(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2018-111702
(P2018-111702A)
(43)公開日　平成30年7月19日(2018.7.19)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 14/575	(2006.01)	C07K	14/575	ZNA	4C076
C07K 7/08	(2006.01)	C07K	7/08		4C084
C07K 14/00	(2006.01)	C07K	14/00		4H045
A61P 27/02	(2006.01)	A61P	27/02		
A61P 27/06	(2006.01)	A61P	27/06		

審査請求 有　請求項の数 1　OL　外国語出願　（全 26 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-29089(P2018-29089)
(22)出願日　平成30年2月21日(2018.2.21)
(62)分割の表示　特願2015-559495(P2015-559495)の分割
原出願日　平成26年2月27日(2014.2.27)
(31)優先権主張番号　13382063.9
(32)優先日　平成25年3月1日(2013.3.1)
(33)優先権主張国　欧州特許庁(EP)

（特許庁注：以下のものは登録商標）
1．TWEEN

(71)出願人　512274953
フンダシオ　オスピタル　ウニベルシタリ　バル　デブロン－インスティテュート　デ　レセルカ
スペイン国　エー－０８０３５　バルセロナ，　パセッチ　バル　デブロン　１１９－１２９
(74)代理人　110002077
園田・小林特許業務法人
(72)発明者　シモ　カノンジュ，　ラファエル
スペイン国　エ－０８１７３　サン　クガ　デル　バリェス，　カム　ピカニョル　１０，　１階　２号室

最終頁に続く

(54)【発明の名称】網膜神経変性疾患の、特に、初期の糖尿病性網膜症及び神経変性が本質的な役割を果たす他の網膜疾患における局所治療における使用のためのペプチド

(57)【要約】　（修正有）
【課題】ペプチド及びこれらのペプチドのアナログを含む、眼の中に局所的に適用される有用なツールを提供する。
【解決手段】網膜神経変性疾患の局所眼治療及び／又は予防における使用のための、網膜に到達することができる１３～５０アミノ酸の配列長を有するペプチドであって、前記ペプチドのＮ－末端領域が、配列：ＨＸａａ^{1}ＥＧＴＦＴＳＤＸａａ^{2}ＳＸａａ^{3}Ｘａａ^{4}を含み、Ｘａａ^{1}が、アラニン及びグリシンから選択されるアミノ酸であり、Ｘａａ^{2}が、バリン及びロイシンから選択されるアミノ酸であり、Ｘａａ^{3}が、セリン及びリシンから選択されるアミノ酸であり、Ｘａａ^{4}が、チロシン及びグルタミンから選択されるアミノ酸であり、ヒスチジンが、Ｎ－末端残基である、ペプチド。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
網膜神経変性疾患の局所眼治療及び／又は予防における使用のための、網膜に到達することができる１３～５０アミノ酸の配列長を有するペプチドであって、前記ペプチドのＮ－末端領域が、配列：
ＨＸａａ^{1}ＥＧＴＦＴＳＤＸａａ^{2}ＳＸａａ^{3}Ｘａａ^{4}（配列番号：１）を含み、
Ｘａａ^{1}が、アラニン及びグリシンから選択されるアミノ酸であり、
Ｘａａ^{2}が、バリン及びロイシンから選択されるアミノ酸であり、
Ｘａａ^{3}が、セリン及びリシンから選択されるアミノ酸であり、
Ｘａａ^{4}が、チロシン及びグルタミンから選択されるアミノ酸であり、
ヒスチジンが、Ｎ－末端残基である、ペプチド。
【請求項２】
配列長が、３０～４０アミノ酸である、請求項１に記載の使用のためのペプチド。
【請求項３】
網膜神経変性疾患が、糖尿病性網膜症（ＤＲ）、加齢性黄斑変性症、緑内障、及び色素性網膜炎からなる群から選択される、請求項１又は２の何れか一項に記載の使用のためのペプチド。
【請求項４】
網膜神経変性疾患が、糖尿病性網膜症である、請求項１から３の何れか一項に記載の使用のためのペプチド。
【請求項５】
初期の糖尿病性網膜症の局所治療において使用される、請求項４に記載の使用のためのペプチド。
【請求項６】
Ｘａａ^{1}がアラニンであり、Ｘａａ^{2}がバリンであり、Ｘａａ^{3}がセリンであり、Ｘａａ^{4}がチロシンである、請求項１から５の何れか一項に記載の使用のためのペプチド。
【請求項７】
哺乳動物グルカゴン様ペプチド－１である、請求項１から６の何れか一項に記載の使用のためのペプチド。
【請求項８】
アミノ酸配列番号：２のヒトグルカゴン様ペプチド－１（７－３７）である、請求項７に記載の使用のためのペプチド。
【請求項９】
アミノ酸配列番号：３：
ＨＡＥＧＴＦＴＳＤＶＳＳＹＬＥＧＱＡＡＫＥＦＩＡＷＬＶＲＧＲＧ
を有し、
リシン残基（Ｋ）が、リシン側鎖のアミノ基にアミド結合によって付加された親油性置換基Ｎ$^{\varepsilon}$－（γ－グルタミル（Ｎ$^{\alpha}$－ヘキサデカノイル））を含む、請求項１から６の何れか一項に記載の使用のためのペプチド。
【請求項１０】
Ｘａａ^{1}はグリシンであり、Ｘａａ^{2}がロイシンであり、Ｘａａ^{3}がリシンであり、Ｘａａ^{4}がグルタミンである、請求項１から５の何れか一項に記載の使用のためのペプチド。
【請求項１１】
アミノ酸配列番号：４：
ＨＧＥＧＴＦＴＳＤＬＳＫＱＭＥＥＥＡＶＲＬＦＩＥＷＬＫＮＧＧＰＳＳＧＡＰＰＰＸａａ^{5}
を有し、
Ｘａａ^{5}が、－ＣＯＯＨ末端が－ＮＨ$_{2}$基と交換されたセリン残基である、請求項１０に記載の使用のためのペプチド。

【請求項１２】
アミノ酸配列番号：８：
ＨＧＥＧＴＦＴＳＤＬＳＫＱＭＥＥＥＡＶＲＬＦＩＥＷＬＫＮＧＧＰＳＳＧＡＰＰＳＫＫＫＫＫＸａａ^{6}
を有し、
Ｘａａ^{6}が、－ＣＯＯＨ末端が－ＮＨ$_{2}$基と交換されたリシン残基である、請求項１０に記載の使用のためのペプチド。
【請求項１３】
請求項１から１２の何れか一項において定義されるペプチドを含む、網膜神経変性疾患の局所眼治療及び／又は予防における使用のための薬学的局所眼用組成物。
【請求項１４】
溶液、クリーム、ローション、軟膏、エマルション、及び懸濁剤からなる群から選択される、請求項１３に記載の使用のための薬学的局所眼用組成物。
【請求項１５】
点眼液である、請求項１３又は１４の何れか一項に記載の使用のための薬学的局所眼用組成物。
【請求項１６】
網膜神経変性疾患が、糖尿病性網膜症、加齢性黄斑変性症、緑内障、及び色素性網膜炎からなる群から選択される、請求項１３から１５の何れか一項に記載の使用のための薬学的局所眼用組成物。
【請求項１７】
網膜神経変性疾患が、糖尿病性網膜症である、請求項１３から１６の何れか一項に記載の使用のための薬学的局所眼用組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、部分的盲目又は全盲に至り得る眼疾患のための医学的アプローチの分野に関する。本発明は、ペプチド及びこれらのペプチドのアナログを含む、眼の中に局所的に適用される有用なツールを提供する。
【背景技術】
【０００２】
網膜神経変性疾患は、進行性の神経細胞損失によって特徴付けられる網膜の状態を指す。糖尿病性網膜症、加齢性黄斑変性症、緑内障、及び色素性網膜炎は、神経変性が本質的な役割を果たす網膜疾患と考えられる。
【０００３】
これらの疾患、それらの重大な部位、並びに保護についての可能な方法及び回復に至る方法についての徹底的な分析は、Schmidtら，“Neurodegenerative Diseases of the Retina and Potential for the Protection and Recovery”，Current Neuropharmacology - 2008，Vol. No. 6，pp.: 164-178から得ることができる。
【０００４】
糖尿病性網膜症（ＤＲ）は、糖尿病の最も一般的な合併症であり、先進国における就業年齢の個人の間で失明の主な原因のままである。レーザー光凝固術、コルチコステロイド又は抗ＶＥＧＦ剤の硝子体内注射などのようなＤＲのための現在の治療は、疾患の超進行期（ｔｏｏａｄｖａｎｃｅｄ　ｓｔａｇｅ）において指示され、著しい副作用に関連する。
【０００５】
糖尿病性網膜症（ＤＲ）は、網膜の微小循環疾患であると典型的に考えられてきた。しかしながら、網膜の神経変性が、Simoら on behalf of the European Consortium for Early Treatment of Diabetic Retinopathy (EUROCONDOR). “Neurodegeneration is an early event in diabetic retinopathy: therapeutic implications”，Br. J. Ophthalmol

. - 2012, vol. 96, pp.1285-1290から推定することができるように、ＤＲにおいて生じる微小循環の異常に関与する、ＤＲの発病における初期のイベントであることを示唆するいくつかのデータがある。

【０００６】

ＤＲの場合には、神経変性（有効な神経細胞の損失）が疾患の初期で生じ、色彩の判別及びコントラスト感度の両方の損失などのような機能的な異常をもたらす。これらの変化は、２年未満の糖尿病期間しか有していない糖尿病患者においてでさえ、つまり、眼科的検査下で微小血管の病変を検出することができる前に、電気生理学的研究によって検出することができる。そのうえ、多局所ＥＲＧ（網膜電図検査）潜時（ｍｆＥＲＧ－ＩＴ）の遅延は、初期の微小血管の異常の発症を予測する。さらに、神経網膜変性は、微小血管障害性プロセス及び血液網膜関門の破壊（ＤＲの発病における重大な要素）に関与するであろう、いくつかの代謝及びシグナル伝達経路を開始する及び／又は活性化する。

【０００７】

初期の網膜神経変性疾患又はこれらの病態に関連する神経変性は、それらが網膜血管新生に至る微小循環の問題などのような進行型病変を予防すると思われるが、現在治療されていない。したがって、特にＤＲの初期で、治療は適用されず、患者の標準的な経過観察が行われる。

【０００８】

他方では、初期のこれらの網膜神経変性疾患、特にＤＲが、治療標的となる場合、レーザー光凝固術又は硝子体内注射などのような積極的治療を推奨することはありえないと思われる。現在まで、点眼剤の使用は、ＤＲの予防又は阻止に対して扱われる薬剤の投与にとって好適なルートと考えられていなかった。これは、Urtti Aら, “Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery”. Adv. Drug. Deliv. Rev. 2006, vol. 58, pp. 1131-1135において明言されるように、それらが後眼部（つまり硝子体及び網膜）に到達しないと一般に仮定されているからである。角膜中に投与された化合物が網膜に到達することができるというわずかな証拠が存在するが、それらは、まれな症例に相当し、Aielloら, “Targeting Intraocular Neovascularization and Edema - One Drop at a Time”, N. Eng. J Med - 2008, vol. 359, pp. 967-969において言及されるものなどのように、低分子量の化合物に相当する。Ａｉｅｌｌｏらは、２つの異なるアッセイにおいて、新生血管生成及び網膜浮腫に関与するキナーゼの阻害剤として作用する能力を有する、ピロリジン由来の化合物（ＴＧ１００５７２と命名、４-クロロ-３-(５-メチル-３-{[４-(２-ピロリジン-Ｉ-イルエトキシ)フェニル]アミノ}-１,２,４-ベンゾトリアジン-７-イル)フェノール)）が、一旦点眼剤の形態で投与された網膜において標的に到達することができたことを示す。それにもかかわらず、この小さな化合物は、高分子量を有するペプチド又はタンパク質などのような他の性質の化合物とは比べものにならない。

【０００９】

糖尿病は、高血糖症によって特徴付けられる慢性疾患のグループである。糖尿病性合併症を予防するために、血中グルコース降下剤を使用して、高血糖症を低下させることが不可欠である。そのため、任意のグルコース降下薬は、ＤＲを含む糖尿病性合併症を予防する又は阻止するために理論上有益になり得る。しかしながら、血中グルコースレベルを低下させる際のそれらの作用と無関係の、ＤＲに対する糖尿病剤の直接的な効果に関する情報が不足している。例として、エクセナチド（Ｂｙｅｔａ、ＡｍｙｌｉｎＰｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）及びリラグルチド（Ｖｉｃｔｏｚａ、Ｎｏｖｏ Ｎｏｒｄｉｓｋ）として知られているグルカゴン様ペプチド１アゴニストは、血中グルコースレベルの低下を促進することによって２型糖尿病の治療に使用される。さらに、これらのアゴニストが、肥満及び高血圧などのようなメタボリックシンドロームの関連疾患において改善をもたらすことが知られている。また、国際公開第２００７０６２４３４号は、鼻腔内に投与される薬学的組成物を開示し、同じグルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ－１）が、メタボリックシンドローム及びＤＲを含む糖尿病性合併症の治療のために送達される。

【００１０】

上記から、そのため、疾患の主な原因又は発端、特に、血液中の高レベルのグルコースが、決定的な段階で改善されるので、そのようなグルカゴン様ペプチド１アゴニストの投与もまた、ＤＲ症状を改善する又は弱めることが知られている。それにもかかわらず、これらの治療から全身性の副作用が取り除かれていない。さらに、これらの物質が治療濃度で網膜に到達しなければならない場合、高用量が必要とされ、したがって、副作用を増加させる。

【００１１】

インビボモデルにおいてＧＬＰ－１Ｒ活性化によって媒介される神経保護を示す１つの研究が、Zhangら，“Intravitreal injection of exendin-4 analogue protects retinal cells in early diabetic rats”，Invest Ophthalmol Vis Sci.-2011，vol.52(1)，pp.278-85.において開示される。著者らは、エキセンディン－４（エクセナチド）の硝子体内投与が、ストレプトゾトシン（ＳＴＺ）によって誘発された糖尿病を有するラットにおいて、網膜電図検査（ＥＲＧ）異常及び神経変性に関する形態学的特徴を予防したことを報告した。しかしながら、Ｚｈａｎｇの研究における結果から、ヒトＤＲ（又は網膜の神経変性を有する他の疾患）について容易に推定することはできない。第１に、ＳＴＺ－ＤＭモデルにおいて、結果の解釈は、ＳＴＺの神経毒性の効果によって狂わされるかもしれない。第２に、ＧＬＰ－１Ｒ発現がラット由来の網膜において見つけられたが、それはヒト網膜において今まで報告されていない。最後に、また、上記に言及されるように、硝子体内注射は、眼底検査においてたとえあったとしてもごくわずかな微小血管の異常しか有していない患者において不適切に侵襲性である。

【００１２】

現在、網膜神経変性疾患のための特異的な治療はない。ＤＲの特定の症例において、これは、背景網膜症又は非増殖ＤＲのための及び損傷（神経細胞の損失に至る）から神経網膜を保護するための特異的な治療がないことを意味する。そのため、初期の疾患のための新しい薬理学的治療は、神経変性が始まっているように思われる場合、必要である。ＤＲの早期治療は、外科的介入などのような侵襲性療法を必要とする進行期への進行を低下させるのに有効になるであろう。

【発明の概要】

【００１３】

本発明者らは、すべてがＮ－末端領域中に特異的な配列を共通して有するいくつかのペプチド及び前記ペプチドを含む組成物が、眼中に（すなわち角膜又は結膜円蓋中に）局所的に適用された場合、それらが高分子量であるにもかかわらず、網膜に到達することができたこと並びにそれらがまた、変性から網膜を保護し、予防することもできたことを発見した。これらの化合物は、網膜（特に、神経細胞を含むが、網膜色素上皮を有していない網膜の一部である神経網膜）の局所神経保護物質（ｎｅｕｒｏｐｒｏｔｅｃｔｏｒ）として作用した。

【００１４】

本発明に従う使用のためのペプチドの局所投与は、網膜に到達するだけではなく、糖尿病性網膜症の発達を抑止するのに有効な濃度を実現することが強調されるべきである。

【００１５】

したがって、第１の態様では、本発明は、網膜神経変性疾患の局所治療及び／又は予防における使用のための、１３－５０アミノ酸の配列長を有するペプチドに関し、前記ペプチドのＮ－末端領域が、配列：

ＨＸａａ^{1}ＥＧＴＦＴＳＤＸａａ^{2}ＳＸａａ^{3}Ｘａａ^{4}（配列番号：１）を含み、

Ｘａａ^{1}が、アラニン及びグリシンから選択されるアミノ酸であり、

Ｘａａ^{2}が、バリン及びロイシンから選択されるアミノ酸であり、

Ｘａａ^{3}が、セリン及びリシンから選択されるアミノ酸であり、

Ｘａａ^{4}が、チロシン及びグルタミンから選択されるアミノ酸であり、

ヒスチジンが、Ｎ－末端残基である。

【００１６】

局所治療及び／又は予防は、ペプチドが、眼に局所的に適用された場合に、網膜に到達することができるという事実により、局所眼治療及び／又は予防、したがって眼表面における（すなわち角膜又は結膜円蓋における）ものとなる。これは、本発明において開示される実施形態及び実施形態の組み合わせのいずれにも適用される。

【００１７】

本発明者らは、驚いたことに、グルカゴン様ペプチド１受容体（ＧＬＰ－１　Ｒｃ）がヒト網膜中に存在することを発見し、すべての以前の仮定に反して、本発明者らは、眼に（すなわち角膜中に）局所的に適用された場合、３．３５ｋＤａ－４．１８ｋＤａの範囲にわたる分子量を有するペプチド性質の物質が、網膜に到達することができたことを実証することができた。したがって、本発明者らは、３０－４０アミノ酸を含み、配列番号：１を含むペプチドの局所使用（局所眼使用）を提案し、この配列は、ＧＬＰ－１　Ｒｃの活性化を担うと考えられ、また、哺乳動物ＧＬＰ－１中にも存在する。

【００１８】

技術的現状を考慮すれば、１ｋＤａ以上の分子量の分子が、角膜表面中に一旦局所的に投与されたら、網膜に到達することができるであろうということは予想外であった。

【００１９】

ＧＬＰ－１（グルカゴン様ペプチド－１）は、食物に応じて胃腸管のＬ細胞から分泌される内因性インスリン分泌性ペプチドである（「インクレチン応答」）。ＧＬＰ－１は、受容体（ＧＬＰ－１Ｒｃ）を通して作用することによって、グルコース依存性インスリン分泌、インスリン遺伝子発現、島ベータ細胞新生、胃腸の運動、エネルギーホメオスタシス、及び食物摂取に対して強力な効果を有する。ＧＬＰ－１受容体（ＧＬＰ－１Ｒｃ）は、７回膜貫通型ヘテロ三量体Ｇプロテイン共役受容体（ＧＰＣＲ）のペプチドホルモン結合クラスＢ１（セクレチン様受容体）ファミリーのメンバーである。ＧＬＰ－１Ｒは、広範な分布を有し、それらは、膵臓、脂肪組織、筋肉、心臓、胃腸管、及び肝臓中に見つけられる。そのうえ、ＧＬＰ－１Ｒは、中枢神経系（つまり視床下部、線条体、脳幹、黒質、及び脳室下帯）の至る所で見つけられ、ＧＬＰ－１によるＧＬＰ－１Ｒ刺激が、中枢及び末梢神経系の両方において神経保護効果を及ぼすといういくつかの証拠がある。

【００２０】

ヒトＧＬＰ－１は、ｉ．ａ．、回腸末端部中のＬ細胞において、膵臓において、及び脳において合成されるプログルカゴン前駆体（ｐｒｅｐｒｏｇｌｕｃａｇｏｎ）に起源を持つ３７アミノ酸残基ペプチドである。ヒトプログルカゴン前駆体は、ＵｎｉＰｒｏｔデータベース受入番号Ｐ０１２７５、２００７年２月６日；バージョン３により同定される。ＧＬＰ－１（７－３６）アミド、ＧＬＰ－１（７－３７）、及びＧＬＰ－２をもたらすプログルカゴン前駆体のプロセシングは、主として、Ｌ細胞において生じる。単純な方式が、このペプチドの断片及び類似体を説明するために使用される。したがって、たとえば、Gly^{8}－ＧＬＰ－１（７－３７）は、アミノ酸残基第１－６を欠失させ、位置８（Ａｌａ）の天然に存在するアミノ酸残基をＧｌｙと置換することによって、ＧＬＰ－１に形式的に由来する、ＧＬＰ－１の断片（類似体）を示す。同様に、Lys^{34}（N^{ε}－テトラデカノイル）－ＧＬＰ－１（７－３７）は、位置３４のＬｙｓ残基のε－アミノ基がテトラデカノイル化された（ｔｅｔｒａｄｅｃａｎｏｙｌａｔｅ）ＧＬＰ－１（７－３７）を示す。

【００２１】

したがって、すべての先入観に反して、本発明者らは、局所投与によって又は局所組成物（したがって局所眼用組成物）の成分として、網膜に到達し、そこで神経保護効果を及ぼすことができるペプチドを提供することによって、眼科の分野において長い間感じられてきた必要性を解決した。そのうえ、これらのペプチドの局所投与は、それらの作用を眼に制限し、関連する全身性の副作用を最小限にする。

【００２２】

本発明のこの態様はまた、１３～５０アミノ酸の配列長を有し、前記ペプチドのＮ－末端領域に、上記に定義される$HXaa^{1}EGTFTSDXaa^{2}SXaa^{3}Xaa^{4}$（配

列番号：１）を含むアミノ酸配列を含むペプチドの、網膜神経変性疾患の治療及び／又は予防（局所眼治療及び／又は予防を意味する）のための医薬の製造のための、特に、ペプチドの神経保護効果による、初期の網膜神経変性疾患、特に、初期のＤＲにおける網膜の治療及び／又は予防のための使用として明確に示すことができる。本発明はまた、特に、初期の網膜神経変性疾患、特に、初期のＤＲにおける神経保護のための、網膜神経変性疾患の治療及び／又は予防のための方法であって、１３～５０アミノ酸の配列長を有し、前記ペプチドのＮ－末端領域に、上記に定義されるＨＸａａ^{1}ＥＧＴＦＴＳＤＸａａ^{2}ＳＸａａ^{3}Ｘａａ^{4}（配列番号：１）を含むアミノ酸配列を含む、治療有効量のペプチドを、ヒトを含むその必要がある対象において、薬学的に許容され得る賦形剤及び／又はキャリヤと一緒に投与する工程（眼中に局所的に投与することを意味する）を含む方法にも関する。

【図面の簡単な説明】

【００２３】

【図１】特定の網膜神経変性疾患、糖尿病性網膜症（ＤＲ）（初期及び末期）の進行の概略図並びに先行技術に従うステージのそれぞれにおいて用いられる治療上のアプローチを示す図である。水平の矢印は、時間（任意単位で）を示し、これに沿って、血液中のグルコースのレベルの増加が、検出可能となる（糖尿病又は高血中グルコースレベル）。「ＮｏＤＲ」は、正常な眼球検査（微細動脈瘤、微小出血、又は滲出液なし）を意味し、「ＮＰＤＲ」は、非増殖糖尿病性網膜症を意味し、「ＤＭＯ」は、糖尿病性黄斑浮腫を意味し、「ＣａｐＯｃ」は、毛細血管閉塞を意味し、「ＰＤＲ」は、増殖性糖尿病性網膜症を意味し、「ＰＨＣ」は、光凝固術を意味し、「ＩＶＴＲ」は、硝子体内注射を意味し、「ＶＴＲ」は、硝子体切除術を意味する。新生血管という用語は、新しく形成された血管を指す。

【図２】ヒト組織サンプルにおけるＧＬＰ－１受容体の発現を示す図である。パネルＡは、ＧＬＰ－１受容体のｍＲＮＡの相対量を定量的リアルタイムＰＣＲによって分析した棒グラフである。パネルＢにおいて、ヒト神経網膜の切片の光学顕微鏡画像（２０×）は、光受容体セグメント（ＰＲ）における受容体の存在を明確に示す（太い矢印により説明する）。「ＯＮＬ」は、外顆粒層を意味し、「ＩＮＬ」は、内顆粒層を意味、「ＧＣＬ」は、神経節細胞層を意味、それらはすべて、神経網膜の構成部分である。

【図３】糖尿病性網膜症（ＤＲ）に関し、グリア線維性酸性タンパク質（ＧＦＡＰ）の存在がグリア活性化の指標として評価される、網膜の切片（スライド）の顕微鏡的画像（Ｏｌｙｍｐｕｓ顕微鏡）を示す図である。それは、ＧＬＰ－１Ｒアゴニストであるｌｉｒａｇｌｕｔｉｄｅ（７－３７）類似体により治療された糖尿病マウス（左、試験、Ｔ）及びビヒクルにより治療された糖尿病マウス（右パネル、コントロール、Ｃ）からの代表的なサンプルの間の、網膜におけるＧＦＡＰ免疫活性（矢印）の比較を示す。核はＤＡＰＩにより標識した。ＯＮＬ：外顆粒層；ＩＮＬ：内顆粒層；ＧＣＬ：神経節細胞層。

【図４】糖尿病性網膜症（ＤＲ）に関し、ＴＵＮＥＬアッセイの結果を示す棒グラフを示す図である。パネルＡは、ＧＬＰ－１Ｒアゴニストであるｌｉｒａｇｌｕｔｉｄｅ（７－３７）類似体により治療された糖尿病マウス（試験、Ｔ、ｎ＝１０）及びビヒクルにより治療された糖尿病マウス（コントロール、Ｃ、ｎ＝１０）における、神経節細胞層（ＧＣＬ）におけるＴＵＮＥＬ（％）陽性細胞のパーセンテージを示す。パネルＢは、ＧＬＰ－１Ｒアゴニストにより治療された糖尿病マウス（Ｔ）及びビヒクルにより治療された糖尿病マウス（コントロール、Ｃ）からの神経網膜全体におけるＴＵＮＥＬ陽性免疫蛍光を示す。Ａ．Ｕ．：任意単位。結果は平均±ＳＤとする。＊ｐ＜０．０５。

【図５】糖尿病性網膜症（ＤＲ）に関し、ＧＬＰ－１Ｒアゴニスト（Ｔ）により治療された糖尿病マウス及びビヒクル（コントロール、Ｃ）により治療された糖尿病マウスからの神経網膜全体におけるグルタメート免疫蛍光（パネルＡ）及びＧＬＡＳＴ免疫蛍光（パネルＢ）の結果を示す棒グラフを示す図である。Ａ．Ｕ．：任意単位。結果は平均±ＳＤとする。＊ｐ＜０．０５。

【発明を実施するための形態】

【００２４】
理解のために、以下の定義を含む。
【００２５】
本発明の意味では、用語「神経保護」は、神経網膜を構成する神経細胞が保護されて残るように、また、健康な対象動物（ヒトを含む）の１つに対応する生理学的状態において使用することができる、任意の種類の治療又は予防的方法を意味する。「神経網膜」は、神経細胞を含み、網膜色素上皮を有していない網膜の一部である。神経網膜は、視覚サイクルを担う。
【００２６】
「初期の糖尿病性網膜症における神経保護」という表現は、進行ステージのＤＲ（前増殖又は増殖性ＤＲ）が確立される前に実行される任意の治療又は予防的方法に関する。
【００２７】
「初期の糖尿病性網膜症」は、糖尿病の存在により、機能的な異常を眼において検出することができる（すなわち色彩の判別、コントラスト感度、及び網膜電図検査の異常）が、ＤＲの微小血管の変化のパターンが完全には確立されていない、すなわち、前増殖又は増殖性ＤＲについての典型的な病変を観察することができない時期として理解されたい。
【００２８】
「ヒトグルカゴン様ペプチド－１（７－３６）アミド（ＧＬＰ－１（７－３６）アミド）」及び「ヒトグルカゴン様ペプチド－１（７－３７）（ＧＬＰ－１（７－３７）」は、ヒトプログルカゴンに由来し、前記ヒトプログルカゴンのアミノ酸配列のそれぞれアミノ酸７～３６又はアミノ酸７～３７を含む断片に関する。
【００２９】
「ヒトＧＬＰ－１（７－３７）の類似体」として、ＧＬＰ－１（７－３７）の１つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基と置換された及び／又はＧＬＰ－１（７－３７）のアミノ酸残基の１つ以上が欠失された及び／又は１つ以上のアミノ酸残基がＧＬＰ－１（７－３７）に追加されたペプチドが理解されたい。
【００３０】
本明細書において使用される表現「治療有効量」は、投与された場合に、扱われている疾患の症状の１つ以上の発症を予防するのに十分である又はある程度まで軽減する化合物の量を指す。本発明に従って投与される化合物の特定の用量は、もちろん、投与される化合物、投与のルート、治療されている特定の状態、及び同様の考慮を含む、症例を取り囲む特定の状況によって決定されるであろう。
【００３１】
本明細書において使用される用語「薬学的に許容され得る」は、正しい医学的判断の範囲内にあり、深刻な毒性、刺激作用、アレルギー応答、又は他の問題若しくは合併症を伴うことなく、対象（たとえばヒト）の組織と接触する使用に適しており、妥当なベネフィット／リスク比と釣り合っている化合物、材料、組成物、及び／又は投薬形態に関する。それぞれのキャリヤ、賦形剤などはまた、薬学的組成物の他の成分と適合性であるという意味で「許容され得る」ものでもなければならない。それもまた、過度の毒性、刺激作用、アレルギー応答、免疫原性、又は他の問題若しくは合併症を伴うことなく、ヒト及び動物の組織又は器官と接触する使用に適しており、妥当なベネフィット／リスク比と釣り合っていなければならない。適したキャリヤ、賦形剤などは、標準的な薬学の教科書において見つけることができ、例として、保存剤、凝着剤、保湿剤、皮膚軟化剤、及び酸化防止剤を含む。
【００３２】
「Ｎ－末端領域」又は「Ｎ－末端」（アミノ末端、ＮＨ２－末端、Ｎ－末端部、又はアミン末端としても知られている、それらすべて、これにより、交換可能な表現として使用される）は、遊離アミン基（－ＮＨ２）を有するアミノ酸によって終結するタンパク質又はポリペプチドの最初の部分を指す。ペプチド配列を書くための規則は、左にＮ－末端を置き、かつＮ－からＣ－末端に配列を書くことである。タンパク質がメッセンジャーＲＮ

Ａから翻訳される場合、それはＮ－末端からＣ－末端に生成される。

【００３３】

「Ｎ－末端残基」は、遊離している又は少なくとも、他のアミノ酸残基によってアシル化されず（それはたとえばアシル化されてもよい又はホルミル化されてもよい）、Ｎ－末端と呼ばれるアミノ基を有するペプチド中の残基と理解されたい；それはＮ－末端にある。遊離カルボキシル基を有する又は少なくとも他のアミノ酸残基をアシル化しない（それは、たとえば、アンモニアをアシル化し、－ＮＨ－ＣＨＲ－ＣＯ－ＮＨ２をもたらしてもよい）残基は、Ｃ－末端と呼ばれる。

【００３４】

上記に示されるように、発明者らは、非侵襲性であることは別として、初期のこれらの疾患の治療において、特に、初期のＤＲの治療において有用である網膜神経変性疾患（神経変性が本質的な役割を果たす網膜疾患）のための治療上のアプローチを初めて提案する。

【００３５】

特定の実施形態では、本発明に従う局所治療及び／又は予防における使用のためのペプチドが、３０～５０アミノ酸の配列長を有する。

【００３６】

他の特定の実施形態は、網膜神経変性疾患の局所治療及び／又は予防における使用のための３０～４０アミノ酸の配列長を有するペプチドであり、前記ペプチドのＮ－末端領域が、配列：

ＨＸａａ^{1}ＥＧＴＦＴＳＤＸａａ^{2}ＳＸａａ^{3}Ｘａａ^{4}（配列番号：１）を含み、

Ｘａａ^{1}が、アラニン及びグリシンから選択されるアミノ酸であり、

Ｘａａ^{2}が、バリン及びロイシンから選択されるアミノ酸であり、

Ｘａａ^{3}が、セリン及びリシンから選択されるアミノ酸であり、

Ｘａａ^{4}が、チロシン及びグルタミンから選択されるアミノ酸であり、

ヒスチジンが、Ｎ－末端残基である。

【００３７】

他の特定の実施形態では、ペプチドが、１３～４０アミノ酸長を有する配列を有する。

【００３８】

これは、任意の特定の配列長を有するペプチドのいずれも、網膜神経変性疾患の治療及び／又は予防（局所眼治療及び／又は予防を意味する）のための医薬の製造において、特に、初期の網膜神経変性疾患、特に、初期のＤＲにおける網膜の治療及び／又は予防のために、使用されてもよいことを意味する。したがって、本発明はまた、特定の実施形態において、特に、初期の網膜神経変性疾患、特に、初期のＤＲにおける神経保護のための、網膜神経変性疾患の治療及び／又は予防のための方法であって、上記に特定される配列長のいずれかを有する治療有効量のペプチドを投与する（眼に局所的に投与することを意味する）工程を含む方法にも関する。

【００３９】

特に、局所眼治療及び／又は予防における使用を意味する、本発明に従う局所治療及び／又は予防における使用のためのペプチドは、ＤＲ、加齢性黄斑変性症、緑内障、及び色素性網膜炎からなる群から選択される網膜神経変性疾患の治療及び／又は予防のためのものである。

【００４０】

好ましい実施形態では、本発明に従う局所治療及び／又は予防における使用のためのペプチドが、ＤＲの治療及び／又は予防のためのものである。

【００４１】

さらに、他の好ましい実施形態では、本発明に従う局所治療及び／又は予防における使用のためのペプチドが、初期のＤＲの治療及び／又は予防のためのものである。

【００４２】

特に、ＤＲがまだ確立されていないこれらの初期に、局所的に適用される本発明のペプ

チドは、神経網膜の神経保護剤（ｎｅｕｒｏｐｒｏｔｅｃｔｏｒａｇｅｎｔ）として作用し、したがって、神経保護効果を及ぼす。これは、神経細胞が損傷及び機能の損失から保護され、それらが健康な生理学的状態に維持されることを意味する。同じ考え方が、他の網膜神経変性疾患に適用される。実際に、ペプチドは、その神経保護特性により、使用することができる。

【００４３】

糖尿病性網膜症発症の略図は、図１から分かる。手短に言えば、高血糖症によって引き起こされる代謝経路及び高血糖症自体は、ＤＲに至るが、検眼鏡検査下でＤＲを診断することができる前に、少なくとも５年の期間が必要とされる。認識することができる最初のステージは、背景網膜症又は非増殖糖尿病性網膜症（ＮＰＤＲ）（微細動脈瘤、微小出血、及び硬性白斑によって構成される）である。このステージで、糖尿病の対象の標準的な追跡調査（ｆｏｌｌｏｗ－ｏｎ）以外に特異的な治療はない。このステージから、疾患の自然の経緯は、他方を除外するわけではないが、２つの方向をたどり得る。それらの１つは、最も重要な病原性の要素が血液網膜関門（ＢＲＢ）の崩壊である、臨床的に深刻な糖尿病性黄斑浮腫（ＤＭＯ）の発症である。この道のりは、２型糖尿病の患者においてより頻繁となる。他の方向は、増殖性糖尿病性網膜症（ＰＤＲ）に向かうものであり、これは、１型糖尿病においてより頻繁となる。この後の状況において、毛細血管閉塞は、血管新生因子及び抗血管新生因子の間のアンバランスを生成する本質的な役割を果たし、これは、最終的に新血管新生（ＰＤＲの特徴）を刺激する。しかしながら、眼科的検査においてＮＰＤＲを検出することができる前でさえ、網膜の神経変性は存在する。図１において指示されるように、ＤＭＯ及びＰＤＲが確立された場合、積極的治療が実行される。前記治療は、光凝固術（ＰＧＣ）、コルチコステロイド及び／又は抗血管内皮成長因子（ＩＶＴＲ）の硝子体内注射、並びに硝子体切除術（ＶＴＲ）を含む。

【００４４】

本発明に従うＤＲの局所治療及び／又は予防における使用のためのペプチドにより、これらの積極的治療のいくつかは、初期の疾患において、機能的な異常（すなわち色彩の判別、コントラスト感度、及び網膜電図検査の異常）を検出することができる場合、対象が網膜の神経保護を支援する化合物を受けるならば、回避することができる。そのため、網膜が慢性血中グルコースレベルの事象から保護される場合、重大な合併症は、糖尿病患者の生活質の実際の改善と共に、最小限にすることができる又はさらに、決して現われない。ペプチドの眼への局所投与は、実際の利点を表し、さらなる積極的治療を回避する。

【００４５】

一実施形態では、網膜神経変性疾患の、特にＤＲの治療及び／又は予防における使用のためのペプチドが、３１、３２、３３、３４、３７、３６、３７、３８、及び３９アミノ酸からなる群から選択される配列長を有する。他の実施形態では、配列長が、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３７、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４２、４４、４５、４６、４７、４８、及び４９アミノ酸から選択される。

【００４６】

本発明の実施形態では、網膜神経変性疾患の局所（眼球）治療及び／又は予防における使用のためのペプチドが、Ｎ－末端部に、Xaa^{1}がアラニンであり、Xaa^{2}がバリンであり、Xaa^{3}がセリンであり、Xaa^{4}がチロシンである配列番号：１を含むアミノ酸配列を含むものである。すなわち、それらは、アミノ酸配列配列番号：５（ＨＡＥＧＴＦＴＳＤＶＳＳＹ）を含む。これらのペプチドは、特に、ＤＲの局所治療及び／又は予防のためのものであり、これは、ＤＲの局所眼治療及び／又は予防のためのものである。

【００４７】

他の実施形態では、本発明に従う使用のためのペプチドが、哺乳動物グルカゴン様ペプチド－１である。このペプチドは、そのＮ－末端部（Ｎ－末端領域）に、配列番号：５として同定される配列を含み、これは、ヒト、ブタ、及びサルなどのようなほとんどの哺乳動物において維持される。そのうえ、これは、ほとんどＧＬＰ－１Ｒｃによって認識され

る配列である。

【００４８】

したがって、好ましい実施形態では、網膜神経変性疾患（すなわちＤＲ）の局所（眼球）治療及び／又は予防における使用のためのペプチドが、ＨＡＥＧＴＦＴＳＤＶＳＳＹＬＥＧＱＡＡＫＥＦＩＡＷＬＶＫＧＲＧに対応するアミノ酸配列配列番号：２のヒトグルカゴン様ペプチド－１及びこのヒトペプチドの変異を含む。変異は、個人の間の突然変異に関し、一方、これらの突然変異は、ＧＬＰ－１　Ｒｃとの相互作用に影響を与えず、この受容体を通して作用するペプチドを邪魔しない（特に、神経保護又は血中グルコースレベルの低下に至る、続くシグナル伝達経路のアゴニスト又は活性化因子として）。「突然変異」によって、１つ又は２つのアミノ酸の任意の欠失及び保存的アミノ酸の置換又は追加が理解されたい。

【００４９】

他の実施形態では、本発明に従う使用のためのペプチドが、アミノ酸配列配列番号：３（ＨＡＥＧＴＦＴＳＤＶＳＳＹＬＥＧＱＡＡＫＥＦＩＡＷＬＶＲＧＲＧ）を有するものであり、リシン（Ｋ）が、リシン側鎖のアミノ基にアミド結合によって付加された親油性置換基Ｎ$^{\varepsilon}$－（γ－グルタミル（Ｎ$^{\alpha}$－ヘキサデカノイル））を含む。すなわち、ペプチドは、配列番号：３を含む。

【００５０】

配列番号：３は、リラグルチド（Ａｒｇ^{34}Ｌｙｓ^{26}（Ｎ$^{\varepsilon}$－（γ－グルタミル（Ｎ$^{\alpha}$－ヘキサデカノイル））－ＧＬＰ－１（７－３７）とも命名される）として知られている有効成分に相当し、これは、少なくとも１つのアミノ酸中に親油性置換基を含むもののＧＬＰ－１（７－３７）の類似体と考えられ、前記親油性置換基は、直鎖又は分岐アルカンα，ω－ジカルボン酸のアシル基である。ＧＬＰ－１（７－３７）のこれらの類似体における好ましいアシル基は、ＨＯＯＣ（ＣＨ$_2$）ｍＣＯ－を含む群から選択され、ｍが、４～３８、好ましくは４～２４であり、より好ましくは、ＨＯＯＣ（ＣＨ$_2$）$_{14}$ＣＯ－、ＨＯＯＣ（ＣＨ$_2$）$_{16}$ＣＯ－、ＨＯＯＣ（ＣＨ$_2$）$_{18}$ＣＯ－、ＨＯＯＣ（ＣＨ$_2$）$_{20}$ＣＯ－、及びＨＯＯＣ（ＣＨ$_2$）$_{22}$ＣＯ－を含む群から選択される。

【００５１】

したがって、本発明はまた、網膜神経変性疾患の、特にＤＲの局所（眼球）治療における使用のための哺乳動物グルカゴン様ペプチド－１（７－３７）又はその類似体を包含し、グルカゴン様ペプチド－１（７－３７）の類似体が、少なくとも１つの以下の修飾を含むペプチドであり：

ａ）グルカゴン様ペプチド－１（７－３７）の少なくとも１つのアミノ酸残基の欠失；

ｂ）他のアミノ酸残基によるグルカゴン様ペプチド－１（７－３７）の少なくとも、１つのアミノ酸残基の置換；及び

ｃ）グルカゴン様ペプチド－１（７－３７）のＣ－末端部の少なくとも１つのアミノ酸残基の追加、一方、それらは、Ｎ－末端領域にアミノ酸配列配列番号：１を含む。前記類似体は、そのうえ、ヒトグルカゴン様ペプチド－１受容体のペプチドアゴニストであり、受容体の在る所で試験された場合、ｃＡＭＰの形成を刺激することができる。

【００５２】

特に、哺乳動物グルカゴン様ペプチド－１（７－３７）又はその類似体は、網膜神経変性疾患の、特にＤＲの、疾患の初期における治療及び／又は予防において使用可能である。ペプチドは、眼において局所的に適用される場合、初期において神経保護剤として作用する（予防的処置の場合、神経変性を回避する）。

【００５３】

網膜神経変性疾患の、特にＤＲの治療及び／又は予防における使用のためのＧＬＰ－１（７－３７）の類似体の例はまた、リラグルチドの一部、Ｌｙｓ^{26}（Ｎ$^{\varepsilon}$－（テトラデカノイル）－ＧＬＰ－１（７－３７）；Ｌｙｓ^{34}（Ｎ$^{\varepsilon}$－（テトラデカノイル）－ＧＬＰ－１（７－３７）；Ｌｙｓ^{26,34}ビス（Ｎ$^{\varepsilon}$－（テトラデカノイル）－ＧＬＰ－１（７－３７）；Ｌｙｓ^{26}（Ｎ$^{\varepsilon}$－（テトラデカノイル）Ａｒｇ^{34}－ＧＬＰ－１（７－

３７）；Ｇｌｙ^{8}Ａｒｇ^{26,34}Ｌｙｓ^{35}（Ｎ^{ε}－（テトラデカノイル）－ＧＬＰ－１（７－３７）；Ａｒｇ^{26,34}Ｌｙｓ^{36}（Ｎ^{ε}－（テトラデカノイル）－ＧＬＰ－１（７－３７）；Ｌｙｓ^{26,34}ビス（Ｎ^{ε}－（ω－カルボキシノナデカノイル））－ＧＬＰ－１（７－３７）；Ａｒｇ^{34}Ｌｙｓ^{26}（Ｎ^{ε}－（ω－カルボキシノナデカノイル））－ＧＬＰ－１（７－３７）；Ａｒｇ^{34}Ｌｙｓ^{26}（Ｎ^{ε}－（ω－カルボキシヘプタデカノイル））－ＧＬＰ－１（７－３７）；Ａｒｇ^{26,34}Ｌｙｓ^{36}（Ｎ^{ε}－（ω－カルボキシヘプタデカノイル））－ＧＬＰ－１（７－３７）；Ａｒｇ^{26,34}Ｌｙｓ^{36}（Ｎ^{ε}－（ω－カルボキシウンデカノイル））－ＧＬＰ－１（７－３７）；Ｌｙｓ^{26,34}ビス（Ｎ^{ε}－（ω－カルボキシウンデカノイル））－ＧＬＰ－１（７－３７）；Ａｒｇ^{34}Ｌｙｓ^{26}（Ｎ^{ε}－（ω－カルボキシウンデカノイル））－ＧＬＰ－１（７－３７）；Ａｒｇ^{34}Ｌｙｓ^{26}（Ｎ^{ε}－（ω－カルボキシヘプタノイル））－ＧＬＰ－１（７－３７）；Ａｒｇ^{26,34}Ｌｙｓ^{36}（Ｎ^{ε}－（ω－カルボキシヘプタノイル））－ＧＬＰ－１（７－３７）；Ｌｙｓ^{26,34}ビス（Ｎ^{ε}－（ω－カルボキシヘプタノイル））－ＧＬＰ－１（７－３７）；Ａｒｇ^{34}Ｌｙｓ^{26}（Ｎ^{ε}－（ω－カルボキシペンタデカノイル））－ＧＬＰ－１（７－３７）；Ａｒｇ^{34}Ｌｙｓ^{26}（Ｎ^{ε}－（リトコリル）－ＧＬＰ－１（７－３７）；Ｌｙｓ^{26,34}ビス（Ｎ^{ε}－（ω－カルボキシトリデカノイル））－ＧＬＰ－１（７－３７）；Ｌｙｓ^{26,34}ビス（Ｎ^{ε}－（γ－グルタミル（Ｎ^{α}－テトラデカノイル））－ＧＬＰ－１（７－３７）；Ｌｙｓ^{26,34}ビス（Ｎ^{ε}－（γ－グルタミル（Ｎ^{α}－ヘキサデカノイル））－ＧＬＰ－１（７－３７）；；Ａｒｇ^{34}Ｌｙｓ^{26}（Ｎ^{ε}－（γ－グルタミル（Ｎ^{α}－テトラデカノイル））－ＧＬＰ－１（７－３７）をも含む。

【００５４】

これらの類似体はすべて、欧州特許第０９４４６４８号（Ｎｏｖｏ Ｎｏｒｄｉｓｋ）において広く開示され、その合成の例もまた、含まれる。それらのほとんどは、微生物において実行される組換え技術によって及び化学合成によって得られる。

【００５５】

他の実施形態では、網膜神経変性疾患の局所（眼球）治療及び／又は予防における使用のためのペプチドが、Ｎ－末端領域に、Ｘａａ^{1}がグリシンであり、Ｘａａ^{2}がロイシンであり、Ｘａａ^{3}がリシンであり、Ｘａａ^{4}がグルタミンである配列番号：１を含むアミノ酸配列を含むものである。ペプチドは、特に、ＤＲの局所治療及び／又は予防のためのものである。

【００５６】

他の実施形態では、網膜神経変性疾患、特にＤＲの治療及び／又は予防における使用のためのペプチドが、アミノ酸配列配列番号：４（ＨＧＥＧＴＦＴＳＤＬＳＫＱＭＥＥＥＡＶＲＬＦＩＥＷＬＫＮＧＧＰＳＳＧＡＰＰＰＸａａ^{5}）を含み又はそれを有するものであり、Ｘａａ^{5}が、末端の－ＣＯＯＨが－ＮＨ２基と交換されたセリン残基である。この配列番号：４は、エクセナチド（ＡｍｙｌｉｎＰｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）として知られている有効成分に相当する。化合物は、米国特許第５４２４２８６号において公開されるように、固体化学合成によって又は微生物においてＤＮＡ組換え技術を使用して得ることができる。

【００５７】

他の実施形態では、網膜神経変性疾患、特にＤＲの治療及び／又は予防における使用のためのペプチドが、アミノ酸配列配列番号：８（ＨＧＥＧＴＦＴＳＤＬＳＫＱＭＥＥＥＡＶＲＬＦＩＥＷＬＫＮＧＧＰＳＳＧＡＰＰＳＫＫＫＫＫＸａａ^{6}）を含み又はそれを有するものであり、Ｘａａ^{6}が、－ＣＯＯＨ末端が－ＮＨ$_{2}$基と交換されたリシン残基である。この配列番号：８は、リキシセナチド（Ｓａｎｏｆｉ－Ａｖｅｎｔｉｓ）として知られている有効成分に相当する。化合物は、固体化学合成（Ｍｅｒｉｆｉｅｌｄ固相方法）によって得ることができる。産物は、米国特許第６５２８４８６号において広く開示される。

【００５８】

１３～５０アミノ酸、特に３０～５０又は３０～４０の長さを有し、Ｎ－末端部（Ｎ－末端領域）に、配列番号：１を含むアミノ酸配列を含む本発明のこれらのすべてのペプチド及びＧＬＰ－１（７－３７）の類似体として定義される任意のペプチドは、ＧＬＰ－１Ｒｃのアゴニストである。実際に、この配列番号：１が、ＧＬＰ－１Ｒｃと相互作用するアミノ酸配列の少なくとも一部であると考えられる。下記に例証されるように、それらはすべて、網膜神経変性疾患の、特にＤＲの治療及び／又は予防において局所的に使用されてもよい。

【００５９】

したがって、特定の実施形態では、本発明に従う使用のためのペプチドが、ＧＬＰ－１Ｒｃのアゴニストである。

【００６０】

特定のペプチドについてのアゴニスト活性の決定は、クローニングヒトＧＬＰ－１Ｒｃを発現する細胞株においてｃＡＭＰ形成が刺激されるアッセイによって試験することができる。そのようなアッセイの例は、欧州特許第０９４４６４８号（ＮｏｖｏＮｏｒｄｉｓｋ）から推論可能である。

【００６１】

手短に言えば、特定のペプチドのＥＣ５０は、ヒト膵臓ＧＬＰ－１Ｒｃを発現するベビーハムスター腎臓（ＢＨＫ）細胞を使用して決定される用量－応答曲線から計算される。細胞の形質膜は、バッファー（１０ｍｍｏｌ／ｌＴｒｉｓ－ＨＣｌ及び３０ｍｍｏｌ／ｌＮａＣｌ　ｐＨ７．４、そのうえ１ｍｍｏｌ／ｌジチオスレイトール、５ｍｇ／ｌロイペプチン（Ｓｉｇｍａ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ、ＵＳＡ）、５ｍｇ／ｌペプスタチン（Ｓｉｇｍａ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ、ＵＳＡ）、１００ｍｇ／ｌバシトラシン（Ｓｉｇｍａ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ、ＵＳＡ）、及び１６ｍｇ／ｌアプロチニン（ＮｏｖｏＮｏｒｄｉｓｋ　Ａ／Ｓ、Ｂａｇｓｖａｅｒｄ、Ｄｅｎｍａｒｋ）を含有する）において均質化によって調製される。次いで、ホモジネートは、４１ｗ／ｖ％スクロースの層の上で遠心分離される。２つの層の間の白色のバンドは、バッファー中に希釈され、遠心分離される。アッセイは、１４０μｌの総容積の９６ウェルマイクロタイタープレートにおいて実行することができる。使用されるバッファーは、１ｍｍｏｌ／ｌＥＧＴＡ、１．５ｍｍｏｌ／ｌ　ＭｇＳＯ４　１．７ｍｍｏｌ／ｌＡＴＰ、２０ｍＭ　ＧＴＰ、２ｍｍｏｌ／ｌ　３－イソブチル－１－メチルキサンチン、０．０１％　Ｔｗｅｅｎ　２０、及び０．１％ヒト血清アルブミン（Ｒｅｉｎｓｔ、ＢｅｈｒｉｎｇｗｅｒｋｅＡＧ、Ｍａｒｂｕｒｇ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を追加した５０ｍｍｏｌ／ｌ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．４とすることができる。アゴニスト活性のために試験されることになっている化合物は、バッファー中に溶解され、希釈され、膜調製物に追加され、混合物は、３７℃で２時間、インキュベートされる。反応は、２５μｌの０．０５ｍｏｌ／ｌＨＣｌの追加によって止められる。サンプルは、シンチレーション近接アッセイ（ＲＰＡ　５３８、Ａｍｅｒｓｈａｍ、ＵＫ）によってｃＡＭＰについての分析の前に１０倍に希釈される。

【００６２】

次いで、ペプチドは、これらの条件下で、ＥＣ５０（ｐＭ）が、少なくとも５５ｐＭ～又は好ましくは少なくとも６０ｐＭ～であるＧＬＰ－１（７－３７）の少なくとも１つである場合、アゴニストと見なされる。

【００６３】

いくつかの眼科検査によって検出される網膜の神経変性の保護は、血管性の異常が発症する前にＤＲを治療するための好適なアプローチに相当する。初期のＤＲにおいて、神経変性は存在する（これは、色彩の判別及びコントラスト感度の両方の損失、グリア活性化、並びに神経細胞のアポトーシスによって検出することができる）。本発明の局所投与（眼への局所投与）のためのペプチドは、より進行したステージのＤＲが確立される（臨床的に深刻な糖尿病性黄斑浮腫及び／又は増殖性糖尿病性網膜症）まで、指示される治療がなく、経過観察のみが推奨される場合、これらの初期において有用である。

【００６４】

初期のＤＲにおける治療は、さらなる合併症、すなわち微細動脈瘤、微小出血、硬性白斑、新血管新生、毛細血管閉塞、及び血液網膜関門（ＢＲＢ）の崩壊が回避されるという実際の利点を有する。

【００６５】

他の実施形態では、本発明に従う使用のためのペプチドが、薬学的局所組成物の成分（構成成分）であり、前記組成物が、上記に開示される少なくとも１つのペプチド並びに任意の薬学的に許容され得るキャリヤ及び／又は賦形剤を含む。したがって、本発明はまた、上記に定義される少なくとも１つのペプチドを含む、網膜神経変性疾患の、特に糖尿病性網膜症の局所治療及び／又は予防における使用のための薬学的局所組成物に関する。特定の及び／又は賦形剤は、水、食塩水バッファー、及び油中水型又は水中油型の混合物に関する。特定の賦形剤は、保存剤、凝着剤、保湿剤、皮膚軟化剤、及び酸化防止剤から選択される。

【００６６】

好ましい薬学的局所組成物は、溶液（たとえば点眼剤）、クリーム、ローション、軟膏、エマルション、エアロゾル及び非エアロゾル噴霧剤、ゲル、外用薬、並びに懸濁剤からなる群から選択される。上記に公開されるように、薬学的局所組成物は、局所眼用組成物として理解されたい。

【００６７】

そのうえ、本発明の組成物は、芳香、着色剤、及び局所製剤における使用のための技術的現状において知られている他の構成成分などのような他の成分を含有してもよい。

【００６８】

本発明の局所組成物は、技術的現状においてよく知られている方法に従って調製することができる。適切な賦形剤及び／又はキャリヤ並びにそれらの量は、調製されている製剤のタイプに従って当業者らによって容易に決定することができる。

【００６９】

好ましい実施形態では、本発明の局所組成物が、点眼液とも命名される点眼剤の形態をした水剤である。点眼剤の形態をしたペプチドの投与は、その必要性のある対象が使用するのに容易であり、かつ不便でないという優れた利点を包含する。

【００７０】

説明及び請求項の全体にわたって、語「含む」及びその語の変形は、他の技術的特徴、添加剤、構成成分、又は工程を除外するようには意図されない。さらに、語「含む」は、「からなる」のケースを包含する。本発明のさらなる目的、利点、及び特徴は、説明の考察に際して当業者らに明らかになるであろう又は本発明の実施によって知られてもよい。以下の実施例及び図面は、例説として提供され、それらは、本発明を限定するとして意図されない。さらに、本発明は、本明細書において記載される特定の好ましい実施形態のすべての可能な組み合わせを包含する。

【実施例】

【００７１】

実施例１．ＧＬＰ－１－Ｒｃはヒト網膜において発現される

網膜の神経変性の主な特徴（アポトーシス及びグリア活性化）は、死亡の前の年に実行される検眼鏡検査においていかなる微小循環の異常をも有していない糖尿病のドナーの網膜中に既に存在することが知られている（Carrascoら，“Lower Somatostatin Expression Is an Early Event in Diabetic Retinopathy and Is Associated With Retinal Neurodegeneration”，Diabetes Care-2007，Vol. No. 30，pp.:2902-2908）。そのため、正常検眼鏡検査は、網膜の神経変性が糖尿病の眼中に既にある可能性を除外しない。

【００７２】

本発明の研究では、本発明者らは、ヒト網膜においてＧＬＰ－１受容体（ＧＬＰ－１Ｒｃ）が発現されるかどうかを検出する必要があった。

【００７３】

８つのヒトの死後の眼を、８人の糖尿病のドナー及び８人の非糖尿病のドナー（年齢：

６６．９±５．４年）から得た。死亡から眼摘出までに経過した時間は、４時間未満であった。摘出の後に、それぞれのドナーの一方の眼を、－８０℃でスナップ凍結し（ｓｎａｐｆｒｅｅｚｅ）、ｍＲＮＡについてアッセイするまで保管した。他方のアイカップ（ｅｙｅｃｕｐ）は、４％パラホルムアルデヒド中で固定し、免疫組織化学的研究のためにパラフィン中に包埋した。

【００７４】

眼球組織はすべて、適用法及びＤｅｃｌａｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｈｅｌｓｉｎｋｉ ｆｏｒｒｅｓｅａｒｃｈ ｉｎｖｏｌｖｉｎｇ ｈｕｍａｎ ｔｉｓｓｕｅに従って使用した。そのうえ、この研究は、Ｖａｌｌ ｄ’Ｈｅｂｒｏｎ Ｈｏｓｐｉｔａｌ （Ｂａｒｃｅｌｏｎａ－Ｓｐａｉｎ）の倫理委員会によって承認された。

【００７５】

神経網膜及び網膜色素上皮（ＲＰＥ）は、ドナーから単離されたアイカップの顕微鏡的解剖下で摘出した。それぞれの眼からの神経網膜及びＲＰＥは、モルタルを使用して液体窒素中で粉末に砕いた。組織は、ＱＩＡｓｈｒｅｄｄｅｒスピンカラム（Ｑｕｉａｇｅｎ、Ｈｉｌｄｅｎ、Ｇｅｒｍａｎｙ）によって均質化し、ｍＲＮＡは、メーカーの指示に従って、ＲＮｅａｓｙＭｉｃｒｏ Ｋｉｔ（Ｑｕｉａｇｅｎ、Ｈｉｌｄｅｎ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用して、組織から抽出した。ｍＲＮＡの濃度及び完全性は、ＲＮＡｎａｎｏ Ｌａｂ Ｃｈｉｐ Ｋｉｔ Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒ（Ａｇｉｌｅｎｔ、ＰａｌｏＡｌｔｏ、ＣＡ、ＵＳＡ）によって決定した。１μｇの全ｍＲＮＡは、ランダムヘキサヌクレオチドプライミング（ｐｒｉｍｉｎｇ）についてのメーカーのプロトコールに従って、ＴａｑＭａｎ（登録商標） ＲｅｖｅｒｓｅＴｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔｓ（ＡｐｐｌｉｅｄＢｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、Ｒｏｃｈｅ、Ｎｅｗ Ｊｅｒｓｅｙ、ＵＳＡ）を使用して逆転写した。定量的リアルタイムＰＣＲ（Ｑ－ＲＴ－ＰＣＲ）は、メーカーのプロトコールに従って、ＡＢＩＰｒｉｓｍ ７０００ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ；Ｍａｄｒｉｄ、Ｓｐａｉｎ）を使用して実行した。ＧＬＰ－１Ｒｃのレベルは、ＴａｑＭａｎＡｓｓａｙｓにより評価した。

【００７６】

免疫蛍光アッセイのために、パラフィンで処理した眼は、７μｍ厚に連続的にカットした。切片は、キシレンにより脱パラフィンし、エタノール中で再水和した。次いで、切片は、９５℃で、２０分間、抗原賦活（ａｎｔｉｇｅｎ－ｒｅｔｒｉｅｖａｌ）溶液（ＤａｋｏＡ／Ｓ、Ｇｌｏｓｔｒｕｐ、Ｄｅｎｍａｒｋ）中に固定して、置いた。次いで、切片は、抗体の非特異的な結合を遮断するために、ＰＢＳ中０．３％ ＴｒｉｔｏｎＸ－１００中１％ ＢＳＡにより１時間、インキュベートし、次いで、ヒトＧＬＰ－１Ｒｃ（Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＵＫ）に対する特異的な一次抗体と共に４℃で一晩インキュベートした。切片は、１時間、室温でＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ（登録商標）４８８（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ、Ｅｕｇｅｎｅ、ＯＲ）二次抗体と共にインキュベートする前に洗浄した。スライドは、細胞核の可視化のために、ＤＡＰＩを含有する少量の封入剤（ＶｅｃｔｏｒＬａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｂｕｒｌｉｎｇａｍｅ、ＣＡ）と共にカバーグラスをかけた。

【００７７】

定量的リアルタイムＰＣＲ（Ｑ－ＲＴ－ＰＣＲ）アッセイの結果を、いくつかのヒト組織におけるＧＬＰ－１受容体に対応するｍＲＮＡの相対量を示す図２Ａに示す。特に、分析した組織は、糖尿病のドナー由来の網膜色素上皮（ＲＰＥＤＢＴ）、糖尿病のドナー由来の神経網膜（ＮＲ ＤＢＴ）、非糖尿病のドナー由来の網膜色素上皮（ＲＰＥ）、非糖尿病のドナー由来の神経網膜（ＮＲ）のサンプルであった。比較アッセイとして、他の組織における、すなわちヒト膵臓（ＨＰ）、腸（ＢＷ）、肝臓（ＬＶ）、及び内臓脂肪（Ｆ）の細胞系におけるＧＬＰ－１受容体の発現を分析した。ヒトベーターアクチンは、Ｑ－ＲＴ－ＰＣＲの内部標準として使用した。

【００７８】

図２Ａにおけるデータは、糖尿病及び非糖尿病のドナー由来の網膜（ＲＰＥ／ＤＢＴ；ＮＲ／ＤＢＴ；ＲＰＥ、ＮＲ）においてｍＲＮＡＧＬＰ－１Ｒｃ発現を検出することができたことを実証した。

【００７９】

免疫蛍光アッセイの結果を、パラフィンで処理した切片のうちの１つの２０×光学顕微鏡画像を示す図２Ｂに示す。太い矢印は、緑色の染色を指し、したがって、ＧＬＰ－１受容体に相当する。外顆粒層（ＯＮＬ）の核は、破線の矢印によって示す。この図２Ｂは、ＧＬＰ－１受容体がまた、免疫組織化学的検査によっても、網膜において検出されたことをもう一度証明するのに役立つ。

実施例２．ＧＬＰ－１Ｒｃアゴニストの局所投与は糖尿病のマウスにおいて網膜の神経変性を予防する

動物及び治療

【００８０】

Ｈａｒｌａｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．から得た合計２０匹のＣ５７ＢＬ／ＫｓＪ－ｄｂ／ｄｂマウスを含んだ。１０匹のＣ５７ＢＬ／ＫｓＪ非糖尿病マウスは、コントロールグループとして果たした。実験はすべて、ＡｎｉｍａｌＣａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ ｏｆＶａｌｌ ｄ’Ｈｅｂｒｏｎ Ｉｎｓｔｉｔｕｔ ｄｅ Ｒｅｃｅｒｃａ（ＶＨＩＲ、Ｂａｒｃｅｌｏｎａ－Ｓｐａｉｎ）並びにＣＥＥ（８６／６０９／ＣＥＥ）及びＡＲＶＯ（Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎｆｏｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ｉｎ Ｖｉｓｉｏｎ ａｎｄＯｐｈｔｈａｌｍｏｌｏｇｙ）の基本方針によって承認されるプロトコールに従って実行した。マウスは、１２時間の明／暗サイクルと共に温度（２０℃）及び湿気（６０％）の管理条件下に収容し、食物及び水を自由に摂取した。

【００８１】

Ｃ５７ＢＬ／ＫｓＪ－ｄｂ／ｄｂマウスは、ＤＲを有する患者において観察される神経変性特徴を研究するための好適なモデルに相当する。Ｃ５７ＢＬ／ＫｓＪ－ｄｂ／ｄｂマウスは、レプチン受容体遺伝子中に突然変異を伴い、肥満誘発性の２型糖尿病のためのモデルとなる。それらは、過度の摂食量の結果として~４－６週齢で始まる高血糖症を発症する。

【００８２】

ＧＬＰ－１受容体アゴニストの効果の分析に先立って、本発明者らは、糖尿病に関連する網膜の異常の時間的順序を評価した。網膜電図検査並びに網膜の形態計測、グリア活性化、及びアポトーシス評価を含むいくつかの神経変性測定を実行した。全体的な網膜の厚さが、１６及び２４週の非糖尿病のマウスと比較して、糖尿病のマウスにおいて有意に減少したことが結論づけられた。そのうえ、グリア線維性酸性タンパク質の過形成及びアップレギュレーション（グリア活性化の徴候）によって特徴付けられる「反応性」糖尿病の表現型が、糖尿病のマウスにおいて観察された。８、１６、及び２４週の非糖尿病のマウスと比較して、糖尿病のマウスにおいて、アポトーシス性の神経節の（ｇａｎｇｌｉｏｎａｒ）細胞の数の著しい増加もまた、観察された。したがって、この動物モデルは、ＤＲの治療又は予防に向けられる任意の化合物を試験するための実に好適なモデルであり、さらに、ＳＴＺの神経毒性効果が結果に危害を及ぼし得るストレプトゾトシン誘発性の糖尿病（ＳＴＺ－ＤＭ）として知られているＤＲにおける網膜の神経変性を研究するために使用されたものよりも好適なモデルであった。

【００８３】

ＧＬＰ－１（７－３７）類似体であるＧＬＰ－１Ｒｃアゴニスト、リラグルチドを、８週齢のマウスにおいてシリンジを使用してそれぞれの眼の上方の角膜表面上に直接、点眼剤（リラグルチド、濃度：０．９％塩化ナトリウム蒸留水溶液中６ｍｇ／ｍｌ）の形態で投与した。コントロールとして、ビヒクル（水中０．９％塩化ナトリウム）点眼剤を投与した。１０匹のマウスをリラグルチドにより治療し、１０匹のマウスをビヒクルにより治療した。治療（リラグルチド又はビヒクル）は、１４日間、毎日１回施した。１５日目に、動物の眼に、検死のおよそ１時間前に少量のリラグルチド又はビヒクルを滴下した。マ

ウスは頚椎脱臼によって安楽死させた。眼は直ちに摘出し、神経網膜を分離した。一方の眼由来の神経網膜を液体窒素中で凍結し、ｍＲＮＡ及びタンパク質の評価のために－８０℃で保管した。他方の眼は、液体窒素中で浸漬によってＴｉｓｓｕｅＦｒｅｅｚｉｎｇＭｅｄｉｕｍ；ＴＦＭ（商標）（ＥｌｅｃｔｒｏｎＭｉｃｒｏｓｃｏｐｙ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）中で急速冷凍し、背／腹面で８ｍｍで凍結切片にした。切片は、スライド上にマウントし、－８０℃で保管した。これらの切片は、網膜の形態の評価、ＧＬＰ－１Ｒｃの存在、グリア線維性酸性タンパク質（ＧＦＡＰ）の存在、及びＴｅｒｍｉｎａｌＴｒａｎｓｆｅｒ ｄＵＴＰ Ｎｉｃｋ－Ｅｎｄ Ｌａｂｅｌｉｎｇ（ＴＵＮＥＬ）免疫活性の評価のために調製した。

【００８４】

マウスの神経網膜におけるＧＬＰ－１Ｒｃ存在の評価は、リアルタイムＰＣＲによってｍＲＮＡの発現を決定することによって並びに免疫組織化学的分析及びウエスタンブロット分析によって実行した。

ＧＬＰ－１ＲｃのｍＲＮＡ発現

【００８５】

ＧＬＰ－１Ｒｃ発現は、リアルタイムＰＣＲによって分析した。以下のプライマーを使用した：ＧＧＧＴＣＴＣＴＧＧＣＴＡＣＡＴＡＡＧＧＡＣＡＡＣ（フォワード、配列番号：６）及びＡＡＧＧＡＴＧＧＣＴＧＡＡＧＣＧＡＴＧＡＣ（リバース、配列番号：７）。

免疫組織化学的分析

【００８６】

ＧＬＰ－１Ｒｃは、ＧＬＰ－１Ｒｃに対する特異的抗体を使用して、蛍光顕微鏡検査法によって評価した。切片は、２分間、酸性メタノール（－２０℃）中に固定し、その後、それぞれ５分間、ＰＢＳ中で３回洗浄した。切片は、ＴＢＳ－ＴｒｉｔｏｎＸ－１００　０．１％により透過処理し、室温で３０分間、遮断薬（ＰＢＳ中１０％ＢＳＡ及び１０％ヤギ血清）中でインキュベートした。次いで、切片は、湿度の高い大気中で４℃で一晩、ＧＬＰ－１Ｒｃ（ＡｂｃａｍＬｔｄ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、Ｕ．Ｋ．）（遮断溶液中で調製した１：５００希釈液）と共にインキュベートした。それぞれ５分間、ＰＢＳ中での３回の洗浄の後に、切片は、二次抗体Ａｌｅｘａ　５９４ヤギ抗ウサギ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、ＵＫ）（調製遮断溶液中１：２００希釈液）と共にインキュベートした。切片は、ＰＢＳ中で３回洗浄し、ヘキストにより対比染色し、ＭｏｕｎｔｉｎｇＭｅｄｉｕｍ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ（Ｐｒｏｌｏｎｇ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）と共にマウントし、カバーガラスによりマウントした。画像は、全く同じ光度及びコントラスト設定を使用して、Ｏｌｙｍｐｕｓ顕微鏡により記録した。

ウエスタンブロット分析：

【００８７】

神経網膜は、溶解バッファー（Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　１００ｍＭ、ｐＨ７．５；フェニルメチルスルホニルフッ化物（ＰＭＳＦ）、０．１ｍＭ；Ｔｒｉｔｏｎ、１％；ＮａＣｌ、１５０ｍＭ；ＮａＦ、２０ｍＭ；Ｎａ３ＰＯ４、２ｍＭ）及びＳｉｇｍａ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、ＵＫ）の１×プロテアーゼ阻害剤の中に移し、次いで、シリンジによって均質化した。ホモジネートは、３０分間、氷上でインキュベートし、１５分間、４℃で１００００ｒｐｍで遠心分離した。上清のタンパク濃度は、ＢＣＡアッセイ（Ｐｉｅｒｃｅ、ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ ＵＳＡ）を使用して決定した。サンプルは、ローディングバッファー６×（Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、１Ｍ、ｐＨ、６．８；ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）、２０％；１０％グリセロール；メルカプトエタノール；及び０．０１ｇブロモフェノール・ブルー）と混合し、１０分間煮沸した。タンパク質サンプルは、１０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分離した。電気泳動による分離の後に、タンパク質は、ポリフッ化ビニリデン膜（Ｂｉｏ－ＲａｄＬａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、ＵＫ）上に転写した。膜は、Ｔｒｉｓ緩衝食塩水（ＴＢＳ）中５％脱脂粉乳、０．１％　Ｔｗｅｅｎ中で室温で１時間、遮断し、次いで、４℃で一晩、ＧＬＰ－１Ｒ（１：１０００希釈液；ＡｂｃａｍＬｔｄ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＵＫ）に対する一次抗体と共にインキュベートした。膜

は、ＴＢＳ－Ｔ（０．１％　Ｔｗｅｅｎ）により広範囲に洗浄し、室温で１時間、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識二次抗体（１：５０００希釈液、Ｄａｋｏ、Ｄｅｎｍａｒｋ）と共にインキュベートした。バンドは、化学発光検出系（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、ＵＳＡ）を使用して視覚化した。相対的なタンパク質発現は、ＩｍａｇｅＪを使用することによって定量化した。

神経変性測定：

【００８８】

神経変性を決定するために、グリア活性化評価のための免疫組織化学的分析及びアポトーシス評価のための免疫組織化学的分析を実行した。そのうえ、グルタメート代謝を評価した。

【００８９】

グリア活性化は、ＧＦＡＰ（グリア線維性酸性タンパク質）に対する特異的抗体を使用して、蛍光顕微鏡検査法によって評価した。切片は、２分間、酸性メタノール（－２０℃）中に固定し、その後、それぞれ５分間、ＰＢＳにより３回洗浄した。切片は、ＴＢＳ－ＴｒｉｔｏｎＸ－１００　０，０２５％により透過処理し、室温で２時間、遮断薬（ＰＢＳ中１％ＢＳＡ及び１０％ヤギ血清）中でインキュベートした。次いで、切片は、湿度の高い大気中で４℃で一晩、ウサギ抗ＧＦＡＰ（ＡｂｃａｍＬｔｄ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、Ｕ．Ｋ．）（遮断溶液中で調製した１：５００希釈液）と共にインキュベートした。それぞれ５分間、ＰＢＳ中での３回の洗浄の後に、切片は、二次抗体Ａｌｅｘａ　４８８ヤギ抗ウサギ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）（遮断溶液中で調製した１：２００希釈液）と共にインキュベートした。切片は、ＰＢＳ中で３回洗浄し、ヘキストにより対比染色し、ＭｏｕｎｔｉｎｇＭｅｄｉｕｍ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ（Ｐｒｏｌｏｎｇ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）と共にマウントし、カバーガラスによりマウントした。糖尿病及びコントロールサンプル由来の比較デジタル画像は、全く同じ光度及びコントラスト設定を使用して、Ｏｌｙｍｐｕｓ顕微鏡により記録した。

【００９０】

グリア活性化の程度を評価するために、以前に報告されたＧＦＡＰ染色の度合いに基づくスコアリングシステム（Andersonら “Glial and endothelial blood-retinal barrier responses to amyloid-beta in the neural retina of the rat”. Clin Ophthalmol - 2008, Vol. No.: 2, pp.:801-816）を使用した。スコアリングシステムは以下のとおりとした：ミュラー細胞エンドフィート領域／ＧＣＬのみ（スコア１）；ミュラー細胞エンドフィート領域／ＧＣＬ及び少数の近位突起（ｐｒｏｘｉｍａｌｐｒｏｃｅｓｓ）（スコア２）；ミュラー細胞エンドフィート及び多くの突起、ＯＮＬには及ばない（スコア３）；ミュラー細胞エンドフィート及び至る所の突起、いくつかはＯＮＬ中（スコア４）；ミュラー細胞エンドフィート及びＧＣＬからＯＮＬの外側の縁までの多くの黒い突起（ｄａｒｋｐｒｏｃｅｓｓ）（スコア５）。

【００９１】

アポトーシスは、ＤＡＰＩ（４’、６－ジアミノ－２－フェニルインドール）染色と共に、フルオレセインを加えたＴＵＮＥＬ（ＴｅｒｍｉｎａｌＴｒａｎｓｆｅｒａｓｅ ｄＵＴＰＮｉｃｋ－Ｅｎｄ Ｌａｂｅｌｉｎｇ）方法（ＤｅａｄＥｎｄＦｌｕｏｒｏｍｅｔｒｉｃ ＴＵＮＥＬＳｙｓｔｅｍ ｋｉｔ；ＰＲＯＭＥＧＡ、ＵＳＡ）を使用して評価した。網膜の凍結切片は、新たに調製した０．１％クエン酸ナトリウム中０．１％　ＴｒｉｔｏｎＸ－１００により氷上での２分間のインキュベーションによって透過処理した。二次抗体は、Ａｌｅｘａ　５９４ヤギ抗ウサギ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）（５％　ＢＳＡを有する遮断溶液中で調製した１：２００希釈液）とした。蛍光顕微鏡検査法による評価のために、４５０－５００ｎｍの範囲の（たとえば４８８ｎｍ）励起波長及び５１５－５６５ｎｍ（緑色）の範囲の検出を使用した。

【００９２】

細胞外空間におけるグルタメート蓄積及びグルタメート受容体の過剰活性化（「興奮毒性」）は、網膜の神経変性において重要な役割を果たす。グルタメート輸送体は、細胞外

のグルタメート濃度を神経毒性レベル未満に保つのに不可欠である。グルタメート／アスパルテート輸送体（ＧＬＡＳＴ）は、最も中心的なグルタメート輸送体であり、哺乳動物網膜においてグルタメート取込みの少なくとも５０％を占める。ＧＬＡＳＴ及びグルタメートは、特異的抗体［ウサギ抗ＧＬＡＳＴ（ＥＡＡＴ１）（１：１００、Ａｂｃａｍａｂ４１６、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＵＫ）又はウサギ抗Ｌグルタメート（１：１００、Ａｂｃａｍａｂ９４４０、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＵＫ）］を使用して、蛍光顕微鏡検査法によって評価した。

【００９３】

回収したデータの統計分析を行った。変数の正規分布は、コルモゴロフ－スミルノフ検定を使用して評価した。データは、平均±ＳＤとして示した。糖尿病及び非糖尿病のマウスの間の連続変数の比較は、独立スチューデントｔ－検定を使用して実行した。カテゴリー変数の間の比較は、フィッシャーの正確確率検定によって実行した。統計的有意水準は、ｐ＜０．０５に設定した。

結果：

【００９４】

マウス網膜におけるＧＬＰ－１Ｒｃ発現：

【００９５】

データは示さないが、ＧＬＰ－１ＲｃのｍＲＮＡ発現は、リアルタイムＰＣＲによって、糖尿病（ｄｂ／ｄｂ）マウス及び非糖尿病マウス（ｄｂ／＋）の神経網膜において検出した。網膜において観察されたＧＬＰ－１Ｒｃの発現は、ＧＬＰ－１について認識される標的組織である膵臓において観察されたものと同じ範囲にあった。ＧＬＰ－１Ｒｃタンパク質はまた、免疫組織化学的検査及びウエスタンブロット分析によっても検出した。

【００９６】

グリア活性化のデータを図３に示す。図３から分かるように、プラセボ（Ｃ）により治療した糖尿病のマウスの網膜において、ＧＦＡＰ発現は、内境界膜（ＩＮＬ）に沿って、ミュラー細胞エンドフィートにおいて、並びに内側（ＩＮＬ）及び外側網膜（ＯＮＬ）の両方に及ぶミュラー細胞放射状線維（ｒａｄｉａｌｆｉｂｅｒ）において顕著であった。リラグルチド（Ｔ）点眼剤により治療した糖尿病のマウスは、ビヒクルにより治療した糖尿病のマウスよりも有意に低い（ｐ＜０．０５）及び非糖尿病マウスと同様の（ｐ＝ｎ．ｓ）ＧＦＡＰ免疫蛍光スコアを示した（表１）。

【００９７】

次に、表１は、スコアリングシステムに基づくグリア活性化の定量化（パーセンテージ、％で）を示す（Andersonら Clin Ophthalmol 2008、前掲）。

表１．

グリア活性化スコア	プラセボにより治療したｄｂ／ｄｂマウス（ｎ＝１０）	ＧＬＰ－１Ｒｃアゴニスト　リラグルチドにより治療したｄｂ／ｄｂマウス（ｎ＝１０）
1	4.9％	58.5％
2	17.1％	39.1％
3	46.3％	2.4％
4	26.8％	０％
5	０％	０％

【００９８】

ＴＵＮＥＬアッセイによって評価した網膜のアポトーシスのデータを図４に示す。パネルＡにおいて、ＧＬＰ－１（７－３７）類似体　リラグルチドにより治療した糖尿病のマウス（Ｔ、ｎ＝１０）における及びビヒクルにより治療した糖尿病のマウス（コントロール、Ｃ、ｎ＝１０）における神経節細胞層（ＧＣＬ）におけるＴＵＮＥＬ陽性細胞のパーセンテージを示す。データはまた、ＧＬＰ－１Ｒアゴニストにより治療した糖尿病のマウス（Ｔ）由来の及びビヒクルにより治療した糖尿病のマウス（コントロール、Ｃ）についての神経網膜におけるＴＵＮＥＬ陽性免疫蛍光についてもパネルＢに示す。このパネルＢ

において、網膜全体（神経網膜）におけるＴＵＮＥＬ蛍光の定量化は、任意単位で示す。Ａ．Ｕ．：任意単位。結果は平均±ＳＤとする。＊ｐ＜０．０５。

【００９９】

図４から分かるように、網膜全体における網膜アポトーシス細胞の全パーセンテージ並びに網膜層（ｒｅｔｉｎａｌｌａｙｅｒ）（外顆粒層、内顆粒層、及び神経節細胞層）におけるアポトーシス細胞のパーセンテージは、年齢が一致する非糖尿病コントロール由来の網膜において観察されたものと比較して有意に高かった（ｐ＜０．０１）。すべてのグループにおいて、アポトーシスは、神経節細胞層において最も高かった。ＧＬＰ－１Ｒｃアゴニスト（リラグルチド）により治療した糖尿病マウスは、プラセボにより治療した糖尿病マウスよりも神経節細胞層におけるアポトーシスについて有意に低い比を示した（ｐ＜０．０５）。さらに、ＧＬＰ－１Ｒｃアゴニスト点眼剤により治療した糖尿病のマウスは、ビヒクルにより治療した糖尿病のマウスよりも有意に低いＴＵＮＥＬ＋免疫蛍光強度及び非糖尿病マウスと同様の強度（ｐ＝ｎ．ｓ）を示した。したがって、治療マウスでは、アポトーシス細胞のレベルがより低く、これはより低い網膜の損傷について間接的な測定値となる。

【０１００】

糖尿病（Ｃ）によって引き起こされたグルタメートレベルの増加は、ＧＬＰ－１Ｒｃアゴニスト（Ｔ）により治療した糖尿病のマウスにおいて抑止された。この有益な効果は、ＧＬＰ－１Ｒｃアゴニスト（Ｔ）により治療した糖尿病のマウスにおけるＧＬＡＳＴ含有量の著しい増加に関連した（図５）。

【０１０１】

これらのデータはすべて、まとめると、ＧＬＰ－１Ｒｃアゴニストの局所眼球投与（点眼剤）が、初期の糖尿病性網膜症において生じる網膜の神経変性プロセスを予防する際に強力な効果を有するという第１の証拠を提供する。データはまた、神経変性が本質的な役割を果たす他の網膜疾患が、ＧＬＰ－１Ｒｃアゴニストの局所眼球投与（点眼剤）により、特に、上記に開示されるペプチドの局所投与により、治療されてもよい及び／又は予防されてもよいという証拠をも提供する。

本出願において引用される参考文献

Schmidtら，“Neurodegenerative Diseases of the Retina and Potential for the Protection and Recovery”，Current Neuropharmacology - 2008，Vol. No. 6，pp.: 164-178

Simoら，“Neurodegeneration is an early event in diabetic retinopathy: therapeutic implications”，Br. J. Ophthalmol. - 2012，vol. 96，pp.1285-1290

Aielloら，“Targeting Intraocular Neovascularization and Edema - One Drop at a Time”，N. Eng. J Med - 2008，vol. 359，pp. 967-969

Urtti Aら，“Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery”. Adv. Drug. Deliv. Rev. 2006，vol. 58，pp. 1131-1135

国際公開第２００７０６２４３４号

Zhangら，“Intravitreal injection of exendin-4 analogue protects retinal cells in early diabetic rats”，Invest Ophthalmol Vis Sci.-2011，vol.52(1)，pp.278-85.

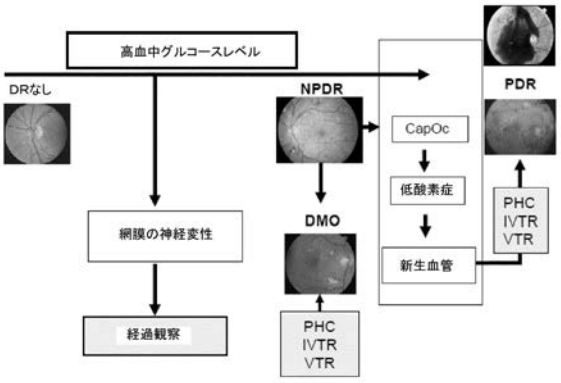
欧州特許第０９４４６４８号

米国特許第５４２４２８６号

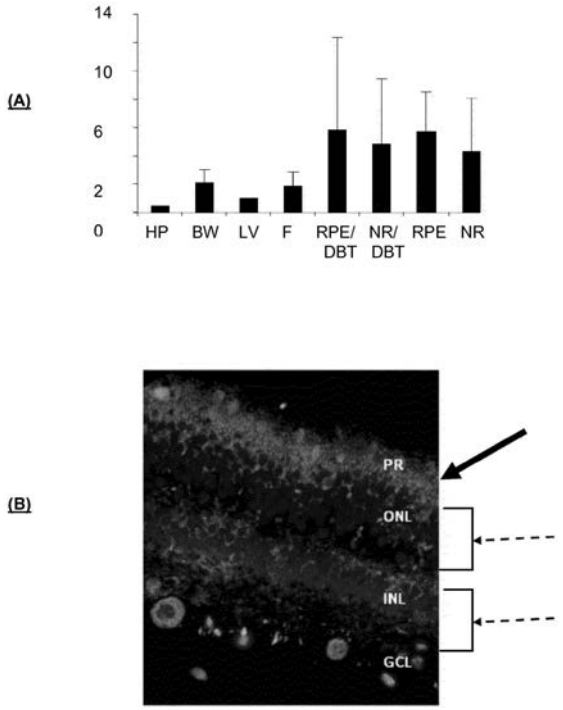
Carrascoら，“Lower Somatostatin Expression Is an Early Event in Diabetic Retinopathy and Is Associated With Retinal Neurodegeneration”，Diabetes Care-2007，Vol. No. 30，pp.:2902-2908

Andersonら “Glial and endothelial blood-retinal barrier responses to amyloid-beta in the neural retina of the rat”. Clin Ophthalmol - 2008，Vol. No.: 2，pp.:801-816

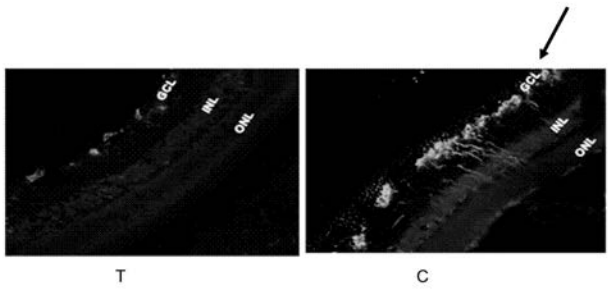
【図１】


高血中グルコースレベル
DRなし
NPDR
PDR
CapOc
低酸素症
新生血管
PHC
IVTR
VTR
網膜の神経変性
DMO
経過観察
PHC
IVTR
VTR

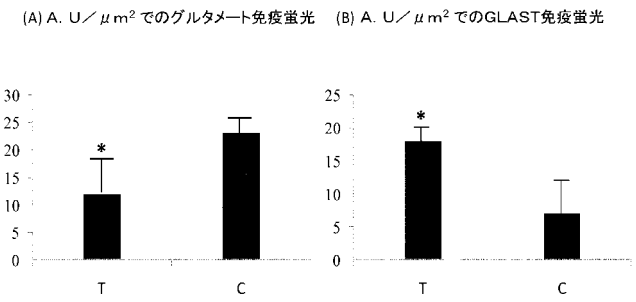
【図２】


(A)
14
10
6
2
0
HP
BW
LV
F
RPE/
DBT
NR/
DBT
RPE
NR
(B)
PR
ONL
INL
GCL

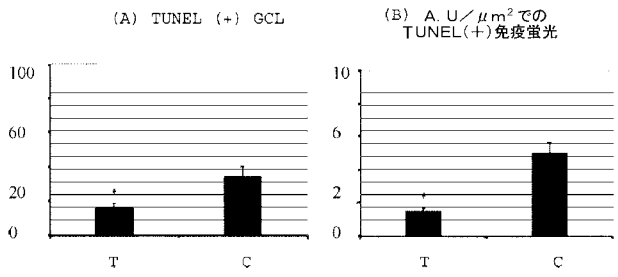
【図３】


GCL
INL
ONL
T
C

【図５】


(A) A. U／μm² でのグルタメート免疫蛍光
(B) A. U／μm² でのGLAST免疫蛍光
30
25
20
15
10
5
0
*
T
C
25
20
15
10
5
0
*
T
C

【図４】


(A) TUNEL (+) GCL
(B) A. U／μm² での
TUNEL(+)免疫蛍光
100
60
20
0
T
C
10
6
2
0
T
C

【配列表】
2018111702000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成30年3月23日(2018.3.23)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
明細書に記載の発明。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１０１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１０１】
これらのデータはすべて、まとめると、ＧＬＰ－１Ｒｃアゴニストの局所眼球投与（点眼剤）が、初期の糖尿病性網膜症において生じる網膜の神経変性プロセスを予防する際に強力な効果を有するという第１の証拠を提供する。データはまた、神経変性が本質的な役割を果たす他の網膜疾患が、ＧＬＰ－１Ｒｃアゴニストの局所眼球投与（点眼剤）により、特に、上記に開示されるペプチドの局所投与により、治療されてもよい及び／又は予防されてもよいという証拠をも提供する。
本出願において引用される参考文献
Schmidtら，“Neurodegenerative Diseases of the Retina and Potential for the Protection and Recovery”，Current Neuropharmacology - 2008，Vol. No. 6，pp.: 164-178
Simoら，“Neurodegeneration is an early event in diabetic retinopathy: therapeutic implications”，Br. J. Ophthalmol. - 2012，vol. 96，pp.1285-1290
Aielloら，“Targeting Intraocular Neovascularization and Edema - One Drop at a Time”，N. Eng. J Med - 2008，vol. 359，pp. 967-969
Urtti Aら，“Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery”. Adv. Drug. Deliv. Rev. 2006，vol. 58，pp. 1131-1135
国際公開第２００７０６２４３４号
Zhangら，“Intravitreal injection of exendin-4 analogue protects retinal cells in early diabetic rats”，Invest Ophthalmol Vis Sci.-2011，vol.52(1)，pp.278-85.
欧州特許第０９４４６４８号
米国特許第５４２４２８６号
Carrascoら，“Lower Somatostatin Expression Is an Early Event in Diabetic Retinopathy and Is Associated With Retinal Neurodegeneration”，Diabetes Care-2007，Vol. No. 30，pp.:2902-2908
Andersonら “Glial and endothelial blood-retinal barrier responses to amyloid-beta in the neural retina of the rat”. Clin Ophthalmol - 2008，Vol. No.: 2，pp.:801-816
＜本発明の更なる実施態様＞
［実施態様１］
網膜神経変性疾患の局所眼治療及び／又は予防における使用のための、網膜に到達することができる１３～５０アミノ酸の配列長を有するペプチドであって、前記ペプチドのＮ

－末端領域が、配列：
ＨＸａａ^{1}ＥＧＴＦＴＳＤＸａａ^{2}ＳＸａａ^{3}Ｘａａ^{4}（配列番号：１）を含み、
Ｘａａ^{1}が、アラニン及びグリシンから選択されるアミノ酸であり、
Ｘａａ^{2}が、バリン及びロイシンから選択されるアミノ酸であり、
Ｘａａ^{3}が、セリン及びリシンから選択されるアミノ酸であり、
Ｘａａ^{4}が、チロシン及びグルタミンから選択されるアミノ酸であり、
ヒスチジンが、Ｎ－末端残基である、ペプチド。
［実施態様２］
配列長が、３０～４０アミノ酸である、実施態様１に記載の使用のためのペプチド。
［実施態様３］
網膜神経変性疾患が、糖尿病性網膜症（ＤＲ）、加齢性黄斑変性症、緑内障、及び色素性網膜炎からなる群から選択される、実施態様１又は２の何れか一つに記載の使用のためのペプチド。
［実施態様４］
網膜神経変性疾患が、糖尿病性網膜症である、実施態様１から３の何れか一つに記載の使用のためのペプチド。
［実施態様５］
初期の糖尿病性網膜症の局所治療において使用される、実施態様４に記載の使用のためのペプチド。
［実施態様６］
Ｘａａ^{1}がアラニンであり、Ｘａａ^{2}がバリンであり、Ｘａａ^{3}がセリンであり、Ｘａａ^{4}がチロシンである、実施態様１から５の何れか一つに記載の使用のためのペプチド。
［実施態様７］
哺乳動物グルカゴン様ペプチド－１である、実施態様１から６の何れか一つに記載の使用のためのペプチド。
［実施態様８］
アミノ酸配列番号：２のヒトグルカゴン様ペプチド－１（７－３７）である、実施態様７に記載の使用のためのペプチド。
［実施態様９］
アミノ酸配列番号：３：
ＨＡＥＧＴＦＴＳＤＶＳＳＹＬＥＧＱＡＡＫＥＦＩＡＷＬＶＲＧＲＧ
を有し、
リシン残基（Ｋ）が、リシン側鎖のアミノ基にアミド結合によって付加された親油性置換基Ｎ$^{\varepsilon}$－（γ－グルタミル（Ｎ$^{\alpha}$－ヘキサデカノイル））を含む、実施態様１から６の何れか一つに記載の使用のためのペプチド。
［実施態様１０］
Ｘａａ^{1}はグリシンであり、Ｘａａ^{2}がロイシンであり、Ｘａａ^{3}がリシンであり、Ｘａａ^{4}がグルタミンである、実施態様１から５の何れか一つに記載の使用のためのペプチド。
［実施態様１１］
アミノ酸配列番号：４：
ＨＧＥＧＴＦＴＳＤＬＳＫＱＭＥＥＥＡＶＲＬＦＩＥＷＬＫＮＧＧＰＳＳＧＡＰＰＰＸａａ^{5}
を有し、
Ｘａａ^{5}が、－ＣＯＯＨ末端が－ＮＨ$_{2}$基と交換されたセリン残基である、実施態様１０に記載の使用のためのペプチド。
［実施態様１２］
アミノ酸配列番号：８：
ＨＧＥＧＴＦＴＳＤＬＳＫＱＭＥＥＥＡＶＲＬＦＩＥＷＬＫＮＧＧＰＳＳＧＡＰＰＳＫＫＫＫＫＸａａ^{6}

を有し、
Ｘａａ^{6}が、－ＣＯＯＨ末端が－ＮＨ$_{2}$基と交換されたリシン残基である、実施態様１０に記載の使用のためのペプチド。
［実施態様１３］
実施態様１から１２の何れか一つにおいて定義されるペプチドを含む、網膜神経変性疾患の局所眼治療及び／又は予防における使用のための薬学的局所眼用組成物。
［実施態様１４］
溶液、クリーム、ローション、軟膏、エマルション、及び懸濁剤からなる群から選択される、実施態様１３に記載の使用のための薬学的局所眼用組成物。
［実施態様１５］
点眼液である、実施態様１３又は１４の何れか一つに記載の使用のための薬学的局所眼用組成物。
［実施態様１６］
網膜神経変性疾患が、糖尿病性網膜症、加齢性黄斑変性症、緑内障、及び色素性網膜炎からなる群から選択される、実施態様１３から１５の何れか一つに記載の使用のための薬学的局所眼用組成物。
［実施態様１７］
網膜神経変性疾患が、糖尿病性網膜症である、実施態様１３から１６の何れか一つに記載の使用のための薬学的局所眼用組成物。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 38/10	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	38/10	
Ａ６１Ｋ 38/16	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	38/16	
Ａ６１Ｋ 38/26	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	38/26	
Ａ６１Ｋ 9/06	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	9/06	
Ａ６１Ｋ 9/08	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	9/08	
Ａ６１Ｋ 9/10	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	9/10	
Ａ６１Ｋ 9/107	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	9/107	

(72)発明者 エルナンデス パスクアル, クリスティーナ
スペイン国 エー０８０１８ バルセロナ, カレール ビルバウ ２０７－２０９, ５階 １号室

Ｆターム(参考) 4C076 AA06 AA11 AA16 AA17 AA22 BB24 CC10 DD21 DD23
4C084 AA01 AA02 BA18 BA19 DB35 MA17 MA22 MA23 MA28 MA58 NA14 ZA331 ZA332
4H045 AA10 AA20 AA30 BA16 BA17 BA18 BA19 CA40 DA30 EA20 FA33

【外国語明細書】
2018111702000001.pdf