皮質骨を損傷させたモデル（非特許文献 12、13）であり、椎体骨折で生じる海綿骨の微細構造の損傷を評価できるモデルではない。

また、骨折治癒の過程においては、骨芽細胞による骨形成のみではなく、破骨細胞による骨破壊の過程も進行することが知られている。ビスフォスフォネートのような破骨細胞の機能を抑制する物質とは異なり、PTH や PTHrP は破骨細胞も

活性化することが知られている。事実、PTH等は、骨から破骨細胞の活性で血中にカルシウムを放出する作用を持っていることから、従来は高カルシウム血症を引き起こす骨破壊因子と考えられていた時期もある。現在は、骨代謝を高める作用から骨粗鬆症での骨量増加作用に基づく治療剤として利用されている一方、骨折治療

5 にも用いることが期待されている。そのため、いろいろな動物モデルでPTH等の骨折治癒への作用が検討されている（非特許文献14）。しかしながら、そこで用いられているモデルは長管骨（例えば大腿骨）で骨折を起こした後にピンなどを挿入することで望ましくない方向に加重がかからないように固定したものや、扁平骨でも非加重骨（頭骸骨など）での効果をみたもののみである。一方、椎体は体幹を支

10 える脊椎の主要部分であり、常にある程度の加重がかかっている骨である。また、臨床的にも実験的にも椎体の構造上、骨折部位をピンなどで固定することは非常に困難である。よって、椎体骨折治療の目的でPTHやPTHrP又はそれらのアナログを投与した場合に、骨折治癒の過程での骨吸収が予想以上に亢進すると、一時的に骨折部位付近の脆弱性が高まる可能性も考えられ、そこに加重がかかることに

15 よって、骨折が逆に悪化することや、場合によっては圧壊骨折に至ることで構造的にも機能的にも修復できない状況に至ることも想定される。

従って、従来から報告されている長骨骨幹の骨折モデルを用いて椎体骨折の薬剤候補となる物質をスクリーニングした場合、大腿骨骨折に最適な物質を見出すことはできても、椎体骨折で生じる海綿骨の微細構造の損傷を治療するのに最適な物質

20 を見出すことは不可能であった。すなわち、非ヒト動物を用いて椎体骨折を評価する方法はなかったため、椎体骨折を治療する薬剤の開発は困難であった。

骨折の治癒の過程は、一般的に炎症期、修復期、リモデリング期に分けられる（非特許文献15）。炎症期においては、骨折部位に血腫が形成されるが、その中には炎症系の細胞も存在し、そこから多くの炎症性サイトカインなどの因子が放出される。

脊椎の構造をみると、椎体に近接する脊柱管には全身の運動や感覚、また生理作用の制御に重要な脊髄が通っているという特徴がある。この脊髄がなんらかの原因によって炎症を起こした疾患は脊髄炎と呼ばれ、その症状としては軽い場合には感覚や運動機能の異常であるが、重篤な場合にはその支配下の部位全体の麻痺や死に至る場合もある。一方、PTHrPはいくつかの疾患における炎症反応に関与していることが示されている（非特許文献16-20）。また、副甲状腺機能亢進症の患者の骨においては肥満細胞（マストセル）が多く存在し、その肥満細胞の集積にPTHが関与しており、PTHrPも同様の作用があると考えらる（非特許文献21）、PTH及びPTHrPが骨芽細胞に作用して好中球などに対する細胞遊走因子であるCXCL1の発現を誘導するなどの作用も知られている（非特許文献22）。従って、PTH/PTHrPやそれらのアナログなどを椎体骨折の治療目的で投与した場合、骨折部位炎症がさらに重篤になる可能性も考えられ、近傍に存在する脊髄に対しても炎症が広がって障害をおこすおそれが想定される。

椎体骨折治療の研究においては、上記のように、椎体骨折の有用な動物モデルが存在せず、また重篤な副作用の可能性も考えられていた。

PTHの部分活性ポリペプチドは、これまで、上述した長骨骨幹の骨折モデルを用いて、皮質骨の骨折修復促進作用が示されてきた（特許文献1、非特許文献23、24）。しかし、椎体骨折で生じる海綿骨の微細構造の損傷に対して治療効果を明確に検出した報告はない。また、特許文献2に示されている化合物が椎体骨折治療剤となる可能性を示した報告がある（特許文献2）が、この報告は、臨床試験で椎体骨折の予防効果を検討しただけで、薬剤の椎体骨折に対する治療効果を明確に検出したものではなく、椎体骨折に対する治療効果を漠然と憶測したものにすぎない。すなわち、本発明のように、椎体骨折の特徴である海綿骨の微細構造の損傷に特化し、その損傷部のみで薬剤の椎体骨折治療効果を明確に示した報告はない。

先行技術文献

特許文献

特許文献 1 : 特表 2 0 0 2 - 5 0 9 8 5 4

特許文献 2 : 特開 2 0 0 6 - 2 1 9 4 8 5

5 非特許文献

非特許文献 1 : 日医大医学誌 2 0 0 9 . 5 (2) ; 1 2 5 - 1 2 9 、骨粗鬆症性脊椎椎体骨折、元文 芳和

非特許文献 2 : Bone. 1996 Mar;18(3 Suppl):185S-189S., The clinical impact of vertebral fractures: quality of life in women with osteoporosis., Gold DT.

10 非特許文献 3 : J Bone Miner Res. 1997 Apr;12(4):663-75., Clinical grading of spinal osteoporosis: quality of life components and spinal deformity in women with chronic low back pain and women with vertebral osteoporosis., Leidig-Bruckner G, Minne HW, Schlaich C, Wagner G, Scheidt-Nave C, Bruckner T, Gebest HJ, Ziegler R.

15 非特許文献 4 : Kitazawa A, Kushida K, Yamazaki K, et al : Prevalence of vertebral fractures in a population-based sample in Japan. J Bone Miner Metab2001; 19 : 115-118,

非特許文献 5 : Yoshimura N, Kinoshita H, Danjoh S, et al : Prevalence of vertebral fractures in a rural Japanese population. J Epidemiol 1995; 5: 171-175

20 非特許文献 6 : Ross PD, Fujiwara S, Huang C, et al : Vertebral fracture prevalence in women in Hiroshima compared to Caucasians or Japanese in the US. Int J Epidemiol 1995; 24 : 1171-1177

非特許文献 7 : Osteoporos Int. 2000;11(7):556-61., Risk of mortality following clinical fractures., Cauley JA, Thompson DE, Ensrud KC, Scott JC,

Black D.

非特許文献 8 : 萩野浩 : 骨粗鬆症治療の費用対効果分析. 日本臨床 60 (増刊号 3) 2002 : 645-654

非特許文献 9 : 関節外科 vol. 29 No. 5 (2010) p32-36、骨粗鬆症性脊椎骨折の日本における治療現状骨粗鬆症の椎体骨折、伊東学、原田敦、中野哲雄、倉都滋之、出口正男、松山幸弘、町田正文、末吉泰信、米澤嘉朗、若尾典充

非特許文献 10 : 骨粗鬆症の椎体骨折 骨の量・構造と強度、メディカルカルチュア、p186

非特許文献 11 : J Bone Miner Res. 2001 Apr;16(4):671-80., Low-intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reactions in the fracture callus., Azuma Y, Ito M, Harada Y, Takagi H, Ohta T, Jingushi S.

非特許文献 12 : Bone. 2000 Jul;27(1):81-90., Transient expression of activin betaA mRNA on osteoprogenitor cells in rat bone regeneration after drill-hole injury., Uchida S, Doi Y, Kudo H, Furukawa H, Nakamura T, Fujimoto S.

非特許文献 13 : Bone. 2004 Jun;34(6):940-8., Prostaglandin E2 receptor (EP4) selective agonist (ONO-4819. CD) accelerates bone repair of femoral cortex after drill-hole injury associated with local upregulation of bone turnover in mature rats., Tanaka M, Sakai A, Uchida S, Tanaka S, Nagashima M, Katayama T, Yamaguchi K, Nakamura T.

非特許文献 14 : Calcif. Tissue Int. (2010) 87:1-13., Parathyroid hormone and bone healing., Ellegaard M, Jørgensen NR, Schwarz P.

非特許文献 1 5 : Rockwood and Green's fractures in adults; Seventh Edition.
Robert W. Bucholz, James D. Heckman, 2009, (Chapter4,) Lippincott Williams
& Wilkins.

5 非特許文献 1 6 : Int Immunopharmacol. 2001 Jun;1(6):1101-21., A role for
parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of
inflammatory/autoimmune diseases., Funk JL.

非特許文献 1 7 : Brain Res. 2001 Oct 12;915(2):195-209., Parathyroid
hormone-related protein (PTHrP) induction in reactive astrocytes following
brain injury: a possible mediator of CNS inflammation., Funk JL, Trout CR, Wei
10 H, Stafford G, Reichlin S.

非特許文献 1 8 : Stroke. 2003 Jul;34(7):1783-9. Epub 2003 Jun 12., Possible
role of parathyroid hormone-related protein as a proinflammatory cytokine in
atherosclerosis., Martín-Ventura JL, Ortego M, Esbrit P, Hernández-Presa MA,
Ortega L, Egido J.

15 非特許文献 1 9 : Cancer. 2005 May 1;103(9):1810-8., Serum parathyroid
hormone-related peptide is associated with systemic inflammation and adverse
prognosis in gastroesophageal carcinoma., Deans C, Wigmore S, Paterson-Brown
S, Black J, Ross J, Fearon KC.

非特許文献 2 0 : Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2010 May;14(5):471-5.,
20 Expression of parathyroid hormone-related protein in human inflamed dental
pulp., Marigo L, Migliaccio S, Monego G, La Torre G, Somma F, Ranelletti FO.

非特許文献 2 1 : J Bone Miner Res. 2010 Jul;25(7):1637-49., The role of mast
cells in parathyroid bone disease., Turner RT, Iwaniec UT, Marley K, Sibonga
JD.

非特許文献 2 2 : endocrinology. 2009 May;150 (5) :2244-53. Epub 2009 Jan 15.,
The chemokine Cxcl1 is a novel target gene of parathyroid
hormone (PTH)/PTH-related protein in committed osteoblasts., Onan D, Allan EH,
Quinn JM, Gooi JH, Pompolo S, Sims NA, Gillespie MT, Martin TJ.

5 非特許文献 2 3 : J Bone Miner Res. 2002 Nov;17 (11) :2038-47., Mechanisms for
the enhancement of fracture healing in rats treated with intermittent low-dose
human parathyroid hormone (1-34)., Nakajima A, Shimoji N, Shiomi K, Shimizu
S, Moriya H, Einhorn TA, Yamazaki M.

10 非特許文献 2 4 : J Bone Joint Surg Am. 2005 Apr;87 (4) :731-41., Enhancement
of experimental fracture-healing by systemic administration of recombinant
human parathyroid hormone (PTH 1-34)., Alkhiary YM, Gerstenfeld LC, Krall E,
Westmore M, Sato M, Mitlak BH, Einhorn TA.

発明の概要

15 発明が解決しようとする課題

骨粗鬆症性椎体骨折では、骨の脆弱性が亢進すると、通常骨折を生じない程度
の軽微な外力、日常生活動作程度の弱いストレスが繰り返し加わることによって、
海綿骨の微細構造の損傷が生じ、骨構造が連続的に破断する。しかし、椎体骨折で
生じる海綿骨の微細構造の損傷を評価する動物モデルはなく、椎体骨折を治療する
20 物質を非ヒト動物を用いてスクリーニングすることは不可能であった。椎体骨折で
生じる海綿骨の微細構造の損傷を評価する動物モデルがこれまで報告されなかった
のは、小動物の健康状態に影響を与えず、椎体を損傷させ、その損傷度を評価する
ことが困難であったためである。

椎体骨折で生じる海綿骨の微細構造の損傷を評価する動物モデルが存在すれば、

そのモデルを用いて、椎体骨折を治療する物質をスクリーニングすることができる。
すなわち、椎体骨折で生じる海綿骨の微細構造の損傷に対し、治療効果を有する新しい薬剤を開発する有用な動物モデルとなる。これまで椎体骨折を治療するための薬剤はなかったが、椎体骨折で生じる海綿骨の微細構造の損傷を評価する動物モデルを構築できれば、椎体骨折を治療する新しい薬剤の開発が可能となる。また、PTH・PTHrP及びそのアナログによる椎体骨折治療剤を開発する上で、当該モデルを用いることによって、これらの物質の投与によって懸念される炎症反応の増悪や過度の骨吸収などの副作用につながる可能性がないことを確認することも可能になる。

10 そこで、本発明者らは、薬剤の開発に当たって汎用性の高い動物であるラットを用い、椎体骨折で生じる海綿骨の微細構造の損傷を生じさせる動物モデルを構築し、その損傷修復過程を評価する評価方法を決定し、さらに、その動物モデルと評価方法を用いて、スクリーニングを行い、椎体骨折で生じる海綿骨の微細構造の損傷を治療できる物質を見出し、椎体骨折を治療する薬剤として開発することを可能とした。

15 本発明の目的は、PTH／PTHrP受容体アゴニスト、又はPTH又はPTHrP産生を誘導する活性を有する物質を含有することによって、椎体骨折治療剤、椎体骨折に起因する疼痛の治療又は予防剤、椎体圧迫骨折予防剤、又は椎体骨折に起因する運動障害及び／又は神経障害の治療又は予防剤を提供することである。

20 また、本発明の目的は、1) 非ヒト動物の椎体骨に外科的な損傷を与える工程、2) 当該非ヒト動物に被検物質を投与する工程、及び3) 当該非ヒト動物又はそれに由来する検体の椎体骨の外科的な損傷の回復を測定する工程、を含むことによって、椎体骨折治療剤の評価方法を提供することである。

課題を解決するための手段

本発明は、以下に示すものである。

(1) PTH/PTHrP受容体アゴニストを含有することを特徴とする、椎体骨折治療剤。

5 (2) PTH/PTHrP受容体アゴニストが、副甲状腺ホルモン(PTH)、副甲状腺ホルモン関連ペプチド(PTHrP)、又はそれらの部分活性ポリペプチド、若しくはそれらのアナログである、(1)に記載の椎体骨折治療剤。

(3) PTH、PTHrP又はそれらの部分活性ポリペプチドが、PTH(1-84)、PTH(1-37)、PTH(1-34)、PTH(1-31)、PTHrP(1-141)、PTHrP(1-139)、PTHrP(1-86)、PTHrP(1-40)、PTHrP(1-37)、PTHrP(1-36)、及びPTHrP(1-34)のいずれかである、(2)に記載の椎体骨折治療剤。

(4) PTH、PTHrP又はそれらの部分活性ポリペプチドが、ヒトPTH又はヒトPTHrPに由来するアミノ酸配列を有するポリペプチドである、(2)又は
15 (3)に記載の椎体骨折治療剤。

(5) PTH、PTHrP又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログが、PTH、PTHrP又はそれらの部分活性ポリペプチドにおけるアミノ酸配列のうち、1~10個のアミノ酸を別のアミノ酸に置換したポリペプチドである、(2)に記載の椎体骨折治療剤。

20 (6) PTH、PTHrP又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログが、PTH(1-84)、PTH(1-37)、PTH(1-34)、PTH(1-31)、PTHrP(1-141)、PTHrP(1-139)、PTHrP(1-86)、PTHrP(1-40)、PTHrP(1-37)、PTHrP(1-36)、及びPTHrP(1-34)のいずれかのアミノ酸配列のうち、1~10個のアミノ酸を別の

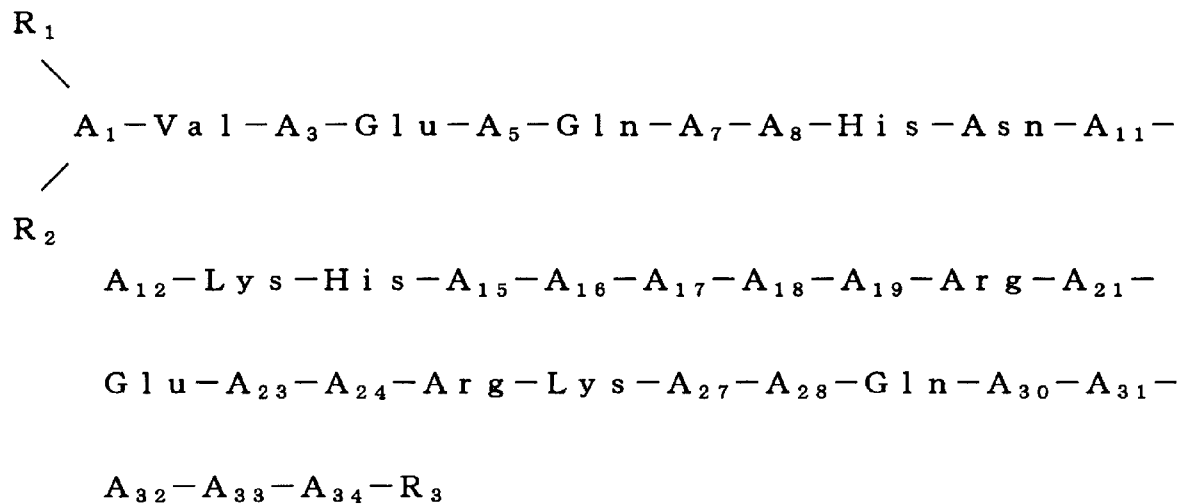
アミノ酸に置換したポリペプチドである、(5)に記載の椎体骨折治療剤。

(7) PTH、PTHrP又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログが、ヒトPTH又はヒトPTHrPに由来するアミノ酸配列のうち、1～10個のアミノ酸を別のアミノ酸に置換したポリペプチドである、(5)又は(6)に記載の椎体骨折治療剤。

(8) PTH、PTHrP又はそれらの部分活性ポリペプチド、若しくはそれらのアナログが、製薬上許容される塩である、(1)～(7)のいずれかに記載の椎体骨折治療剤。

(9) PTH、PTHrP又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログが下記式のポリペプチド：

[化1]



ただし、

A_1 はSer、Ala、又はDapであり；

A_3 はSer、Thr、又はAibであり；

15 A_5 はLeu、Nle、Ile、Cha、 β -Nal、Trp、Pal、Phe、又はp-X-Pheであり、この際、XはOH、ハロゲン、又はCH₃であり；

A_7 はLeu、Nle、Ile、Cha、 β -Nal、Trp、Pal、Phe、又

は $p-X-Phe$ であり、この際、 X はOH、ハロゲン、又は CH_3 であり；

A_8 はMet、Nva、Leu、Val、Ile、Cha、又はNleであり；

A_{11} はLeu、Nle、Ile、Cha、 $\beta-Nal$ 、Trp、Pal、Phe又は
 $p-X-Phe$ であり、この際、 X はOH、ハロゲン、又は CH_3 であり；

5 A_{12} はGly又はAibであり；

A_{15} はLeu、Nle、Ile、Cha、 $\beta-Nal$ 、Trp、Pal、Phe、
 又は $p-X-Phe$ であり、この際、 X はOH、ハロゲン、又は CH_3 であり；

A_{16} はSer、Asn、Ala、又はAibであり；

A_{17} はSer、Thr、又はAibであり；

10 A_{18} はMet、Nva、Leu、Val、Ile、Nle、Cha、又はAibで
 あり；

A_{19} はGlu又はAibであり；

A_{21} はVal、Cha、又はMetであり；

A_{23} はTrp又はChaであり；

15 A_{24} はLeu又はChaであり；

A_{27} はLys、Aib、Leu、hArg、Gln、又はChaであり；

A_{28} はLeu又はChaであり；

A_{30} はAsp又はLysであり；

A_{31} はVal、Nle、若しくはChaである、又は欠損しており；

20 A_{32} はHisである又は欠損しており；

A_{33} はAsnである又は欠損しており；

A_{34} はPhe、Tyr、Amp、若しくはAibである、又は欠損しており；

R_1 及び R_2 は、それぞれ独立して、H、 C_{1-12} アルキル、 C_{2-12} アルケニル、 C_{2-12} アルキニル、 C_{7-20} フェニルアルキル、 C_{11-20} ナフチルアルキル、 C_{1-12}

ヒドロキシアルキル、 C_{2-12} ヒドロキシアルケニル、 C_{7-20} ヒドロキシフェニルアルキル、若しくは C_{11-20} ヒドロキシナフチルアルキルであり；又は R_1 及び R_2 の両方又は一方のみが COE_1 であり、この際、 E_1 は C_{1-12} アルキル、 C_{2-12} アルケニル、 C_{2-12} アルキニル、 C_{7-20} フェニルアルキル、 C_{11-20} ナフチルアルキル、 C_{1-12} ヒドロキシアルキル、 C_{2-12} ヒドロキシアルケニル、 C_{7-20} ヒドロキシフェニルアルキル、若しくは C_{11-20} ヒドロキシナフチルアルキルであり；及び

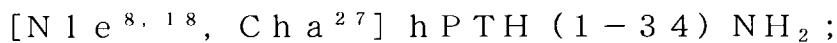
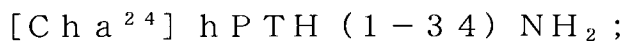
R_3 は OH 、 NH_2 、 C_{1-12} アルコキシ、又は $NH-Y-CH_2-Z$ であり、この際、 Y は C_{1-12} 炭化水素部分であり、 Z は H 、 OH 、 CO_2H 、又は $CONH_2$ であり；

10 A_5 、 A_7 、 A_8 、 A_{11} 、 A_{15} 、 A_{18} 、 A_{21} 、 A_{23} 、 A_{24} 、 A_{27} 、 A_{28} 及び A_{31} の少なくとも一つは Cha である、又は A_3 、 A_{12} 、 A_{16} 、 A_{17} 、 A_{18} 、 A_{19} 及び A_{34} の少なくとも一つは Aib である；

又はこれらの製薬上許容できる塩である、(1)又は(2)に記載の椎体骨折治療剤。

(10) PTH、PTHrP又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログが、下

15 記式のポリペプチド：



20 $[Cha^{28}] hPTH(1-34)NH_2;$



[C h a^{24, 28, 31}, L y s³⁰] h P T H (1 - 3 4) N H₂ ;

[C h a^{7, 11}, N l e^{8, 18}, T y r³⁴] h P T H (1 - 3 4) N H₂ ;

[C h a^{7, 11}, N l e^{8, 18}, A i b^{16, 19}, T y r³⁴] h P T H (1 - 3 4) N H₂ ;

5 [C h a^{7, 11}, N l e^{8, 18, 31}, A i b^{16, 19}, T y r³⁴] h P T H (1 - 3 4) N H₂ ;

[C h a¹¹] h P T H (1 - 3 4) N H₂ ;

[C h a^{28, 31}] h P T H (1 - 3 4) N H₂ ;

[C h a^{7, 11}, N l e^{8, 18}, A i b³⁴] h P T H (1 - 3 4) N H₂ ;

10 [C h a¹⁵] h P T H (1 - 3 4) N H₂ ;

[C h a^{7, 11}, A i b¹⁹] h P T H (1 - 3 4) N H₂ ;

[C h a^{7, 11}, A i b¹⁶] h P T H (1 - 3 4) N H₂ ;

[A i b^{16, 19}] h P T H (1 - 3 4) N H₂ ;

[A i b¹²] h P T H (1 - 3 4) N H₂ ;

15 [A i b³] h P T H (1 - 3 4) N H₂ ;

[C h a^{7, 11}, A i b¹⁹, L y s³⁰] h P T H (1 - 3 4) N H₂ ;

[C h a⁷] h P T H (1 - 3 4) N H₂ ;

[C h a^{24, 28, 31}] h P T H (1 - 3 4) N H₂ ;

[A i b¹⁷] h P T H (1 - 3 4) N H₂ ; 及び

20 [C h a^{7, 11, 15}] h P T H (1 - 3 4) N H₂、

からなる群より選択されるペプチド、又はこれらの製薬上許容できる塩である、
(9) に

記載の椎体骨折治療剤。

(11) P T H、P T H r P 又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログが下記

式のポリペプチド：

[化2]

R_1

＼

$A_1 - V a l - A_3 - G l u - A_5 - G l n - A_7 - A_8 - H i s - A_{10} - A_{11} -$

/

R_2

$A_{12} - L y s - A_{14} - A_{15} - A_{16} - A_{17} - A_{18} - A_{19} - A r g - A r g -$

$A_{22} - A_{23} - A_{24} - A_{25} - A_{26} - A_{27} - A_{28} - A_{29} - A_{30} - A_{31} -$

$A_{32} - A_{33} - A_{34} - R_3$

ただし、

A_1 はA l a、S e r、又はD a pであり；

5 A_3 はS e r又はA i bであり；

A_5 はH i s、I l e、又はC h aであり；

A_7 はL e u、C h a、N l e、 β -N a l、T r p、P a l、P h e、又はp-X
-P h eであり、この際、XはOH、ハロゲン、又はCH₃であり；

A_8 はL e u、M e t、又はC h aであり；

10 A_{10} はA s p又はA s nであり；

A_{11} はL y s、L e u、C h a、P h e、又は β -N a lであり；

A_{12} はG l y又はA i bであり；

A_{14} はS e r又はH i sであり；

A_{15} はI l e、又はC h aであり；

15 A_{16} はG l n又はA i bであり；

A_{17} はA s p又はA i bであり；

A_{18} はL e u、A i b、又はC h aであり；

- A_{19} はA r g 又はA i b であり；
- A_{22} はP h e、G l u、A i b、又はC h a であり；
- A_{23} はP h e、L e u、L y s、又はC h a であり；
- A_{24} はL e u、L y s、又はC h a であり；
- 5 A_{25} はH i s、A i b、又はG l u であり；
- A_{26} はH i s、A i b、又はL y s であり；
- A_{27} はL e u、L y s、又はC h a であり；
- A_{28} はI l e、L e u、L y s、又はC h a であり；
- A_{29} はA l a、G l u、又はA i b であり；
- 10 A_{30} はG l u、C h a、A i b、又はL y s であり；
- A_{31} はI l e、L e u、C h a、若しくはL y s である、又は欠損しており；
- A_{32} はH i s である又は欠損しており；
- A_{33} はT h r である又は欠損しており；
- A_{34} はA l a である又は欠損しており；
- 15 R_1 及び R_2 は、それぞれ独立して、H、 C_{1-12} アルキル、 C_{2-12} アルケニル、 C_{2-12} アルキニル、 C_{7-20} フェニルアルキル、 C_{11-20} ナフチルアルキル、 C_{1-12} ヒドロキシアリル、 C_{2-12} ヒドロキシアリケニル、 C_{7-20} ヒドロキシフェニルアルキル、若しくは C_{11-20} ヒドロキシナフチルアルキルであり；又は R_1 及び R_2 の一方及び一方のみが COE_1 であり、この際、 E_1 は C_{1-12} アルキル、 C_{2-12} アルケニル、 C_{2-12} アルキニル、 C_{7-20} フェニルアルキル、 C_{11-20} 、ナフチルアルキル、 C_{1-12} ヒドロキシアリル、 C_{2-12} ヒドロキシアリケニル、 C_{7-20} ヒドロキシフェニルアルキル、若しくは C_{11-20} ヒドロキシナフチルアルキルであり；及
- 20 び
- R_3 はOH、 NH_2 、 C_{1-12} アルコキシ、又は $NH-Y-CH_2-Z$ であり、この際、

YはC₁₋₁₂炭化水素部分であり、ZはH、OH、CO₂H、又はCONH₂であり；

A₅、A₇、A₈、A₁₁、A₁₅、A₁₈、A₂₂、A₂₃、A₂₄、A₂₇、A₂₈、A₃₀、

若しくはA₃₁の少なくともひとつはChaである、又はA₃、A₁₂、A₁₆、A₁₇、

A₁₈、A₁₉、A₂₂、A₂₅、A₂₆、A₂₉、A₃₀、若しくはA₃₄の少なくともひとつ

5 つはAibである；

又はこれらの製薬上許容できる塩である、(1)又は(2)に記載の椎体骨折治療剤。

(12)PTH、PTHrP又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログが、式：

[Glu^{22, 25}, Leu^{23, 28, 31}, Aib²⁹, Lys^{26, 30}]hPTHrP(1

10 -34)NH₂のポリペプチド又はその製薬上許容できる塩である、(11)に記載

の椎体骨折治療剤。

(13)PTH、PTHrP又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログが下記
式のポリペプチド：

[化3]

R₁

\

A₁-Val-A₃-Glu-A₅-Gln-A₇-A₈-His-A₁₀-A₁₁-

/

R₂

A₁₂-Lys-A₁₄-A₁₅-A₁₆-A₁₇-A₁₈-A₁₉-Arg-Arg-

A₂₂-A₂₃-A₂₄-A₂₅-A₂₆-A₂₇-A₂₈-A₂₉-A₃₀-A₃₁-

A₃₂-A₃₃-A₃₄-R₃

ただし、

15 A₁はAla、Ser、又はDapであり；A₃はSer又はAibであり；

A₅はHis、Ile、Acc、又はChaであり；

A₇はLeu、Cha、Nle、β-Nal、Trp、Pal、Acc、Phe、又

は $p-X-Phe$ であり、この際、 X はOH、ハロゲン、又は CH_3 であり；

A_8 はLeu、Met、Acc、又はChaであり；

A_{10} はAsp又はAsnであり；

A_{11} はLys、Leu、Cha、Acc、Phe、又は $\beta-Nal$ であり；

5 A_{12} はGly、Acc、又はAibであり；

A_{14} はSer又はHisであり；

A_{15} はIle、Acc、又はChaであり；

A_{16} はGln又はAibであり；

A_{17} はAsp又はAibであり；

10 A_{18} はLeu、Aib、Acc、又はChaであり；

A_{19} はArg又はAibであり；

A_{22} はPhe、Glu、Aib、Acc、又はChaであり；

A_{23} はPhe、Leu、Lys、Acc、又はChaであり；

A_{24} はLeu、Lys、Acc、又はChaであり；

15 A_{25} はHis、Lys、Aib、Acc、又はGluであり；

A_{26} はHis、Aib、Acc、又はLysであり；

A_{27} はLeu、Lys、Acc、又はChaであり；

A_{28} はIle、Leu、Lys、Acc、又はChaであり；

A_{29} はAla、Glu、Acc、又はAibであり；

20 A_{30} はGlu、Leu、Nle、Cha、Aib、Acc、又はLysであり；

A_{31} はIle、Leu、Cha、Lys若しくはAccである、又は欠損しており；

A_{32} はHisである又は欠損しており；

A_{33} はThrである又は欠損しており；

A_{34} はAlaである又は欠損しており；

- R_1 及び R_2 は、それぞれ独立して、 H 、 C_{1-12} アルキル、 C_{2-12} アルケニル、 C_{2-12} アルキニル、 C_{7-20} フェニルアルキル、 C_{11-20} ナフチルアルキル、 C_{1-12} ヒドロキシアルキル、 C_{2-12} ヒドロキシアルケニル、 C_{7-20} ヒドロキシフェニルアルキル、若しくは C_{11-20} ヒドロキシナフチルアルキルであり；又は R_1 及び R_2 の一方及び一方のみが COE_1 であり、この際、 E_1 は C_{1-12} アルキル、 C_{2-12} アルケニル、 C_{2-12} アルキニル、 C_{7-20} フェニルアルキル、 C_{11-20} ナフチルアルキル、 C_{1-12} ヒドロキシアルキル、 C_{2-12} ヒドロキシアルケニル、 C_{7-20} ヒドロキシフェニルアルキル、若しくは C_{11-20} ヒドロキシナフチルアルキルであり；及び
- 10 R_3 は OH 、 NH_2 、 C_{1-12} アルコキシ、又は $NH-Y-CH_2-Z$ であり、この際、 Y は C_{1-12} 炭化水素部分であり、 Z は H 、 OH 、 CO_2H 、又は $CONH_2$ であり；
 A_5 、 A_7 、 A_8 、 A_{11} 、 A_{12} 、 A_{15} 、 A_{18} 、 A_{22} 、 A_{23} 、 A_{24} 、 A_{25} 、 A_{26} 、 A_{27} 、 A_{28} 、 A_{29} 、 A_{30} 、又は A_{31} の少なくとも一つが Acc である；
 又はこれらの製薬上許容できる塩である、(1) 又は (2) に記載の椎体骨折治療剤。
- 15 (14) PTH、PTHrP 又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログが、下記式のポリペプチド：
- $[Glu^{22, 25}, Leu^{23, 28}, Lys^{26, 30}, Aib^{29}, Ahc^{31}] hPTHrP(1-34)NH_2$ ；
- $[Glu^{22, 25}, Ahc^{23}, Lys^{26, 30}, Leu^{28, 31}, Aib^{29}] hPTHrP(1-34)NH_2$ ；
- 20 $[Glu^{22, 25}, Leu^{23, 28, 31}, Lys^{26, 30}, Ahc^{27}, Aib^{29}] hPTHrP(1-34)NH_2$ ；
- $[Glu^{22, 25, 29}, Leu^{23, 28, 31}, Lys^{26}, Ahc^{30}] hPTHrP(1-34)NH_2$ ；

[C h a²², L e u^{23, 28, 31}, G l u²⁵, L y s^{26, 30}, A h c²⁷, A i b²⁹]

h P T H r P (1 - 3 4) N H₂ ;

[G l u^{22, 25}, L e u^{23, 28, 31}, A h c²⁴, L y s^{26, 30}, A i b²⁹] h P T

H r P (1 - 3 4) N H₂ ;

5 [G l u^{22, 29}, L e u^{23, 28, 31}, A i b²⁵, L y s^{26, 30}, A h c²⁷] h P T

H r P (1 - 3 4) N H₂ ;

[G l u²², L e u^{23, 28, 31}, A i b^{25, 29}, L y s^{26, 30}, A h c²⁷] h P T

H r P (1 - 3 4) N H₂ ;

[A h c²², L e u^{23, 28, 31}, G l u²⁵, L y s^{26, 30}, A i b²⁹] h P T H

10 r P (1 - 3 4) N H₂ ;

[G l u^{22, 25}, L e u^{23, 31}, L y s^{26, 30}, A h c²⁸, A i b²⁹] h P T H

r P (1 - 3 4) N H₂ ;

[C h a²², A h c²³, G l u²⁵, L y s^{26, 30}, L e u^{28, 31}, A i b²⁹] h

P T H r P (1 - 3 4) N H₂ ;

15 [C h a²², L e u^{23, 28, 31}, A h c^{24, 27}, G l u²⁵, L y s^{26, 30}, A i b

²⁹] h P T H r P (1 - 3 4) N H₂ ;

[G l u²², L e u^{23, 28, 31}, A h c^{24, 27}, L y s^{25, 26}, A i b²⁹] h P T

H r P (1 - 3 4) N H₂ ;

[A h c^{18, 24, 27}, G l u²², C h a²³, L y s^{25, 26}, L e u²⁸, A i b²⁹]

20 h P T H r P (1 - 3 4) N H₂ ;

[G l u²², C h a²³, A h c²⁴, L y s^{25, 26}, L e u²⁸, A i b²⁹] h P T

H r P (1 - 3 4) N H₂ ;

[A h c^{22, 24}, L e u^{23, 28, 31}, G l u²⁵, L y s^{26, 30}, A i b²⁹] h P T

H r P (1 - 3 4) N H₂ ;

[A h c^{22, 24}, L e u^{23, 28}, L y s^{25, 26}, A i b²⁹] h P T H r P (1 - 34) N H₂ ;

又はこれらの製薬上許容できる塩である、(13)に記載の椎体骨折治療剤。

(15) P T H、P T H r P 又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログが、下

5 記式のポリペプチド：

[N l e³¹] h P T H (1 - 34) N H₂ ;

[h A r g²⁷] h P T H (1 - 34) N H₂ ;

[D a p¹, N l e^{8, 18}, T y r³⁴] h P T H (1 - 34) N H₂ ;

又はこれらの製薬上許容できる塩である、(1)又は(2)に記載の椎体骨折治療剤。

10 (16) P T H、P T H r P 又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログが、下記式の

ポリペプチド：

[G l u^{22, 25}, C h a²³, L y s²⁶, L e u^{28, 31}, A i b²⁹, N l e³⁰] h P T H r P (1 - 34) N H₂ ;

15 [G l u^{22, 25}, C h a²³, L y s^{26, 30}, L e u^{28, 31}, A i b²⁹] h P T H r P (1 - 34) N H₂ ;

[G l u^{22, 25}, C h a²³, L y s^{26, 30}, A i b²⁹] h P T H r P (1 - 34) N H₂ ;

20 [G l u^{22, 25}, C h a²³, L y s^{26, 30}, L e u²⁸, A i b²⁹] h P T H r P (1 - 34) N H₂ ;

[L e u²⁷, A i b²⁹] h P T H (1 - 34) N H₂ ;

又はこれらの製薬上許容できる塩である、(1)又は(2)に記載の椎体骨折治療剤。

(17) P T H 又は P T H r P 産生を誘導する活性を有する物質を含有することを特徴とする、椎体骨折治療剤。

(18) PTH又はPTHrP産生を誘導する活性を有する物質がカルシウム感受性受容体アンタゴニストである、(17)に記載の椎体骨折治療剤。

(19) 椎体骨折が海綿骨における骨折である、(1)～(18)のいずれかに記載の椎体骨折治療剤。

5 (20)(1)～(16)のいずれかに記載の、PTH、PTHrP、若しくはそれらの部分活性ポリペプチド、又はそれらのアナログ、若しくは(17)又は(18)に記載のPTH又はPTHrP産生を誘導する活性を有する物質を含有することを特徴とする、椎体骨折に起因する疼痛の治療又は予防剤。

10 (21)(1)～(16)のいずれかに記載の、PTH、PTHrP、若しくはそれらの部分活性ポリペプチド、又はそれらのアナログ、若しくは(17)又は(18)に記載のPTH又はPTHrP産生を誘導する活性を有する物質を含有することを特徴とする、椎体圧迫骨折予防剤。

15 (22)(1)～(16)のいずれかに記載の、PTH、PTHrP、若しくはそれらの部分活性ポリペプチド、又はそれらのアナログ、若しくは(17)又は(18)に記載のPTH又はPTHrP産生を誘導する活性を有する物質を含有することを特徴とする、椎体骨折に起因する運動障害及び／又は神経障害の治療又は予防剤。

20 (23) 椎体骨折治療剤の評価方法であって、1) 非ヒト動物の椎体骨に外科的な損傷を与える工程、2) 当該非ヒト動物に被検物質を投与する工程、及び3) 当該非ヒト動物又はそれに由来する検体の椎体骨の外科的な損傷の回復を測定する工程、を含むことを特徴とする、評価方法。

(24) 椎体骨の外科的な損傷の回復の測定を行った結果を、さらに正常非ヒト動物若しくは対象非ヒト動物、又はそれに由来する検体における測定の結果と比較する工程を含む、(23)に記載の評価方法。

(25) 椎体骨の外科的な損傷が、椎体骨の皮質骨を通り海綿骨まで達する損傷で

あることを特徴とする、(23)又は(24)に記載の評価方法。

(26) 椎体骨の外科的な損傷が、ドリルによる穿孔による損傷であることを特徴とする、(23)～(25)のいずれかに記載の評価方法。

(27) 椎体骨の外科的な損傷の回復の測定を、検体の組織学的観察、又はX線CTを用いた形態観察により行う、(23)～(26)のいずれかに記載の評価方法。

(28) 椎体骨の外科的な損傷の回復の測定を、痛覚又は運動機能の測定により行う、(23)～(26)のいずれかに記載の評価方法。

(29) 椎体骨の外科的な損傷の回復の計測を、検体の組織化学的解析、骨分化発生マーカーのタンパク質又は遺伝子の発現の解析により行う、(23)～(26)のいずれかに記載の評価方法。

(30) 非ヒト動物が、骨粗鬆症のモデル動物である、(23)～(29)のいずれかに記載の評価方法。

(31) 骨粗鬆症のモデル動物が、卵巣摘出モデルである、(30)に記載の評価方法。

(32) 非ヒト動物が、霊長類又は齧歯類の非ヒト動物である、(23)～(31)のいずれかに記載の評価方法。

(33) 齧歯類の非ヒト動物が、ラットである、(32)に記載の評価方法。

(34) 椎体骨が、腰椎の椎体骨である、(23)～(33)のいずれかに記載の評価方法。

(35) 腰椎の椎体骨が、第4腰椎及び／又は第5腰椎である、(34)に記載の評価方法。

(36) 被検物質の投与を、経口又は非経口により行う、(23)～(35)のいずれかに記載の評価方法。

発明の効果

本発明は、PTH／PTHrP受容体アゴニスト、又はPTH又はPTHrP産生を誘導する活性を有する物質を含有することによって、椎体骨折治療剤、椎体骨折に起因する疼痛の治療又は予防剤、椎体圧迫骨折予防剤、又は椎体骨折に起因する運動障害及び／又は神経障害の治療又は予防剤を提供することを可能とする。

また、本発明は、1) 非ヒト動物の椎体骨に外科的な損傷を与える工程、2) 当該非ヒト動物に被検物質を投与する工程、及び3) 当該非ヒト動物又はそれに由来する検体の椎体骨の外科的な損傷の回復を測定する工程、を含むことによって、椎体骨折治療剤の評価方法を提供することを可能とする。

10

図面の簡単な説明

図1は、損傷椎体のmicro CT画像（モデル作製日（day 0）での3D画像と2D画像の代表例）である。

図2は、自然修復過程におけるマッソン・トリクローム染色像である。

15 図3は、自然修復過程における海綿骨の損傷部の骨体積密度を示すグラフである。

図4は、hPTH（1-34）又はPTHrPアナログAを7日間又は14日間投与したときのマッソン・トリクローム染色像である。

図5は、hPTH（1-34）又はPTHrPアナログAを7日間又は14日間投与したときの損傷椎体の海綿骨の損傷部における骨体積密度を示すグラフである。

20 図6は、hPTH（1-34）又はPTHrPアナログAを7日間又は14日間投与したときの非損傷椎体の海綿骨における骨体積密度を示すグラフである。

図7は、偽手術を行ったラットと腰椎椎体骨損傷モデルのラットの経時的体重変化を示したグラフ（A）、及び椎体骨損傷モデルのラットにおいてhPTH（1-34）及びPTHrPアナログAを投与した群とVehicleを投与した群での

ラットの経時的体重変化を示したグラフ（B）である。

発明を実施するための形態

本発明者らは、椎体骨折で生じる海綿骨の微細構造の損傷を生じさせる動物モデルとその評価方法を確立した。椎体骨折で生じる海綿骨の微細構造の損傷を生じさせる動物モデルとその評価方法が確立できたことで、椎体骨折で生じる海綿骨の微細構造の損傷を治療できる物質をスクリーニングすることが可能となった。その結果、h P T H（1－3 4）とP T H r PアナログA（配列番号4 2）は、非損傷椎体では薬効が検出されない投与量にもかかわらず、損傷椎体では、椎体骨折で生じる海綿骨の微細構造の損傷を治療する効果を発揮した。すなわち、h P T H（1－3 4）とP T H r PアナログAは、椎体骨折で生じる海綿骨の微細構造の損傷に対し、特異的に治療効果を示す物質であることを見出した。従って、P T H／P T H r P受容体アゴニスト、P T H又はP T H r P産生を誘導する活性を有する物質は、椎体骨折で生じる海綿骨の微細構造の損傷を治療できる薬剤となることを見出した。

また、P T H／P T H r P受容体アゴニスト、P T H又はP T H r P産生を誘導する活性を有する物質は、海綿骨の微細構造の損傷を治療できるため、骨構造が連続的に破断し、椎体が圧潰していく椎体骨折の進行を止められることを見出した。

さらに、P T H／P T H r P受容体アゴニスト、P T H又はP T H r P産生を誘導する活性を有する物質は、椎体骨折に起因する運動障害及び／又は神経障害の治療又は予防剤となることを見出した。

P T H／P T H r P受容体アゴニスト、P T H又はP T H r P産生を誘導する活性を有する物質は、椎体骨折患者のQ O Lを高め生命予後を改善する、画期的な薬剤となる。新しい椎体骨折を治療するこれらの薬剤は、患者個人の利益のみならず、入院患者や寝たきり患者を減らし医療費を削減することができ、社会的利益にも大

きく貢献できる。

[P T H / P T H r P 受容体アゴニスト]

P T H / P T H r P 受容体は P T H 1 R、P T H 1 又は P P R と呼ばれる G タンパク質共役型受容体の 1 種であり、副甲状腺ホルモン (P T H) 及び副甲状腺ホル
5 モン関連ペプチド (P T H r P) の両者と結合し細胞内にホルモンのシグナルを伝達する働きをしている。つまり、P T H 及び P T H r P による共通の機能の発揮には、この P T H / P T H r P 受容体の働きが関与していると考えられる。特に P T H 及び P T H r P のカルシウム代謝における作用においては、この P T H / P T H r P 受容体が重要な役割を演じている。従って、本発明における椎体骨折治療剤
10 は P T H / P T H r P 受容体を活性化する物質、つまり P T H / P T H r P 受容体アゴニストを含有することを特徴とする。

P T H / P T H r P 受容体アゴニストの代表としては、後述の P T H、P T H r P、又はそれらの部分ポリペプチド、若しくはそのアナログが挙げられるが、それに限定されず、P T H / P T H r P 受容体に結合して細胞内にシグナルを発生させる物質であれば本発明の椎体骨折治療剤に用いることができる。そのような P T H、
15 P T H r P、又はそれらの部分ポリペプチド、若しくはそのアナログ以外の P T H / P T H r P 受容体アゴニストの例としては、P T H / P T H r P 受容体に対するアゴニスト抗体、P T H 又は P T H r P の構造や性状を模倣する形でデザインされた P T H 又は P T H r P のミミック分子、また P T H / P T H r P 受容体の活性化
20 を指標にスクリーニングすることによって得られた低分子化合物などが挙げられる。

P T H / P T H r P 受容体の活性化とは、細胞に発現した P T H / P T H r P 受容体への結合や細胞内のシグナルを測定することによって判断をすることができる。P T H / P T H r P 受容体へのアゴニストの結合の測定は、被検物質に直接放射性同位元素、蛍光物質、発光物質、その他検出用の物質 (ビオチン-アビジン系に関

連する物質、タグ配列など）で標識を行い、PTH／PTHrP受容体を発現した細胞と反応させてその結合を検出される標識の量を調べることで測定することができる。また、別の方法としてはPTH、PTHrP、又はそれらの部分ポリペプチド、若しくはそのアナログやその他のPTH／PTHrP受容体の結合する物質の中から標準物質を選定し、その標準物質を直接放射性同位元素、蛍光物質、発光物質、その他検出用の物質（ビオチン－アビジン系に関連する物質、タグ配列など）で標識を行い、被検物質と共存させた形でPTH／PTHrP受容体を発現した細胞と反応させて、標準物質のPTH／PTHrP受容体への結合が被検物質の存在によって競合的に阻害されたかについてを標準物質の標識の量を調べることによって測定することが可能である。また、PTH／PTHrP受容体へのアゴニストの結合は、PTH／PTHrP受容体を発現した細胞を用いる方法の他、当該細胞から調製された細胞膜を用いることで、当該細胞を用いるのと同様の方法で測定することが可能である。PTH／PTHrP受容体アゴニストの結合による細胞内シグナル発生の測定については、被検物質をPTH／PTHrP受容体を発現した細胞と反応させて、細胞内のcAMP（環状アデノシン－リン酸）の濃度上昇を調べることによって測定することができる。細胞内のcAMP濃度の測定は、当業者であれば適宜既存技術の情報を用いて実施することができ、また市販のキットなども用いることも可能であるが、例えば特表平11－509201に記載の方法などでも実施が可能である。また、PTH／PTHrP受容体アゴニストの結合による細胞内シグナル発生を測定する方法としては、被検物質をPTH／PTHrP受容体を発現した細胞と反応させて、細胞内のカルシウムイオンの濃度上昇を調べることによって測定することができる。細胞内のカルシウムイオンの濃度上昇は、Fura-2AM・Fura-4AMなどのカルシウム感受性蛍光物質やエクオリンなどのカルシウム感受性発光物質などを用いることで、当業者であれば適宜既存技術の情

報を用いて実施することが可能である。また、PTH/PTHrP受容体アゴニストの結合による細胞内シグナル発生を測定する別の方法としては、細胞内のホスホリパーゼA₂ (PLA₂)の活性亢進を調べることによって測定することができる。PLA₂の活性亢進を調べる方法としては、当業者であれば適宜既存技術の情報を用いて実施することが可能であるが、例えばCayman Chemical社のcPhospholipase A₂ Colorimetric Assay Kitなどの市販のキットやMolecular Probes社のRed/Green BODIPY (R) PC-A₂などの市販の試薬などを用いることで調べることが可能である。

- 10 PTH/PTHrP受容体への結合や細胞内のシグナルを測定に用いるPTH/PTHrP受容体発現細胞とは、PTH/PTHrP受容体を内在的に発現している細胞又はPTH/PTHrPを人為的に発現した細胞のいずれでも用いることができる。PTH/PTHrP受容体を内在的に発現している細胞とは、ヒトや非ヒト動物における生体内でPTH/PTHrP受容体を発現している組織や細胞から
- 15 得られた細胞や細胞株であり、PTH/PTHrP受容体を発現している組織や細胞としては例えば骨における骨芽細胞・骨細胞や破骨細胞、腎臓における腎臓の遠位尿細管や集合管の細胞、子宮や小腸における平滑筋・腺組織や上皮の細胞、その他卵巣や肝臓の細胞などから得られた細胞をいう (IUPHAR DATABASE / <http://www.iuphar-db.org/index.jsp/> のPHT1の説明より)。また、PTH
- 20 /PTHrP受容体を内在的に発現している細胞株の例としては、例えば骨芽細胞系の細胞株があり、より具体的にはヒト骨肉腫細胞株SaOS-2細胞・ラット骨芽細胞様細胞であるROS17/2.8細胞等を挙げることができる。PTH/PTHrP受容体を人為的に発現した細胞とは、PTH/PTHrP受容体タンパク質をコードする遺伝子を遺伝子工学的手法によって宿主細胞の導入し、当該PTH

／PTHrP受容体タンパク質を発現させた細胞をいう。PTH／PTHrP受容体タンパク質とは、例えば配列番号1にアミノ酸配列が示されているヒトPTH／PTHrP受容体タンパク質が挙げられる。このヒトPTH／PTHrP受容体タンパク質をコードする遺伝子が導入された宿主細胞では、配列番号1のアミノ酸配列のタンパク質として翻訳された後、シグナル配列であるN末端から28個までのアミノ酸が切り取られ、29番目以降のアミノ酸配列からなる成熟配列のヒトPTH／PTHrP受容体タンパク質が細胞表面に発現される。またヒトPTH／PTHrP受容体タンパク質以外にも、配列番号2にアミノ酸配列が示されているチンパンジー（*Pan troglodytes*）のPTH／PTHrP受容体、配列番号3にアミノ酸配列が示されているアカゲザル（*Macaca mulatta*）のPTH／PTHrP受容体、配列番号4にアミノ酸配列が示されているオランウータン（*Pongo abelii*）のPTH／PTHrP受容体、配列番号5にアミノ酸配列が示されているブタ（*Sus scrofa*）のPTH／PTHrP受容体、配列番号6にアミノ酸配列が示されているウマ（*Equus caballus*）のPTH／PTHrP受容体、配列番号7にアミノ酸配列が示されているウシ（*Bos taurus*）のPTH／PTHrP受容体、配列番号8にアミノ酸配列が示されているコモンマーモセット（*Callithrix jacchus*）のPTH／PTHrP受容体、配列番号9に示されているイヌ（*Canis lupus familiaris*）のPTH／PTHrP受容体、配列番号10に示されているラット（*Rattus norvegicus*）のPTH／PTHrP受容体、配列番号11に示されているマウス（*Mus musculus*）のPTH／PTHrP受容体、配列番号12に示されているハイイロジネズミオポッサム（*Monodelphis domestica*）のPTH／PTHrP受容体等のタンパク質を発現させた細胞も用いることができる。また、ヒトのPTH／PTHrP受容体とハイイロジネズミオポッサムのPTH／PTHrPの間でのホモロジーは、NCBIのBLASTp法での両者を並列的に並べたところ、保存的なアミノ酸置換を許さ

ない相同性 (Identities) で 80 %、保存的アミノ酸への置換を許容する相同性 (Positives) では 86 % のホモロジーを示す。そのことから、本発明の PTH/PTHrP 受容体アゴニストの結合や細胞内シグナル発生の測定に用いることのできる PTH/PTHrP 受容体には、ヒト PTH/PTHrP 受容体のアミノ酸配列と 80 % 以上のホモロジーを有し、PTH/PTHrP 受容体の機能を保持している上述以外の PTH・PTHrP 受容体も含まれる。なお、オポッサムの PTH/PTHrP 受容体にはヒトなどの PTH/PTHrP が結合/作用することは公知である (Juppner H. et al. Endocrinology 134 pp879 1994)。当該 PTH・PTHrP 受容体が PTH/PTHrP 受容体の機能を保持していることを調べるためには、PTH・PTHrP 及びその活性部分ポリペプチド若しくはそのアナログなどの既知の PTH/PTHrP 受容体アゴニストとしての活性を有する物質の結合や細胞内シグナル発生を調べることで確認することができる。遺伝子工学的に PTH/PTHrP 受容体を発現させるための宿主としては、動物細胞 (ヒト及び非ヒト動物に由来するもの)・昆虫細胞・酵母細胞・バクテリア又はウイルス/バクテリオファージなどの中から適宜選択して用いることができるが、好ましくは動物細胞であり、より好ましくは動物細胞から樹立された動物細胞株である。当該動物細胞株の一例としては、Cos-7 細胞株、LLC-PK1 細胞株、HEK293 細胞株又は Act20 細胞株などを挙げることができる。

[PTH、PTHrP 又はその部分活性ポリペプチド]

副甲状腺ホルモン (PTH) とは、魚類以上の脊椎動物の生体内に認められるペプチドホルモンで、不活性なプレプロホルモンの形で発現されてプロセスを受けた後、通常は 84 アミノ酸からなる PTH となる。84 アミノ酸からなる PTH はパラトルモンとも呼ばれ、また、PTH に由来する他の活性部分ポリペプチドと区別するために PTH (1-84) と呼ばれることもある。本発明に用いる PTH の一

つの例としては、配列番号 1 3 にアミノ酸配列が示されているヒトの P T H (1 - 8 4) が挙げられる。また、ヒト以外での P T H (1 - 8 4) に相当する P T H の例としては、配列番号 1 4 にはコモンマーモセット (*Callithrix jacchus*)、配列番号 1 5 にはジャイアントパンダ (*Ailuropoda melanoleuca*)、配列番号 1 6 にはウマ (*Equus caballus*)、配列番号 1 7 にはイヌ (*Canis lupus familiaris*)、配列番号 1 8 にはウシ (*Bos taurus*)、配列番号 1 9 にはネコ (*Felis catus*)、配列番号 2 0 にはブタ (*Sus scrofa*)、配列番号 2 1 にはウサギ (*Oryctolagus cuniculus*)、配列番号 2 2 にはラット (*Rattus norvegicus*) 及び配列番号 2 3 にはマウス (*Mus musculus*) のそれぞれの種に由来する P T H (1 - 8 4) が挙げられ、これらのヒト以外の種に由来する P T H (1 - 8 4) も本発明に用いることができるが、これらに限定されることはない。

また、米国の N a t i o n a l C e t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i n (N C B I) で提供している配列類似性検索プログラムである B L A S T (T h e B a s i c L o c a l A l i g n m e n t S e a r c h T o o l) のデフォルトのパラメーター(マトリックス: B L O S U M 6 2、ギャップコスト; E x i t e n c e = 1 1 ; E x t e n s i o n = 1) でヒト P T H (1 - 8 4) とマウス P T H (1 - 8 4) を比較すると、両者のアミノ酸配列が一致するホモロジー (I d e n t i t y) は 7 1 %、性状の近いアミノ酸への置換を許諾した場合には 8 6 % の類似性 (S i m i l a r i t y) を示した。従って、この明細書に具体的に配列が記載されていないヒト又はヒト以外の種における P T H (1 - 8 4) であっても、ヒト P T H (1 - 8 4) と 7 0 % 以上のホモロジーを示すものであれば、本発明で用いる P T H (1 - 8 4) に含まれる。

また、P T H (1 - 8 4) の部分的なアミノ酸配列を有する P T H 部分活性ポリペプチドも本発明で用いることができる P T H に含まれる。ヒト P T H の代表的な

部分活性ポリペプチドとしては、ヒトPTH（1-37）（C.P. Schmitt et al.,
Kidney Int., 57, 1484 (2000)）（配列番号1のN末端側1番目から37番目までの
アミノ酸配列に相当）、ヒトPTH（1-34）（配列番号1のN末端側1番目から
34番目までのアミノ酸配列に相当）、ヒトPTH（1-31）（J.F. Whitfield and
5 P. Morley, Trends Pharmacol. Sci., 16, 382 (1995)）（配列番号1のN末端側1番
目から31番目までのアミノ酸配列に相当）が例示できる。特にPTH（1-34）
はテリパラチドとも呼ばれ、最初に人工的に合成されてPTH（1-84）と同等
の生物活性を有することが示されたPTHの部分活性ポリペプチドである（J. T.
Potts, J. Endocrinol. 187, 311 (2005)）。また、本発明に用いることができるPT
10 Hの部分活性ポリペプチドの例としては、上述のヒト以外の種に由来するPTH（1
-84）における、PTH（1-37）、PTH（1-34）又はPTH（1-31）
に相当するポリペプチドが挙げられる。

それに加えて、ヒトPTH（1-34）と近いアミノ酸配列を有する他の種に由
来する32から33アミノ酸からなるペプチドとして、ニワトリ（Gallus gallus）
15 のPTH（1-33）（配列番号24）、キンカチョウ（Taeniopygia guttata）のP
TH（1-33）（配列番号25）、ハイイロジネズミオポッサム（Monodelphis
domestica）のPTH（1-33）（配列番号26）が挙げられ、これらも本発明で
用いることができるPTHに含まれる。なお、オポッサムのPTH／PTHrP受
容体にはヒトなどのPTH／PTHrPが結合／作用することは公知である
20 （Juppner H. et al. Endocrinology 134 pp879 1994）。ヒトPTH（1-34）と
ハイイロジネズミオポッサムPTH（1-33）をBLAST法で比較すると両者
の間のホモロジーは63%程度であり、性状の近いアミノ酸への置換を許諾した場
合には82%の類似性を示した。また、ヒトPTHにおいてはPTH（1-34）
の配列のうち最初の21アミノ酸がPTH／PTHrP受容体への結合及びシグナ

ルの発生に重要であることが公知であるが (Gerdella FJ et al J. Biol. Chem. 270 pp6584 1995、Gerdella FJ et al J. Biol. Chem. 271 pp19888, 1996)、ヒト P T H (1 - 3 4) に対してハイイロジネズミオボッサム P T H (1 - 3 3) の間では 1 2 個のアミノ酸配列 (性状の近いアミノ酸への置換を許諾した場合には 9 個) の

5 アミノ酸で置換が起こっていた。

この明細書に具体的に配列が記載されていないヒト又はヒト以外の種における P T H (1 - 3 4) 又はその部分活性ポリペプチドであっても、ヒト P T H (1 - 3 4) と 6 3 % 以上のホモロジーを示すもの、又は 1 2 個以内のアミノ酸置換があるものであれば、本発明で用いる P T H (1 - 3 4) 又はその部分活性ペプチドに含

10 まれる。

副甲状腺ホルモン関連ペプチド (P T H r P) とは、魚類以上の脊椎動物の生体内に認められるペプチドホルモンで、 P T H と構造的に類似し、 P T H と同様にカルシウム代謝に作用する。 P T H r P は不活性なプレプロホルモンの形で発現されてプロセスを受けた後、通常は 1 4 1 アミノ酸又は 1 3 9 アミノ酸からなる P T H

15 r P となる。 1 4 1 アミノ酸又は 1 3 9 アミノ酸からなる P T H r P は P T H に由来する他の活性部分ポリペプチドと区別するためにそれぞれ P T H r P (1 - 1 4 1)、 P T H r P (1 - 1 3 9) と呼ばれることもある。本発明に用いる P T H r P 一つの例としては、配列番号 2 7 にアミノ酸配列が示されているヒトの P T H r P (1 - 1 4 1) (アイソフォーム 1)、又は配列番号 2 8 にアミノ酸配列が示されて

20 いる P T H r P (1 - 1 3 9) (アイソフォーム 2) が挙げられる。

また、ヒト以外での P T H r P (1 - 1 4 1) 又は P T H r P (1 - 1 3 9) に相当す

る P T H の例としては、配列番号 2 9 のアカゲザル (Macaca mulatta) P T H r P (1 - 1 3 9)、配列番号 3 0 のジャイアントパンダ (Ailuropoda melanoleuca) P

TH (1-141)、配列番号31のウシ (*Bos taurus*) のPTHrP (1-141)、
配列番号32のブタ (*Sus scrofa*) PTHrP (1-141)、配列番号33のイヌ
(*Canis lupus familiaris*) のPTHrP (1-141)、配列番号34のウマ (*Equus
caballus*) PTHrP (1-141)、配列番号35のラット (*Rattus norvegicus*)
5 PTHrP (1-141)、配列番号36のマウス (*Mus musculus*) PTHrP (1-
141) 及び配列番号37のウサギ (*Oryctolagus cuniculus*) PTHrP (1-
141) が挙げられ、これらのヒト以外の種に由来するPTH (1-84) も本発
明に用いることができるが、これらに限定されることはない。また、NIHのBL
AST法でのデフォルトのパラメーターでヒトPTHrP (1-141) とウサギ
10 PTHrP (1-141) を比較すると、両者のアミノ酸配列が一致するホモロジ
ー (Identity) は90%、性状の近いアミノ酸への置換を許諾した場合に
は91%の類似性 (Similarity) を示した。

従って、この明細書に具体的に配列が記載されていないヒト又はヒト以外の種に
おけるPTHrP (1-141) 又はPTHrP (1-139) であっても、ヒト
15 PTHrP (1-141) と90%以上のホモロジーを示すものであれば、本発明
で用いるPTHrP (1-141) 又はPTHrP (1-139) に含まれる。

ヒトPTHrPの代表的な部分活性ポリペプチドとしては、ヒトPTHrP (1-
86) (E. Lewin et al., *Kidney Int.*, 58, 71 2000) (配列番号27のN末端側
1番目から86番目のアミノ酸配列に相当)、PTHrP (1-40) (E. Lewin et
20 al., *Kidney Int.*, 58, 71 2000) (配列番号配列番号27のN末端側1番目から4
0番目のアミノ酸配列に相当)、PTHrP (1-37) (L. J. Suva et al., *Science*,
237, 893 1987) (配列番号配列番号27のN末端側1番目から37番目のアミノ酸
配列に相当)、PTHrP (1-34) (B. E. Kemp et al., *Science*, 238, 1568 1987)
(配列番号配列番号27のN末端側1番目から34番目のアミノ酸配列に相当) が

例示できる。

また、本発明に用いることができる P T H r P の部分活性ポリペプチドの例としては、上述のヒト以外の種に由来する P T H r P (1-141) 又は P T H r P (1-139) における、P T H r P (1-86)、P T H r P (1-40)、P T H r P (1-37) 又は P T H r P (1-34) に相当するポリペプチドが挙げられる。

それに加えて、ヒト P T H r P (1-34) と近いアミノ酸配列を有する他の種に由来する 34 アミノ酸からなるポリペプチドとして、カモノハシ (Ornithorhynchus anatinus) の P T H r P (1-34) (配列番号 38)、キンカチョウ (Taeniopygia guttata) の P T H r P (1-34) (配列番号 39)、ニワトリ (Gallus gallus) の P T H r P (1-34) (配列番号 40)、ハイイロジネズミオポッサム (Monodelphis domestica) の P T H r P (1-34) (配列番号 41) が挙げられ、これらも本発明で用いることができる P T H に含まれる。なお、オポッサムの P T H / P T H r P 受容体にはヒトなどの P T H / P T H r P が結合/作用することは公知である (Juppner H. et al. Endocrinology 134 pp879 1994)。ヒト P T H r P (1-34) とハイイロジネズミオポッサム P T H r P (1-34) を B L A S T 法で比較すると両者の間のホモロジーは 77% 程度であり、性状の近いアミノ酸への置換を許諾した場合には 83% の類似性を示した。

また、前述のように P T H と P T H r P は共通の受容体 P T H / P T H r P に結合して細胞へのシグナルを惹起することが知られており (Juppner H. et al. Science. 254 p1024 1991)、ヒト P T H 及びヒト P T H r P においては P T H (1-34) 及び P T H r P (1-34) の配列のうち最初の 21 アミノ酸が P T H / P T H r P 受容体への結合及びシグナルの発生に重要であることも公知である (Gerdella FJ et al J. Biol. Chem. 270 pp6584 1995、Gerdella FJ et al J. Biol. Chem. 271 pp19888 1996)。ヒト P T H (1-34) とヒト P T H r P (1-34) の最初の 21 個のア

ミノ酸を比較すると、12個のアミノ酸（性状の近いアミノ酸への置換を許諾した場合には7個）に相違が存在する。従って、この明細書に具体的に配列が記載されていないヒト又はヒト以外の種におけるPTH、PTHrP、又はその部分活性ポリペプチドであっても、ヒトPTH（1-34）又はヒトPTHrP（1-34）

- 5 の最初のN末から21個に相当するアミノ酸配列に対して12個以内のアミノ酸置換が存在するアミノ酸配列を有するPTH、PTHrP、又はその部分活性ポリペプチドであれば、本発明で用いるPTH、PTHrP又はその部分活性ポリペプチドに含まれる。

- 上記のようなPTH、PTHrP又はその部分活性ポリペプチドは、そのペプチドを産生している動物や細胞から抽出して製造されたもの、そのポリペプチドをコードする遺伝子を遺伝子工学的に宿主に導入した組換え体細胞やトランスジェニック非ヒト動物又はトランスジェニック植物で発現させて製造されたもの、固相合成法などのペプチドの化学合成法によって製造されたものなどのいずれでも使用することができる。また、PTH、PTHrP又はその部分活性ポリペプチドは、試薬
- 15 メーカー等より入手可能なものもあり、例えばBachem社からはPTH（1-84）（human）（Cat. No. H-1370）、PTH（1-37）（human）（Cat. No. H-5974）、PTH（1-34）（human）（Cat. No. H-4835）、PTH（1-31）（human）（Cat. No. H-2274）、PTH（1-31）amide（human）（Cat. No. H-340
- 20 8）、PTH-Related Protein（1-86）（human）（Cat. No. H-9815）、PTH-Related Protein（1-40）（human, mouse, rat）（Cat. No. H-6810）、PTH-Related Protein（1-37）（human, mouse, rat）（Cat. No. H-5494）、pPTH-Related Protein（1-34）（hu

man, mouse, rat) (Cat. No. H-6630) PTH-Related Protein (1-34) amide (human, mouse, rat) (Cat. No. H-9095) などが販売されており、そのような PTH、PTHrP 又はその部分活性ポリペプチドも使用することが可能である。

- 5 本発明で用いる PTH、PTHrP 又はその部分活性ポリペプチドは、その C 末端の構造としてはカルボキシル基 (COOH) の状態又はアミド化 (CONH₂) のいずれでも構わない。さらに、本発明の PTH、PTHrP 又はその部分活性ポリペプチドは、その N 末端、C 末端又はアミノ酸残基の側鎖の何れか、又は 2 箇所以上の組合せにおいて、化合物やアミノ酸、PTH、PTHrP 又はその部分活性ポリペプチド以外のタンパク質又はペプチドが付加された形態であってもよい。付加
- 10 される化合物の例としては、ポリエチレングリコール (PEG) など生体内に投与した際に安定化するための物質やビスフォスフォネートなどの薬効を有する化合物などが挙げられる。アミノ酸が付加された状態とは、N 末端に、メチオニン残基、アセチル基又はピログルタミン酸等が結合した形態や、PTH、PTHrP 又はその
- 15 部分活性ポリペプチドの製造において融合タンパク質として調整した後タンパク質分解酵素で切断を行なった際に N 末端又は C 末端に残る 1 から数個のアミノ酸の付加などが挙げられる。付加されるタンパク質としてはアルブミンや免疫グロブリンなどの生体内での安定化や運搬に関与するタンパク質などが挙げられる。付加されるペプチドについては、製造過程での精製などに用いられるタグ配列 (ヒスチジン
- 20 タグ又は FLAG タグ等) や他の生体活性ポリペプチドなどが挙げられる。このような、化合物やアミノ酸、PTH、PTHrP 又はその部分活性ポリペプチド以外のタンパク質又はペプチドが付加の付加については、公知の方法 (ハーマンソン (Hermanson) 等 バイオコンジュゲート・テクニクス (Bioconjugate techniques) (USA) 1996 年発行 Academic Press) を用いて酵素的又は化学的に会合させて実施

することができる。また、P T H、P T H r P 又はその部分活性ポリペプチドのN
末端及び／又はC末端にアミノ酸やタンパク質・ペプチドが付加された構造の場合
には遺伝子工学的に当該構造のポリペプチドをコードする発現用の遺伝子を構築し
て、その遺伝子が導入された宿主細胞又はトランスジェニック植物又は非ヒトトラ
5 ンスジェニック動物などを用いて遺伝子発現産物として調整することもできる。

[P T H、P T H r P、又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログ]

P T H、P T H r P、又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログとは、前記
のP T H、P T H r P、又はそれらの部分活性ポリペプチドにおけるアミノ酸配列
のうち、一つ以上のアミノ酸配列を人為的に他のアミノ酸又は化合物に置換したも
10 ので、P T H／P T H r P 受容体アゴニストとしての活性を保持したものをいう。

当該P T H、P T H r P、又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログがP T H
／P T H r P 受容体アゴニストとしての活性を保持しているかを調べる方法として
は、上記[P T H／P T H r P 受容体アゴニスト]で記載したP T H／P T H r P 受
容体の活性化を調べる方法と同様に行なうことが可能である。アミノ酸の置換には
15 保存的置換と非保存的な置換があり、保存的置換とは性質が近いアミノ酸同士で置
換することをいい、非保存的置換とはそれ以外のアミノ酸置換をいう。一般にアミ
ノ酸の保存的置換の方が非保存的置換より基となる分子の機能が保存される可能性
が高いと考えられている。よって、アミノ酸の保存的置換によって、同等の作用を
有するポリペプチドを得ることが可能である。

20 保存的置換でのアミノ酸の性質の近さを考える一つの観点としては、アミノ酸側
鎖の極性や電荷に大きく影響せずに置換できるアミノ酸の組合せでの置換がある。
これはアミノ酸側鎖の疎水性や電荷の変化によって二次構造やさらに高次の構造に
おいて分子間や分子内での他のアミノ酸側鎖、水分子、他のタンパク質構成要素（金
属イオンなど）との相互作用を考慮するうえで、疎水性や電荷の変化が少なければ

構造や機能が保存されるであろうとの考えによる。通常天然タンパク質及びペプチドは20種類のアミノ酸（何も指定がない場合はL体アミノ酸をいう）より構成されているが、それらの側鎖は大きく極性を持つものと極性を持たないもの（非極性）に分類される。極性を持つ側鎖を有するアミノ酸は生理的pH条件で荷電する側鎖を有するものと荷電を有さないもの（非荷電）に分類される。さらに荷電を有する側鎖を有するものは酸性側鎖と塩基性側鎖に分類される。一方、非極性の側鎖を持つアミノ酸は、脂肪族側鎖を有するものと芳香族側鎖を有するものに分類される。

これらの分類によると、通常天然タンパク質及びペプチドを構成する20種類のアミノ酸は、アスパラギン酸（Asp）とグルタミン酸（Glu）は極性／荷電／酸性側鎖のアミノ酸、アルギニン（Arg）・リジン（Lys）及びヒスチジン（His）は極性／荷電／塩基性側鎖のアミノ酸、グリシン（Gly）・セリン（Ser）・スレオニン（Thr）・アスパラギン（Asn）・グルタミン（Gln）・チロシン（Tyr）及びシステイン（Cys）は極性／非荷電側鎖のアミノ酸、アラニン（Ala）・バリン（Val）・ロイシン（Leu）・イソロイシン（Ile）・メチオニン（Met）及びプロリン（Pro）は非極性／脂肪族側鎖のアミノ酸、フェニルアラニン（Phe）及びトリプトファン（Trp）は非極性／芳香族側鎖のアミノ酸に分類される。それぞれ同じ分類に属するアミノ酸同士は保存的アミノ酸置換に用いられることが多い。但し、Cysについてはジスルフィド結合を介して分子内又は分子間での架橋の形成に関与する可能性があり、Proはタンパク質／ペプチドの二次構造に影響する可能性があるため、保存的アミノ酸置換では扱われない場合もある。

また、同様にアミノ酸側鎖の物理化学的性質の指標として、疎水性や荷電を数値化した疎水性インデックスを用いる場合がある。疎水性インデックスの例としては、

天然タンパク質に含まれる２種類のアミノ酸の疎水性インデックススコアは、A r
 g : - 1 0 . 0、L y s : - 9 . 9、G l u 及び A s p : - 8 . 3、A s n : - 7 .
 1、G l n : - 6 . 0、S e r : - 4 . 3、H i s 及び T h r : - 3 . 8、G l y :
 - 2 . 4、C y s : - 2 . 3、A l a : - 1 . 1、P r o : - 0 . 2、T y r : 2 .
 5 5、V a l : 4 . 1、M e t : 4 . 6、I l e : 8 . 7、L e u 及び T r p : 9 .
 7、P h e : 1 0 とされている。また通常のタンパク質には含まれない特殊なアミ
 ノ酸の例としては、 α 、 β -ジアミノプロピオン酸 (D a p) : - 9 . 5、 α -アミ
 ノイソ酪酸 (A i b) : 1 . 1、ノルロイシン (N l e) : 9 . 1 など、疎水インデ
 ックスのスコアがそれぞれ算定されている (A l e s s a n d r o 等、P E P T I
 10 D E S 2 0 0 2、P r o c e e d i n g o f 2 7 t h E u r o e a n P
 e p t i d e S y m p o s u i m)。保存的アミノ酸置換を行うには、この疎水イ
 ンデックスにおいて、そのスコアが近いアミノ酸を選択するほど疎水性や荷電が近
 く、構造や機能が保存される可能性が高いと考えられる。

また、別の保存的アミノ酸置換の判断するための他の方法としては、ペプチドや
 15 タンパク質のアミノ酸配列のホモロジー比較に用いられるアミノ酸置換行列を用い
 る方法が挙げられる。アミノ酸置換行列は類似の構造や機能を持つ配列を集めて比
 較してアミノ酸置換の頻度と種類によって数値化した行列であり、進化過程におけ
 る相対的な置換のしやすさを反映したものである。その代表的なものとしては
 ファミリーを形成する配列の全長アミノ酸配列を比較して作成された P A M
 20 (Point-Accepted-Mutation) (M. O. Dayhoff 等, Atlas of Protein Sequence and
 Structure 5 , p345 1978) と類似の配列ブロックを集めて比較して作成された B L
 O S U M (Blocks Substitution Matrix) (S. Henikoff, と J.G. Henikoff,
 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
 89 p10915 1992) がある。これらの置換行列では保存的な置換となると考えられる

アミノ酸同士の組合せほど大きな値が付けられており、その値を参照して導入するアミノ酸の変異を選択することも可能である。例えば、置換行列の一つである B L O S M 6 4 についてみると、A l a に対するスコアとして、同じ A l a であれば 4、それに続いて S e r であれば 1、C y s ・ G l y ・ T h r ・ V a l は 0 となっており、保存的な置換が行なえる可能性が高い。それに対して A l a に対して T r p は - 3、A s n ・ A s p ・ H i s ・ P h e ・ T y r は - 2 と低いスコアであり保存的な置換が行なえる可能性が低いことが分かる。同様に、A r g に対して L y s が 2、G l n が 1、A s n ・ G l u ・ H i s が 0 という形で数値が与えられているため、このような置換行列でのスコアを参考に P T H、P T H r P、又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログをデザインすることも可能である。

通常の天然タンパク質及びペプチドを構成するアミノ酸の置換による P T H、P T H r P、又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログは、そのポリペプチドをコードする遺伝子を遺伝子工学的に宿主に導入した組換え体細胞やトランスジェニック非ヒト動物又はトランスジェニック植物で発現させる方法や、固相合成法などのペプチドの化学合成法によって製造することが可能である。

P T H、P T H r P、又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログを作成するためのアミノ酸置換においては上記のように天然タンパク質に通常含まれる 20 種類のアミノ酸以外の非タンパク質性アミノ酸と呼ばれるアミノ酸への置換も可能である。非タンパク質性アミノ酸の例としては、工学異性体である D 体のアミノ酸が挙げられる。天然タンパク質に通常含まれる 20 種類のアミノ酸のうち、G l y 以外はアルファ炭素が不斉炭素原子となっており、L 体と D 体の工学異性体を取る。また、天然タンパク質に通常含まれるアミノ酸は L 体である。したがって、P T H、P T H r P、又はそれらの部分活性ポリペプチドのアミノ酸配列において一つ以上のアミノ酸を D 体のアミノ酸に置換して、かつ P T H / P T H r P 受容体アゴニス

トとしての活性が維持されているものも本発明で用いる P T H、P T H r P、又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログに含まれる。また、非タンパク質性アミノ酸として、前記 20 種類のアミノ酸以外のアミノ酸が用いられる場合もあり、例えば β - (2 - ナフチル) アラニン (β - N a l)、ノルロイシン (N l e)、 α ,

5 β - ジアミノプロピオン酸 (D a p)、シクロヘキシルアラニン (C h a)、ノルバリン (N v a)、4 - アミノフェニルアラニン (A m p)、3 - ピリジニルアラニン (A m p)、 α - アミノイソ酪酸 (A i b)、1 - アミノ - 1 - シクロヘキサンカルボン酸 (A h c) などが挙げられる。また、A h c に加えて、1 - アミノ - 1 - シクロプロパンカルボン酸、1 - アミノ - 1 - シクロブタンカルボン酸、1 - ア

10 ミノ - 1 - シクロペンタンカルボン酸、1 - アミノ - 1 - シクロヘプタンカルボン酸、1 - アミノ - 1 - シクロオクタンカルボン酸及び 1 - アミノ - 1 - シクロノナンカルボン酸の群から選ばれる非タンパク質性アミノ酸をここでは A c c として表記することがある。従って、P T H、P T H r P、又はそれらの部分活性ポリペプチドのアミノ酸配列において一つ以上の非タンパク質性アミノ酸に置換して、かつ

15 P T H / P T H r P 受容体アゴニストとしての活性が維持されているものも本発明で用いる P T H、P T H r P、又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログに含まれる。これらの非タンパク質性アミノ酸への置換を行った P T H、P T H r P、又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログは、通常は固相合成法などの公知のペプチド合成法で作成することができる。

20 P T H、P T H r P、又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログとしての別の形態としては、分子内又は分子間での架橋が行なわれたペプチドがある。分子内での架橋の一例としては、P T H (1 - 3 4) において種間で保存されている 2 6 位の L y s と 3 0 位の A s p の間での架橋や P T H r P (1 - 3 4) において種間で保存されている 1 3 位の L y s と 1 7 位の A s p の間での架橋など、分子内での

架橋を行なった環状ペプチドの合成方法やその環状ペプチドが P T H / P T H r P 受容体アゴニストとしての活性が維持されていることが知られている (Bisello A. et. al., Biochem 36 p3293 1997)。

本発明で用いる P T H、P T H r P、又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナ
5 ログをデザインする場合には、アミノ酸置換による配列の変化が二次構造にできる
だけ影響しないようにデザインを行なうことも、構造や機能の保存の上では重要と
考えられる。P T H (1 - 3 4) 及び P T H r P (1 - 3 4) の二次構造を見ると
N末端側とC末端側に2つの α -ヘリックス構造をとることが知られており、それ
が P T H / P T H r P 受容体アゴニストとしての活性に重要な働きをしていると考
10 えられている (Cohen EF 等, J. Biol. Chem. 266 p1997 1991)。したがって、P
T H、P T H r P、又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログをデザインする
時に、アミノ酸置換によって、このような二つの α -ヘリックス構造が崩れないよ
うにデザインすることによって、P T H / P T H r P 受容体アゴニストとしての活
性が保存された P T H、P T H r P、又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナロ
15 グを得ることができる。二次構造を解析する方法としては、G O R 1 (又は R o b
s o n) 法 (Garnier, Osguthorpe と Robson, J. Mol. Biol. 120 p97 1978) や P
R E D E T O R 法 (Frishman D と Argos P, Protein Eng 9 p133 1996) やその他の
公知の方法で行なうことができる。

また、本発明で用いる P T H、P T H r P、又はそれらの部分活性ポリペプチド
20 のアナログは、P T H、P T H r P、又はそれらの部分活性ポリペプチドのアミノ
酸配列のうち少なくとも1箇所の位置でのアミノ酸置換又はアミノ酸側鎖の架橋や
修飾を伴うが、その数の上限としては P T H、P T H r P、又はそれらの部分活性
ポリペプチドのN末端から21個のアミノ酸の範囲では12箇所以内のアミノ酸置
換であることが望ましい。これは、ヒト P T H (1 - 3 4) とヒト P T H r P (1

－ 3 4）の最初の 2 1 個のアミノ酸を比較すると、1 2 個のアミノ酸に相違があるものの、P T H（1－3 4）と P T H r P（1－3 4）は同様の P T H／P T H r P 受容体アゴニストとしての活性を有していることによる。

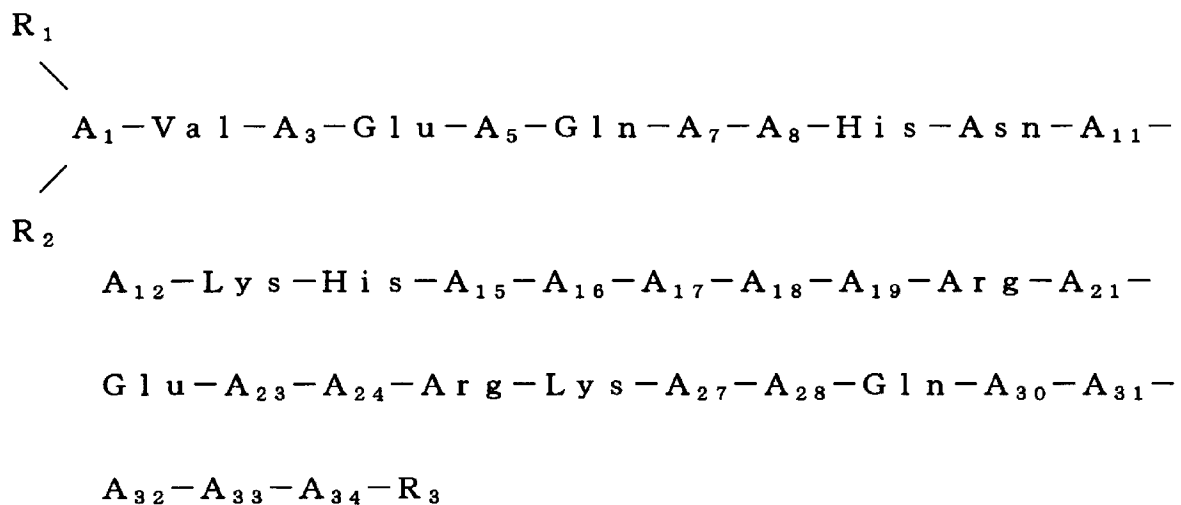
本発明の用いる P T H、P T H r P 又はその部分活性ポリペプチドのアナログは、
5 その C 末端の構造としてはカルボキシル基（C O O H）の状態又はアミド化（C O N H₂）のいずれでも構わない。さらに、本発明の P T H、P T H r P 又はその部分活性ポリペプチドのアナログは、その N 末端、C 末端又はアミノ酸残基の側鎖の何れか、又は 2 箇所以上の組合せにおいて、化合物やアミノ酸、P T H、P T H r P 又はその部分活性ポリペプチドのアナログ以外のタンパク質又はペプチドが付加さ
10 れた形態であってもよい。付加される化合物の例としては、ポリエチレングリコール（P E G）など生体内に投与した際に安定化するための物質やビスフォスフォネートなどの薬効を有する化合物などが挙げられる。アミノ酸が付加された状態とは、N 末端に、メチオニン残基、アセチル基又はピログルタミン酸等が結合した形態や、P T H、P T H r P 又はその部分活性ポリペプチドのアナログの製造において融合
15 タンパク質として調整した後、タンパク質分解酵素で切断を行なった際に N 末端又は C 末端に残る 1 から数個のアミノ酸の付加などが挙げられる。付加されるタンパク質としてはアルブミンや免疫グロブリンなどの生体内での安定化や運搬に関与するタンパク質などが挙げられる。付加されるペプチドについては、製造過程での精製などに用いられるタグ配列（ヒスチジンタグ又は F L A G タグ等）や他の生体活
20 性ペプチドなどが挙げられる。

具体的な P T H、P T H r P、又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログの構造については、非常に多くものが公知となっており（例えば特開平 9－1 5 7 2 9 4、特開平 5－3 2 0 1 9 3、特開平 5－3 2 6 9 6、特表平 5－5 0 9 0 9 8、特表平 5－5 0 5 5 9 4 及び特許第 3 1 3 5 1 2 2 号、特表平 8－5 0 3 6 9 2、

特開昭 62-67099、特開昭 61-57600、特開昭 61-24598、特開平 59-204159 及び特公平 3-14320、特開昭 59-42351 等)、それらは本発明で用いることができる PTH、PTHrP、又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログに含まれる。

- 5 さらに具体的には特表平 11-509201 に示されている PTH、PTHrP、又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログであり、それは下記式で表される PTH の部分活性ポリペプチドのアナログであるポリペプチド：

[化 4]



ただし、

- 10 A_1 は Ser、Ala、又は Dap であり；
 A_3 は Ser、Thr、又は Aib であり；
 A_5 は Leu、Nle、Ile、Cha、 β -Nal、Trp、Pal、Phe、又は p-X-Phe であり、この際、X は OH、ハロゲン、又は CH_3 であり；
 A_7 は Leu、Nle、Ile、Cha、 β -Nal、Trp、Pal、Phe、又は p-X-Phe であり、この際、X は OH、ハロゲン、又は CH_3 であり；
15 A_8 は Met、Nva、Leu、Val、Ile、Cha、又は Nle であり；
 A_{11} は Leu、Nle、Ile、Cha、 β -Nal、Trp、Pal、Phe 又

は $p-X-Phe$ であり、この際、 X は OH 、ハロゲン、又は CH_3 であり；

A_{12} は Gly 又は Aib であり；

A_{15} は Leu 、 Nle 、 Ile 、 Cha 、 $\beta-Nal$ 、 Trp 、 Pal 、 Phe 、

又は $p-X-Phe$ であり、この際、 X は OH 、ハロゲン、又は CH_3 であり；

5 A_{16} は Ser 、 Asn 、 Ala 、又は Aib であり；

A_{17} は Ser 、 Thr 、又は Aib であり；

A_{18} は Met 、 Nva 、 Leu 、 Val 、 Ile 、 Nle 、 Cha 、又は Aib であり；

A_{19} は Glu 又は Aib であり；

10 A_{21} は Val 、 Cha 、又は Met であり；

A_{23} は Trp 又は Cha であり；

A_{24} は Leu 又は Cha であり；

A_{27} は Lys 、 Aib 、 Leu 、 $hArg$ 、 Gln 、又は Cha であり；

A_{28} は Leu 又は Cha であり；

15 A_{30} は Asp 又は Lys であり；

A_{31} は Val 、 Nle 、若しくは Cha である、又は欠損しており；

A_{32} は His である又は欠損しており；

A_{33} は Asn である又は欠損しており；

A_{34} は Phe 、 Tyr 、 Amp 、若しくは Aib である、又は欠損しており；

20 R_1 及び R_2 は、それぞれ独立して、 H 、 C_{1-12} アルキル、 C_{2-12} アルケニル、 C_{2-12} アルキニル、 C_{7-20} フェニルアルキル、 C_{11-20} ナフチルアルキル、 C_{1-12} ヒドロキシアリル、 C_{2-12} ヒドロキシアリケニル、 C_{7-20} ヒドロキシフェニルアルキル、若しくは C_{11-20} ヒドロキシナフチルアルキルであり；又は R_1 及び R_2 の両方又一方のみが COE_1 であり、この際、 E_1 は C_{1-12} アルキル、 C_{2-12} アル

ケニル、 C_{2-12} アルキニル、 C_{7-20} フェニルアルキル、 C_{11-20} ナフチルアルキル、 C_{1-12} ヒドロキシアルキル、 C_{2-12} ヒドロキシアルケニル、 C_{7-20} ヒドロキシフェニルアルキル、若しくは C_{11-20} ヒドロキシナフチルアルキルであり；

及び R_3 はOH、 NH_2 、 C_{1-12} アルコキシ、又は $-NH-Y-CH_2-Z$ であり、

- 5 この際、Yは C_{1-12} 炭化水素部分であり、ZはH、OH、 CO_2H 、又は $CONH_2$ であり；

A_5 、 A_7 、 A_8 、 A_{11} 、 A_{15} 、 A_{18} 、 A_{21} 、 A_{23} 、 A_{24} 、 A_{27} 、 A_{28} 及び A_{31} の少なくとも一つはCh aである、又は A_3 、 A_{12} 、 A_{16} 、 A_{17} 、 A_{18} 、 A_{19} 及び A_{34} の少なくとも一つはA i bである；ポリペプチドが挙げられる。

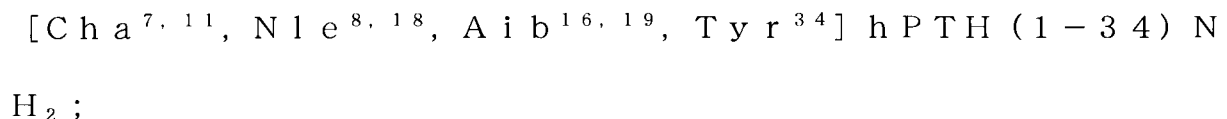
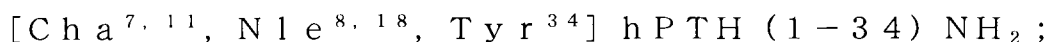
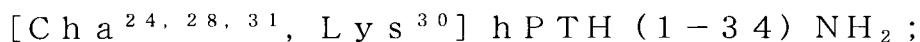
- 10 その中でも好ましくは特表平11-509201及び日本特許第4008825に記載されているヒトPTH(1-34)のアナログである下記式のポリペプチド：



- 15 $[Nle^{8, 18}, Ch a^{27}] hPTH(1-34)NH_2;$



- 20 $[Aib^{34}] hPTH(1-34)NH_2;$



[C h a^{7, 11}, N l e^{8, 18, 31}, A i b^{16, 19}, T y r³⁴] h P T H (1 - 3 4)
NH₂ ;

[C h a¹¹] h P T H (1 - 3 4) NH₂ ;

[C h a^{28, 31}] h P T H (1 - 3 4) NH₂ ;

5 [C h a^{7, 11}, N l e^{8, 18}, A i b³⁴] h P T H (1 - 3 4) NH₂ ;

[C h a¹⁵] h P T H (1 - 3 4) NH₂ ;

[C h a^{7, 11}, A i b¹⁹] h P T H (1 - 3 4) NH₂ ;

[C h a^{7, 11}, A i b¹⁶] h P T H (1 - 3 4) NH₂ ;

[A i b^{16, 19}] h P T H (1 - 3 4) NH₂ ;

10 [A i b¹²] h P T H (1 - 3 4) NH₂ ;

[A i b³] h P T H (1 - 3 4) NH₂ ;

[C h a^{7, 11}, A i b¹⁹, L y s³⁰] h P T H (1 - 3 4) NH₂ ;

[C h a⁷] h P T H (1 - 3 4) NH₂ ;

[C h a^{24, 28, 31}] h P T H (1 - 3 4) NH₂ ;

15 [A i b¹⁷] h P T H (1 - 3 4) NH₂ ; 及び

[C h a^{7, 11, 15}] h P T H (1 - 3 4) NH₂、

からなる群より選択されるポリペプチドである。ここで、[C h a^{7, 11}] h P T H

(1 - 3 4) NH₂との表記は、ヒト P T H (1 - 3 4) の7位の L e u と11位の

L e u が C h a (シクロヘキシルアラニン) に置換されており、C末端がアミド化

20 されていることを示しており、他の同様の表記も同様の意味を示す。

また、特表平11-509201に示されている別の P T H、P T H r P、又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログとしての態様としては、下記式で表される P T H p P の部分活性ポリペプチドのアナログであるポリペプチド：

[化5]

R₁

\

A₁-V a l-A₃-G l u-A₅-G l n-A₇-A₈-H i s-A₁₀-A₁₁-

/

R₂A₁₂-L y s-A₁₄-A₁₅-A₁₆-A₁₇-A₁₈-A₁₉-A r g-A r g-A₂₂-A₂₃-A₂₄-A₂₅-A₂₆-A₂₇-A₂₈-A₂₉-A₃₀-A₃₁-A₃₂-A₃₃-A₃₄-R₃

ただし、

A₁はA l a、S e r、又はD a pであり；A₃はS e r又はA i bであり；A₅はH i s、I l e、又はC h aであり；

- 5 A₇はL e u、C h a、N l e、β-N a l、T r p、P a l、P h e、又はp-X
-P h eであり、この際、XはOH、ハロゲン、又はCH₃であり；

A₈はL e u、M e t、又はC h aであり；A₁₀はA s p又はA s nであり；A₁₁はL y s、L e u、C h a、P h e、又はβ-N a lであり；

- 10 A₁₂はG l y又はA i bであり；

A₁₄はS e r又はH i sであり；A₁₅はI l e、又はC h aであり；A₁₆はG l n又はA i bであり；A₁₇はA s p又はA i bであり；

- 15 A₁₈はL e u、A i b、又はC h aであり；

A₁₉はA r g又はA i bであり；A₂₂はP h e、G l u、A i b、又はC h aであり；

- A_{23} はP h e、L e u、L y s、又はC h aであり；
- A_{24} はL e u、L y s、又はC h aであり；
- A_{25} はH i s、A i b、又はG l uであり；
- A_{26} はH i s、A i b、又はL y sであり；
- 5 A_{27} はL e u、L y s、又はC h aであり；
- A_{28} はI l e、L e u、L y s、又はC h aであり；
- A_{29} はA l a、G l u、又はA i bであり；
- A_{30} はG l u、C h a、A i b、又はL y sであり；
- A_{31} はI l e、L e u、C h a、若しくはL y sである、又は欠損しており；
- 10 A_{32} はH i sである又は欠損しており；
- A_{33} はT h rである又は欠損しており；
- A_{34} はA l aである又は欠損しており；
- R_1 及び R_2 は、それぞれ独立して、H、 C_{1-12} アルキル、 C_{2-12} アルケニル、 C_{2-12} アルキニル、 C_{7-20} フェニルアルキル、 C_{11-20} ナフチルアルキル、 C_{1-12}
- 15 ヒドロキシアリル、 C_{2-12} ヒドロキシアリケニル、 C_{7-20} ヒドロキシフェニル
アリル、若しくは C_{11-20} ヒドロキシナフチルアリルであり；又は R_1 及び R_2
の両方又は一方のみが COE_1 であり、この際、 E_1 は C_{1-12} アリル、 C_{2-12} ア
リケニル、 C_{2-12} アリニル、 C_{7-20} フェニルアリル、 C_{11-20} ナフチルアリ
ル、 C_{1-12} ヒドロキシアリル、 C_{2-12} ヒドロキシアリケニル、 C_{7-20} ヒドロ
- 20 キシフェニルアリル、若しくは C_{11-20} ヒドロキシナフチルアリルであり；及
び R_3 はOH、 NH_2 、 C_{1-12} アルコキシ、又は $-NH-Y-CH_2-Z$ であり、こ
の際、Yは C_{1-12} 炭化水素部分であり、ZはH、OH、 CO_2H 、又は $CONH_2$
であり；
- A_5 、 A_7 、 A_8 、 A_{11} 、 A_{15} 、 A_{18} 、 A_{22} 、 A_{23} 、 A_{24} 、 A_{27} 、 A_{28} 、 A_{30} 、

若しくは A_{31} の少なくとも一つはC h aである、又は A_3 、 A_{12} 、 A_{16} 、 A_{17} 、 A_{18} 、 A_{19} 、 A_{22} 、 A_{25} 、 A_{26} 、 A_{29} 、 A_{30} 、若しくは A_{34} の少なくとも一つはA i bである；

ポリペプチドが挙げられる。

- 5 その中でも、特に好ましくはヒトP T H r P (1-34)のアナログである、
式： $[G l u^{22, 25}, L e u^{23, 28, 31}, A i b^{29}, L y s^{26, 30}] h P T H r P$
(1-34) NH_2 (配列番号42) で表されるポリペプチドである。

さらに別のP T H、P T H r P、又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログとしての態様としては、特表2001-508439に記載されているP T H r P

- 10 の活性部分ペプチドのアナログである下記式：

[化6]

R_1

＼

$A_1-V a l-A_3-G l u-A_5-G l n-A_7-A_8-H i s-A_{10}-A_{11}-$

／

R_2

$A_{12}-L y s-A_{14}-A_{15}-A_{16}-A_{17}-A_{18}-A_{19}-A r g-A r g-$

$A_{22}-A_{23}-A_{24}-A_{25}-A_{26}-A_{27}-A_{28}-A_{29}-A_{30}-A_{31}-$

$A_{32}-A_{33}-A_{34}-R_3$

ただし、

A_1 はA l a、S e r、又はD a pであり；

A_3 はS e r又はA i bであり；

- 15 A_5 はH i s、I l e、A c c、又はC h aであり；

A_7 はL e u、C h a、N l e、 β -N a l、T r p、P a l、A c c、P h e、又はp-X-P h eであり、この際、XはOH、ハロゲン、又は CH_3 であり；

- A_8 はLeu、Met、Acc、又はChaであり；
- A_{10} はAsp又はAsnであり；
- A_{11} はLys、Leu、Cha、Acc、Phe、又は β -Nalであり；
- A_{12} はGly、Acc、又はAibであり；
- 5 A_{14} はSer又はHisであり；
- A_{15} はIle、Acc、又はChaであり；
- A_{16} はGln又はAibであり；
- A_{17} はAsp又はAibであり；
- A_{18} はLeu、Aib、Acc、又はChaであり；
- 10 A_{19} はArg又はAibであり；
- A_{22} はPhe、Glu、Aib、Acc、又はChaであり；
- A_{23} はPhe、Leu、Lys、Acc、又はChaであり；
- A_{24} はLeu、Lys、Acc、又はChaであり；
- A_{25} はHis、Lys、Aib、Acc、又はGluであり；
- 15 A_{26} はHis、Aib、Acc、又はLysであり；
- A_{27} はLeu、Lys、Acc、又はChaであり；
- A_{28} はIle、Leu、Lys、Acc、又はChaであり；
- A_{29} はAla、Glu、Acc、又はAibであり；
- A_{30} はGlu、Leu、Nle、Cha、Aib、Acc、又はLysであり；
- 20 A_{31} はIle、Leu、Cha、Lys若しくはAccである、又は欠損しており；
- A_{32} はHisである又は欠損しており；
- A_{33} はThrである又は欠損しており；
- A_{34} はAlaである又は欠損しており；
- R_1 及び R_2 は、それぞれ独立して、H、 C_{1-12} アルキル、 C_{2-12} アルケニル、C

C_{2-12} アルキニル、 C_{7-20} フェニルアルキル、 C_{11-20} ナフチルアルキル、 C_{1-12} ヒドロキシアルキル、 C_{2-12} ヒドロキシアルケニル、 C_{7-20} ヒドロキシフェニルアルキル、若しくは C_{11-20} ヒドロキシナフチルアルキルであり；又は R_1 及び R_2 の両方又は一方のみが COE_1 であり、この際、 E_1 は C_{1-12} アルキル、 C_{2-12} アルケニル、 C_{2-12} アルキニル、 C_{7-20} フェニルアルキル、 C_{11-20} ナフチルアルキル、 C_{1-12} ヒドロキシアルキル、 C_{2-12} ヒドロキシアルケニル、 C_{7-20} ヒドロキシフェニルアルキル、若しくは C_{11-20} ヒドロキシナフチルアルキルであり；及び

R_3 はOH、 NH_2 、 C_{1-12} アルコキシ、又は $-NH-Y-CH_2-Z$ であり、この際、 Y は C_{1-12} 炭化水素部分であり、 Z はH、OH、 CO_2H 、又は $CONH_2$ であり；

A_5 、 A_7 、 A_8 、 A_{11} 、 A_{12} 、 A_{15} 、 A_{18} 、 A_{22} 、 A_{23} 、 A_{24} 、 A_{25} 、 A_{26} 、 A_{27} 、 A_{28} 、 A_{29} 、 A_{30} 、又は A_{31} の少なくとも一つがAccである；

ポリペプチドが挙げられる。その中でも特に好ましくは、特表2001-5084

39及び日本特許第3963482号に記載されているヒトPTHrP(1-34)のアナログである、下記式のポリペプチド：

$[Glu^{22, 25}, Leu^{23, 28}, Lys^{26, 30}, Aib^{29}, Ahc^{31}] hPTHrP(1-34)NH_2$ ；

$[Glu^{22, 25}, Ahc^{23}, Lys^{26, 30}, Leu^{28, 31}, Aib^{29}] hPTHrP(1-34)NH_2$ ；

$[Glu^{22, 25}, Leu^{23, 28, 31}, Lys^{26, 30}, Ahc^{27}, Aib^{29}] hPTHrP(1-34)NH_2$ ；

$[Glu^{22, 25, 29}, Leu^{23, 28, 31}, Lys^{26}, Ahc^{30}] hPTHrP(1-34)NH_2$ ；

[C h a²², L e u^{23, 28, 31}, G l u²⁵, L y s^{26, 30}, A h c²⁷, A i b²⁹]
h P T H r P (1 - 3 4) N H₂ ;

[G l u^{22, 25}, L e u^{23, 28, 31}, A h c²⁴, L y s^{26, 30}, A i b²⁹] h P T
H r P (1 - 3 4) N H₂ ;

5 [G l u^{22, 29}, L e u^{23, 28, 31}, A i b²⁵, L y s^{26, 30}, A h c²⁷] h P T
H r P (1 - 3 4) N H₂ ;

[G l u²², L e u^{23, 28, 31}, A i b^{25, 29}, L y s^{26, 30}, A h c²⁷] h P T
H r P (1 - 3 4) N H₂ ;

[A h c²², L e u^{23, 28, 31}, G l u²⁵, L y s^{26, 30}, A i b²⁹] h P T H
10 r P (1 - 3 4) N H₂ ;

[G l u^{22, 25}, L e u^{23, 31}, L y s^{26, 30}, A h c²⁸, A i b²⁹] h P T H
r P (1 - 3 4) N H₂ ;

[C h a²², A h c²³, G l u²⁵, L y s^{26, 30}, L e u^{28, 31}, A i b²⁹] h
P T H r P (1 - 3 4) N H₂ ;

15 [C h a²², L e u^{23, 28, 31}, A h c^{24, 27}, G l u²⁵, L y s^{26, 30}, A i b²⁹]
h P T H r P (1 - 3 4) N H₂ ;

[G l u²², L e u^{23, 28, 31}, A h c^{24, 27}, L y s^{25, 26}, A i b²⁹] h P T
H r P (1 - 3 4) N H₂ ;

[A h c^{18, 24, 27}, G l u²², C h a²³, L y s^{25, 26}, L e u²⁸, A i b²⁹]
20 h P T H r P (1 - 3 4) N H₂ ;

[G l u²², C h a²³, A h c²⁴, L y s^{25, 26}, L e u²⁸, A i b²⁹] h P T
H r P (1 - 3 4) N H₂ ;

[A h c^{22, 24}, L e u^{23, 28, 31}, G l u²⁵, L y s^{26, 30}, A i b²⁹] h P T
H r P (1 - 3 4) N H₂ ;

[A h c^{22, 24}, L e u^{23, 28}, L y s^{25, 26}, A i b²⁹] h P T H r P (1 - 34) N H₂ ;

からなる群より選択されるポリペプチドである。

さらに、特表平 1 1 - 5 0 9 2 0 1 及び日本特許日本特許第 4 0 0 8 8 2 5 に記載されている、別の P T H、P T H r P、又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログとしての態様としては、下記式で表される P T H の部分活性ポリペプチドのアナログであるポリペプチド：

[N l e³¹] h P T H (1 - 34) N H₂ ;

[h A r g²⁷] h P T H (1 - 34) N H₂ ;

10 [D a p¹, N l e^{8, 18}, T y r³⁴] h P T H (1 - 34) N H₂ ;

が挙げられる。また、さらに特表 2 0 0 1 - 5 0 8 4 3 9 及び日本特許第 3 9 6 3 4 8 2 号に記載されているヒト P T H r P (1 - 34) のアナログ又はヒト P T H (1 - 34) のアナログである、式：

[L e u²⁷, A i b²⁹] h P T H (1 - 34) N H₂

15 [G l u^{22, 25}, C h a²³, L y s²⁶, L e u^{28, 31}, A i b²⁹, N l e³⁰] h P T H r P (1 - 34) N H₂ ;

[G l u^{22, 25}, C h a²³, L y s^{26, 30}, L e u^{28, 31}, A i b²⁹] h P T H r P (1 - 34) N H₂ ;

20 [G l u^{22, 25}, C h a²³, L y s^{26, 30}, A i b²⁹] h P T H r P (1 - 34) N H₂ ;

[G l u^{22, 25}, C h a²³, L y s^{26, 30}, L e u²⁸, A i b²⁹] h P T H r P (1 - 34) N H₂ ;

で表されるポリペプチドも P T H、P T H r P、又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログの例として挙げることができる。

[PTH又はPTHrP産生を誘導する物質]

PTH又はPTHrP産生を誘導する活性を有する物質とは、その物質自体は直接PTH／PTHrP受容体へのアゴニスト作用は有さないが、生体内において組織や細胞でのPTH／PTHrPの遺伝子発現やタンパク質の産生及び／又は分泌を誘導することによって、全身及び／又は局所でのPTH／PTHrPの濃度を上昇させることによって、PTH、PTHrP、又はそれらの部分ペプチド、若しくはそのアナログに代表されるPTH／PTHrP受容体アゴニストの投与による効果と同様に椎体骨折の治癒効果を有する物質をいう。

そのようなPTH又はPTHrP産生を誘導する活性を有する物質の例としては、カルシウム感受性受容体（CaSR）のアンタゴニストが挙げられる。CaSRアンタゴニストが投与された動物ではPTHの分泌が亢進することが知られている（Gowen等、The Journal of Clinical Investigation、105巻 p1595、2000年）。CaSRアンタゴニストの実例を挙げると、例えばJTT-305やMK-5442（福本等、CLINICAL CALCIUM、21巻 p89、2011年）、NPS2143（Gowen等、The Journal of Clinical Investigation、105巻 p1595、2000年）、SB-423557（Matheny等、Bone、46巻 p534、2010年）、SB-751689（31st Annual Meeting, American Society for Bone and Mineral Research、口頭発表、発表番号1051・1130／ポスター発表、発表番号SA0350）、ATX914（American Society for Bone and Mineral Research、2010 Annual Meeting、ポスター発表、発表番号SU0372）などが挙げられる。またCaSRアンタゴニストの別の例としては、

特開 2010-248183、特開 2005-239611 や特開 2010-159258 に開示されている化合物などが挙げられる。但し、PTH 又は PTHrP 産生を誘導する活性を有する物質としては上述の物質に限定されるものではなく、当業者であれば、PTH 産生を誘導する活性を有する物質については、例えば特開 5 2010-279372 に記載の方法などで求める活性の物質をスクリーニングによって取得することが可能であり、また CaSR アンタゴニストについては Nemeth 等、Journal of Molecular Endocrinology、29 巻 p15、2002 年に記載の方法などで取得することが可能であり、このような物質も本発明における PTH 又は PTHrP 産生を誘導する活性を有する物質 10 に含まれる。

[椎体骨折の治療剤]

また、本発明は PTH/PTHrP 受容体アゴニストを含有することを特徴とする、あるいは、PTH、PTHrP、又はそれらの部分活性ポリペプチド、若しくはそれらのアナログを含有することを特徴とする、椎体骨折治療剤に関する。さらに、本発明は PTH 又は PTHrP 産生を誘導する活性を有する物質を含有する椎 15 体骨折治療剤に関する。

椎体とは、「脊椎管の前方にある椎骨の主たる部分で、椎弓と区別される」（ステッドマン医学大辞典、改訂第 5 版、メジカルビュー社）、又は、「椎骨の前部を占める半円形の部分」（大辞林、第二版、三省堂）と説明される。従って、椎体骨折とは、20 脊椎を構成する椎骨における骨折のうち、通常は棘突起、横突起や関節突起などが存在する椎弓部分での骨折を含まず、半円柱状の形態を有する椎体部分における骨折のことをいう。また、椎体骨折の原因としては、事故やスポーツ等での強い衝撃が原因となる椎体骨折も存在するが、社会的や医療経済的に問題になっているのは骨粗鬆症に伴う椎体骨折であり、これらは必ずしも強い衝撃が受けていない場合で

も生じる可能性があるうえに患者の予後に大きく影響するため（元文等、日医大医学会誌、5巻 p 125-129、2009年）、より治療ニーズとしては高いといえる。

従って、本発明の椎体骨折治療剤が使用される主な対象としては、骨粗鬆症に伴う椎体骨折の治療となる。また、脊椎は7個の頸椎、12個の胸椎、5個の腰椎、5個の仙椎（成人では融合して仙骨となり骨盤の後壁となる）、3～5個の尾椎（融合して1～数個の尾骨となる）によって形成されるが、骨粗鬆症に伴う椎体骨折の発生部位は胸椎と腰椎に集中している。そのことから、本発明におけるラット腰椎椎体骨損傷モデルは腰椎を用いた検討を中心に行っている。従って、本発明の椎体骨折治療剤が使用される対象としては、主に胸椎及び腰椎における椎体骨折の治療となる。

椎体の構造的な特徴として、外側を覆う皮質骨の内側に非常に発達した海綿骨によって形成される骨梁構造が存在する。椎体の物理的強度はこの海綿骨による骨梁構造に大きく依存すると考えられており、骨粗鬆症に伴う椎体骨折の最終像である椎体圧迫骨折の発生にはこの骨梁の減少や変形が関与しているといわれる（IONOVICI 等、ルーマニアン・ジャーナル・オブ・モーフオロジー・アンド・エンブリオロジー、50巻 p 79-84、2009年）。そのため、海綿骨又は皮質骨と海綿骨にまたがる椎体骨折の治療効果が求められていたが、本発明以前においてはPTH等の作用としては皮質骨が優位である大腿骨、橈骨や胸骨などにおける骨折治療効果が非臨床又は臨床の研究で示されていたのみであった（Alkhiary 等、ジャーナル・オブ・ボーン・アンド・ジョイント・サージェリー、87-A巻 p 731-740、2005年；Aspenberg 等、ジャーナル・オブ・ボーン・アンド・ミネラル・リサーチ、25巻 p 404-414、2010年；Chintamaneni 等、オステオポローシス・インターナショナル、21巻 p 1059-1063、2010

年)。

また、本発明では、ラット腰椎椎体骨損傷モデルを開発したことにより椎体において皮質骨のみではなく海綿骨の骨折治療効果を解析することを可能にした。従って、本発明の椎体骨折治療剤が使用される対象としては、主に海綿骨における椎体骨折又は皮質骨と海綿骨にまたがる椎体骨折の治療となる。

また、本発明における椎体骨折治療剤が使用される患者としては、治療開始時にすでに椎体に 1 箇所以上の骨折が認められる患者であり、好ましくは椎体骨折が椎体圧迫骨折までは至っていない患者であり、より好ましくは椎体に骨折線が認められるが椎体全体の構造にはほぼ変化の無い患者からグレード 1 (椎体の前縁高、中央高及び／又は後縁高の変化が約 20～25%減少、ならびに面積が10～20%減少) (Fukunaga 等、ジャーナル・オブ・ボーン・アンド・ミネラル・メタボリズム、22 巻 p 104-110、2004 年) までの患者である。治療開始前の椎体骨折の検出及び／又は椎体高の減少に関する診断は、例えば単純 X 線、CT、MRI などの方法で当業者であれば実施することができる (元文等、日医大医会誌、5 巻 p 125-129、2009 年; Majumdar 等、アチーブス・インターナル・メディシン、165 巻 p 905-909、2005 年; Harvey 等、ザ・ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・ラディオロジー、70 巻 p 645-649、1997 年)。

また本発明における椎体骨折治療剤の効果についても同様に、単純 X 線、CT、MRI などの方法を用いて行なうことが可能であり、この効果の指標としては治療前に存在した骨折線の長さ及び／又は領域の減少又は消失、椎体高や面積の回復などを指標として判定することができる。また、このような椎体の形状に基づく診断や治療効果の判定では、例えば日本特許第 3229179 号、日本特許第 3258233 号、日本特許特許第 4495891 号、日本特許第 3888975 号などに記載の画像解析技術を用いて適宜実施することも可能である。

椎体骨折による症状としては背部及び／又は腰部への疼痛が生じることがある。

また、発生した椎体骨折が治療されずに放置された場合、当初は感じられなかった疼痛が発生することもある。従って、そのような疼痛の軽減又は消失、若しくは疼痛の予防効果をもって本発明の椎体骨折治療剤の効果を判定することも可能である。

5 その意味で、本発明はまた、椎体骨折に起因する疼痛の治療又は予防剤に関する。

一方、椎体骨折が治療されずに進行した場合には椎体圧迫骨折（椎体の中央高／前縁高・中央高／後縁高のいずれかの値が0.8以下、又は前縁高／後縁高の値が0.75以下の場合、若しくは椎体の高さが全体的に減少する場合、判定椎体の上位・下位椎体より高さが20%以上減じている場合に椎体圧迫骨折と判定）にまで
10 いたる場合がある。この椎体圧迫骨折の診断は単純X線、CT、MRIなどを用いた測定で行なわれる。従って、そのような圧迫骨折への進展の予防効果をもって本発明の椎体骨折治療剤の効果を判定することも可能である。その意味で、本発明はまた、椎体圧迫骨折の予防剤に関する。

また、椎体骨折に関連する症状としては、運動障害や神経障害を伴っている場合
15 や治療されずに病態が進行することによってそのような運動障害や神経障害に進展する場合があります、特に強い疼痛を伴う椎体骨折や椎体圧迫骨折で大きな椎体損傷が生じる場合にはリスクが高くなる。従って、そのような運動障害及び／又は神経障害の軽減又は消失、若しくは運動障害及び／又は神経障害の予防効果をもって本発明の椎体骨折治療剤の効果を判定することも可能である。その意味で、本発明はま
20 た、椎体骨折に起因する運動障害及び／又は神経障害の治療又は予防剤に関する。

本発明の椎体骨折治療剤は、薬学的に許容されるいずれの添加剤を含有してもよい。薬学的に許容される添加剤を用いての製剤は「REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY 20th EDITION フィラデルフィア科学大学 (University of the Sciences in Philadelphia) 著 Williams & Wilkins 社 2000 年 12 月 15 日発行」

に記載の方法で実施することも可能である。このような医薬組成物の一つの形態としては、無菌の水性液若しくは油性液に溶解、懸濁又は乳化することによって調製された液剤として供される。このような溶剤として、水性液としては注射用蒸留水、生理食塩水等が挙げられ、それに加えて浸透圧調節剤（例えば、D-グルコース、

5 D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）が添加されたり、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート 80、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 50）などが併用される場合もある。また、溶剤としては油性液が用いられる場合もあり、該油性液の

10 例としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどが併用される場合もある。このような液剤においては適宜、緩衝剤（例えば、リン酸塩類緩衝剤、酢酸塩類緩衝剤）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、アスコルビン酸、エリソルビン酸及

15 びそれらの塩など）着色剤（例えば、銅クロロフィル、 β -カロチン、赤色 2 号、青色 1 号など）、防腐剤（例えばパラオキシ安息香酸エステル、フェノール、塩化ベンゼトニウム、塩化ベンザルコニウムなど）増粘剤（例えばヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース及びそれらの塩等）、安定化剤（例えば人血清アルブミン、マンニトール、ソルビトールなど）、矯臭剤（例えばメントール、柑

20 橘香料など）の添加剤が用いられる場合がある。また別の医薬組成物（上記いくつか「医薬品組成物」の表現と統一するため）の形態としては、散剤、錠剤、顆粒剤、カプセル剤、丸剤、坐剤、トローチ剤などの固形剤があげられる。経口用製剤の形で投与する固形剤の場合には、添加剤として、賦形剤（例えば、結晶性セルロース、ラクトース、デンプンなど）、滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク

など)、結合剤(ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、マクロゴールなど)、崩壊剤(例えば、デンプン、カルボキシメチルセルロースカルシウムなど)などが用いられる。また、必要に応じて、防腐剤(例えば、ベンジルアルコール、クロロブタノール、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸プロピルなど)、抗酸化剤、着色剤、甘味剤などの添加剤を用いることができる。さらに別の形態として、粘膜用医薬組成物もあげられ、この製剤においては粘膜への吸着性、滞留性等を付与することを主な目的として添加剤として粘着剤、粘着増強剤、粘稠剤、粘稠化剤等(例えば、ムチン、カンテン、ゼラチン、ペクチン、カラギーナン、アルギン酸ナトリウム、ローカストビンガム、キサンタンガム、トラガントガム、アラビアゴム、キトサン、プルラン、ワキシースターチ、スクラルフェート、セルロース及びその誘導体(例えば、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリグリセリン脂肪酸エステル、アクリル酸(メタ)アクリル酸アルキル共重合体又はその塩、ポリグリセリン脂肪酸エステルなど)が含有される場合もある。しかしながら、生体に供与される医薬組成物の形態及び溶剤や添加剤はこれらに限定されるものではなく、当業者であれば適宜選択できる。

前記椎体骨折治療剤は、症状の改善を目的として、経口又は非経口的に投与することができる。経口投与の場合には、顆粒剤、散剤、錠剤、カプセル剤、液剤、シロップ剤、乳剤又は懸濁剤、エリキシル剤などの剤型を選択することができる。非経口投与の場合には、たとえば経鼻剤とすることができ、液剤、懸濁剤、固形製剤などを選択できる。また別の非経口投与の形態としては、注射剤とすることができ、注射剤としては、皮下注射剤、静脈注射剤、点滴注射剤、筋肉注射剤又は腹腔内注射剤などを選択することができる。またその他の非経口投与に用いる製剤としては、坐剤、舌下剤、経皮剤、経鼻剤以外の経粘膜投与剤なども挙げられる。さらに、ステントや血管内栓塞剤に含有若しくは塗布する態様で、血管内局所投与することも

できる。

前記医薬組成物の投与量は、患者の年齢、性別、体重、症状、治療効果、投与方法、処理時間、又は該医薬組成物に含有される活性成分の種類などにより異なるが、通常成人1人あたり、1回につき0.001mgから500mgの範囲で、好ましくは0.005mgから200mgの範囲で投与することができる。しかし、投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量よりも少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を超える投与量が必要な場合もある。

[椎体骨折治療剤の評価方法]

また、本発明は、椎体骨折治療剤の評価方法に関する。

- 10 本発明の評価方法は、1) 非ヒト動物の椎体骨に外科的な損傷を与える工程、2) 当該非ヒト動物に被検物質を投与する工程、3) 当該非ヒト動物又はそれに由来する検体の椎体骨の外科的な損傷の回復について形態学的、生理学的、生化学的又は行動学的な測定をする工程、を含むことを特徴とする。また、本発明の評価方法には好ましくは、椎体骨の外科的な損傷の回復の形態学的、生理学的、生化学的又は
- 15 行動学的な測定を行った結果を、さらに正常非ヒト動物若しくは又は対照非ヒト動物、又はそれに由来する検体における測定の結果と比較する工程も含まれる。一方、本発明評価方法で椎体骨に与える外科的な損傷については、椎体骨の皮質骨を通り海綿骨まで達する損傷であることが望ましく、損傷を与えることができれば特に限定されないが、ドリルによる穿孔により損傷を与える方法が好ましい。ドリル等及び
- 20 びそれを用いた穿孔の直径及び深さは、用いる動物や用いる椎体の部位によって適宜適切な用具を用いて適切な条件によって実施することが可能である。ラットの腰椎を例にとると歯科用ドリルを用いることが好ましく、その穿孔の直径としては好ましくは0.5～2.0mmの間、より好ましくは0.5～1.5mmの間、さらにより好ましくは0.7～0.8mmの直径である。穿孔の深さは皮質骨から海綿

骨に達する深さであればよいが、好ましくは皮質骨から海綿骨に達するが反対側の皮質骨までは達しない深さであり、より好ましくは2.5～3.0 mmの深さである。これらの条件は、最も汎用性のある200～350 gのラットを用いた場合であり、動物の大きさ、椎体の大きさに合わせて、適宜変更したほうが良い。

- 5 本発明の評価方法における椎体骨の外科的な損傷の治癒効果の測定には、単純X線、CT若しくはマイクロCT、MRIなどの形態観察の方法を用いて適宜実施することが可能である。本発明の実施例においては、ラットを用いた評価方法について、その外科的な損傷の治癒効果の測定としてX線マイクロCTを用いた方法を記載しているが、形態観察の方法としてはこれに限定されるものではない。また、本
- 10 発明の評価方法における椎体骨の外科的な損傷の治癒効果の測定には、組織学的観察による方法も可能である。組織学的観察に用いる試料としては、外科的損傷を与えた椎体の組織に加えて、周辺の骨組織や軟骨・筋・神経等のその他の組織、また血液や脳脊髄液等の体液などが挙げられる。椎体骨やその周辺の組織の採取には、解剖による組織の採取のほか、バイオプシーによる組織採取の方法を用いることができる。組織学的観察に用いる試料は適宜、固定、薄切、及び／又は染色などの処理を行ったうえで観察に供される。また、生化学的及び／又は細胞学的なマーカー、例えば骨分化や代謝に関するマーカーについてのタンパク質や遺伝子の発現について検出する方法、例えば組織免疫化学や*in situ*ハイブリダイゼーションやPCRなどの手法を用いて、組織学的観察を行うことも、当業者であれば適宜実施
- 20 することが可能である。また、採取した組織及び／又は体液から分離した細胞や液性成分、又は組織及び／又は細胞や体液から作成した抽出液などを用いて、生化学的マーカー生化学的及び／又は細胞学的なマーカー、例えば骨分化や代謝に関するマーカーのタンパク質や遺伝子の発現の測定などを行う方法も公知の種々の方法で実施することができ、そのような方法も当該組織学的な解析に含まれる。椎体骨

の外科的な損傷の治癒効果の測定を行う別の形態としては生理学的観察による測定であり、その例として痛覚の測定による方法である。非ヒト動物における痛覚の測定方法としては、例えば、機械的刺激性痛覚過敏反応 (mechanical hyperalgesia) の程度を測定するテストである paw pressure テストや von Frey テスト、機械刺激性アロディニアの程度を測定するアロディニアテスト、温熱性痛覚過敏反応の程度を測定する paw flick テストなどが挙げられる (河谷編、痛み研究のアプローチ、p 31 - 33、2006 年、真興交易株式会社医書出版部) が、他にも多くの公知の情報があり、当業者であれば用いる動物や評価する部位に応じて適宜その方法を選択して実施することが可能である。

また、本発明の評価方法では被検物質の投与による局所又は全身での炎症への影響についても評価することが可能である。局所での炎症への影響の測定には、上記のような組織学的な解析が用いられ、炎症性細胞、例えばリンパ球、単球／マクロファージ、肥満細胞、好中球、好酸球、好塩基球などの局所への集積の量や量の増減を調べるなどが挙げられる。また、組織又はそこから分離された細胞もしくはそれらからの抽出液を用いて、そこで発現している炎症性の因子、例えば腫瘍壊死因子 (TNF)、インターロイキン 1 (IL-1) やインターロイキン 6 (IL-6) などの炎症性サイトカインのタンパク質又は mRNA の量や量の増減を調べることも測定することが可能である。全身での炎症への影響の測定には、血液又はその他の体液などの試料を用いて赤血球沈降速度や白血球数と白血球分画などの一般的な炎症反応のマーカーに加えて、上記のような炎症性サイトカインタンパク質、又は C 反応性タンパク質 (CRP)、 $\alpha 1$ -アンチトリプシン、 $\alpha 1$ -アンチキモトリプシン、 $\alpha 1$ -酸性糖蛋白、血清アミロイド A、ハプトグロビン、セルロプラスミン、アルブミン、トランスサイレチン、トランスフェリンなど量や量の増減を調べる方法なども挙げられる。その他、局所又は全身での炎症に関する測定は、当業

者であれば適宜方法を選択して実施することが可能である。

さらに、本発明の評価方法では被検物質の投与による骨吸収への影響も測定することができる。骨吸収の測定は上記の外科的な損傷の治癒効果の測定における形態観察の方法が用いられることに加えて、骨体積密度の測定なども用いることができる。骨体積密度の測定方法は、例えば実施例 3 及び 5 に示されているマイクロ C T を用いた方法などが例示できるが、当業者は適宜一般的な骨体積密度の測定方法を選択して実施することも可能である。その他にも、骨吸収への影響を評価する方法として血液や尿などの試料における骨吸収マーカーを用いる方法があり、そのような骨吸収マーカーとしては、例えばデオキシピリジノリン、I 型コラーゲン架橋 N - テロペプチド、I 型コラーゲン架橋 C - テロペプチド、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼなどが挙げられるが、これに限定されるものではない。

さらに、本発明の評価方法では被検物質の投与による脊髄の炎症又はそれに伴う脊髄の損傷についても評価することが可能である。脊髄の炎症や損傷について調べるためには、組織学的方法、生理学的方法や行動学的方法などが用いられる。組織学的方法としては、治癒効果の測定における外科的な損傷の治癒効果の測定における組織学的観察による方法に記載した方法に加えて、脊髄組織などの試料を用いて上記局所での炎症への影響の測定に記載した方法などを用いて実施することが可能である。生理学的方法としては上記の外科的な損傷の治癒効果の測定での生理学的観察と同様の方法を用いることができる。また行動学的方法としては、Basso, Beattie, and Bresnahan (BBB) scale、立ち上がり行動やトレッドミルなどによる方法が挙げられる。さらに簡易的には脊髄の損傷にともない下肢に運動障害などが起こった場合は飼育ケージ内での摂餌行動にも支障をきたすことから、摂餌量の測定や体重の変化の測定などでも脊髄の損傷を評価することができる。その他、脊髄の炎症や損傷に関する測定は、当業者であ

れば適宜方法を選択して実施することが可能である。

本発明における評価方法で用いる非ヒト動物は非ヒト脊椎動物であり、好ましくはヒト以外の霊長類又は齧歯類であり、当該齧歯類の動物としてはラットが好ましいものとして例示でき、マウスなどげっ歯類、ウサギ、イヌ、サルなど、いずれの非ヒト脊椎動物にも応用できる。また、本発明で用いる非ヒト動物は、骨粗鬆症モデルの非ヒト動物を用いることも可能であり、当該骨粗鬆症モデルとしては卵巣摘出モデルが例示できる。本発明における評価方法で用いる椎体骨の部位は、当業者であれば用いる非ヒト動物の種類によって頸椎・胸椎・腰椎・仙椎・尾椎のうちから適切な椎体の部位を選択して実施することが可能であるが、好ましくは胸椎及び／又は腰椎の椎体であり、より好ましくは腰椎の椎体を用いる方法である。本発明における実施例においては、非ヒト動物としてラットを用いており、この場合には腰椎、特に腰椎のうちの第4腰椎と第5腰椎を用いた方法が示されている。従って、用いる椎体の部位としては第4腰椎及び／又は第5腰椎がより好ましいが、それに限定されるわけではない。

本発明における評価方法における被検物質の投与は、経口又は非経口による経路で実施することができ、当業者であれば用いる非ヒト動物の種類や評価部位、被検物質の物理的及び／又は化学的性質を勘案して、投与方法や投与部位を判断し、それに対応した被検物質を含有する投与用の試料を調整することが可能である。

実施例

以下、実施例をもって本発明をさらに詳しく説明するが、これらの実施例は本発明を制限するものではない。

動物（雄性 Sprague-Dawley ラット、手術時8週齢）は、1日12時間（6：00～18：00）の人工照明下で、温度 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ の条件で飼育を

行った。飲水条件は、次亜塩素酸消毒した井水（自給・深井戸）の自動給水による自由摂取、摂餌条件は、CE-2（日本クレア、マウス、ラット用）の自由摂取とした。実験は帝人ファーマ株式会社生物医学総合研究所動物実験委員会の許可のもとに行われた。動物の取り扱いは「生物医学総合研究所 動物実験規則」、処分は「生物医学総合研究所 動物の安楽死に関する規則」に、それぞれ準じた。

【実施例1】ラット腰椎椎体骨損傷モデルの作製方法の検討

椎体骨折に対する薬剤の治療効果を *in vivo* で検討する目的で、新しい動物モデルを構築した。本モデルは、ラット腰椎椎体に骨損傷を生じさせ、その治癒過程を観察する *in vivo* モデルである。具体的には、正常ラットの腰椎に歯科用ドリルで穴をあけ、その穴を骨損傷とした。

ラットは1週間の馴化期間の後、ペントバルビタールナトリウム（共立製薬株式会社）により麻酔し、腹部周囲をバリカンで剃毛したのち、手術台に仰向けに固定した。正中線にそって開腹し、腹部の臓器を滅菌ガーゼで隔離した後、腰椎周囲の血管、脂肪組織等は、綿棒を用いて丁寧に剥離した。微量の出血は、綿棒で押さえることで止血した。腰椎周囲の筋層をピンセットで裂き、第4腰椎及び第5腰椎それぞれに対し、約1cm四方の視野を確保した。露出した第4腰椎及び第5腰椎の前縦靱帯及び血管を避けた中央付近に、歯科用ドリルを用いて穴をあけた。その後、隔離した臓器を正常な位置に戻し、抗生物質を滴下し、縫合糸で切創を縫合した。縫合部はステープラーで留め、ヨードチンキで消毒した。麻酔から覚醒後、飼育ケージに戻し、飼育した。

結果

本モデルの作製には、2つの工程が重要であった。1工程目は、開腹後の腰椎周囲の血管、脂肪組織等の剥離である。剥離するためには、一般的に用いられている大小2種類の綿棒を用いた。大の綿棒は直径約1.2mm、小の綿棒は直径約3mm

mのものを使用した。綿棒に組織を絡ませながら徐々に剥離することで、出血を防ぐだけでなく、椎体周囲の筋組織へのダメージを最小限に抑えることができた。また、歯科用ドリルを椎体に近づける時、歯科用ドリルが周囲組織を巻き込まないようにし、かつ最小限の筋組織障害にとどめるために、1椎体に対し、約1cm四方の視野を確保した。

2工程目は、確保した視野で、第4腰椎及び第5腰椎の前縦靱帯及び血管を避けた中央付近に、穴をあけることである。穴の直径を2mm（Uchidaらが大腿骨に作製した穴の大きさは直径約2-2.5mm（非特許文献12、15））にすると、血管を避けることができず多くの血管を傷つけてしまうため、出血多量となり、ラットは麻酔から覚醒することなく死亡した。逆に、穴の直径を0.4mm以下にすると、円柱状の安定した骨損傷を均等に生じさせることができなかった。従って、ラットが術後死亡することなく生存し、その自然修復過程が21日間という短期間で、さらにmicro CTを用いた評価ができる骨損傷の大きさとして、直径約0.72mm、深さはそれぞれの椎体の大きさに合わせ椎体を貫通しない2.5-3.0mm程度という条件を決定した。

代表例として、モデル作製の損傷椎体（穴をあけた椎体）のmicro CT画像（3D画像と2D画像）を示した（図1）。図1は、ラット腰椎椎体損傷モデルを作製し、micro CTを用いてその椎体を撮影したものである。具体的には、歯科用ドリルを用い、露出したL4及びL5の前縦靱帯及び血管を避けた中央付近に直径0.72mm程度の穴をあけた。矢印は、あけた穴を指し示す。図のように、第4腰椎又は第5腰椎の前縦靱帯及び血管を避けた中央付近に、直径約0.72mm、深さは椎体を貫通しない2.5-3.0mmの骨損傷を作製した。この穴の大きさであれば、ラットは麻酔から覚醒後、開腹のみ実施した偽手術ラットと同様の緩やかな体重増加を示した。また、外観による一般症状の観察では、異常所見はな

く、術後 21 日間、良好な健康状態を保ちながら飼育することができた。実施例 2、3 に示すように、術後 21 日では、正常椎体と同程度の骨構造の回復を確認できたことから、本モデルを椎体骨折に対する薬剤の治療効果を *in vivo* で検討できる新しいモデルとして、ラット腰椎椎体骨損傷モデルと命名した。

5 [実施例 2] ラット腰椎椎体骨損傷モデルの自然修復過程における組織学的検討

ラット腰椎椎体骨損傷モデルの骨損傷後の自然修復過程を、椎体の組織標本を作製することにより観察した。モデル作製日（穴をあけた日）を *day 0* とし、*day 4*、*day 7*、*day 14*、*day 21* に、ペントバルビタール麻酔下で腹部大動脈から放血致死させ、腰椎を摘出した。摘出した腰椎は、70%エタノールに浸け、4℃で保存した。それぞれの椎体は、蟻酸・クエン酸ナトリウム脱灰し、パラフィン包埋した（密閉式自動固定包埋装置（サクラ ETP-180BV））。micro CT 画像を元に海綿骨の損傷部を面出しし、損傷部を面出しできたブロックを観察した。3mmで薄切した切片（滑走式ミクロトーム（サクラ IVS-410））をスライドガラスにのせ、脱パラ後、それぞれ、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色、マッソン・トリクローム（MT）染色を実施した。作製した組織標本は、顕微鏡（Leica DM4000B）、カメラ（Leica DFC480）、顕微鏡写真撮影ソフト（Leica IM500）を用いて観察した。

結果

モデル作製日（穴をあけた日）を *day 0* とし、*day 4*、*day 7*、*day 14*、*day 21* の HE 染色像及び MT 染色像を観察した。図 2 に、それぞれの時点での MT 染色の代表例（海綿骨の損傷部）を示した。図 2 は、モデル作製日（*day 0*）、*day 4*、*day 7*、*day 14*、*day 21* の MT 染色像を示した。2A は *day 0*、2B は *day 4*、2C は *day 7*、2D は *day 14*、2E は *day 21*、さらに、2F は *day 21* の正常椎体（偽手術ラット）の海綿骨を示した。

それぞれ、損傷椎体に関しては、上部は損傷部、下部は非損傷部であり、境界を矢印で指し示した。

モデル作製直後 (day 0) では、損傷部での骨髓細胞の漏出が観察された (図 2 A)。day 4 (図 2 B) では、骨折治癒の初期ステージである血腫と肉芽組織の混在と少量の線維性骨が観察された。day 7 (図 2 C) では、血腫は組織化して消失し、線維性骨が増加し、周囲と明らかに区別できる骨梁が認められた。day 14 (図 2 D) では、骨梁はより増加し、肉芽組織や線維性骨はほとんど認められなかった。day 21 (図 2 E) では、損傷部は完全に修復し、偽手術ラット (図 2 F) と同様の組織像が観察された。

- 10 [実施例 3] ラット腰椎椎体骨損傷モデルの自然修復過程における、micro CT 撮影とその撮影画像を用いた骨体積密度 (mg/cm^3) の計測

マイクロフォーカス X 線 CT 装置 (株式会社日鉄エレックス) を用いた。撮影ソフト ELE SCAN (NX-CP-C80H-IL-021: 株式会社日鉄エレックス) を用い、管電圧 50 kV、管電流 60 mA の撮影条件で、3D 断層像撮影した。椎体側面から見た後縦靱帯が位置するラインを中心線に合わせ、撮影中椎体が動かないように固定し、0.02 mm 幅で 300 枚撮影した。また、測定値を骨体積密度 (mg/cm^3) に変換するために、4 段階に設定した炭酸カルシウムファントム ($0 \sim 300 \text{ mg}/\text{cm}^3 \text{ CaCO}_3$) を同条件で撮影した。CT 画像は、C3D ファイルで保存し、コンビーム再構成ソフトウェア (ELE SCAN CB3D: 株式会社日鉄エレックス) を用いて再構成した (C3V ファイル作成)。保存した C3V ファイルを元に、300 枚の TIFF ファイルを作成し、このファイルを用いて解析を行った。解析には、Real IMAGE ver 2.1 (株式会社ケイ・ジー・ティー) を用い、輝度値の計測を行った。

損傷椎体の海綿骨の損傷部の骨体積密度を計測した。具体的には、撮影した m i

micro CT画像の椎体側面から見た後縦靱帯が位置するラインを0としたときの、
1.90 mmから2.10 mmの11枚のTiffファイルについて、それぞれ0.40 mm²の円の輝度値を測定した。

5 正常椎体（偽手術ラット）の海綿骨についても骨体積密度を計測した。具体的に
は、撮影したmicro CT画像の椎体側面から見た後縦靱帯が位置するライン
を0としたときの、1.90 mmから2.10 mmの11枚のTiffファイル
について、それぞれ2.0 mm²の長方形（皮質骨を含まない）の輝度値を測定した。

測定した輝度値は、同条件で測定した炭酸カルシウムファントムを元に、骨体積
密度（mg/cm³）に変換した。

10 結果

micro CTを用いて、海綿骨の損傷部の骨体積密度を計測した。モデル作
製日（穴をあけた日）をday 0とし、day 4、day 7、day 14、day
21の骨体積密度を示した（図3）。図3は、モデル作製日（day 0）、day 4、
day 7、day 14、day 21の骨体積密度を示す。黒丸（●）は、損傷椎体
15 の海綿骨の損傷部の骨体積密度の平均値±標準偏差、四角（□）は、正常椎体（偽
手術ラット）の海綿骨の骨体積密度の平均値±標準偏差を示す。

1椎体を1例として取り扱った。モデル作製直後の骨体積密度の平均値±標準偏
差は、0.0±31.6 mg/cm³であり、day 4、day 7、day 14、d
ay 21では、それぞれ、33.5±39.5、92.4±29.8、100.2±
20 45.4、263.2±50.1 mg/cm³であった。一方、正常椎体（偽手術ラ
ット）の海綿骨の骨体積密度は、day 0では246.4±64.6、day 21
では220.7±50.1 mg/cm³であり、観察期間内において、ほぼ一定の値
を示した。

従って、腰椎に歯科用ドリルで穴をあけたとき、その穴の骨体積密度は緩やかに

増加し、21日目で正常椎体（偽手術ラット）と同程度まで回復することが示された。また、micro CTを用いて骨体積密度を測定することで、ラット腰椎椎体骨損傷モデルの骨損傷修復レベルを定量できることが示された。

[実施例4]ラット腰椎椎体骨損傷モデルにhPTH（1-34）及びPTHrPア

5 ナログAを投与したときの組織学的検討

モデル作製日から7日間又は14日間、hPTH（1-34）（Bachem社）又はPTHrPアナログA（Ipsen社）（配列番号42）を投与したときの椎体組織標本を観察した。hPTH（1-34）群、PTHrPアナログA及びVehicle群を設定した。Vehicle投与液は、2%ラット血清を含むSaline（pH4.0±0.1）を用いた。hPTH（1-34）投与液、PTHrPアナログA投与液は、Vehicleを用いて10μg/mLに調製した。初回投与は、モデル作製4時間後に実施し、次の日からは1日1回皮下投与した。投与容量は1mL/kgとした。最終投与24時間後にペントバルビタール麻酔下で腹部大動脈から放血致死させ、第4腰椎、第5腰椎（損傷椎体）と第3腰椎、第6腰椎（非損傷椎体）を摘出した。摘出した腰椎は、70%エタノールに浸け、4℃で保存した。

それぞれの椎体は、蟻酸・クエン酸ナトリウム脱灰し、パラフィン包埋した（密閉式自動固定包埋装置（サクラETP-180BV））。micro CT画像を元に海綿骨の損傷部を面出しし、損傷部を面出しできたブロックを観察した。3mmで薄切した切片（滑走式ミクロトーム（サクラIVS-410））をスライドガラスにのせ、脱パラ後、それぞれ、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色、マッソン・トリクローム（MT）染色を実施した。作製した組織標本は、顕微鏡（Leica DM4000B）、カメラ（Leica DFC480）、顕微鏡写真撮影ソフト（Leica IM500）を用いて観察した。

結果

モデル作製日から7日間又は14日間、hPTH(1-34) $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 又はPTHrPアナログA $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ を連日皮下投与したときのHE染色像及びMT染色像を観察した。図4に、それぞれの時点でのMT染色の代表例（海綿骨の損傷部）を示した。図4は、モデル作製日から7日間又は14日間、hPTH(1-34) $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 又はPTHrPアナログA $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ を連日皮下投与したときのMT染色像を示す。4Aはday 7でのvehicle群、4Bはday 7でのhPTH(1-34)群、4Cはday 7でのPTHrPアナログA群、4Dはday 14でのvehicle群、4Eはday 14でのhPTH(1-34)群、4Fはday 14でのPTHrPアナログA群を示す。それぞれ、上部は損傷部、下部は非損傷部であり、境界を矢印で指し示す。

投与7日目において、hPTH(1-34)群（図4B）では、Vehicle群（図4A）と比較して、線維性骨の増加、骨梁の増加傾向が観察された。投与14日目においては、両群ともに肉芽組織や線維性骨はほとんど認められず、形態学的な差は観察されなかったが、hPTH(1-34)群（図4E）では、Vehicle群（図4D）と比較して、より多くの骨梁が観察された。

同様に、投与7日目において、PTHrPアナログA群（図4C）では、Vehicle群（図4A）と比較して、線維性骨の増加、骨梁の増加傾向が観察された。投与14日目においては、両群ともに肉芽組織や線維性骨はほとんど認められず、形態学的な差は観察されなかったが、PTHrPアナログA群（図4F）では、Vehicle群（図4D）と比較して、より多くの骨梁が観察された。hPTH(1-34)群とPTHrPアナログA群の間に、著明な差は観察されなかった。

また、HE染色での組織像について、モデル作製日から7日間又は14日間を観察した。hPTH(1-34) $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 又はPTHrPアナログA 10μ

g/kgを投与した群をVehicle投与群と比較した結果、損傷部及び非損傷部での炎症性細胞の明らかな集積は認められず、形態学的な差はなかった。

[実施例5]ラット腰椎椎体骨損傷モデルにhPTH(1-34)及びPTHrPアナログAを投与したときの損傷椎体の海綿骨の損傷部における骨体積密度の検討

- 5 モデル作製日から7日間又は14日間、hPTH(1-34) 10 µg/kg又はPTHrPアナログA 10 µg/kgを連日皮下投与したときの損傷椎体の海綿骨の損傷部の骨体積密度を計測した。骨体積密度は実施例3と同様の方法を用いて測定した。

結果

- 10 Micro CT撮影画像を用いて計測した骨体積密度(mg/cm³)に対して、解析を実施した。解析を実施するにあたり、1椎体を1例として取り扱った。

Day 7、day 14でのhPTH(1-34)群とVehicle群の2群間、PTHrPアナログA群とvehicle群の2群間に対し、それぞれStudentのt検定を実施した。有意水準は5%とした。

- 15 ハードウェアは、富士通株式会社 FMVXD0572 FMV ESPRIMO D3230を使用し、ソフトウェアは、株式会社SAS インスティテュート ジャパン SAS ver 8.2、株式会社アーム EXSAS ver 7.10を使用した。

micro CTを用いて、損傷椎体の海綿骨の損傷部の骨体積密度を計測した。

- 20 モデル作製日から7日間又は14日間、hPTH(1-34) 10 µg/kgを連日皮下投与したときの骨体積密度を示した(図5)。図5は、モデル作製日から7日間又は14日間、hPTH(1-34) 10 µg/kg又はPTHrPアナログA 10 µg/kgを連日皮下投与したときの海綿骨の損傷部の骨体積密度を示す。黒丸(●)は、vehicle群の平均値±標準偏差、白丸(○)は、hPT

H (1 - 3 4) 群の平均値±標準偏差、三角 (△) は、P T H r P アナログ A 群の平均値±標準偏差を示す。各時点での h P T H (1 - 3 4) 群と V e h i c l e 群の 2 群間、P T H r P アナログ A 群と V e h i c l e 群の 2 群間に対し、それぞれ S t u d e n t の t 検定を実施したところ、投与 1 4 日目において、V e h i c l e 群と h P T H (1 - 3 4) 群の 2 群間、V e h i c l e 群と P T H r P アナログ A 群の 2 群間に統計学的に有意な差が認められた ($p = 0.0100$ 、 $p = 0.0025$)。

投与 7 日目において、海綿骨の損傷部の骨体積密度の平均値±標準偏差は、V e h i c l e 群は $91.4 \pm 33.8 \text{ mg/cm}^3$ 、h P T H (1 - 3 4) 群は $158.0 \pm 77.5 \text{ mg/cm}^3$ であり、2 群間に統計学的に有意な差は認められなかった ($p = 0.0743$: S t u d e n t の t 検定)。投与 1 4 日目において、海綿骨の損傷部の骨体積密度の平均値±標準偏差は、V e h i c l e 群は $140.9 \pm 58.8 \text{ mg/cm}^3$ 、h P T H (1 - 3 4) 群は $250.5 \pm 78.7 \text{ mg/cm}^3$ であり、2 群間に統計学的に有意な差が認められた ($p = 0.0100$: S t u d e n t の t 検定)。

同様に、モデル作製日から 7 日間又は 1 4 日間、P T H r P アナログ A $10 \mu\text{g/kg}$ を連日皮下投与したときの骨体積密度を示した (図 5)。投与 7 日目において、海綿骨の損傷部の骨体積密度の平均値±標準偏差は、V e h i c l e 群は $91.4 \pm 33.8 \text{ mg/cm}^3$ 、P T H r P アナログ A 群は $148.5 \pm 56.2 \text{ mg/cm}^3$ であり、2 群間に統計学的に有意な差は認められなかった ($p = 0.0590$: S t u d e n t の t 検定)。投与 1 4 日目において、海綿骨の損傷部の骨体積密度の平均値±標準偏差は、V e h i c l e 群は $140.9 \pm 58.8 \text{ mg/cm}^3$ 、P T H r P アナログ A 群は $237.0 \pm 40.4 \text{ mg/cm}^3$ であり、2 群間に統計学的に有意な差が認められた ($p = 0.0025$: S t u d e n t の t 検定)。従って、

椎体の海綿骨の損傷部において、h P T H (1 - 3 4)、P T H r P アナログ A とともに、14 日間投与することで有意な骨体積密度増加作用を示すことが分かった。

また、モデル作製日から7 日間、h P T H (1 - 3 4) 10 μ g / k g 又は P T H r P アナログ A 10 μ g / k g を投与した群においても、有為な差は見られないものの、V e h i c l e 投与群と比較して高い骨体積密度を示したことから、h P T H (1 - 3 4)、P T H r P アナログ A とともに、損傷部における過度の骨吸収は起こっていないことが示された。

[実施例 6] ラット腰椎椎体骨損傷モデルに h P T H (1 - 3 4) 及び P T H r P アナログ A を投与したときの非損傷椎体の海綿骨の骨体積密度の検討

10 モデル作製日から7 日間又は14 日間、h P T H (1 - 3 4) 10 μ g / k g 又は P T H r P アナログ A 10 μ g / k g を連日皮下投与したときの非損傷椎体の海綿骨の骨体積密度を計測した。骨体積密度は、実施例 3 と同様の方法を用いて測定した。ただし、非損傷椎体（第3 腰椎、第6 腰椎）の大きさを考慮し、測定位置を第4 腰椎、第5 腰椎と異なる位置に設定した。具体的には、第3 腰椎は、撮影した m i c r o C T 画像の椎体側面から見た後縦靱帯が位置するラインを0 としたときの、1.70 mm から1.90 mm の11 枚の T i f f ファイルについて、第6 腰椎は、撮影した C T 画像の椎体側面から見た椎体後方を0 としたときの、2.10 mm から2.30 mm の11 枚の T i f f ファイルについて、それぞれ2.0 mm² の長方形（皮質骨を含まない）の輝度値を測定した。

20 結果

M i c r o C T 撮影画像を用いて計測した骨体積密度 (m g / c m³) に対して、解析を実施した。解析を実施するにあたり、1 椎体を1 例として取り扱った。

D a y 7、d a y 14 での h P T H (1 - 3 4) 群と V e h i c l e 群の2 群間、P T H r P アナログ A 群と v e h i c l e 群の2 群間に対し、それぞれ S t u d e

Studentのt検定を実施した。有意水準は5%とした。

ハードウェアは、富士通株式会社 FMVXD0572 FMV ESPRIMO D3230を使用し、ソフトウェアは、株式会社SAS インスティテュート ジャパン SAS ver 8.2、株式会社アーム EXSAS ver 7.10
5 を使用した。

非損傷椎体（第3腰椎、第6腰椎）の海綿骨の骨体積密度を計測した。モデル作製日から7日間と14日間、hPTH（1-34） $10\mu\text{g}/\text{kg}$ を連日皮下投与したときの骨体積密度を示した（図6）。図6は、モデル作製日から7日間又は14日間、hPTH（1-34） $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 又はPTHrPアナログA $10\mu\text{g}/\text{kg}$ を連日皮下投与したときの非損傷椎体の海綿骨の骨体積密度を示す。黒丸（●）は、vehicle群の平均値±標準偏差、白丸（○）は、hPTH（1-34）群の平均値±標準偏差、三角（△）は、PTHrPアナログA群の平均値±標準偏差を示す。各時点でのhPTH（1-34）群とVehicle群の2群間、PTHrPアナログA群とVehicle群の2群間に対し、それぞれStudentのt検定を実施したところ、day 7、day 14ともに統計学的に有意な差は認められなかった（day 7: $p=0.9981$ 、 $p=0.5591$ 、day 14: $p=0.2539$ 、 $p=0.1919$ ）。投与7日目において、海綿骨の骨体積密度の平均値±標準偏差は、Vehicle群は $214.9 \pm 56.6\text{mg}/\text{cm}^3$ 、hPTH（1-34）群は $215.0 \pm 42.1\text{mg}/\text{cm}^3$ であり、2群間に統計学的に有意な差は認められなかった（ $p=0.9981$: Studentのt検定）。
20 投与14日目において、海綿骨の骨体積密度の平均値±標準偏差は、Vehicle群は $240.2 \pm 59.7\text{mg}/\text{cm}^3$ 、hPTH（1-34）群は $268.3 \pm 30.0\text{mg}/\text{cm}^3$ であり、2群間に統計学的に有意な差は認められなかった（ $p=0.2539$: Studentのt検定）。

同様に、PTHrPアナログA $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ を連日皮下投与したときの骨体積密度を示した（図6）。投与7日目において、海綿骨の骨体積密度の平均値±標準偏差は、Vehicle群は $214.9 \pm 56.6 \text{ mg}/\text{cm}^3$ 、PTHrPアナログA群は $233.4 \pm 66.6 \text{ mg}/\text{cm}^3$ であり、2群間に統計学的に有意な差は認められなかった（ $p=0.5591$ ；Studentのt検定）。投与14日目において、海綿骨の骨体積密度の平均値±標準偏差は、Vehicle群は $240.2 \pm 59.7 \text{ mg}/\text{cm}^3$ 、PTHrPアナログA群は $278.0 \pm 50.1 \text{ mg}/\text{cm}^3$ であり、2群間に統計学的に有意な差は認められなかった（ $p=0.1919$ ；Studentのt検定）。

従って、hPTH（1-34）、PTHrPアナログAを14日間投与しても、損傷させていない椎体の海綿骨の骨体積密度は変化しないことが分かった。以上の結果より、損傷椎体の海綿骨の損傷部で認められたhPTH（1-34）、PTHrPアナログAの骨体積密度の増加作用は、損傷部位特異的であることが分かった。

上記のように、ラット腰椎椎体骨損傷モデルに、PTH（1-34）やPTHrPアナログAを投与すると、非損傷椎体の海綿骨の骨体積密度は変化しない投与量でも、損傷椎体の海綿骨の損傷部の骨体積密度は有意に増加することを見出した。従って、PTH（1-34）やPTHrPアナログAは、椎体骨折で生じる海綿骨の微細構造の損傷を損傷部位特異的に治療する作用を持つことが分かった。

[実施例7]ラット腰椎椎体骨損傷モデルにhPTH（1-34）及びPTHrPアナログAを投与したときの運動機能及び体重変化への影響の検討

hPTH（1-34）及びPTHrPアナログAを投与することで、骨折修復過程の炎症反応が増悪すること、又は過度の骨吸収によって椎体が破壊されることにより、椎体の近傍に存在する脊髄が損傷をうける可能性を検討した。一般的に、脊椎の損傷によって下肢での運動機能に重篤な障害が生じた場合には、飼育ケージに

取り付けられた餌箱からの摂餌行動も制限されるため、摂餌量が減ることによる体重減少が起これと考えられる。

ラット腰椎椎体骨損傷モデルの作製については実施例 1 に記載の方法で実施し、偽手術ラットの作製については、歯科用ドリルを用いて穴をあける工程以外は、実施例 1 に記載したラット腰椎椎体骨損傷モデルと同じ方法で作製した。

まず、本発明のラット腰椎椎体骨損傷モデル作成での運動機能及び体重変化への影響を検討した。ラット腰椎椎体骨損傷モデル及び偽手術ラットの各群について、手術を行った日を Day 0 として、各 Day 4、7、14、21 日に体重の測定を実施した。また、行動異常については体重測定時に歩行及び立ち上がり等の行動に不自然さがないかを目視で観察した。続いて、ラット腰椎椎体骨損傷モデルを用いてモデル作製日から 14 日間、hPTH (1-34) $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 又は PTHrP アナログ A $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ を連日皮下投与したときの体重変化について検討した。投与開始日であるモデル作成日を Day 0 とし、Day 14 までの体重を連日測定した。また、行動異常については上記のように目視での観察により行った。

結果

ラット腰椎椎体骨損傷モデル及び偽手術ラットの各群についての体重測定の結果を図 7 A に示す。測定した日の全てにおいて、ラット腰椎椎体骨損傷モデルと偽手術ラットの各群での体重の差は認められなかった。また、各動物における目視での行動異常も認められなかった。このことから、本発明のラット腰椎椎体骨損傷モデルではモデル作製による運動機能への影響は認められない。

hPTH (1-34) $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 又は PTHrP アナログ A $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ もしくは Vehicle をモデル作製日から 14 日間連日皮下投与したときの各群の体重変化を図 7 B に示す。投与開始から 14 日までの間、hPTH (1-34)、PTHrP アナログ A 及び Vehicle 投与の各群の間で、体重の差は認め

られなかった。また、各動物における目視での行動異常も認められなかった。このことから、ラット腰椎椎体骨損傷モデルにhPTH（1-34）又はPTHrPアナログAを投与することで、行動障害を起こすような重篤な脊髄への損傷などの作用は起こっていないことが確認された。

5

産業上の利用可能性

本発明は、PTH／PTHrP受容体アゴニスト、又はPTH又はPTHrP産生を誘導する活性を有する物質を含有することによって、椎体骨折治療剤、椎体骨折に起因する疼痛の治療又は予防剤、椎体圧迫骨折予防剤、又は椎体骨折に起因する運動障害及び／又は神経障害の治療又は予防剤として使用できる。また、本発明は、非ヒト動物の椎体骨に外科的な損傷を与える工程、当該非ヒト動物に被検物質を投与する工程、及び当該非ヒト動物又はそれに由来する検体の椎体骨の外科的な損傷の回復を測定する工程、を含むことによって、椎体骨折治療剤の評価方法として使用できる。

15

請求の範囲

[請求項 1]

PTH／PTHrP 受容体アゴニストを含有することを特徴とする、椎体骨折治療剤。

[請求項 2]

PTH／PTHrP 受容体アゴニストが、副甲状腺ホルモン（PTH）、副甲状腺ホルモン関連ペプチド（PTHrP）、又はそれらの部分活性ポリペプチド、若しくはそれらのアナログである、請求項 1 に記載の椎体骨折治療剤。

10 [請求項 3]

PTH、PTHrP 又はそれらの部分活性ポリペプチドが、PTH（1－84）、PTH（1－37）、PTH（1－34）、PTH（1－31）、PTHrP（1－141）、PTHrP（1－139）、PTHrP（1－86）、PTHrP（1－40）、PTHrP（1－37）、PTHrP（1－36）、及びPTHrP（1－34）のいずれかである、請求項 2 に記載の椎体骨折治療剤。

[請求項 4]

PTH、PTHrP 又はそれらの部分活性ポリペプチドが、ヒトPTH又はヒトPTHrP に由来するアミノ酸配列を有するポリペプチドである、請求項 2 又は 3 に記載の椎体骨折治療剤。

20 [請求項 5]

PTH、PTHrP 又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログが、PTH、PTHrP 又はそれらの部分活性ポリペプチドにおけるアミノ酸配列のうち、1～10 個のアミノ酸を別のアミノ酸に置換したポリペプチドである、請求項 2 に記載の椎体骨折治療剤。

[請求項 6]

P T H、P T H r P 又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログが、P T H (1
- 8 4)、P T H (1 - 3 7)、P T H (1 - 3 4)、P T H (1 - 3 1)、P T H r
P (1 - 1 4 1)、P T H r P (1 - 1 3 9)、P T H r P (1 - 8 6)、P T H r P
5 (1 - 4 0)、P T H r P (1 - 3 7)、P T H r P (1 - 3 6)、及びP T H r P (1
- 3 4) のいずれかのアミノ酸配列のうち、1 ~ 1 0 個のアミノ酸を別のアミノ酸
に置換したポリペプチドである、請求項 5 に記載の椎体骨折治療剤。

[請求項 7]

P T H、P T H r P 又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログが、ヒト P T
10 H 又はヒト P T H r P に由来するアミノ酸配列のうち、1 ~ 1 0 個のアミノ酸を別
のアミノ酸に置換したポリペプチドである、請求項 5 又は 6 に記載の椎体骨折治療
剤。

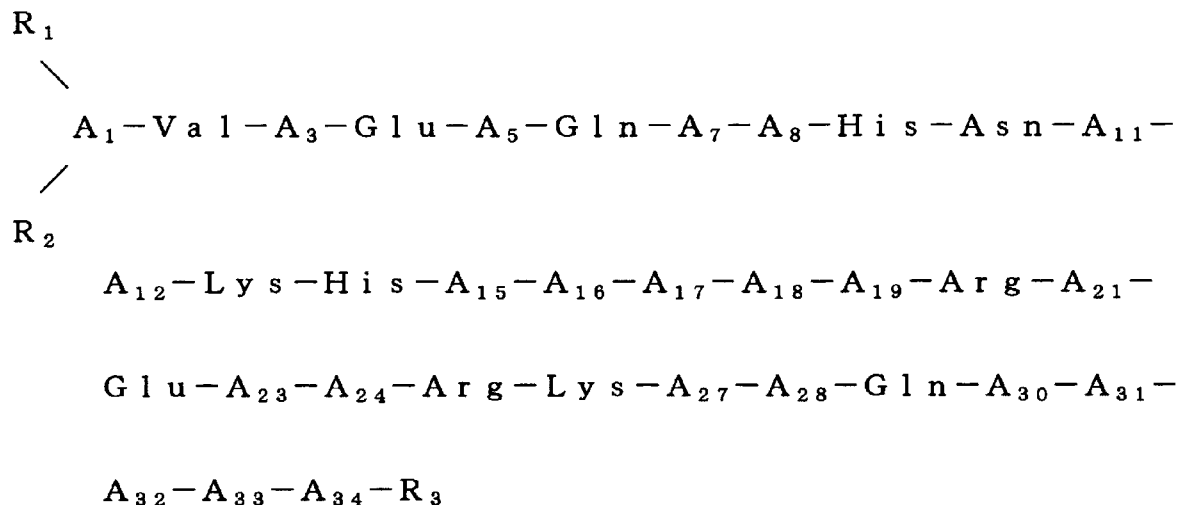
[請求項 8]

P T H、P T H r P 又はそれらの部分活性ポリペプチド、若しくはそれらのアナ
15 ログが、製薬上許容される塩である、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の椎体骨折治
療剤。

[請求項 9]

P T H、P T H r P 又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログが下記式のポリ
ペプチド：

20 [化 1]



ただし、

A_1 はSer、Ala、又はDapであり；

A_3 はSer、Thr、又はAibであり；

A_5 はLeu、Nle、Ile、Cha、 β -Nal、Trp、Pal、Phe、又はp-X-Pheであり、この際、XはOH、ハロゲン、又はCH₃であり；

A_7 はLeu、Nle、Ile、Cha、 β -Nal、Trp、Pal、Phe、又はp-X-Pheであり、この際、XはOH、ハロゲン、又はCH₃であり；

A_8 はMet、Nva、Leu、Val、Ile、Cha、又はNleであり；

A_{11} はLeu、Nle、Ile、Cha、 β -Nal、Trp、Pal、Phe又はp-X-Pheであり、この際、XはOH、ハロゲン、又はCH₃であり；

A_{12} はGly又はAibであり；

A_{15} はLeu、Nle、Ile、Cha、 β -Nal、Trp、Pal、Phe、又はp-X-Pheであり、この際、XはOH、ハロゲン、又はCH₃であり；

A_{16} はSer、Asn、Ala、又はAibであり；

A_{17} はSer、Thr、又はAibであり；

A_{18} はMet、Nva、Leu、Val、Ile、Nle、Cha、又はAibであり；

A_{19} はG l u又はA i bであり；

A_{21} はV a l、C h a、又はM e tであり；

A_{23} はT r p又はC h aであり；

A_{24} はL e u又はC h aであり；

5 A_{27} はL y s、A i b、L e u、h A r g、G l n、又はC h aであり；

A_{28} はL e u又はC h aであり；

A_{30} はA s p又はL y sであり；

A_{31} はV a l、N l e、若しくはC h aである、又は欠損しており；

A_{32} はH i sである又は欠損しており；

10 A_{33} はA s nである又は欠損しており；

A_{34} はP h e、T y r、A m p、若しくはA i bである、又は欠損しており；

R_1 及び R_2 は、それぞれ独立して、H、 C_{1-12} アルキル、 C_{2-12} アルケニル、 C_{2-12} アルキニル、 C_{7-20} フェニルアルキル、 C_{11-20} ナフチルアルキル、 C_{1-12} ヒドロキシアリル、 C_{2-12} ヒドロキシアリケニル、 C_{7-20} ヒドロキシフェニル

15 アリル、若しくは C_{11-20} ヒドロキシナフチルアルキルであり；又は R_1 及び R_2 の両方又は一方のみが COE_1 であり、この際、 E_1 は C_{1-12} アルキル、 C_{2-12} アルケニル、 C_{2-12} アルキニル、 C_{7-20} フェニルアルキル、 C_{11-20} ナフチルアルキル、 C_{1-12} ヒドロキシアリル、 C_{2-12} ヒドロキシアリケニル、 C_{7-20} ヒドロキシフェニルアルキル、若しくは C_{11-20} ヒドロキシナフチルアルキルであり；及

20 び

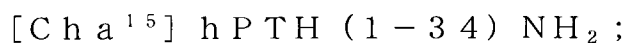
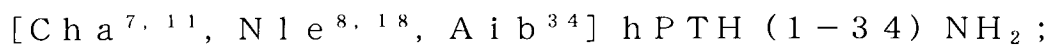
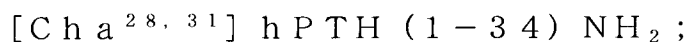
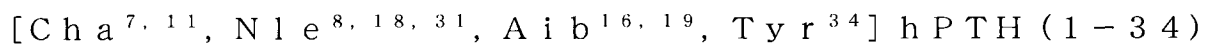
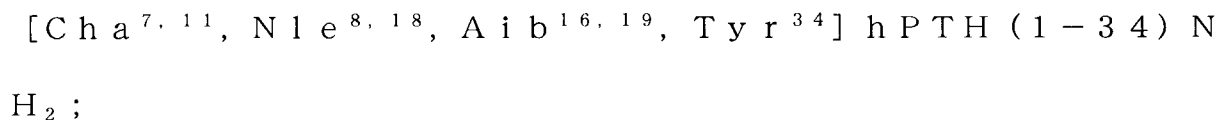
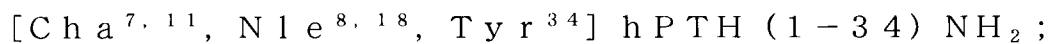
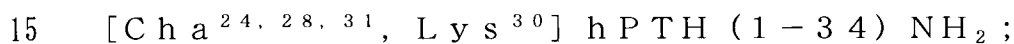
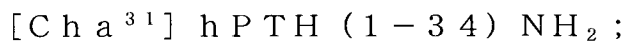
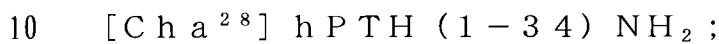
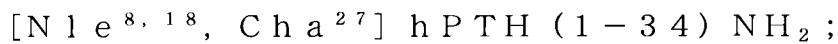
R_3 はOH、 NH_2 、 C_{1-12} アルコキシ、又は $NH-Y-CH_2-Z$ であり、この際、 Y は C_{1-12} 炭化水素部分であり、 Z はH、OH、 CO_2H 、又は $CONH_2$ であり； A_5 、 A_7 、 A_8 、 A_{11} 、 A_{15} 、 A_{18} 、 A_{21} 、 A_{23} 、 A_{24} 、 A_{27} 、 A_{28} 及び A_{31} の少なくとも一つはC h aである、又は A_3 、 A_{12} 、 A_{16} 、 A_{17} 、 A_{18} 、 A_{19} 及

びA₃₄の少なくとも一つはAibである；又はこれらの製薬上許容できる塩である、請求項1又は2に記載の椎体骨折治療剤。

[請求項10]

PTH、PTHrP又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログが、下記式の

5 ポリペプチド：



[C h a^{7, 11}, A i b¹⁹] h P T H (1 - 3 4) N H₂ ;

[C h a^{7, 11}, A i b¹⁶] h P T H (1 - 3 4) N H₂ ;

[A i b^{16, 19}] h P T H (1 - 3 4) N H₂ ;

[A i b¹²] h P T H (1 - 3 4) N H₂ ;

5 [A i b³] h P T H (1 - 3 4) N H₂ ;

[C h a^{7, 11}, A i b¹⁹, L y s³⁰] h P T H (1 - 3 4) N H₂ ;

[C h a⁷] h P T H (1 - 3 4) N H₂ ;

[C h a^{24, 28, 31}] h P T H (1 - 3 4) N H₂ ;

[A i b¹⁷] h P T H (1 - 3 4) N H₂ ; 及び

10 [C h a^{7, 11, 15}] h P T H (1 - 3 4) N H₂、

からなる群より選択されるペプチド、又はこれらの製薬上許容できる塩である、請求項 9 に記載の椎体骨折治療剤。

[請求項 11]

P T H、P T H r P 又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログが下記式のポ

15 リペプチド：

[化 2]

R₁

＼

A₁-V a l-A₃-G l u-A₅-G l n-A₇-A₈-H i s-A₁₀-A₁₁-

／

R₂

A₁₂-L y s-A₁₄-A₁₅-A₁₆-A₁₇-A₁₈-A₁₉-A r g-A r g-

A₂₂-A₂₃-A₂₄-A₂₅-A₂₆-A₂₇-A₂₈-A₂₉-A₃₀-A₃₁-

A₃₂-A₃₃-A₃₄-R₃

ただし、

- A_1 はAla、Ser、又はDapであり；
- A_3 はSer又はAibであり；
- A_5 はHis、Ile、又はChaであり；
- A_7 はLeu、Cha、Nle、 β -Nal、Trp、Pal、Phe、又はp-X
- 5 -Pheであり、この際、XはOH、ハロゲン、又はCH₃であり；
- A_8 はLeu、Met、又はChaであり；
- A_{10} はAsp又はAsnであり；
- A_{11} はLys、Leu、Cha、Phe、又は β -Nalであり；
- A_{12} はGly又はAibであり；
- 10 A_{14} はSer又はHisであり；
- A_{15} はIle、又はChaであり；
- A_{16} はGln又はAibであり；
- A_{17} はAsp又はAibであり；
- A_{18} はLeu、Aib、又はChaであり；
- 15 A_{19} はArg又はAibであり；
- A_{22} はPhe、Glu、Aib、又はChaであり；
- A_{23} はPhe、Leu、Lys、又はChaであり；
- A_{24} はLeu、Lys、又はChaであり；
- A_{25} はHis、Aib、又はGluであり；
- 20 A_{26} はHis、Aib、又はLysであり；
- A_{27} はLeu、Lys、又はChaであり；
- A_{28} はIle、Leu、Lys、又はChaであり；
- A_{29} はAla、Glu、又はAibであり；
- A_{30} はGlu、Cha、Aib、又はLysであり；

A_{31} はI l e、L e u、C h a、若しくはL y sである、又は欠損しており；

A_{32} はH i sである又は欠損しており；

A_{33} はT h rである又は欠損しており；

A_{34} はA l aである又は欠損しており；

- 5 R_1 及び R_2 は、それぞれ独立して、H、 C_{1-12} アルキル、 C_{2-12} アルケニル、 C_{2-12} アルキニル、 C_{7-20} フェニルアルキル、 C_{11-20} ナフチルアルキル、 C_{1-12} ヒドロキシアルキル、 C_{2-12} ヒドロキシアルケニル、 C_{7-20} ヒドロキシフェニルアルキル、若しくは C_{11-20} ヒドロキシナフチルアルキルであり；又は R_1 及び R_2 の一方及び一方のみが COE_1 であり、この際、 E_1 は C_{1-12} アルキル、 C_{2-12} アルケニル、 C_{2-12} アルキニル、 C_{7-20} フェニルアルキル、 C_{11-20} ナフチルアルキル、 C_{1-12} ヒドロキシアルキル、 C_{2-12} ヒドロキシアルケニル、 C_{7-20} ヒドロキシフェニルアルキル、若しくは C_{11-20} ヒドロキシナフチルアルキルであり；及び

R_3 はOH、 NH_2 、 C_{1-12} アルコキシ、又は $NH-Y-CH_2-Z$ であり、この際、

- 15 Yは C_{1-12} 炭化水素部分であり、ZはH、OH、 CO_2H 、又は $CONH_2$ であり；
 A_5 、 A_7 、 A_8 、 A_{11} 、 A_{15} 、 A_{18} 、 A_{22} 、 A_{23} 、 A_{24} 、 A_{27} 、 A_{28} 、 A_{30} 、
 若しくは A_{31} の少なくともひとつはC h aである、又は A_3 、 A_{12} 、 A_{16} 、 A_{17} 、
 A_{18} 、 A_{19} 、 A_{22} 、 A_{25} 、 A_{26} 、 A_{29} 、 A_{30} 、若しくは A_{34} の少なくともひとつはA i bである；

- 20 又はこれらの製薬上許容できる塩である、請求項1又は2に記載の椎体骨折治療剤。

[請求項12]

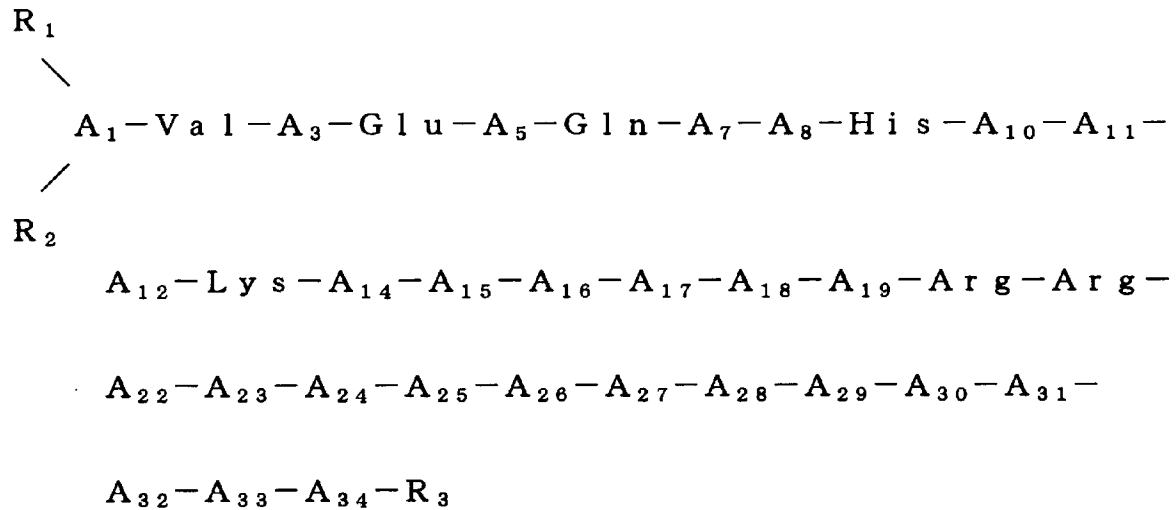
P T H、P T H r P又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログが、式： $[G_{1u}^{22, 25}, L e u^{23, 28, 31}, A i b^{29}, L y s^{26, 30}] h P T H r P (1-34) NH_2$ のポリペプチド又はその製薬上許容できる塩である、請求項11に記載の椎体

骨折治療剤。

[請求項 13]

P T H、P T H r P 又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログが下記式のポリペプチド：

5 [化 3]



ただし、

A_1 は A l a、S e r、又は D a p であり； A_3 は S e r 又は A i b であり；

A_5 は H i s、I l e、A c c、又は C h a であり；

A_7 は L e u、C h a、N l e、 β -N a l、T r p、P a l、A c c、P h e、又

10 は p-X-P h e であり、この際、X は O H、ハロゲン、又は C H₃ であり；

A_8 は L e u、M e t、A c c、又は C h a であり；

A_{10} は A s p 又は A s n であり；

A_{11} は L y s、L e u、C h a、A c c、P h e、又は β -N a l であり；

A_{12} は G l y、A c c、又は A i b であり；

15 A_{14} は S e r 又は H i s であり；

A_{15} は I l e、A c c、又は C h a であり；

A_{16} は G l n 又は A i b であり；

- A_{17} はA s p 又はA i b であり；
- A_{18} はL e u、A i b、A c c、又はC h a であり；
- A_{19} はA r g 又はA i b であり；
- A_{22} はP h e、G l u、A i b、A c c、又はC h a であり；
- 5 A_{23} はP h e、L e u、L y s、A c c、又はC h a であり；
- A_{24} はL e u、L y s、A c c、又はC h a であり；
- A_{25} はH i s、L y s、A i b、A c c、又はG l u であり；
- A_{26} はH i s、A i b、A c c、又はL y s であり；
- A_{27} はL e u、L y s、A c c、又はC h a であり；
- 10 A_{28} はI l e、L e u、L y s、A c c、又はC h a であり；
- A_{29} はA l a、G l u、A c c、又はA i b であり；
- A_{30} はG l u、L e u、N l e、C h a、A i b、A c c、又はL y s であり；
- A_{31} はI l e、L e u、C h a、L y s 若しくはA c c である、又は欠損しており；
- A_{32} はH i s である又は欠損しており；
- 15 A_{33} はT h r である又は欠損しており；
- A_{34} はA l a である又は欠損しており；
- R_1 及び R_2 は、それぞれ独立して、H、 C_{1-12} アルキル、 C_{2-12} アルケニル、 C_{2-12} アルキニル、 C_{7-20} フェニルアルキル、 C_{11-20} ナフチルアルキル、 C_{1-12} ヒドロキシアルキル、 C_{2-12} ヒドロキシアルケニル、 C_{7-20} ヒドロキシフェニル
- 20 アルキル、若しくは C_{11-20} ヒドロキシナフチルアルキルであり；又は R_1 及び R_2 の一方及び一方のみが COE_1 であり、この際、 E_1 は C_{1-12} アルキル、 C_{2-12} アルケニル、 C_{2-12} アルキニル、 C_{7-20} フェニルアルキル、 C_{11-20} ナフチルアルキル、 C_{1-12} ヒドロキシアルキル、 C_{2-12} ヒドロキシアルケニル、 C_{7-20} ヒドロキシフェニルアルキル、若しくは C_{11-20} ヒドロキシナフチルアルキルであり；及

び

R_3 はOH、 NH_2 、 C_{1-12} アルコキシ、又は $NH-Y-CH_2-Z$ であり、この際、
Yは C_{1-12} 炭化水素部分であり、ZはH、OH、 CO_2H 、又は $CONH_2$ であり；

A_5 、 A_7 、 A_8 、 A_{11} 、 A_{12} 、 A_{15} 、 A_{18} 、 A_{22} 、 A_{23} 、 A_{24} 、 A_{25} 、 A_{26} 、

5 A_{27} 、 A_{28} 、 A_{29} 、 A_{30} 、又は A_{31} の少なくとも一つがAccである；

又はこれらの製薬上許容できる塩である、請求項1又は2に記載の椎体骨折治療剤。

[請求項14]

PTH、PTHrP又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログが、下記式のポリペプチド：

10 $[Glu^{22, 25}, Leu^{23, 28}, Lys^{26, 30}, Aib^{29}, Ahc^{31}] hPTHrP(1-34)NH_2$ ；

$[Glu^{22, 25}, Ahc^{23}, Lys^{26, 30}, Leu^{28, 31}, Aib^{29}] hPTHrP(1-34)NH_2$ ；

15 $[Glu^{22, 25}, Leu^{23, 28, 31}, Lys^{26, 30}, Ahc^{27}, Aib^{29}] hPTHrP(1-34)NH_2$ ；

$[Glu^{22, 25, 29}, Leu^{23, 28, 31}, Lys^{26}, Ahc^{30}] hPTHrP(1-34)NH_2$ ；

$[Cha^{22}, Leu^{23, 28, 31}, Glu^{25}, Lys^{26, 30}, Ahc^{27}, Aib^{29}] hPTHrP(1-34)NH_2$ ；

20 $[Glu^{22, 25}, Leu^{23, 28, 31}, Ahc^{24}, Lys^{26, 30}, Aib^{29}] hPTHrP(1-34)NH_2$ ；

$[Glu^{22, 29}, Leu^{23, 28, 31}, Aib^{25}, Lys^{26, 30}, Ahc^{27}] hPTHrP(1-34)NH_2$ ；

$[Glu^{22}, Leu^{23, 28, 31}, Aib^{25, 29}, Lys^{26, 30}, Ahc^{27}] hPTHrP(1-34)NH_2$ ；

H r P (1 - 3 4) NH₂ ;

[A h c²², L e u^{23, 28, 31}, G l u²⁵, L y s^{26, 30}, A i b²⁹] h P T H

r P (1 - 3 4) NH₂ ;

[G l u^{22, 25}, L e u^{23, 31}, L y s^{26, 30}, A h c²⁸, A i b²⁹] h P T H

5 r P (1 - 3 4) NH₂ ;

[C h a²², A h c²³, G l u²⁵, L y s^{26, 30}, L e u^{28, 31}, A i b²⁹] h

P T H r P (1 - 3 4) NH₂ ;

[C h a²², L e u^{23, 28, 31}, A h c^{24, 27}, G l u²⁵, L y s^{26, 30}, A i b²⁹] h P T H r P (1 - 3 4) NH₂ ;

10 [G l u²², L e u^{23, 28, 31}, A h c^{24, 27}, L y s^{25, 26}, A i b²⁹] h P T
H r P (1 - 3 4) NH₂ ;

[A h c^{18, 24, 27}, G l u²², C h a²³, L y s^{25, 26}, L e u²⁸, A i b²⁹] h P T H r P (1 - 3 4) NH₂ ;

[G l u²², C h a²³, A h c²⁴, L y s^{25, 26}, L e u²⁸, A i b²⁹] h P T

15 H r P (1 - 3 4) NH₂ ;

[A h c^{22, 24}, L e u^{23, 28, 31}, G l u²⁵, L y s^{26, 30}, A i b²⁹] h P T

H r P (1 - 3 4) NH₂ ;

[A h c^{22, 24}, L e u^{23, 28}, L y s^{25, 26}, A i b²⁹] h P T H r P (1 - 3
4) NH₂ ;

20 又はこれらの製薬上許容できる塩である、請求項 1 3 に記載の椎体骨折治療剤。

[請求項 1 5]

P T H、P T H r P 又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログが、下記式の
ポリペプチド :

[N l e³¹] h P T H (1 - 3 4) NH₂ ;

[h A r g²⁷] h P T H (1 - 3 4) N H₂ ;

[D a p¹, N l e^{8, 18}, T y r³⁴] h P T H (1 - 3 4) N H₂ ;

又はこれらの製薬上許容できる塩である、請求項 1 又は 2 に記載の椎体骨折治療剤。

[請求項 1 6]

- 5 P T H、P T H r P 又はそれらの部分活性ポリペプチドのアナログが、下記式のポリペプチド：

[G l u^{22, 25}, C h a²³, L y s²⁶, L e u^{28, 31}, A i b²⁹, N l e³⁰] h
P T H r P (1 - 3 4) N H₂ ;

- 10 [G l u^{22, 25}, C h a²³, L y s^{26, 30}, L e u^{28, 31}, A i b²⁹] h P T H
r P (1 - 3 4) N H₂ ;

[G l u^{22, 25}, C h a²³, L y s^{26, 30}, A i b²⁹] h P T H r P (1 - 3 4)
N H₂ ;

[G l u^{22, 25}, C h a²³, L y s^{26, 30}, L e u²⁸, A i b²⁹] h P T H r P
(1 - 3 4) N H₂ ;

- 15 [L e u²⁷, A i b²⁹] h P T H (1 - 3 4) N H₂ ;

又はこれらの製薬上許容できる塩である、請求項 1 又は 2 に記載の椎体骨折治療剤。

[請求項 1 7]

P T H 又は P T H r P 産生を誘導する活性を有する物質を含有することを特徴とする、椎体骨折治療剤。

- 20 [請求項 1 8]

P T H 又は P T H r P 産生を誘導する活性を有する物質がカルシウム感受性受容体アンタゴニストである、請求項 1 7 に記載の椎体骨折治療剤。

[請求項 1 9]

椎体骨折が海綿骨における骨折である、請求項 1 ~ 1 8 のいずれかに記載の椎体

骨折治療剤。

[請求項 20]

請求項 1～16 のいずれかに記載の、PTH、PTHrP、若しくはそれらの部分活性ポリペプチド、又はそれらのアナログ、若しくは請求項 17 又は 18 に記載
5 の PTH 又は PTHrP 産生を誘導する活性を有する物質を含有することを特徴とする、椎体骨折に起因する疼痛の治療又は予防剤。

[請求項 21]

請求項 1～16 のいずれかに記載の、PTH、PTHrP、若しくはそれらの部分活性ポリペプチド、又はそれらのアナログ、若しくは請求項 17 又は 18 に記載
10 の PTH 又は PTHrP 産生を誘導する活性を有する物質を含有することを特徴とする、椎体圧迫骨折予防剤。

[請求項 22]

請求項 1～16 のいずれかに記載の、PTH、PTHrP、若しくはそれらの部分活性ポリペプチド、又はそれらのアナログ、若しくは請求項 17 又は 18 に記載
15 の PTH 又は PTHrP 産生を誘導する活性を有する物質を含有することを特徴とする、椎体骨折に起因する運動障害及び／又は神経障害の治療又は予防剤。

[請求項 23]

椎体骨折治療剤の評価方法であって、1) 非ヒト動物の椎体骨に外科的な損傷を与える工程、2) 当該非ヒト動物に被検物質を投与する工程、及び 3) 当該非ヒト
20 動物又はそれに由来する検体の椎体骨の外科的な損傷の回復を測定する工程、を含むことを特徴とする、評価方法。

[請求項 24]

椎体骨の外科的な損傷の回復の測定を行った結果を、さらに正常非ヒト動物若しくは対象非ヒト動物、又はそれに由来する検体における測定の結果と比較する工程

を含む、請求項 2 3 に記載の評価方法。

[請求項 2 5]

椎体骨の外科的な損傷が、椎体骨の皮質骨を通り海綿骨まで達する損傷であることを特徴とする、請求項 2 3 又は 2 4 に記載の評価方法。

5 [請求項 2 6]

椎体骨の外科的な損傷が、ドリルによる穿孔による損傷であることを特徴とする、請求項 2 3 ～ 2 5 のいずれかに記載の評価方法。

[請求項 2 7]

椎体骨の外科的な損傷の回復の測定を、検体の組織学的観察、又は X 線 C T を用いた形態観察により行う、請求項 2 3 ～ 2 6 のいずれかに記載の評価方法。

[請求項 2 8]

椎体骨の外科的な損傷の回復の測定を、痛覚又は運動機能の測定により行う、請求項 2 3 ～ 2 6 のいずれかに記載の評価方法。

[請求項 2 9]

15 椎体骨の外科的な損傷の回復の計測を、検体の組織化学的解析、骨分化発生マーカーのタンパク質又は遺伝子の発現の解析により行う、請求項 2 3 ～ 2 6 のいずれかに記載の評価方法。

[請求項 3 0]

20 非ヒト動物が、骨粗鬆症のモデル動物である、請求項 2 3 ～ 2 9 のいずれかに記載の評価方法。

[請求項 3 1]

骨粗鬆症のモデル動物が、卵巣摘出モデルである、請求項 3 0 に記載の評価方法。

[請求項 3 2]

非ヒト動物が、霊長類又は齧歯類の非ヒト動物である、請求項 2 3 ～ 3 1 のい

れかに記載の評価方法。

[請求項 3 3]

齧歯類の非ヒト動物が、ラットである、請求項 3 2 に記載の評価方法。

[請求項 3 4]

- 5 椎体骨が、腰椎の椎体骨である、請求項 2 3 ～ 3 3 のいずれかに記載の評価方法。

[請求項 3 5]

腰椎の椎体骨が、第 4 腰椎及び／又は第 5 腰椎である、請求項 3 4 に記載の評価方法。

[請求項 3 6]

- 10 被検物質の投与を、経口又は非経口により行う、請求項 2 3 ～ 3 5 のいずれかに記載の評価方法。

図 1

3 D 画像



2 D 画像

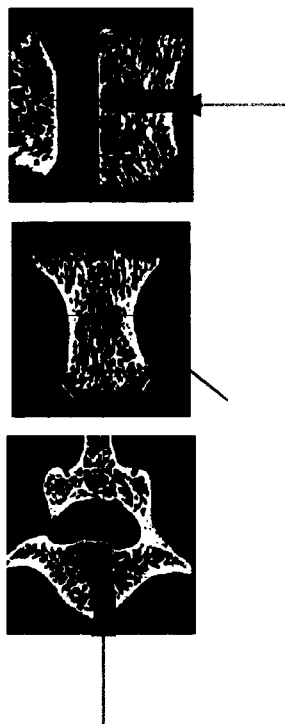


図 2



A



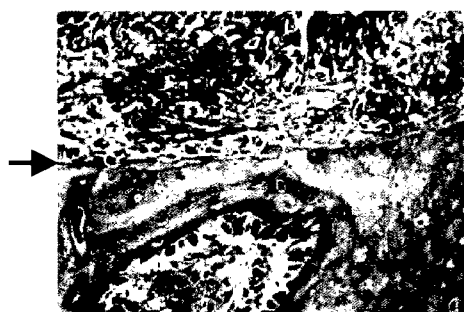
D



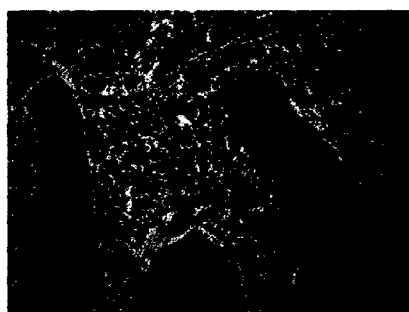
B



E



C



F

図 3

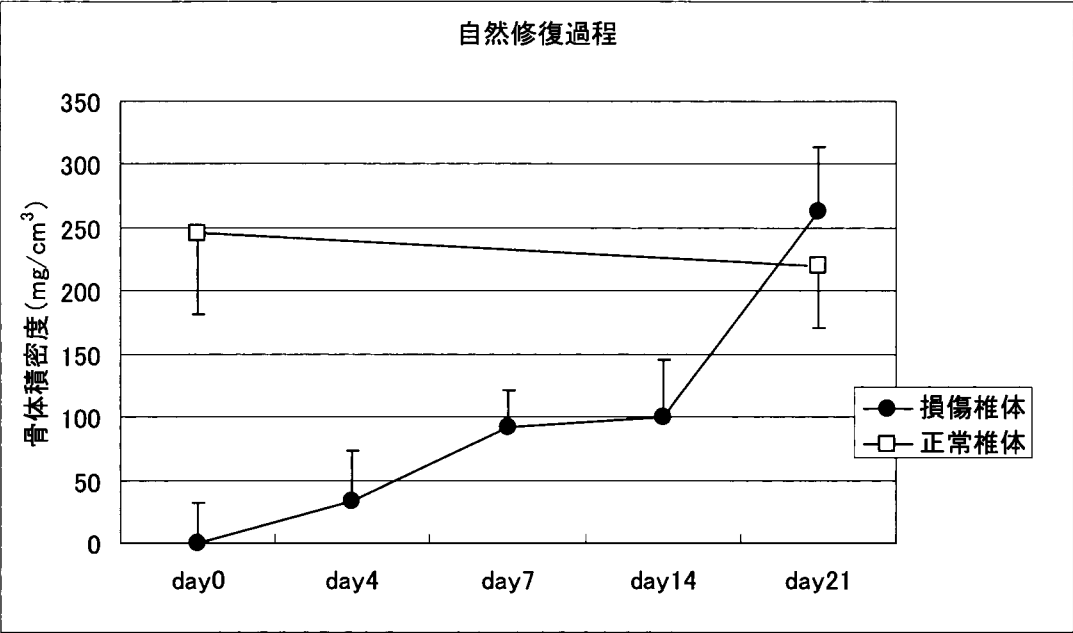
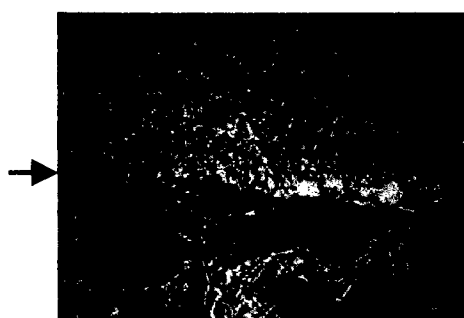


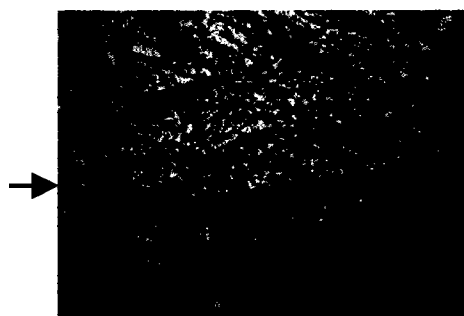
図 4



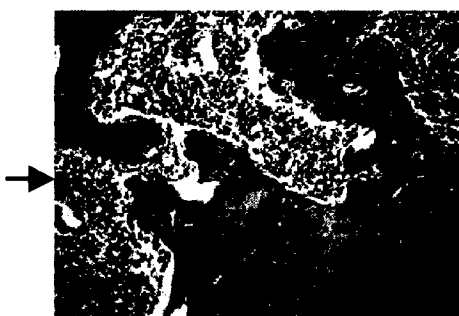
A



D



B



E



C



F

図 5

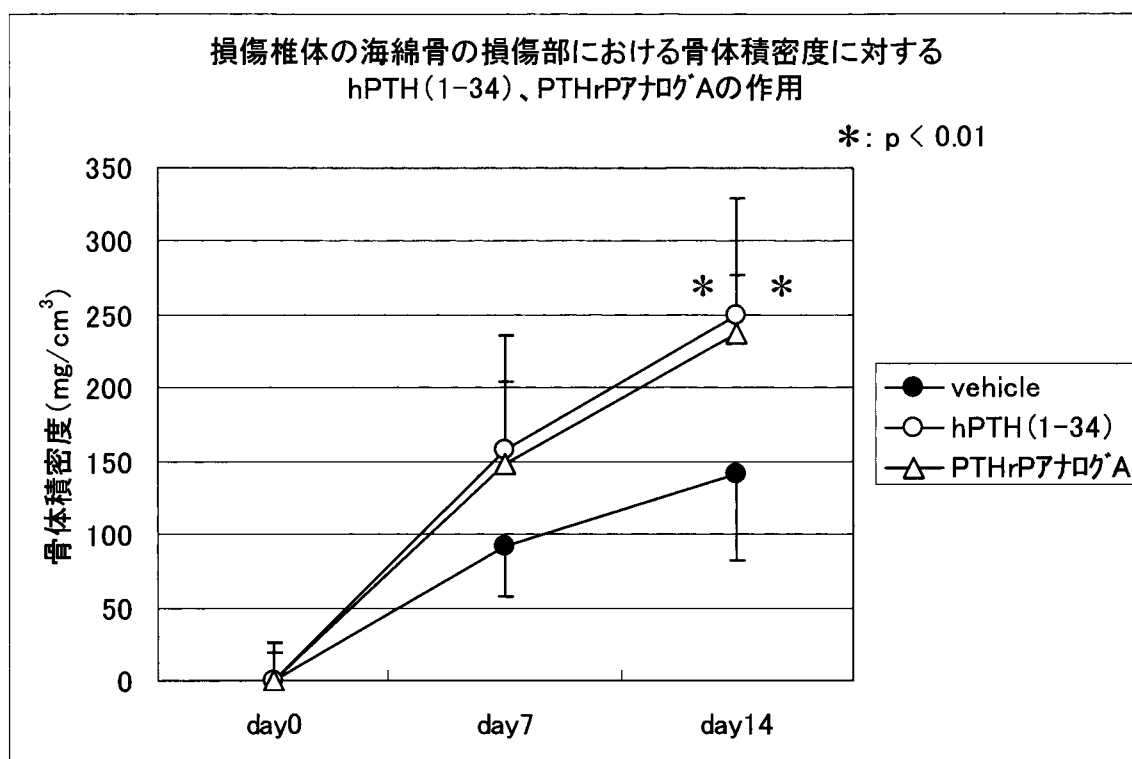


図 6

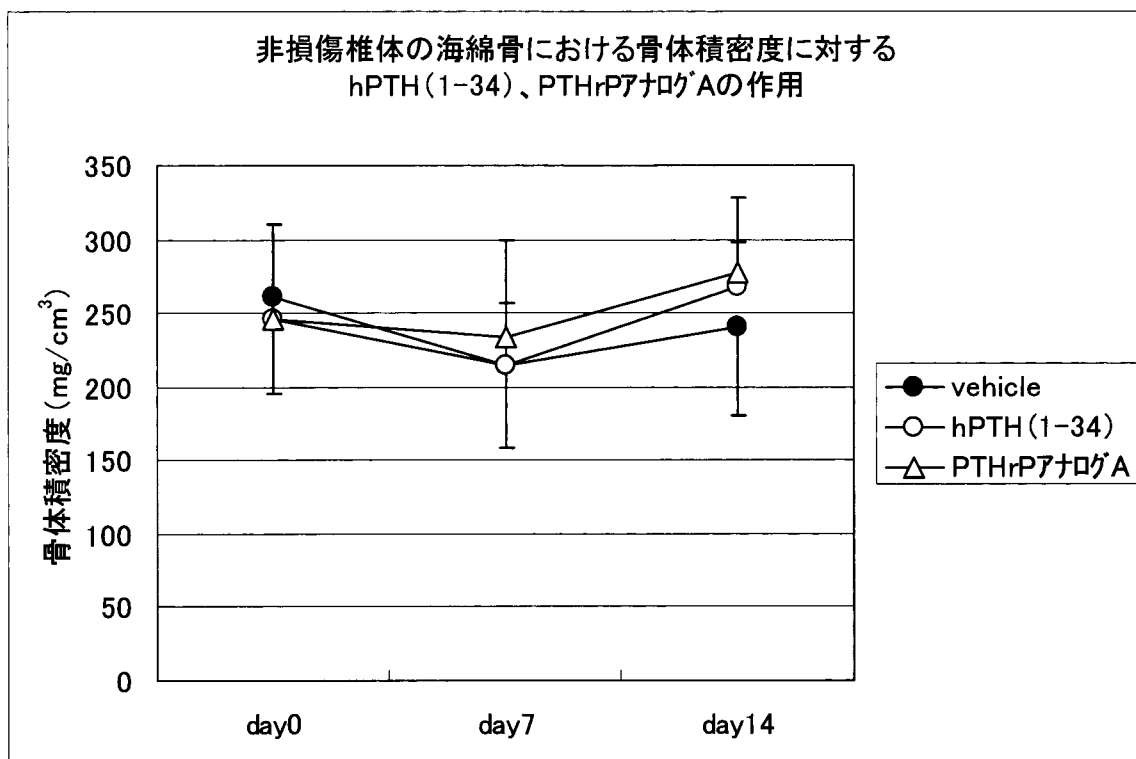
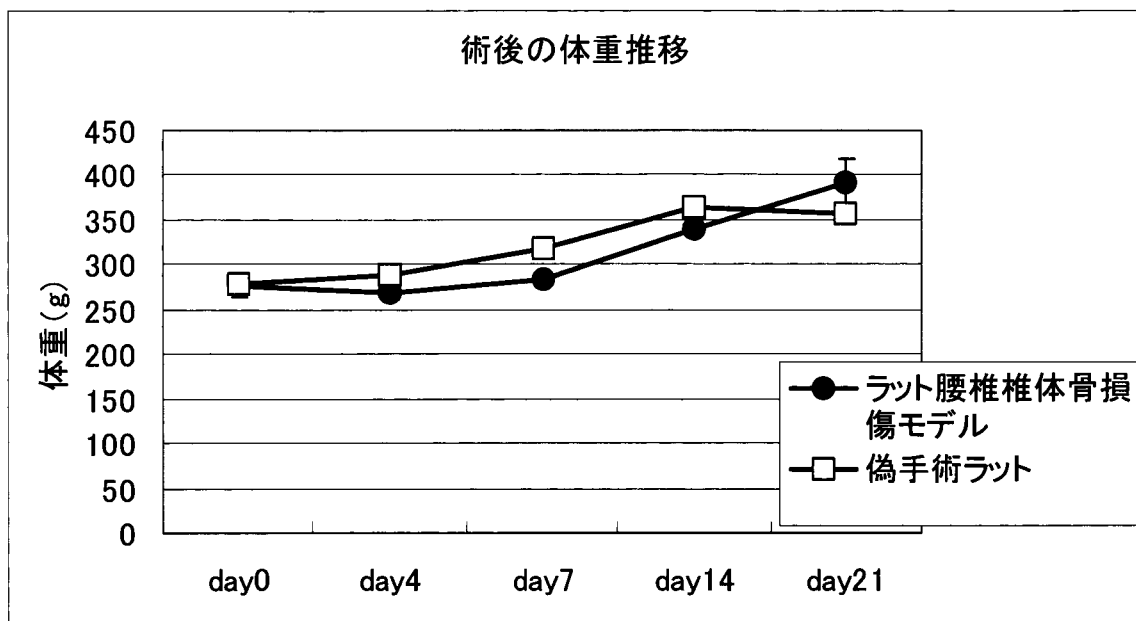
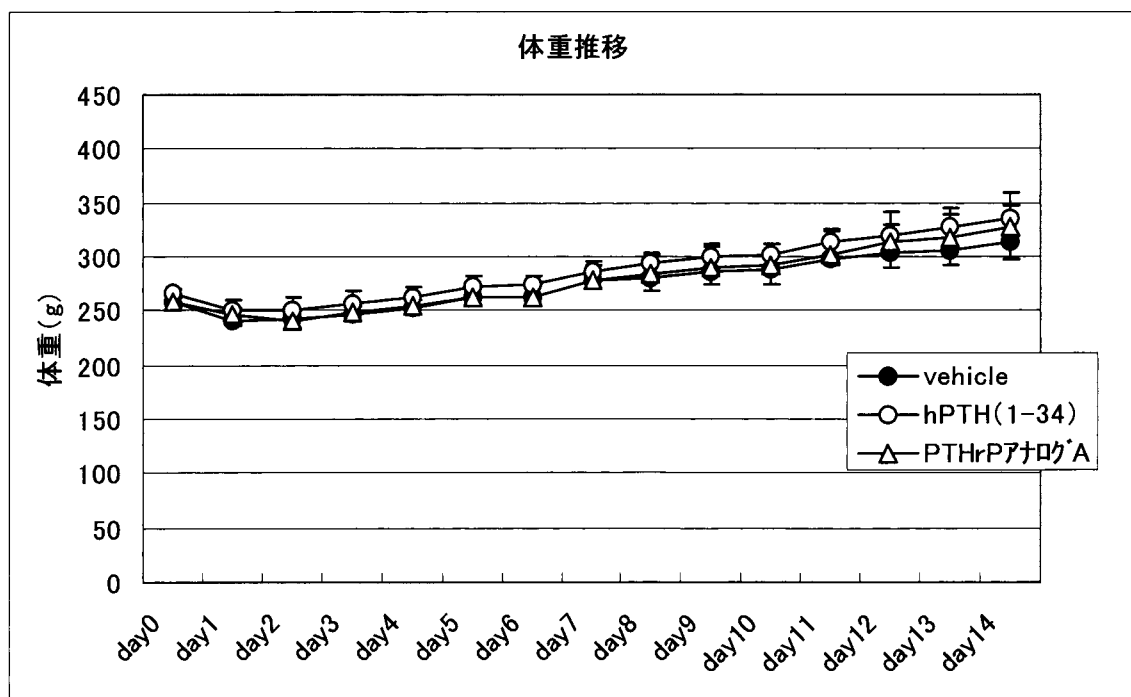


図 7

A



B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/054340

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K45/00(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K38/22(2006.01)i, A61P19/06(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K45/00, A61K38/00, A61K38/22, A61P19/06, G01N33/15, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN) ,
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Toshitsugu SUGIMOTO, "Fuku Kojosen Hormone", Journal of Osteoporotic Medicine, vol.6, no.4, 2007, pages 292 to 298, entire text, particularly, page 293, left column	1-8, 19-22 1-16, 19-22
X Y	GEUSENS, P., Bisphosphonates for postmenopausal osteoporosis: determining duration of treatment, Current osteoporosis reports, 2009, Vol.7, No.1, p.12-7, entire text, particularly, Abstract, Table 2	1-8, 19-22 1-16, 19-22

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07 May, 2012 (07.05.12)

Date of mailing of the international search report
22 May, 2012 (22.05.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/054340

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2002-523375 A (ELI LILLY & CO.), 30 July 2002 (30.07.2002), entire text; particularly, claims; examples & WO 2000/10596 A1 & EP 1059933 A1 & EP 1136076 A1 & EP 1059933 B1 & EP 1295605 A2 & US 2005/197294 A1 & US 6977077 B1 & US 2006/094642 A1 & US 7163684 B2 & EP 1769804 A2 & US 2007/161567 A1 & US 7351414 B2 & EP 1769804 A3 & EP 2266598 A1 & JP 2011021035 A	1-8,19-22 1-16,19-22
X Y	JP 2011-021035 A (ELI LILLY & CO.), 03 February 2011 (03.02.2011), entire text; particularly, claims; examples & WO 2000/10596 A1 & EP 1059933 A1 & EP 1136076 A1 & JP 2002-523375 A & EP 1059933 B1 & EP 1295605 A2 & US 2005/197294 A1 & US 6977077 B1 & US 2006/094642 A1 & US 7163684 B2 & EP 1769804 A2 & US 2007/161567 A1 & US 7351414 B2 & EP 1769804 A3 & EP 2266598 A1	1-8,19-22 1-16,19-22
X Y	HODSMAN, A.B. et al, Parathyroid hormone and teriparatide for the treatment of osteoporosis: a review of the evidence and suggested guidelines for its use, Endocr Rev, 2005, Vol.26, No.5, p.688-703, entire text, particularly, Abstract	1-8,19-22 1-16,19-22
X Y	JP 8-73376 A (ASAHI KASEI KOGYO KABUSHIKI KAISHA), 19 March 1996 (19.03.1996), entire text; particularly, claims; examples (Family: none)	1-8,19-22 1-16,19-22
X Y	JP 7-179358 A (GEN HOSPITAL CORP.), 18 July 1995 (18.07.1995), entire text; particularly, claims; examples & EP 197514 A & JP 62-000033 A & US 4698328 A & US 4833125 A & EP 197514 B1 & JP 2531505 B2	1-8,19-22 1-16,19-22
Y	JP 11-509201 A (BIOMEASURE INC.), 17 August 1999 (17.08.1999), entire text; particularly, claims; examples & WO 97/02834 A1 & US 5723577 A & EP 847278 A1 & US 5955574 A & US 5969095 A & US 6544949 B1 & EP 847278 B1 & JP 2003-238595 A & EP 1405861 A2 & JP 4008825 B2 & JP 2007-302682 A & US 2007/299009 A1 & US 7410948 B2 & EP 1405861 B1	1-16,19-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/054340

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Inventions of claims 1-16 and parts of claims 19-22 dependent on claims 1-16

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/054340

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

The technical feature common to the invention of claim 1 "a therapeutic agent for vertebral fracture, which is characterized by containing a PTH/PTHrP receptor agonist", the invention of claim 17 "a therapeutic agent for vertebral fracture, which is characterized by containing a substance that has PTH or PTHrP production-inducing activity" and the invention of claim 23 "a method for evaluating a therapeutic agent for vertebral fracture, which is characterized by comprising (1) a step of providing the vertebral bone of a non-human animal with a surgical injury, (2) a step of administering a substance to be tested to the non-human animal, and (3) a step of measuring resolution of the surgical injury on the vertebral bone of the non-human animal or of a sample derived from the non-human animal" is "a therapeutic agent for vertebral fracture".

The common technical feature, however, cannot be considered as a special technical feature since it does not make a contribution over the prior art in view of the disclosure of documents 1-4 that set forth that PHT serves as a therapeutic agent for vertebral fracture.

In addition, there is no other same or corresponding special technical feature among those inventions.

Consequently, the claims of this international application contain the following three groups of inventions.

(Invention group 1) the inventions of claims 1-16 and parts of claims 19-22 dependent on claims 1-16

(Invention group 2) the inventions of claims 17 and 18 and parts of claims 19-22 dependent on claims 17 and 18

(Invention group 3) the inventions of claims 23-36

Document 1: Toshitsugu SUGIMOTO, "Fuku Kojosen Hormone", Journal of Osteoporotic Medicine, vol. 6, no. 4, 2007, pp. 292-298

Document 2: GEUSENS, P., Bisphosphonates for postmenopausal osteoporosis: determining duration of treatment, current osteoporosis reports, 2009, vol. 7, no. 1, p. 12-7

Document 3: JP 2002-523375 A (ELI LILLY & CO) 30 July 2002 (30.07.2002)

Document 4: JP 2011-021035 A (ELI LILLY & CO) 3 February 2011 (03.02.2011)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K45/00(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K38/22(2006.01)i, A61P19/06(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K45/00, A61K38/00, A61K38/22, A61P19/06, G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 2 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 2 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 2 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	杉本利嗣, 副甲状腺ホルモン, 骨粗鬆症治療, Vol.6, No.4, 2007, p.292-298, 全文, 特に 293 頁左欄	1-8, 19-22 1-16, 19-22
X Y	GEUSENS, P., Bisphosphonates for postmenopausal osteoporosis: determining duration of treatment, Current osteoporosis reports, 2009, Vol.7, No.1, p.12-7, 全文, 特に Abstract, Table2	1-8, 19-22 1-16, 19-22

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 7 . 0 5 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

2 2 . 0 5 . 2 0 1 2

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小堀 麻子

4 C

2 9 3 8

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	JP 2002-523375 A (ELI LILLY & CO) 2002.07.30, 全文, 特に請求項, 実施例 & WO 2000/10596 A1 & EP 1059933 A1 & EP 1136076 A1 & EP 1059933 B1 & EP 1295605 A2 & US 2005/197294 A1 & US 6977077 B1 & US 2006/094642 A1 & US 7163684 B2 & EP 1769804 A2 & US 2007/161567 A1 & US 7351414 B2 & EP 1769804 A3 & EP 2266598 A1 & JP 2011021035 A	1-8, 19-22 1-16, 19-22
X Y	JP 2011-021035 A (ELI LILLY & CO) 2011.02.03, 全文, 特に請求項, 実施例 & WO 2000/10596 A1 & EP 1059933 A1 & EP 1136076 A1 & JP 2002-523375 A & EP 1059933 B1 & EP 1295605 A2 & US 2005/197294 A1 & US 6977077 B1 & US 2006/094642 A1 & US 7163684 B2 & EP 1769804 A2 & US 2007/161567 A1 & US 7351414 B2 & EP 1769804 A3 & EP 2266598 A1	1-8, 19-22 1-16, 19-22
X Y	HODSMAN, A. B. et al, Parathyroid hormone and teriparatide for the treatment of osteoporosis: a review of the evidence and suggested guidelines for its use, Endocr Rev, 2005, Vol.26, No.5, p.688-703, 全文, 特に Abstract	1-8, 19-22 1-16, 19-22
X Y	JP 8-73376 A (ASAHI KASEI KOGYO KK) 1996.03.19, 全文, 特に請求項, 実施例 (ファミリーなし)	1-8, 19-22 1-16, 19-22
X Y	JP 7-179358 A (GEN HOSPITAL CORP) 1995.07.18, 全文, 特に請求項, 実施例 & EP 197514 A & JP 62-000033 A & US 4698328 A & US 4833125 A & EP 197514 B1 & JP 2531505 B2	1-8, 19-22 1-16, 19-22
Y	JP 11-509201 A (BIOMEASURE INC) 1999.08.17, 全文, 特に請求項, 実施例 & WO 97/02834 A1 & US 5723577 A & EP 847278 A1 & US 5955574 A & US 5969095 A & US 6544949 B1 & EP 847278 B1 & JP 2003-238595 A & EP 1405861 A2 & JP 4008825 B2 & JP 2007-302682 A & US 2007/299009 A1 & US 7410948 B2 & EP 1405861 B1	1-16, 19-22

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. c の続き)

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、提出された以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. 提出手段

☐ 紙形式

☒ 電子形式

b. 提出時期

☐ 出願時の国際出願に含まれていたもの

☒ この国際出願と共に電子形式により提出されたもの

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの

2. ☒ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しを提出した場合、出願後に提出した配列の写し若しくは追加して提出した配列の写しが、出願時に提出した配列と同一である旨又は出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。
特別ページ参照

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

請求項 1-16 及び請求項 19-22 のうち請求項 1-16 を引用する部分に係る発明

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

請求項 1 に係る発明「PTH/PTHrP 受容体アゴニストを含有することを特徴とする、椎体骨折治療剤。」、請求項 17 に係る発明「PTH又はPTHrP 産生を誘導する活性を有する物質を含有することを特徴とする、椎体骨折治療剤。」、及び請求項 23 に係る発明「椎体骨折治療剤の評価方法であって、1) 非ヒト動物の椎体骨に外科的な損傷を与える工程、2) 当該非ヒト動物に被検物質を投与する工程、及び 3) 当該非ヒト動物又はそれに由来する検体の椎体骨の外科的な損傷の回復を測定する工程、を含むことを特徴とする、評価方法。」は「椎体骨折治療剤」という共通の技術的特徴を有している。

しかしながら、当該技術的特徴は、PTHが椎体骨折治療剤であることを記載する文献 1-4 の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。

また、これらの発明の間には、ほかに同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

そして、請求の範囲には以下に示す 3 の発明群が含まれる。

(発明 1) 請求項 1-16 及び請求項 19-22 のうち請求項 1-16 を引用する部分に係る発明

(発明 2) 請求項 17, 18 及び請求項 19-22 のうち請求項 17, 18 を引用する部分に係る発明

(発明 3) 請求項 23-36 に係る発明

文献 1 : 杉本利嗣, 副甲状腺ホルモン, 骨粗鬆症治療, Vol.6, No.4, 2007, p.292-298

文献 2 : GEUSENS, P., Bisphosphonates for postmenopausal osteoporosis: determining duration of treatment, Current osteoporosis reports, 2009, Vol.7, No.1, p.12-7

文献 3 : JP 2002-523375 A (ELI LILLY & CO) 2002.07.30

文献 4 : JP 2011-021035 A (ELI LILLY & CO) 2011.02.03