(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2004-331674
(P2004-331674A)
(43)公開日　平成16年11月25日(2004.11.25)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
A61K 45/00	A61K	45/00	4C084
A61K 38/22	A61P	1/00	4H045
A61P 1/00	A61P	3/10	
A61P 3/10	A61P	25/02	
A61P 25/02	A61P	43/00　111	

審査請求 有　請求項の数 9　ＯＬ　（全 33 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2004-234571(P2004-234571)
(22)出願日　平成16年8月11日(2004.8.11)
(62)分割の表示　特願平7-508823の分割
原出願日　平成6年9月7日(1994.9.7)
(31)優先権主張番号　118,381
(32)優先日　平成5年9月7日(1993.9.7)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　598133654
アミリン・ファーマシューティカルズ，インコーポレイテッド
ＡＭＹＬＩＮ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬＳ，　ＩＮＣ．
アメリカ合衆国カリフォルニア州９２１２１、サンディエゴ、タウン・センター・ドライブ９３７３番
(74)代理人　100062144
弁理士　青山　葆
(74)代理人　100081422
弁理士　田中　光雄
(74)代理人　100106231
弁理士　矢野　正樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】胃腸の運動性を調節する方法

(57)【要約】
【課題】　本発明は、胃腸の運動性を調節する方法に関する。さらに本発明は、胃が空になることを加速するための、例えば胃の運動性低下および関連疾患の治療におけるアミリンアンタゴニストの使用にも関する。
【解決手段】　治療上有効量のアミリンアンタゴニストを含むことを特徴とする、対象における胃の低運動性および胃が空になることを加速するための治療用医薬組成物の提供。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
治療上有効量のアミリンアンタゴニストを含むことを特徴とする、対象における胃の低運動性の治療用医薬組成物。
【請求項２】
治療上有効量のアミリンアンタゴニストを含むことを特徴とする、対象において胃が空になることを加速するための医薬組成物。
【請求項３】
低運動性が糖尿病性ニューロパシーの結果である請求項１記載の医薬組成物。
【請求項４】
低運動性が糖尿病性ニューロパシーの結果である請求項２記載の医薬組成物。
【請求項５】
低運動性が神経性食欲不振の結果である請求項１記載の医薬組成物。
【請求項６】
低運動性が神経性食欲不振の結果である請求項２記載の医薬組成物。
【請求項７】
アミリンアンタゴニストがアミリン受容体アンタゴニストである請求項１、３および５のいずれか１に記載の医薬組成物。
【請求項８】
アミリンアンタゴニストがアミリン受容体アンタゴニストである請求項２、４および６のいずれか１に記載の医薬組成物。
【請求項９】
アミリンアンタゴニストがアセチル－^{11,18}Arg、^{30}Asn、^{32}Tyr－$^{9-32}$カルシトニン（サケ由来）である請求項７記載の医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、胃腸の運動性を調節する方法に関する。より詳細には、本発明は、胃が空になることを遅延および／または遅滞させることにおいて有用な薬剤により利益を与えられる疾患の治療におけるアミリンまたはアミリンアゴニストの使用に関する。さらに本発明は、胃が空になることを加速するための、例えば胃の運動性低下および関連疾患の治療におけるアミリンアンタゴニストの使用にも関する。
【背景技術】
【０００２】
アミリン
アミリンは３７個のアミノ酸の酸性蛋白ホルモンである。それは単離精製され、ヒト・２型糖尿病の膵臓の島におけるアミロイド沈着物の主成分として化学的に特徴づけられている（クーパー（Cooper）ら,プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・ユーエスエイ（Proc.Natl.Acad.Sci.USA）第８４巻：８６２８～８６３２頁（１９８７年））。アミリン分子は２つの重要な翻訳後修飾を有する：Ｃ末端のアミド化および位置２と７のシステインの架橋によるＮ末端ループの形成である。ヒト・アミリン遺伝子の読み取り枠配列は、Ｌｙｓに対するＮ末端コドンの前のＬｙｓ－Ａｒｇ二塩基性アミノ酸蛋白分解的開裂シグナル、およびアミド化酵素ＰＡＭ（クーパー（Cooper）ら,バイオケミ・バイオフィジ・アクタ（Biochem.Biophys.Acta）第１０１４巻：２４７～２５８頁（１９８９年））によりアミド化される典型的な配列であるCLAIMS－末端位置（CLAIMS-terminal position）におけるＬｙｓ－Ａｒｇ蛋白分解シグナルの前のＧｌｙの存在を示す。アミリンは、１９８７年４月２７日出願の英国特許出願第８７０９８７１号および１９８８年４月２７日、１９８８年１１月２３日ならびに１９８９年５月２日出願の対応する米国出願の主題である。
【０００３】

１型糖尿病において、アミリンは不足しており、例えば、低血糖症のエピソードを制限することにおいて、インスリンとの併用置換がインスリン単独に勝る好ましい治療法として提案されている。糖尿病の治療のためのアミリンの使用は、ジー・ジェオ・エス・クーパー（G.J.S.Cooper）により１９８７年８月２６日に出願された英国特許第８７２０１１５号の主題であり、１９８８年８月２６日に米国特許出願第２３６,９８５号として出願された。アミリンおよびアミリンとインスリンを含有する医薬組成物は、１９９２年６月２３日付与の米国特許第５,１２４,３１４号に記載されている。

【０００４】

過剰なアミリン作用は、２型糖尿病の鍵となる特徴を模倣するものであり、アミリンの遮断が新規治療方法として提案されている。アミリンが、標識グルコースの骨格筋グリコーゲン中への基底の取り込みおよびインスリン刺激された取り込みの両方の減少を引き起こすということが、クーパー,ジー・ジェイ・エスらにより１９８８年１１月２３日に出願された共有の同時係属している米国出願第２７５,４７５号に開示されており、その内容を参照により本明細書に取り入れる。後者の効果もＣＧＲＰにより共有されていることが開示された（レイトン,ビー（Leighton,B.）およびクーパー,ジー・ジェイ・エス（Cooper,G.J.S.）,ネイチャー（Nature）第３３５巻：６３２～６３５頁（１９８８年）も参照）。アミリンおよびＣＧＲＰはほぼ同じ能力を有し、１ないし１０ｎＭで著しい活性を示す。アミリンは、グルコースの骨格筋中へのインスリンにより刺激された取り込みを減少させ、グリコーゲン含量を低下させることも報告されている（ヤング（Young）ら,アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロジー（Amer.J.Physiol.）第２５９巻：４５７～４６１頁（１９９０年））。２型糖尿病およびインスリン耐性のアミリンアンタゴニストでの治療が開示される。

【０００５】

アミリンの化学的構造および遺伝子配列は両方とも、それが生物学的に活性な分子または「メッセンジャー」分子であるという結論を支持すると言われている。化学的構造は、カルシトニン遺伝子関連ペプチド（ＣＧＲＰ）と５０％相同的であり、さらに、血管拡張作用をはじめとする多くの潜在的に生物学的な作用に関する広く分布した神経伝達物質である３７個のアミノ酸の蛋白である。アミリンおよびＣＧＲＰは、２Ｃｙｓ－１Ｃｙｓジスルフィド架橋、およびＣ末端アミドを共有しており、その両方ともが十分な生物学的活性に必要である（クーパーら,プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・ユーエスエイ第８５巻：７７６３～７７６６頁（１９８８年））。

【０００６】

アミリンは、ＣＧＲＰ、インスリン、インスリン様増殖因子およびリラキシンを包含し、共通の遺伝的性質を有している関連ペプチドのファミリーの１のメンバーである可能性がある（クーパー・ジー・ジェイ・エスら,オグ・グロウス・ファクター・リサーチ（Prog.Growth Factor Research）第１巻：９９～１０５頁（１９８９年））。２種のペプチドカルシトニンおよびＣＧＲＰ－１は、初期のｍＲＮＡ転写物の別のプロセッシングが当該２種の別々のペプチドを生み出すカルシトニン遺伝子における共通の生い立ちを有しており、それらは限定された配列相同性（約３０％）のみを共有している（アマラ,エス・ジー（Amara,S.G.）ら,サイエンス（Science）第２２９巻：１０９４～１０９７頁（１９８５年））。アミリン遺伝子配列は分泌メッセンジャー蛋白に典型的なものであり、ゴルジ体または分泌顆粒中での分泌蛋白の生産のためのプロセッシング部位を有するプレプロペプチドをコードしているｍＲＮＡを伴っている。アミリンは主としてインスリンとともにベータ細胞中に局在化しており、プロインスリンからインスリンを生じさせる蛋白分解プロセッシング酵素を共有している可能性がある。

【０００７】

アミリンは、主に膵臓ベータ細胞において合成され、グルコースおよびアルギニンのごとき栄養物による刺激に応答して分泌される。クローン化されたベータ細胞腫瘍系（ムーア（Moore）ら,バイオケミ・バイオフィジ・リサ・コミュニ（Biochem.Biophys.Res. Commun.）第１７９巻（１）（１９９１年））、単離された島（ナカツカ（Nakatsuka）ら,FE

BS Lett.第２５９巻（１）：１９９～２０１頁（１９８９年））および潅流されているラット・膵臓（オガワ（Ogawa）ら,ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲイション（J.Clin.Invest.）第８５巻：９７３～９７６頁（１９９０年））を用いる研究により、グルコースおよびアルギニンのごとき栄養分泌促進物質の１０ないし２０分の短いパルスがアミリンならびにインスリンの放出を刺激することが示されている。分泌蛋白のアミリン：インスリンのモル比は標品により異なるが、約０.０１ないし０.４の範囲であるが、いかなる標品においても刺激の相違によってはさほど変化しないように思われる。しかしながら、グルコースを増加させることにより刺激を延長している間に、アミリン：インスリン比は漸次増加しうる（ゲデュリン（Gedulin）ら,バイオケミ・バイオフィジ・リサ・コミュニ第１８０巻（１）：７８２～７８９頁（１９９１年））。よって、おそらく、遺伝子発現および翻訳速度が依存的に調節されるため、アミリンおよびインスリンは常に一定の比で分泌されるとは限らない。

【０００８】

アミリン様免疫反応性は、そのすべてがウサギ・抗アミリン抗血清を用い、そのほとんどがアッセイ感度向上のために抽出および濃縮を用いる種々のラジオイムノアッセイにより、齧歯類およびヒトの循環血において測定されている。正常なヒトにおいては、１ないし１０ｐＭの絶食時のアミリンレベルおよび５ないし２０ｐＭの食後もしくはグルコース投与後のレベルが報告されている（例えば、ハーラー（Hartter）ら,ダイアベトロジア（Diabetologia）第３４巻：５２～５４頁（１９９１年）；サンケ（Sanke）ら,ダイアベトロジア第３４巻：１２９～１３２頁（１９９１年）：コーダ（Koda）ら,ザ・ランセット（The Lancet）第３３９巻：１１７９～１１８０頁（１９９２年））。肥満かつインスリン耐性の個体においては、食後のアミリンレベルは高くなり、約５０ｐＭにまで達し得る。対照的に、絶食時および食後のインスリン値は、健康人において、それぞれ２０ないし５０ｐＭ、および１００ないし３００ｐＭであり、おそらくインスリン耐性人よりも３～４倍高レベルであろう。１型糖尿病においては、ベータ細胞は破壊され、アミリンレベルは検出レベルまたはそれ以下であり、グルコースに応答して上昇しない（コーダら,ザ・ランセット第３３９巻１１７９～１１８０頁（１９９２年））。正常マウスおよびラットにおいては、基底アミリンレベルは３０ないし１００ｐＭであると報告されているが、齧歯類のある種のインスリン耐性の糖尿病株においては６００ｐＭまでの値が報告されている（例えば、フアング（Huang）ら,ハイパーテンション（Hypertension）第１９巻：Ｉ－１０１－Ｉ－１０９（１９９２年）；ジル（Gill）ら,ライフ・サイエンシズ（Life Sciences）第４８巻：７０３～７１０頁（１９９１年））。

【０００９】

アミリンのある種の作用が、ＣＧＲＰおよびカルシトニンの知られた非代謝的作用と類似であることが見いだされているが、この新たに同定された蛋白の研究中において見いだされたアミリンの代謝的作用はその主たる生物学的役割を反映しているように思われる。著しく血管を拡張させる用量であっても、これらの代謝的作用の少なくともいくつかはＣＧＲＰにより模倣される（例えば、レイトンら,ネイチャー第３３５巻：６３２～６３５頁（１９８８年）；モリナ（Molina）ら,ダイアベーツ（Diabetes）第３９巻：２６０～２６５頁（１９９０年））。

【００１０】

最初に見いだされたアミリンの作用は、グルコースの骨格筋グリコーゲン中へのインスリンにより刺激された取り込みであった（テイトンら,ネイチャー第３３５巻：６３２～６３５頁（１９８８年））。該筋肉はインスリン耐性となった。エクスビボおよびインビトロにおけるラット・ヒラメ筋を用いる引き続き行われた研究により、アミリンがグリコーゲンシンターゼ活性を減じ、不活性ｂ型から活性ａ型へのグリコーゲンホスホリラーゼの変換を促進し、グリコーゲンの正味の損失を促進し（インスリンの存在下または不存在下において）、グルコース－６－リン酸のレイトンを上昇させ、乳酸アウトプットを増加させることが示された（例えば、ディームズ（Deems）ら,バイオケミ・バイオフィジ・リサ・コミュニ第１８１巻（１）：１１６～１２０頁（１９９１年）；ヤング（Young）ら,

FEBS Letts第２８１巻（１,２）：１４９～１５１頁（１９１１年）参照）。アミリンがグルコース輸送自体を妨害するかどうかは不明である（例えば、ヤングら,アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロジー第２５９巻：Ｅ４５７～Ｅ４６１頁（１９９０年）；ツィーラート（Zierath）ら,ダイアベトロジア第３５巻：２６～３１頁（１９９２年）参照）。アミリンおよびインスリン用量応答関係の研究により、アミリンが、骨格筋におけるインスリンの非競争的または機能的アンタゴニストとして作用することが示された（ヤングら,アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロジー第２６３巻（２）：Ｅ２７４～Ｅ２８１頁（１９９２年））。アミリンがインスリンのその受容体への結合または引き続き起こるインスリン受容体キナーゼの活性化を妨害するという証拠はない（フォレット（Follett）ら,クリニカル・リサーチ（Clinical Research）第３９巻（１）：３９Ａ（１９９１年）；コープマンズ（Koopmans）ら,ダイアベトロジア第３４巻：２１８～２２４頁（１９９１年））。骨格筋に対するアミリンの作用はアドレナリン（エピネフリン）の作用に似ている。しかしながら、アドレナリンの作用は大部分がｃＡＭＰにより媒介されると考えられているが、アミリンの作用はｃＡＭＰによっては媒介されない（ディームズら,バイオケミ・バイオフィジ・リサ・コミュニ第１８１巻（１）：１１６～１２０頁（１９９１年）参照）と結論する研究者もいれば、アミリン投与はアデニルシクラーゼを活性化し、骨格筋におけるｃＡＭＰを増加させる（ムーア（Moore）およびリンク（Rink）,ダイアベーツ第４２巻第５号：８２１頁（１９９３年６月））と報告している研究者もおり、そのことは、シンターゼおよびホスホリラーゼのｃＡＭＰ依存性蛋白キナーゼによるホスホリレーションに基づくグリコーゲン代謝に対するその効果の変換と矛盾しない。

【００１１】

アミリンは、形質膜に存在する受容体を通じて作用すると考えられている。グリコーゲン分解の関する律速酵素であるホスホリラーゼａを活性化することによりグリコーゲン分解を促進する受容体により媒介される機構によってアミリンが骨格筋において作用するということが報告されている（ヤング,エイ（Young,A.）ら,FEBS Letters第２８１巻：１４９～１５１頁（１９９１年））。アミリンならびにＣＧＲＰ、およびアンタゴニスト８－３７ＣＧＲＰの効果に関する研究により、アミリンがアミリンに対する受容体を介して作用することが示唆されており（ワング（Wang）ら,FEBS Letts第２１９巻：１９５～１９８頁（１９９１ｂ））、アミリンは主としてＣＧＲＰ受容体において作用しうるという他の研究者の結論（例えば、シャントリー（Chantry）ら,バイオケミ・ジャーナル（Biochem.J.）第２７７巻：１３９～１４３頁（１９９１年）；ガレアザ（Galeazza）ら,ペプタイズ（Peptides）第１２巻：５８５～５９１頁（１９９１年）；ズー（Zhu）ら,バイオケミ・バイオフィジ・リサ・コミュニ第１７７巻（２）：７７１～７７６頁（１９９１年））とは逆である。最近、アミリンアゴニストならびにアンタゴニスト化合物のスクリーニングならびにアッセイのための種々の方法におけるアミリン受容体およびその使用が、１９９２年１０月１日公開の、「リセプター－ベイスド・スクリーニング・メソッズ・フォー・アミリン・アゴニスト・アンド・アンタゴニスツ（Receptor-Based Screening Methods for Amylin Agonists and Antagonists）」と題された国際出願ＰＣＴ／ＵＳ９２／０２１２５に記載された。

【００１２】

アミリンは、インビボでの肝臓の燃料の代謝に対して著しい影響を有するが、アミリンが単離肝細胞または潅流されている肝臓においていかなるアミリンの作用が見られるかどうかについては一般的な同意が得られていない。利用可能なデータは、アミリンが肝臓のグリコーゲン分解を促進する、すなわち、グルカゴンのようには作用しないという考えを支持しない（例えば、スティーブンズ（Stephens）ら,ダイアベーツ第４０巻：３９５～４００頁（１９９１年）；ゴメス（Gomez）ら,バイオケミ・ジャーナル（Biochem.J.）第２７６巻：６０７～６１０頁（１９９１年））。アミリンが肝臓に作用して乳酸のグリコーゲンへの変換を促進し、グルカゴンにより遊離されうるグルコース量を増加させる可能性があることが示唆されている（ローデン(Roden)ら,ダイアベトロジア第３５巻：１１６～１２０頁（１９９２年）参照）。よって、アミリンは、その筋肉における異化作用とは

対照的に、肝臓におけるインスリンに対する同化促進パートナーである可能性がある。

【００１３】

意識のあるラットにおける腎臓血流をはじめとする局部的な血行力学的作用に対するアミリンの効果が最近報告された（ガーディナー（Gardiner）ら,ダイアベーツ第４０巻：９４８～９５１頁（１９９１年））。その著者らは、ラット・アミリンの輸液は、ヒト・α－ＣＧＲＰの輸液時に見られるよりも、腎臓の血管拡張に大いに関連しており、腸間膜血管収縮にはあまり関連していないと記載していた。彼らは、α－ＣＧＲＰよりも腎臓の充血を促進することによってラット・アミリンはレニン－アンギオテンシン系に対してあまり顕著でない刺激を引き起こすことができ、よって、アンギオテンシンIIにより媒介される２次的な血管収縮をあまり引き起こさないと結論した。しかしながら、おそらくはアンギオテンシンIIの無競争の血管収縮剤としての効果により、ヒト・α－８－３７ＣＧＲＰとラット・アミリンとの同時輸液の間は腎臓および腸間膜の血管収縮がマスクされなかったこと、および、この知見はヒト・Ａ－ＣＧＲＰとヒト・α－８－３７ＣＧＲＰとの同時輸液に間に見られた知見と同様であるということも記載されていた。（上記文献９５１頁）。

【００１４】

アミリンは、脂肪細胞においては、その筋肉におけるアドレナリン様作用とは対照的に、インスリンにより刺激されるグルコース摂取、グルコースのトリグリセリド中への取り込み、ＣＯ２産生（クーパー（Cooper）ら,プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・ユーエスエイ第８５巻：７７６３～７７６６頁（１９８８年））、エピネフリンにより刺激される脂質分解、または脂質分解に対するインスリンによる阻害（ルピエン,ジェイ・アール（Lupien,J.R.）およびヤング,エイ・エイ（Young,A.A.）,「ダイアベーツ・ニュートリション・アンド・メタボリズム－クリニカル・アンド・イクスペリメンタル（Diabetes Nutrition and metabolism-Clinical and Experimental）」第６巻（１）,１３～１８頁（１９９３年２月））に対しては検知可能な作用は有していない。よって、アミリンは、骨格筋に対する直接的作用、肝臓に対する著しい間接的（基質の供給による）およびおそらくは直接的効果により、アミリンは組織特異効果を発揮するが、一方では、脂肪細胞はアミリンの存在または不存在に対して「盲目」であるように思われる。

【００１５】

アミリンがインスリン分泌に対して著しい効果を有している可能性がα－ことも報告されている。単離された島（オーサワ（Ohsawa）ら,バイオケミ・バイオフィジ・リサ・コミュニ第１６０巻（２）：９６１～９６７頁（１９８９年））、潅流されている膵臓（シルバーストル（Silverstre）ら,レギュ・ペプタイ（Reg.Pept.）３１－２３－３１（１９９０年））、および無処理のラット（ヤングら,モレ・セル・エンドクリノロ（Mol.Cell.Endocrinol.）第８４巻：Ｒ１～Ｒ５（１９９２年））におけるいくつかの実験は、アミリンがインスリン分泌を抑制方向に調節することを示している。潅流されている膵臓の実験は、アルギニンに対する応答の倹約を伴うグルコースに対する分泌応答の選択的な抑制方向への調節を指摘している。しかしながら、他の研究者は、単離β－細胞、単離された島、または動物全体に対するアミリンの効果を検知することができていない（ブロデリック（Broderick）ら,バイオケミ・バイオフィジ・リサ・コミュニ第１７７巻：９３２～９３８頁（１９９１年）およびその中の文献参照）。

【００１６】

in vivo でのアミリンの最も著しい効果は、血漿ラクテートの迅速な上昇、続く血漿グルコースの上昇の刺激である［ヤング（Ｙoung）ら、ＦＥＢＳレターズ（ＦＥＢＳ Letts)、２８１（１,２）：１４９－１５１（１９９１）]。証拠は、増加したラクテートがグルコース産生のための基質を供給し、アミリン作用がインスリンまたはグルカゴンの変化と無関係に生じることができることを示す。「グルコース・クランプ」実験では、アミリン注入は、末梢グルコース処理を低下させること、および肝臓グルコース排出量のインスリン誘発性抑制を制限することの両方によって、「インスリン耐性」を引き起こす［例え

ば、フロントニ（Ｆrontoni）ら、ダイアビーティーズ（Ｄibetes)、４０：５６８－５７３（１９９１)；クープマンズ（Ｋoopmans）ら、ダイアベトロジア（Ｄiabetologia)、３４、２１８－２２４（１９９１）]。

【００１７】

１８時間断食させて、肝臓グルコーゲンの貯蔵を枯渇させた、軽く麻酔したラットにおいて、アミリン注射は、約０.５から１.５mMの血漿ラクテートの上昇、続く約６から１１mMの血漿グルコースレベルの延長された増加を刺激した。これらの効果は、静脈内注射および皮下注射の両方について観察された［ヤングら、ＦＥＢＳレターズ、２８１(１，２)：１４９－１５１（１９９１）]。摂食したラットにおけるアミリンの効果は、断食した動物におけるその効果から定量的に異なる。おそらく正常な肝臓グルコーゲン貯蔵を有していると思われる摂食したラットにおいて、アミリンは、より著しくかつ延長された血漿ラクテートの上昇を引き起こす；しかしながら、血漿グルコースは、適度に上昇するだけである。アミリンがコーリサイクルの「リターン・リム」（return limb）を促進すること、すなわち、ラクテートへの分解を介する筋肉グリコーゲンは、肝臓糖質新生およびグリコーゲン産生およびおそらくトリグリセリド合成のための基質を提供することが示されている。インスリンは、フォワード・リム（forward limb)、すなわち、グルコースの筋肉への摂取および筋肉グリコーゲンの産生を駆動する。かくして、インスリンおよびアミリンは、食後の肝臓グリコーゲン多血症の「間接的」経路を調整することにおけるパートナーとして見ることもできる。筋内および肝臓の「インスリン耐性」は、アミリンによる正常な生理学的制御下である。

【００１８】

アミリンの代謝作用は、ＣＧＲＰ血管レセプターとの相互作用によって媒介される血管収縮効果を含まない。報告された in vivo 試験は、アミリンが血管収縮薬としてＣＧＲＰよりも少なくとも約１００～１０００倍低いことを示す［ブレイン（Ｂrain）ら、ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・ファーマコロジー（Ｅur.Ｊ.Ｐharmacol.)、１８３：２２２１（１９９０)；ワン（Ｗang）ら、ＦＥＢＳレターズ（ＦＥＢＳ Ｌetts)、２９１：１９５－１９８（１９９１）]。脳へ注射すると、アミリンは、食物摂取を抑制することが報告されており［例えば、チャンス（Ｃhance）ら、Ｂrain Ｒes.、５３９、３５２－３５４（１９９１）]、作用は、ＣＧＲＰおよびカルシトニンと分担した。この作用を媒介する細胞での有効濃度は、知られていない。アリミンは、細胞静止を引き起こす場合の単離した破骨細胞に対して、ならびに、パジェット病のラット、ウサギ、およびヒトにおいて２０％まで血漿カルシウムを低下させることも報告されているin vivo で、共に効果を有することが報告されている［例えば、ギルベイ（Ｇilbey）ら、Ｊ.Ｂone Ｍineral Ｒes.、Ｓ２９３（１９９１）]。入手可能なデータから、アミリンは、これらの作用についてヒトのカルシトニンよりも１０～３０倍低いと思われる。おもしろいことに、アミリンは、破骨細胞ＣＡＭＰ産生を増加させるが、細胞質ゾルCa^{2+}を増加させず、カルシトニンは、共に増加させると思われることが報告された［アラム（Ａlam）ら、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ（Ｂiochem.Ｂiophys.Ｒes.Ｃommun.)、１７９（１）：１４－１３９（１９９１）]。カルシトニンが２つのレセプタータイプを介して作用こと、および、アミリンがこれらの１つと相互作用することが示されたが、確立されていない。

【００１９】

注入用アミリンレセプター拮抗薬を使用して、糖質調節（glucoregulation）を変えてもよい。８－３７ＣＧＲＰは、in vitro および in vivo で証明されたアミリン遮断薬であり［ワン（Ｗang）ら、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ、１８１（３）：１２８８－１２９３（１９９１）]、給餌したラットにおけるアルギニン注入後に糖質調節を変えることが見いだされた［ヤング（Ｙoung）ら、Ｍol.Ｃell.Ｅndocrinol.、８４：Ｒ１－Ｒ５（１９９２）]。グルコース濃度の初期増加は、小島アルファ細胞からのアルギニン刺激グルカゴン分泌に起因する；基礎グルコースのその後の回復は、他の糖質調節ホルモンの変化と一緒にインスリン作用に起因する。

アミリンの作用が８－３７ｈＣＧＲＰの前注入によって遮断されると、初期のグルコース増加は、有意には異ならないが、グルコース濃度において基礎レベル以下にその後に低下し、約８０分後に回復する。かくして、小島分泌促進薬によるこの攻撃の後の糖質調節は、アミリンレセプター拮抗薬の注入によって変えられた。さらに、インスリン濃度は、半時間おきに測定され、アルギニン注入の３０分後のインスリン濃度は、アミリンレセプター拮抗薬を注入した動物における方が正常な対照のほとんど２倍高かったことが判明した。８－３７ＣＧＲＰは、また、有効なＣＧＲＰ拮抗薬でもある。しかしながら、ＣＧＲＰレセプターと比較してアミリンレセプターについて選択的である他のアミリン拮抗薬ＡＣ６６について、非常に類似の結果が見られた［ヤングら、Ｍol.Ｃell.Ｅndocrino.、８４：Ｒ１－Ｒ５（１９９２）］。これらの結果は、アミリン作用の遮断が２型糖尿病における重要な治療利益を発揮することができるという結論を支持すると言われている。

【００２０】

１型糖尿病の患者は、インスリンの欠乏に加えて、顕著なアミリン欠損を有することが報告されている。前記のとおり、データは、膵臓ベータ細胞によるアミリン発現および分泌が１型糖尿病において存在しないか、または、正常以下であることを示す。１型糖尿病のいくつかの動物モデルにおいて、アミリン分泌および遺伝子発現は、抑制される［クーパー（Ｃooper）ら、ダイアビーティス（Ｄiabetes)、４９７－５００（１９９１）；オガワ（Ｏgaawa）ら、ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション（Ｊ.Ｃlin.Ｉnvest.)、８５：９７３－９７６（１９９０）］。１型糖尿病患者における血漿アミリンの測定は、一晩断食した後、これらの患者においてアミリンが欠失していること、および、グルコース負荷がアミリンレベルの増加を顕著にしないことを示す［コーダ（Ｋoda）ら、ザ・ランセット（Ｔhe Ｌancet)、３３９：１１７９－１１８０（１９９２）］。

【００２１】

驚くべきことに、前記レニン血管拡張薬および他の特性を考慮して、アミリンは、血圧の障害を回避する方法で皮下投与した場合に無傷のラットにおける血漿レニン活性を顕著に増加することも見いだされた。これは、低下した血圧がレニン放出に対して強い刺激であるので、重要である。ＣＧＲＰおよび／またはカルシトニンレセプターと比較してアミリンレセプターについて選択的なものを含むアミリンレセプター拮抗薬などのアミリン拮抗薬を使用して、血漿レニン活性のアミリン誘発性上昇を遮断することができる。これらの予想外の発見は、アミリン拮抗薬が高血圧症および心不全ならびに上昇した不適切または望ましくないレニン活性に関連する他の障害における結果として生じる治療利益により血漿レニン活性を低下させるという判断を支持する。さらにまた、アミリン拮抗薬の、インスリン耐性および高血圧症および心臓病にしばしば関連する他の一般的な代謝障害を好ましく調節するさらなる能力は、特に望ましい治療プロフィールを提供する。

【００２２】

胃運動性減弱

液体および／または固体内容物を空にするのが遅延する胃運動性減弱は、多くの胃腸障害の成分である。一般的なディスカッションについては、グッドマン・アンド・ギルマンズ・ザ・ファーマコロジカル・ベイシス・オブ・セラピューティクス（Ｇoodman and Ｇilman's Ｔhe Ｐharmacological Ｂasis of Ｔherapeutics)、第３８章［ペルガモン・プレス（Ｐergamon Ｐress)、第８版、１９９０］を参照。かかる障害の症候は、悪心、嘔吐、胸やけ、食後の不快感、および消化不良が挙げられる。胃食道逆流は、しばしば明らかであり、食道潰瘍を引き起こすことがある；各々、喘息または心筋梗塞と混同することがある呼吸性症候または胸骨下の激痛でもある。原因は、患者の大部分において知られていないが、胃の静止または運動性減弱は、しばしば、糖尿病ニューロパシーの結果である；この状態は、しばしば、神経性食欲不振症または無酸症または胃の手術後の患者にも存在する。

【００２３】

胃運動性減弱に罹っている患者の医療管理は、通常、プロカイネティック剤の投与を含む。制吐薬フェノチアジンまたはベタネコールは、多少の免荷を与えるが、これらの薬物

は、患者のほとんど大部分において胃を空にすることを速めず、しばしば、許容されない副作用を生じる。現在、入手可能なプロカイネティック剤としては、メトクロプラミドおよびシスアプライド（cisapride）が挙げられるが、他のもの（例えば、ドンペリドン）は、評価されている。

【００２４】

メトクロプラミドは、胃の上部における受容弛緩を低下させ、腔の収縮を増大させる。幽門および十二指腸は、弛緩され、一方、下部食道括約筋のトーンは、増強される。これらの効果は、協働して、胃の内容物を空にすることを速め、十二指腸および胃から食道への逆流を減少させる。さらに、十二指腸から回盲弁までの物質の移動時間は、空腸の蠕動が増加した結果、減少する。メトクロプラミドは、胃分泌または結腸運動性に対しては、あまり効果を有しない。

【００２５】

一般に、ドーパミン作用薬は、反対パターンの効果を生じ、これらは、胃腸管内の少なくとも一部に所在するＤ２レセプターによって媒介される。

【００２６】

メトクロプラミドの作用のメカニズムは、それが明らかにドーパミン作動性拮抗薬であり、ドーパミン作動性作用薬の局所的または全身系投与によって生じた胃腸効果を遮断することができる場合でさえ、あまり理解されていない。迷走神経切断手術は、メカニズムの効果を完全に破壊しないが、そのプロカイネティック作用は、アトロピンまたは他のムスカリン様拮抗薬によって遮断することができる。さらにまた、全てのドーパミン様拮抗薬が胃を空にすることを促進するとは限らない。該薬物は、腸管筋ニューロンからのアセチルコリンの放出を促進すると思われるが、この作用の直接的な証拠は、欠けている。ベタネコールは、メトクロプラミドの効果を増強することができるので、アセチルコリンに対する増強された反応性も関係する。

【００２７】

ドンペリドンは、プロカイネティックおよび制吐特性の両方を有するベンザイミダゾールの誘導体である。それは、ドーパミン様拮抗薬であり、それは、著しい過プロラクチン血症を生じる；胃腸運動性に対するその効果は、メトクロプラミドのものと非常によく似ている。しかしながら、メトクロプラミドとは異なって、これらの効果は、アトロピンによって拮抗されない；この差異についての説明は、なお、行われていない。ドンペリドンは、限定された範囲だけに血液－脳障害を交差させ、それは、非常にまれに、錐体外路副作用を引き起こす。結果として、それは、パーキンソン病の治療を妨害せず、レボドパおよびブロモクリプチンによって生じる胃腸障害を拮抗する際に有用である。かくして、該薬物は、胃運動性減弱に罹っている患者の治療においてメトクロプラミドと同様の治療有用性を有すると思われる。しかしながら、それは、あまり制吐活性を有していない。ドンペリドンは、経口投与後に迅速に吸収されると思われるが、その生物学的利用能は、約１５％に過ぎない；該薬物のほとんどおよびその代謝物は、便で排泄される。その血漿からの放出についての半減期は、約７～８時間である。ドンペリドンは、一般に、米国においては入手可能ではない；それは、他には、ＭＯＴＩＬＩＵＭとして入手可能である。最適な投与量は、確立されていないが、胃運動性減弱の治療では、４０～１２０㎎の経口日用量が利用されている。

【００２８】

シスアプライドは、ベンズアミドであり、胃および小腸の運動性に対するその効果は、メトクロプラミドおよびドンペリドンのものと非常に似ている；しかしながら、これらの薬物とは異なって、それは、結腸運動性も増加させ、下痢を引き起こすこともある。その胃腸作用のメカニズムは、あまり理解されていない。メトクロプラミドと同様に、これらの作用は、アトロピンによって遮断され、腸管筋アセチルコリンの放出に関係する。シスアプライドは、ドーパミン遮断活性が欠けていると思われ、それは、血漿におけるプロラクチンの濃度に影響を及ぼさないか、または、錐体外路症候群を生じる。該薬物は、ラット回腸における５－ＨＴ２トリプトアミン作動性レセプターに結合し、該レセプターをブ

ロックするが、ヒトにおけるこの作用とその効果との関係は、確立されていない。かくして、胃運動性減弱の障害の治療における該薬物の効力は、ドーパミン作動性遮断薬により生じる副作用を伴わずに、メトクロプラミドおよびドンペリドンの効力と等しいと思われる。さらに、シスアプライドは、脊髄損傷による慢性突発性便秘症または慢性運動性減弱に罹っている患者の治療において有用である。

【００２９】

前記と対照的に、胃を空にするのを遅延させる薬物は、さらに医薬において、特に、胃腸Ｘ線試験における診断助剤としての地位を見いだした。例えば、グルカゴンは、ランゲルハンス膵島のアルファ細胞によって産生されるポリペプチドホルモンである。それは、肝臓糖原分解を活性化することによってグルコースを代謝する血糖上昇薬である。それは、より少ない程度に膵臓インスリンの分泌を刺激することができる。グルカゴンは、グルカゴン塩酸塩として投与される；投与量は、通常、グルカゴンとして表す。

【００３０】

グルカゴンは、グルコースの静脈内投与が可能ではない場合、インスリン誘発性低血糖症の治療において使用される。それは、皮下注射、筋肉内注射または静脈内注射によって０.５～１mg（単位）の投与量で投与され、必要な場合は、２０分後に繰り返される。しかしながら、グルカゴンは、胃腸管の運動性を低下させるので、胃腸Ｘ線試験における診断助剤として使用される。投与経路は、診断法に依存する。筋肉内投与される１～２mg（単位）の投与量は、４～１４分の作用の開始および１０～４０分の効果の期間を有する；静脈内投与される０.２～２mg（単位）は、１分以内に効果を生じ、９～２５分間持続する。

【００３１】

グルカゴンは、痙攣に関連する種々の痛い胃腸障害を治療するためのいくつかの研究において使用された。ダニエル（Daniel）ら［Br.Med.J.、１９７４、３、７２０］は、鎮痛薬または鎮痙薬で処置された患者と比較してグルカゴンで処置された患者において急性憩室炎のより迅速な症候性免荷を報告した。グラウザー（Glauser）ら［J.Am.Coll.Emergency Physns.、１９７９、８、２２８］によるレビューには、グルカゴン治療後の急性食道食物閉塞症の免荷が開示されている。別の研究では、グルカゴンは、プラシーボで処置された２２人の患者と比較して胆道疾患に罹っている２１人の患者において痛みおよび圧痛を有意に免荷した［エム・ジェイ・ストワー（M.J.Stower）ら、Br.J.Surg.、１９８２、６９、５９１－２］。しかしながら、フランケン（Franken）ら［レイディオロジー（Radiology)、１９８３、１４６、６８７］は、３０人の子供の研究において、回結腸重積症の静水学的減少におけるプラシーボよりもグルカゴンの方が優れていることを示さなかった。ウエブ（Webb）ら［Med.J.Aust.、１９８６、１４４、１２４］は、グルカゴンが救急医療室における尿管仙痛の管理において効果的でないと推断した。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【００３２】

本発明は、胃腸の運動性を調節する方法に関する。さらに本発明は、胃が空になることを加速するための、例えば胃の運動性低下および関連疾患の治療におけるアミリンアンタゴニストの使用にも関する。

【課題を解決するための手段】

【００３３】

本発明者らは、その以前に報告されている血糖上昇特性を考慮すると驚くべきことに、アミリンおよびアミリンアゴニスト（本明細書に記載のとおり、例えばアミリンアゴニストアナログ^{25,28,29}Pro-h-アミリン（「ＡＣ－０１３７」とも称する）を含む）が、かかる化合物の食事後血漿グルコース値減少能により示されるとおり、胃運動性を減少させ、かつ胃が空になるのを遅延させ得ることを見いだした。

【００３４】

本発明は、アミリンまたはアミリンアゴニスト、例えばアミリンアゴニストＡＣ－０１３７を投与することよりなる、胃運動性を減少させ、かつ胃が空になるのを遅延させる新規方法に関する。これらの方法は、例えば、２型（インスリン非依存性）糖尿病に関連した合併症である食事後高血糖症の治療において有用であろう。

【００３５】

「アミリン」なる語は、例えば、出典明示によりその内容を本明細書に一部とする、「高血糖組成物（Hyperglycemic Composition）」について１９９３年８月１０日付けで付与された米国特許第５,２３４,９０６号においてヤング（Young）およびクーパー（Cooper）により定義されたような化合物を包含すると理解される。例えば、それは、アミリンと称され膵臓のベータ細胞から分泌されるヒトペプチドホルモンおよびその種変異物を含む。「アミリンアゴニスト」もまた、当該分野で公知の語であり、アミリンの作用を真似る化合物を意味する。したがって、アミリン自体およびアミリンアゴニストアナログもまた、広義にアミリンアゴニストと称される。「アミリンアゴニストアナログ」なる語は、アミリンアゴニストとして作用するアミリンの誘導体を意味すると理解される。通常、それは、アミリン受容体または他の受容体またはアミリン自体が相互作用して上記生物活性を誘導し得る受容体に結合することにより、あるいはそれに直接的または間接的に相互作用することによると現在考えられている。本明細書に開示するものに加え、他の有用なアミリンアゴニストアナログが、出典明示によりその内容を本明細書の一部とする「低血糖症および糖尿病の治療および予防に使用される新規アミリンアゴニストペプチド（New Amylin Agonist Peptides Used for Treatment and Prevention of Hypoglycemia and Diabetes Mellitus）」という表題の国際出願ＷＰＩ　ＡＣＣ.第９３－１８２４８８／２２号で同定されている。

【００３６】

第１の態様において、本発明は、治療的に有効量のアミリンまたはアミリンアゴニスト、好ましくはアミリンアゴニストアナログを対象に投与することにより、該対象において胃腸運動性を有益に調節する方法よりなる。１つの具体例において、本発明の方法は、胃運動性の減少に関する。もう１つの具体例において、本発明は、胃が空になるのを遅延させる方法に関する。

【００３７】

これらの方法は、胃腸診断処置、例えば放射線検査または磁気共鳴イメージングを受ける対象に使用してもよい。あるいは、これらの方法は、胃腸障害、例えば痙攣（胆管の障害またはオッディ括約筋の障害である急性膵室炎関連していてもよい）を患う対象において胃運動性を減少させるために使用してもよい。

【００３８】

もう１つの態様において、本発明は、治療的に有効量のアミリンアゴニストを対象に投与することによる、該対象における食事後ダンピング症候群の治療法に関する。

【００３９】

またもう１つの態様において、本発明は、治療的に有効量のアミリンアゴニストを対象に投与することによる食事後高血糖症の治療法に関する。好ましい具体例においては、該食事後高血糖症は、２型糖尿病の結果である。

【００４０】

好ましいアミリンアゴニストは、^{25,28,29}Pro-h-アミリンを包含する。また、好ましいアミリンアゴニストアナログは、^{25,28,29}Pro-h-アミリンを包含する。

【００４１】

もう１つの態様において、本発明は、治療的に有効量のアミリンアンタゴニストを対象に投与することによる、該対象における胃運動性減弱の治療法に関する。好ましい具体例において、これらの方法は、運動性減弱が糖尿病性ニューロパシーの結果である場合、あるいは運動性減弱が神経性食欲不振の結果である場合に使用してもよい。また、運動性減弱は、塩酸欠乏症の結果として、あるいは胃手術の結果として起こったものであってもよい。

【００４２】
もう１つの態様において、本発明は、治療的に有効量のアミリンアンタゴニストを対象に投与することによる、該対象において胃が空になるのを促進する方法に関する。アミリンアンタゴニストは、アミリンの作用を阻害する化合物、例えばそれ自体は重要な薬理活性を欠くが、特異的アゴニストの作用を阻害することにより、例えばアゴニスト結合部位に関して競合することにより作用を起こす化合物を意味する。好ましくは、これらの方法で用いるアミリンアンタゴニストは、アミリン受容体アンタゴニストである。好ましいアンタゴニストは、アセチル－^{11,18}Arg、^{30}Asn、^{32}Tyr$^{9-32}$カルシトニン（サケ）である。
【００４３】
もう１つの態様において、本発明は、胃内容物の小腸への通過の抑制または減少に有効な量のアミリンまたはアミリンアゴニストを投与し、胃内容物を吸引することによる、毒素摂取の治療法に関する。
【発明を実施するための最良の形態】
【００４４】
本発明に有用な種々のアミリンアゴニストアナログ化合物の名称を使用して、配列が基づくペプチドおよびいずれかの基礎ペプチドアミリン配列（例、ヒトアミリン）への修飾の両方を示すことができる。上つき数字に続くアミノ酸は、該表示アミノ酸が、基礎アミノ酸配列の上つきのアミノ酸位置で、通常存在するアミノ酸を置換することを示す。例えば、「^{18}Arg^{25,28}Pro-h-アミリン」は、以下の置換を有する「h-アミリン」または「ヒト－アミリン」の配列に基づくペプチドを意味する：残基１８でHisと置換するArg、残基２５でAlaと置換するProおよび残基２８でSerと置換するPro。「des-^{1}Lys-h-アミリン」なる語は、１番目またはＮ末端のアミノ酸が欠失したヒトアミリンの配列に基づくペプチドを意味する。
【００４５】
本発明のアミリンのアゴニストアナログは、その薬理学的性質を考慮すると有用である。アミリンアゴニスト剤として活性は、以下に記載する受容体結合検定およびヒラメ筋検定における活性により示すことができる。また、本明細書に記載のとおり、化合物のアミリンアゴニスト活性も、哺乳動物において高カルシウム血症および／または高血糖を誘導する能力または食事後血漿グルコース値を減少させる能力により評価し得る。
【００４６】
好ましいアミリンアゴニストアナログ化合物であるdes-^{1}Lys-h-アミリン、^{28}Pro-h-アミリン、^{25,28,29}Pro-h-アミリン、^{18}Arg^{25,28}Pro-h-アミリンおよびdes-^{1}Lys^{18}Arg^{25,28}Pro-h-アミリンはすべて、処理された試験動物においてインビボでアミリン活性を示し、著しい高乳糖、ついで高血糖を起こす。また、ある種の好ましい化合物は、アミリンに特徴的な活性に加え、ヒトアミリンと比較した場合、より望ましい溶解性および安定性特性を有することが判明している。これらの好ましい化合物は、^{25}Pro^{26}Val^{28,29}Pro-h-アミリン、^{25,28,29}Pro-h-アミリン（本明細書中、「ＡＣ－０１３７」とも称する）および^{18}Arg^{25,28}Pro-h-アミリンを包含する。
【００４７】
本発明の方法は、アミリンまたはアミリンアゴニストアナログ、例えばアミリン受容体アゴニストアナログ、例えば^{18}Arg^{25,28}Pro-h-アミリン、
des-^{1}Lys^{18}Arg^{25,28}Pro-h-アミリン、^{18}Arg^{25,28,29}Pro-h-アミリン、des-^{1}Lys^{18}Arg^{25,28,29}Pro-h-アミリン、^{25,28,29}Pro-h-アミリン、des-^{1}Lys^{25,28,29}Pro-h-アミリンおよび^{25}Pro^{26}Val^{25,28}Pro-h-アミリンを包含するアミリンアゴニストを用いることができる。他の適切なアミリンアゴニストアナログには、以下のものが包含される。
【００４８】
^{23}Leu^{25}Pro^{26}Val^{28,29}Pro-h-アミリン；

^{23}Leu^{25}Pro^{26}Val^{28}Pro-h-アミリン;
des-^{1}Lys^{23}Leu^{25}Pro^{26}Val^{28}Pro-h-アミリン;
^{18}Arg^{23}Leu^{25}Pro^{26}Val^{28}Pro-h-アミリン;
^{18}Arg^{23}Leu^{25,28,29}Pro-h-アミリン;
^{16}Arg^{23}Leu^{25,28}Pro-h-アミリン;
^{17}Ile^{23}Leu^{25,28,29}Pro-h-アミリン;
^{17}Ile^{25,28,29}Pro-h-アミリン;
des-^{1}Lys^{17}Ile^{23}Leu^{25,28,29}Pro-h-アミリン;
^{17}Ile^{18}Arg^{23}Leu-h-アミリン;
^{17}Ile^{18}Arg^{23}Leu^{26}Val^{29}Pro-h-アミリン;
^{17}Ile^{18}Arg^{23}Leu^{25}Pro^{26}Val^{28,29}Pro-h-アミリン;
^{13}Thr^{21}His^{23}Leu^{26}Ala^{28}Leu^{29}Pro^{31}Asp-h-アミリン;
^{13}Thr^{21}His^{23}Leu^{26}Ala^{29}Pro^{31}Asp-h-アミリン;
des-^{1}Lys^{13}Thr^{21}His^{23}Leu^{26}Ala^{28}Pro^{31}Asp-h-アミリン;
^{13}Thr^{18}Arg^{21}His^{23}Leu^{26}Ala^{29}Pro^{31}Asp-h-アミリン;
^{13}Thr^{18}Arg^{21}His^{23}Leu^{26}Ala^{28,29}Pro^{31}Asp-h-アミリン;および
^{13}Thr^{18}Arg^{21}His^{23}Leu^{25}Pro^{26}Ala^{28,29}Pro^{31}Asp-h-アミリン。

【００４９】

さらに、アミリンアゴニストアナログを包含するアミリンアゴニストが、出典明示によりその開示を本明細書の一部とするＷＰＩ Ａcc第９３－１８２４８８／２２号、「低血糖症および糖尿病の治療および予防に使用される新規アミリンアゴニストペプチド（New Amylin Agonist Peptides Used for Treatment and Prevention of Hypoglycemia and Diabetes Mellitus）」に開示されている。

【００５０】

アミリンアゴニストの活性は、本明細書に記載のある種の生物学的検定を用いて評価してもよい。該受容体結合検定によりアミリンアゴニストおよびアンタゴニストの双方の候補物を同定することができ、該受容体結合検定を結合の評価に使用することができる。一方、ヒラメ筋検定は、アミリンアゴニストとアンタゴニストとを識別する。アミリンまたはアミリンアゴニストが胃運動性に及ぼす影響は、以下の実施例に記載する方法、または胃運動性を測定する他の当該分野で公知のまたは等価な方法を使用して同定し、評価しまたはスクリーニングすることができる。

【００５１】

化合物が胃運動性を遅延させる能力を同定または評価するための１つのかかる方法は、（ａ）１以上の試験化合物よりなる試験試料および胃運動性を評価するための系であって例えばグルコースまたは食事の該系への導入に反応して上昇した血漿グルコースにより特徴づけられる系よりなる試験系を一緒にし、（ｂ）該系における血漿グルコースの上昇の存在または量を測定することを特徴とする。陽性および／または陰性の対照もまた同様に使用し得る。所望により、該試験系に一定量のアミリンアンタゴニスト（例、８－３２サケカルシトニン）を加えてもよい。

【００５２】

好ましくは、アゴニスト化合物は、該受容体結合検定において約１～５nM未満、好ましくは約１nM未満、より好ましくは約５０pM未満のオーダーで活性を示す。ヒラメ筋検定においては、これらの化合物は、好ましくは、約１～１０マイクロモル未満のオーダーでＥＣ５０値を示す。

【００５３】

該受容体結合検定は、出典明示によりその開示を本明細書の一部とする１９９１年３月１５日付けで出願され、１９９２年１０月１日付けで国際出願番号ＰＣＴ／ＵＳ９２／０２１２５として公開された米国特許出願第６７０,２３１号に記載されている。該受容体結合検定は、化合物が膜結合アミリン受容体へ特異的に結合する能力を測定する競合検定である。該検定で使用する膜調製物の好ましい材料は、中隔側坐核および周囲の領域から

の膜よりなる基底前脳である。検定されている化合物は、これらの受容体調製物への結合について１２５Ｉボルトンハンター（Bolton Hunter）ラットアミリンと競合する。４－パラメーターロジスティック式（インプロットプログラム（Inplot program），GraphPAD Software, San Diego, California）またはデリーン（DeLean）らのオールフィットプログラム（ALLFIT program）(ALLFIT Version2.7(NIH, Bethesda, MD 20892))への非線形回帰による分析結果を用い、リガンドの濃度の対数関数として結合量（Ｂ）をプロットした競合曲線をコンピューターで分析する（マンソン，ピー（Munson, P.）およびロッドバード，ディー（Rodbard, D.），Anal. Biochem. 107: 220-239 (1980)）。

【００５４】

ひらめ筋中のアミリン・アゴニストアナログ調製物を包含するアミリン・アゴニストの生物活性のアッセイは、以前に記載されている方法を用いて行った(レイトン,ビイ(Ｌeighton,Ｂ.)およびクーパー,ジイ・ジェイ・エス(Ｃopper,Ｇ.Ｊ.Ｓ.)ネイチャー(Ｎature)第３３５巻：６３２-６３５頁(１９８８年)；クーパー,ジイ・ジェイ・エス(Ｃopper,Ｇ.Ｊ.Ｓ.)ら、プロシーディングズ・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・イン・ユウエスエイ(Ｐroc.Ｎatl.Ａcad.Ｓci.ＵＳＡ)第８５巻：７７６３-７７６６頁(１９８８年))。要約すれば、ひらめ筋におけるインスリン-刺激性のグリコーゲン合成の阻害を測定することによってアミリン・アゴニスト活性を評価した。アミリン・アゴニスト活性は、１００ｎＭラット・アミリンおよびアミリン・アンタゴニストの存在下にてインスリン-刺激性のグリコーゲン合成の回収を測定することによって評価した。無担体-緩衝液に溶解したペプチドの濃度は、本明細書中に記載するごとく、定量性アミノ酸分析によって測定した。本アッセイにおいてアゴニストとして作用する化合物の能力は、ＥＣ５０値を測定することによって判断した。標準誤差は、４パラメーターの論理式を用いた用量応答性Ｓ字曲線のフィッティングによって算出した(ド・リーン,エイ(Ｄe Ｌean,Ａ)、ムンソン,ピイ・ジェイ(Ｍunson,Ｐ.Ｊ.)、ガーダバッソ,ブイ(Ｇardabasso,Ｖ.)およびロッドバード,ディー(Ｒodbard,Ｄ.)ＡＬＬＦＩＴ、バージョン２.７(１９８８年)、メリーランド州、ベセスダ(Ｂethesda,ＭＤ)のＮ.Ｉ.Ｈ.ナショナル・インスティチュート・オブ・チャイルド・ヘルス・アンド・ヒューマン・デベロップメント(National Institute of Child Health and Human Development)、１ディスケット)。これらの生物アッセイを用いて、多くのアミリン・アゴニストが特徴付けられてきた。化合物^{18}Arg^{25,28}Pro-h-アミリン、デス^{1}Lys^{18}Arg^{25,28}Pro-h-アミリン、^{18}Arg^{25,28,29}Pro-h-アミリン、デス-^{1}Lys^{18}Arg^{25,28,29}Pro-h-アミリン、^{25,28,29}Pro-h-アミリン、デス-^{1}Lys^{25,28,29}Pro-h-アミリン、および^{25}Pro^{26}Val^{25,28}Pro-h-アミリンは、全てアミリンと競合することが受容体結合アッセイで見出された。ひらめ筋アッセイによって測定したところ、これらの化合物は無視できる程度のアンタゴニスト活性を有しており、アミリン・アゴニストとして作用することが示された。同様な結果は、前に掲載した他のアゴニスト化合物でも得られた。

【００５５】

胃の運動性減弱を治療する方法に有用なアミリン・アンタゴニスト化合物には、(出典明示して本明細書の一部とみなす)１９９１年１１月１９日に出願された米国特許出願番号０７/７９４,２８８に記載されている化合物が包含される。

【００５６】

前記したごとき化合物は、標準的な固相-ペプチド合成技術を用いて調製できるが、自動化または半自動化ペプチド・シンセサイザーを用いるのが好ましい。典型的に、α-Ｎ-カルバモイル保護アミノ酸と、樹脂上で成長するペプチド鎖に結合したアミノ酸とを、ジイソプロピルエチルアミンのごとき塩基存在下、ジシクロヘキシルカルボジイミドおよび１-ヒドロキシベンゾトリアゾールのごときカップリング剤を入れたジメチルホルムアミド、Ｎ-メチルピロリジノンまたは塩化メチレンのごとき不活性溶媒中、室温にてカップリングさせた。トリフルオロ酢酸またはピペリジンのごとき試薬を用いて、得られるペプチド-樹脂からα-Ｎ-カルバモイル保護基を除去し、該ペプチド鎖に付加すべき次の所望のＮ-保護アミノ酸で該カップリング反応を繰返す。適当なＮ-保護基は当該分野でよく知

られており、本明細書ではｔ-ブチルオキシカルボニル(ｔＢoc)およびフルオレニルメトキシカルボニル(Ｆmoc)が好ましい。

【００５７】

特に断らない限り、ペプチド・シンセサイザーで用いる溶媒、アミノ酸誘導体および４-メチルベンズヒドリル-アミン樹脂は、アプライド・バイオシステムズ,インコーポレイテッド(Ａpplied Ｂiosystems Ｉnc.)社(カルフォルニア州、フォスター・シティー(Ｆoster Ｃity,ＣＡ))から購入した。アプライド・バイオシステムズ,インコーポレイテッド社から購入し、用いる側鎖保護アミノ酸には以下のもの：Ｂoc-Ａrg(Ｍts)、Ｆmoc-Ａrg(Ｐmc)、Ｂoc-Ｔhr(Ｂzl)、Ｆmoc-Ｔhr(ｔ-Ｂu)、Ｂoc-Ｓer(Ｂzl)、Ｆmoc-Ｓer(ｔ-Ｂu)、Ｂoc-Ｔyr(ＢrＺ)、Ｆmoc-Ｔyr(ｔ-Ｂu)、Ｂoc-Ｌys(Ｃl-Ｚ)、Ｆmoc-Ｌys(Ｂoc)、Ｂoc-Ｇlu(Ｂzl)、Ｆmoc-Ｇlu(ｔ-Ｂu)、Ｆmoc-Ｈis(Ｔrt)、Ｆmoc-Ａsn(Ｔrt)、およびＦmoc-Ｇln(Ｔrt)が含まれる。Ｂoc-Ｈis(ＢＯＭ)は、アプライド・バイオシステムズ,インコーポレイテッド(Ａpplied Ｂiosystems,Ｉnc.)社またはバケム,インコーポレイテッド(Ｂachem,Ｉnc.)社(カルフォルニア州、トランス(Ｔorrance,ＣＡ))から購入した。アニゾール、メチルスルフィド、フェノール、エタンジチオールおよびチオアニゾールは、アルドリッチ・ケミカル・カンパニー(Ａldrich Ｃhemical Ｃompany)社(ワイオミング州、ミルウォーキー(Ｍilwaukee,ＷＩ))から購入した。ＨＦはエアー・プロダクツ・アンド・ケミカルズ(Ａir Ｐroducts and Ｃhemicals)社(ペンシルベニア州、アレンタウン(Ａllentown,ＰＡ))から供給した。エチルエーテル、酢酸およびメタノールは、フィッシャー・サイエンティフィック(Ｆisher Ｓcientific)社(ペンシルベニア州、ピッツバーグ(Ｐttsburgh,ＰＡ))から購入した。

【００５８】

固相ペプチド合成は、カップリング剤と共に、ＮＭＰ/ＨＯＢｔ(オプション１)システムおよびｔＢocまたはＦmoc化学(ＡＢＩ ４３０Ａペプチド・シンセサイザー用のアプライド・バイオシステムズ・ユーザー・マニュアル、バージョン１.３Ｂ、１９８８年7月１日、セクション６、４９-７０頁参照)を用いて、自動ペプチド・シンセサイザー(モデル４３０Ａ、カリフォルニア州、フォスターのアプライド・バイオシステムズ,インコーポレイテッド社)で行った。Ｂoc-ペプチド樹脂はＨＦで切断した(-５℃～０℃、１時間)。ペプチドは、交換水および酢酸で樹脂から抽出し、その濾液を凍結乾燥した。Ｆmoc-ペプチド樹脂は、標準的な方法に従って切断した(「切断技術の概要(Ｉntroduction to Ｃleavage Ｔechniques)」アプライド・バイオシステムズ,インコーポレイテッド(Ａpplied Ｂiosystems,Ｉnc)社、１９９０年、６-１２頁)。また、ある種のペプチドは、アドバンスド・ケム・テック・シンセサイザー(Advanced Chem Tech Synthesizer)(モデルＭＰＳ３５０、ケンタッキー州、ルイスビレ(Ｌouisville,Ｋentucky))を用いて会合させた。ペプチドは、ウォーターズ・デルタ・プレップ(Waters Ｄelta Ｐrep)３０００システムを用いたＲＰ-ＨＰＬＣ(分取および分析用)によって精製した。Ｃ４、Ｃ８、Ｃ１８分取用カラム(１０μ、２.２×２５ｃｍ；カリフォルニア州、ヘスペリア(Ｈesperia,ＣＡ)のビダック(Ｖydac)社)を用いてペプチドを単離し、その純度はＣ４、Ｃ８またはＣ１８分析用カラム(５μ、０.４６×２５ｃｍ；ビダック(Ｖydac)社)を用いて測定した。溶媒(Ａ＝０.１％ＴＦＡ/水およびＢ＝０.１％ＴＦＡ/ＣＨ３ＣＮ)は、流速１.０ｍｌ/分で分析用カラムに、１５ｍｌ/分の流速で分取用カラムにデリバリーした。アミノ酸分析は、ウォーターズ・ピコ・タッグ・システム(Waters Ｐico Ｔag system)上で行い、マキシム・プログラム(Ｍaxima program)を用いて処理した。ペプチドは、蒸気-相酸加水分解(１１５℃、２０-２４時間)によって加水分解した。加水分解物は、標準的な方法によって誘導化し分析した(コーエン,エス・エイ(Ｃohen,Ｓ.Ａ.)、メイズ,エム(Ｍeys,Ｍ.)およびタリン,ティー・エル(Ｔarrin,Ｔ.Ｌ.)(１９８９年)、「ピコ・タッグ法:アミノ酸分析用の進歩した技術のマニュアル(Ｔhe ＰicoTag Ｍethod:Ａ Ｍanual of Ａdvanced Ｔechniques for Ａmino Ａcid Ａnalysis)」１１-５２頁、マサチューセッツ州、ミルフォードのミリポア・コーポレイション(Ｍillipore Ｃorporation)社)。高速原子衝撃分析は、Ｍ-スキャン,インコーポレイテッド(Ｍ-Ｓcan,Ｉncorporated)社(ペンシルベニア州、ウエスト・チェスター(

West Chester,ＰＡ))によって行った。質量較正は、ヨウ化セシウムまたはヨウ化セシウム/グリセリンを用いて行った。飛行時間の検出を用いたプラズマ・デソープション・イオン化分析は、アプライド・バイオシステムズ・バイオ-イオン２０(Applied Biosystems Bio-Ion ２０)質量分析器で行った。

【００５９】

本発明に有用なペプチド化合物は、当該分野で現在知られている方法を用いた組換えＤＮＡ技術を用いて調製することもできる(例えば、サムブルック(Sambrook)ら、モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)第２版、コールド・スプリング・ハーバー(Cold Spring Harbor)(１９８９年)参照)。

【００６０】

前記した化合物は、種々の無機および有機の酸および塩基と塩を形成する。かかる塩には、有機酸または無機酸、例えば、ＨＣｌ、ＨＢｒ、H_2SO_4、H_3PO_4、トリフルオロ酢酸、酢酸、ギ酸、メタンスルホン酸、トルエンスルホン酸、マレイン酸、フマル酸およびカンファースルホン酸で調製される塩が含まれる。塩基で調製される塩には、アンモニウム塩、アルカリ金属塩、例えば、ナトリウムおよびカリウム塩、およびアルカリ土類金属塩、例えば、カルシウムおよびマグネシウム塩が含まれる。酢酸塩、塩酸塩およびトリフルオロ酢酸塩を調製した。該塩は、遊離酸または遊離塩基形態の生成物を、塩不溶性の溶媒または媒質、または水のごとき溶媒中の１またはそれを超える当量の適当な塩基または酸と反応させ、次いでそれを真空または凍結乾燥によって除去するか、または適当なイオン交換樹脂上のもう１種のイオンに存在する塩のイオンをイオン交換することによるごとく、従来の方法によって生成することができる。

【００６１】

前記した化合物はその医薬特性の観点より有用である。特に、本発明の化合物は、哺乳動物において食後のグルコースレベルを低下させる能力によって示されたごとく、胃が空になることを遅くする剤としての活性を有している。

【００６２】

実施例１に記載したごとく、イヌにおける経口グルコース耐性試験に対するアミリンの効果を評価した。驚くべきことには、以前よりずっと高血糖症剤(すなわち、グルコース上昇の一因)として記載されてきたアミリンが、その代わりに、これらの試験動物において食後の血漿グルコース・レベルを低下させることが判明した。試験した全ての用量比において、アミリンは、経口グルコース耐性試験において血漿グルコースの上昇比ならびにピーク血漿グルコースの双方を低下させた。

【００６３】

実施例２は、ヒト臨床試行における食後血漿グルコースレベルに対するアミリン・アゴニストＡＣ-０１３７の効果を記載している。ＡＣ-０１３７の丸薬および連続静脈内点滴の双方につき、食後高血糖の用量-依存性の低下が若年型真性糖尿病を患った対象において認められた。

【００６４】

実施例３は、サスタカルＲ(SustacalＲ)食事および静脈内グルコース負荷を投与した後の血漿グルコースレベルに対する、ＡＣ-０１３７(トリプロ-アミリン)の連続点滴の効果について記載している。静脈内グルコース負荷については、５０μg/時間 ＡＣ-０１３７で処理した対象の血漿グルコースレベルはプラシーボ-処理した対象とは顕著に異ならなかった。しかし、ＡＣ-０１３７を２５μｇ/時間または５０μｇ/時間静脈内注入、サスタカルＲ食事を与えた対象において、プラシーボを投与した患者に比してＡＣ-０１３７-処理対象においては血漿グルコースレベルが低下した。ＡＣ-０１３７は経口摂取した後のインスリン依存性糖尿病患者において、食後血漿グルコース濃度を低下したが、静脈内グルコース負荷の投与を行った後は血漿グルコース濃度に対して測定可能な効果は全く及ぼさなかった。

【００６５】

実施例４に記載するごとく、１４-日二重盲検試験のプラシーボ-制御臨床試験において、若年性真性糖尿病患者の通常のインスリン治療を続け、かつ一日に３回トリプロ-アミリン(ＡＣ-０１３７)を自己で注射した彼らは、インスリンおよびプラシーボを投与した患者におけるよりも試験食事後の平均血中グルコースレベルが低かった。１４日後には、非-糖尿病患者の血液中に見出されるアミリンの範囲内であるピークのトリプロ-アミリン血漿濃度である３０μｇで、統計学的に有意(Ｐ＝０.０２)なグルコース平滑効果(グルコース曲線下の面積として測定)が認められた。トリプロ-アミリンは、対象のピーク血中グルコース濃度において４５ｍｇ/ｄｌ～６０ｍｇ/ｄｌの平均低下を伴ったＡＵＣにおける低下を誘導した。

【００６６】

実施例５に記載するごとく、胃が空になることは、胃管栄養法によってデリバリーしたフェノール・レッドを含有する持続性のカロリー性メチルセルロースゲルを用いて、正常およびインスリン-処理自然発生糖尿病ＢＢラットにおいて測定した。殺して取り出したに胃中の色素含量を２０分後に分光分析的に測定し、胃管栄養法処理後に直ちに殺して空腹性を評価したラットのものと比較した。糖尿病ラットは、正常なハーラン・スプラーグ・ドーリー(Harlan Ｓpraque Ｄawley)ラット(４９.１±４.７％通過；Ｐ＜０.００１)および非-糖尿病ＢＢラット(６１.１±９.２％通過；Ｐ＜０.００１)に比して、より顕著な胃が空になること(９０.３±１.７％通過)を有していた。膵臓β-細胞のペプチドであるアミリンはＩＤＤＭでは欠損しており、正常および糖尿病ラットの双方における胃が空になることを用量-依存的に阻害した。正常および糖尿病ラットの双方における応答性のＥＤ５０は～１μｇであり、これは注射２０分後の７６ｐＭのピークのアミリン濃度とする用量である。これらの濃度は、イン・ビボ(in vivo)で認められた範囲内である。これらの結果は、栄養を十二指腸に流入させる生理学的な制御にアミリンが関与しているという考えを支持している。

【００６７】

実施例６に記載するごとく、意識のある、拘束した、肥満ＬＡ/Ｎラットにおいて、摂取させた標識化グルコース負荷の取り込みを測定した。アミリン受容体アンタゴニストＡＣ-０１８７を予め注射すると、血漿中のグルコース由来のトリチウムの出現が加速された。加えて、アミリン・アンタゴニストで予め注射すると、胃腸栄養法１５分後の血漿グルコースがより大きく上昇し、血漿グルコースレベルがより迅速に低下した。これらのデータは、内因的に分泌されるアミリンの作用を中和させるアミリン・アンタゴニストＡＣ-０１８７と矛盾がなく、そのことによって胃が空になることが促進される。

【００６８】

麻酔ラットにおけるさらなる実験において、小腸から血液へのグルコース吸収にアミリンが影響しないことが見出された。これらの実験において、麻酔ラットはラット・アミリン(０.３５ｎｍ/ｋｇ/分)で、または対照動物の場合は生理食塩水で3時間連続点滴した。アミリン点滴１時間後に、食道を通して挿入した管を通して胃または十二指腸のいずれかにグルコース丸薬(１ｇ/ｋｇ)を注入した。実験には、意識のあるラットより麻酔したラットが含まれていたため、胃の運動性の分析にそれら、例えば、十二指腸への胃の内容物が空になる比などは考慮しなかった。しかし、該実験は、小腸から血液へのグルコースの吸収がアミリンによって遅延されなかったことを示している。異なった調製物を用いて、小腸内腔から血液へのグルコースの移行にアミリンが影響するのか否かをさらに直接的に扱った。麻酔ラットにおいて、依然その血液供給を介して動物に連結している小腸の切片を体外に出し、制御した組成のグルコース溶液で小腸が潅流され得るようにカニューレを挿入した。該動物は、動脈(血液サンプリング用)を介して、および静脈(アミリン、インスリンおよびグルコース注入用)を介してカニューレ処理した。内腔はトリチウム-標識グルコース溶液で潅流した。腸の内腔からラットへのグルコースの通過は、血漿中のトリチウム標識の出現によって測定した。血漿におけるかかるトリチウムの出現が、実際に腸からのグルコース取込みを測定しているという仮説を、グルコース輸送阻害剤、フロリジンを投与することによって試験した。フロリジンは、腸内腔から血漿への標識物の移行を

ほとんど阻害した。腸内腔および血漿の間のグルコース勾配が一定のままであるかを確かめるために、アミリン注入の間に、血漿グルコースの変化に反応して変動するグルコースの注入によって血漿グルコースを「クランプ」した。この調製において、静脈内アミリン注入は、血漿へ流入した小腸を示す標識グルコースの比に何等影響を及ぼさなかった。これらの結果は、前記した実験におけるアミリン-処理対象で認められた血中グルコースの低下が、小腸からの吸収の低下によるものではなさそうで、むしろ胃内容物の十二指腸への移行の速度が低下したこと、すなわち胃が空になることが遅延されたことによることを示している。

【００６９】

本発明に有用な組成物は、非経口投与(静脈内、筋肉内および皮下投与を包含する)または鼻腔投与もしくは経口投与に適する処方形態で簡便に提供することができる。ある種の場合においては、投与用の単一の組成物または溶液と一緒に、アミリン・アゴニストまたはグルカゴンのごとき他の抗-空腹剤で簡便に提供されるであろう。他の場合においては、該アミリンまたはアミリン・アゴニストアナログとは別々にもう１種の抗-空腹剤を投与するのがより有利となり得る。適当な投与形式は、各患者の医療従事者によって個々に決定するのが最良であろう。適当な医薬上許容される担体およびその処方は、標準的な処方の扱い方、例えば、イー・ダブリュ・マーチン(Ｅ.Ｗ.Martin)による「レミントンの医薬科学(Ｒemington's Ｐharmaceutical Ｓciences)」に記載されている(また、ワン,ワイ・ジェイ(Wang,Ｙ.Ｊ.)およびハンソン,エム・エイ(Ｈanson,Ｍ.Ａ.)「蛋白質およびペプチドの非経口処方:安定性および安定化剤(Ｐarenteral Ｆormula-tions of Ｐroteins and Ｐeptides:Ｓtability and Ｓtabilizer)」ジャーナル・オブ・パレンテラル・サイエンス・アンド・テクノロジー(Ｊournal of ＰarenteralＳcience and Ｔechnology)テクニカル・レポート第１０号、４２:２Ｓ(1988年)も参照)。スルホニル尿素のごとき低血糖症剤を含む適当な処方も当該分野で知られている。

【００７０】

本発明に有用な化合物は、注射または点滴用の非経口組成物として提供できる。例えば、それは不活性な油、適当にはゴマ、ラッカセイ、オリーブ油または他の許容できる担体のごとき植物油の中に懸濁することができる。好ましくは、それは水性担体、例えば、約５.６～７.４のｐＨの等張な緩衝液中に懸濁する。これらの組成物は、慣用的な滅菌技術によって滅菌するか、または濾過滅菌することができる。該組成物には、ｐＨ緩衝剤のごとき、およその生理学的条件に必要な医薬上許容される補助剤を含ませることができる。有用な緩衝液には、例えば、酢酸ナトリウム/酢酸緩衝液が含まれる。治療的に有効な量の調製物が皮内注射またはデリバリーした後、数時間または数日にわたって血流にデリバリーされるように、持続性または「貯蔵」徐放性形態の調製物を用いることができる。

【００７１】

所望の等張性は、塩化ナトリウム、またはデキストロース、ホウ酸、酒石酸ナトリウム、プロピレングリコール、(マンニトールおよびソルビトールのごとき)ポリオール、あるいは他の無機もしくは有機溶質のごとき他の医薬上許容される剤を用いて達成できる。ナトリウムイオンを含有する緩衝液には、塩化ナトリウムが特に好ましい。

【００７２】

必要なら、上記組成物の溶液は、メチルセルロースなどの増粘剤を用いて増粘してもよい。それらは、油中水型または水中油型のいずれの乳化形態に調製してもよい。例えば、アカシア粉末、非イオン性界面活性剤（ツイーン（Tween）など）またはイオン性界面活性剤（アルカリポリエーテルアルコールスルフェートまたはスルホネート（例えば、トリトン（Triton））など）を含めて、多種多様の医薬上許容される乳化剤のいずれを採用してもよい。

【００７３】

本発明に有用な組成物は、一般的に許容される手順に従って成分を混合することによって調製される。例えば、選択された成分を配合機または他の標準的な装置で単純に混合して濃厚な混合物を製造し、次いで、水または増粘剤と、できれば、ｐＨを調節するための

緩衝液または張度を調節するための付加的な溶質とを添加することによって、これを最終的な濃度および粘度に調節すればよい。

【００７４】

医師が用いる場合、上記組成物は、必要に応じて、単一量または多数量で血糖を所定レベルに調節するのに有効な別の内容排出阻害剤と共に、ある量のアミリンまたはアミリン作用薬（例えば、アミリン作用薬類似化合物）を含む単位剤形で提供される。胃内容の排出を調節するのに用いたり、胃内容の排出を遅延または制御するのに有利な条件下で用いる場合のアミリンまたはアミリン作用薬（例えば、アミリン作用薬類似体）の治療有効量は、食後血中グルコースレベルを好ましくはわずか約８または９ｍＭ程度に減少させるか、または、血中グルコースレベルを必要とされる程度まで低下させるような量である。糖尿病やグルコース不耐症の個体は、血漿グルコースレベルが正常個体より高い。このような個体の場合は、食後血中グルコースレベルを有利に低下または「平滑化」しうる。当業者に認識されているように、治療薬の有効量は、患者の年齢や体重、患者の身体的状態、得るべき血糖レベルまたはアミリン作用の減少を含む多くの因子および他の因子によって変化しうる。

【００７５】

かかる医薬組成物は、被験体における胃の低運動性を起こさせるのに有用であり、胃の運動性を低下させるのが有利な他の障害にも同様に用いうる。

【００７６】

$^{1\,8}Arg^{2\,5\,,2\,8}$Pro-ｈ-アミリン、デス-^{1}Lys$^{1\,8}Arg^{2\,5\,,2\,8}$Pro-ｈ-アミリン、$^{1\,8}Arg^{2\,5\,,2\,8\,,2\,9}$Pro-ｈ-アミリン、デス-^{1}Lys$^{1\,8}$Arg-$^{2\,5\,,2\,8\,,2\,9}$Pro-h-アミリン、$^{2\,5\,,2\,8\,,2\,9}$Pro-ｈ-アミリン、デス-^{1}Lys$^{2\,5\,,2\,8\,,2\,9}$Pro-ｈ-アミリン、および$^{2\,5}Pro^{2\,6}Val^{2\,5\,,2\,8}$Pro-ｈ-アミリンを含む化合物の内容排出阻害に有効な一日量は、典型的には、７０ｋｇの患者に対して、単一量または分割量で投与される、０.０１または０.０３～約５ｍｇ/日、好ましくは約０.０１または０.５～２ｍｇ/日、さらに好ましくは約０.０１または０.１～１ｍｇ/日の範囲内である。投与すべき正確な薬用量は、担当の臨床医によって決定されるが、個体の年齢、体重および状態に依存するだけでなく、特定の化合物が上記の範囲内のどこに存在するかにも依存する。投与は、症状が最初に現れたとき、または、糖尿病と診断された直後に開始する必要がある。投与は、注射、好ましくは皮下注射または筋肉注射によって行えばよい。経口活性な化合物は経口投与してもよいが、用量は５～１０倍増大させる必要がある。

【００７７】

一般的に、上昇して不適切な、または、望ましくない食後血中グルコースレベルを治療または予防する際には、本発明の化合物は、かかる治療を必要とする患者に上記と同様の用量範囲で投与すればよいが、これら化合物は、より頻繁に、例えば、１日に１回、２回または３回投与される。

【００７８】

胃の低運動性を治療するのに有用なアミリン拮抗薬は、０.１～３０ｍｇ／日、好ましくは０.３～１０ｍｇ／日、さらに好ましくは０.１～３０ｍｇ／日の用量で投与すればよい。投与は、例えば、皮下注射または筋肉注射によって行えばよい。経口活性な化合物は経口投与してもよいが、用量は５～１０倍増大させる必要がある。

【００７９】

本発明の理解を助けるために、以下の実施例によって、一連の実験結果を説明する。本発明に関する実験は、もちろん、本発明を特定的に限定するものであると解釈すべきではなく、また、すぐに認識されるか後で開発されるような当業者の範囲内にある本発明の変形は、ここで説明され、以下の請求の範囲に記載されている本発明の範囲内にあるとみなされる。

【実施例】

【００８０】

実施例１

以前の研究によれば、グルコース耐性試験の条件下において、断餌ラットおよび給餌ラットにアミリンを静脈注射すると、用量に依存して、血漿グルコース低下が減少し、血漿乳酸が増加する。インスリン応答もまた、断餌動物にアミリンを注入することによって、有意に抑圧された。

【００８１】

しかしながら、以下の研究および実験によれば、アミリン注入は、経口グルコースレベルに応答してイヌの血漿グルコースレベルを減少させた。これらの研究の目的は、（１）経口グルコース負荷に応答した血漿グルコース、乳酸およびインスリンの変化を調べること、（２）これらの変数に対する静脈内投与アミリンの効果を調べること、および（３）アミリンに誘発された血漿グルコースの変化を逆転するアミリン拮抗薬ＡＣ-０２５３（アセチル-$^{11'18}$Arg,^{30}Arg,^{32}Tyr-$^{9-32}$カルシトニン（サケ））の効力を調べることであった。

【００８２】

この研究には、雑種のイヌ（９匹の雄、体重範囲１２～１７ｋｇ）を用いた。各研究の前に、すべての動物を一晩断餌させた。各動物は、すべてのプロトコルについて、それ自身の対照として役立った。各プロトコルの開始前に、動物を３０～６０分間平衡させた。

【００８３】

ｔ＝－３０で、賦形剤またはアミリン±ＡＣ-０２５３を開始した。アミリン用量は、５０、１００および３００ｐｍｏｌ/ｋｇ/分であった。ＡＣ-０２５３の用量は、５００および１５００ｐｍｏｌ/ｋｇ/分であった。ｔ＝０分に、２５％グルコース（１ｇ/ｋｇ）を口から投与した。アミリン±ＡＣ-０２５３は、ｔ＝１２０分で中止した。インスリン、グルコースおよび乳酸の試料は、ｔ＝－４５からｔ＝１８０分まで、１５分間隔で得た。アミリンおよびＡＣ-０２５３のラット試料は、ｔ＝６０およびｔ＝１２０分に採取した。

【００８４】

正常なイヌの場合、血漿グルコースのピークは、覚醒しているイヌに経口グルコース負荷を与えた後、３０～４５分間で出現する。イヌによってかなりのばらつきが存在するが、応答のパターンは各個体のイヌについて反復可能であった。アミリンは、試験されたすべての用量で、血漿グルコースの上昇速度および血漿グルコースのピーク値をいずれも低下させた。アミリン注入の間、血漿グルコースは、３０～４５分で、対照実験におけるよりも有意に低い血漿グルコースで平衡値に達するように見えたが、アミリン注入を中止すると、再び増加し始めた。５０、１００および３００ｐｍｏｌ/ｋｇ/分というアミリン用量によって、血漿グルコースの変化に差異はなかった。図１は経口グルコース負荷後の血漿グルコースレベルに対するアミリン（５０ｐｍｏｌ/ｋｇ/分）の効果を示す。

【００８５】

アミリンに誘発された血漿グルコースの変化を逆転するＡＣ-０２５３の効力を調べるために行った実験には、５０ｐｍｏｌ/ｋｇ/分というアミリン用量を選択した。１５００ｐｍｏｌ/ｋｇ/分までのＡＣ-０２５３は、アミリン（５０ｐｍｏｌ/ｋｇ/分）の効果を完全には逆転しない。ＡＣ-０２５３単独では、血漿グルコースの変化に対して全く効果を有しない。血漿乳酸に対するアミリンおよびＡＣ-０２５３の効果は顕著ではない。

【００８６】

実施例２

インスリン依存性糖尿病に罹患している２４人の男性被験体が、アミリン作用薬ＡＣ-０１３７の臨床研究に参加した。各被験体を、無作為に、偽薬（プラセボ)、３０、１００または３００μｇのＡＣ-０１３７を投与する４つの処理グループのうちの１つに割り当てた。薬物の静脈内（ＩＶ）濃縮塊（bolus）-対-ＩＶ注入を調べるために、各薬用量グループの被験体を、二期間クロスオーバー （two period crossover）に付した。各期間は、３日間、研究ユニットに拘束することから構成されていた。各場合に、拘束の第１日目は、研究ユニットに順応させるためのものであった。第２日目および第３日目は、偽薬-対-活性薬物のインベッディド・クロスオーバー（imbedded crossover）を構成してい

た。例えば、最初にＩＶ濃縮塊を投与するために無作為抽出した被験体は、さらに、一方の日にはＡＣ-０１３７のＩＶ濃縮塊を投与し、他方の日には偽薬のＩＶ濃縮塊を（または、濃縮塊偽薬の後に濃縮塊ＡＣ-０１３７という逆の順序で）投与するように割り当てられる。２週間後、これらの被験体には、同量のＡＣ-０１３７を、逆の投与手段（すなわち、ＩＶ注入）で投与するようにした。この承認事項の第２日目および第３日目に薬物および偽薬を投与するインベッディド・クロスオーバーデザインを、最初の承認事項の場合と同様に採用した。偽薬グループに割り当てた６人の被験体には、研究した各々の日に偽薬を投与した。

【００８７】

研究日には、研究の開始前に、静脈内カテーテルを少なくとも３０分間挿入した。投与の１５分前に、被験体に通常のインスリン量を皮下注射で投与した。時刻０で、被験体に所定量のＡＣ-０１３７または偽薬を２分間にわたってＩＶ濃縮塊注射するか、ＡＣ-０１３７または偽薬の連続注入を開始し、２時間継続した。注入速度は、所定量の薬物を２時間にわたって投与するように設計した。３０分後、被験体に普通の朝食を摂取させた。血漿ＡＣ-０１３７レベルおよび血漿グルコースレベルを測定するために、－３０～３００分で血液試料を採取した。

【００８８】

図２～４に示すように、血漿薬物レベルは、濃縮塊注射後の早い段階でピークに達した後、見かけ上は一次の速度論で血漿コンパートメントから消失するという予期された経過をたどった。対照的に、図５～７に示すように、連続注入によってもたらされたレベルは、３０分以内にほぼ定常状態となった後、残りの注入の間を通じて、そのレベルに維持された。注入を中止すると、血漿レベルは、ＩＶ濃縮塊投与で観察された場合と同様に減衰した。

【００８９】

血漿グルコースのプロフィールは、いくつかの予期できない興味深い結果を示した。各場合に偽薬を投与した被験体から認められるように、血漿グルコースレベルは、６０～９０分までにベースラインから上昇し、少なくとも２４０分まで上昇したままであった。ＡＣ-０１３７のＩＶ濃縮塊を投与した場合、３０μｇの薬用量では、グルコースレベルの明白な変化は見られなかった。１００μｇの濃縮塊を用いた場合には、グルコースの食後上昇は、明らかに遅延されたが、それほど明白ではなかった。３００μｇの濃縮塊を投与した後、グルコースレベルの食後上昇は本質的に消失した。

【００９０】

連続的な静脈内注入を行った場合には、食後過血糖症の用量に依存した低減が観察された。１５μｇ/時の注入によるデータは、ある効果に関して非常に示唆的であり、注入速度を５０および１５０μｇ/時に上昇させると、グルコースレベルの食後上昇の低下は著しい。薬物の濃縮塊を投与することを採用した研究においても、同様の傾向が見られる。

【００９１】

実施例３

食後過血糖症を低減する際におけるトリプロ-アミリン（ＡＣ-０１３７）の効果をさらに示し、また、食後過血糖症の低減が主として胃腸の効果であることを確認するために、処理間に最低１５分間の洗浄を含めた、偽薬を対照薬とする一重盲検の二期間クロスオーバー研究を行った。インスリン依存性糖尿病に罹患している２７人の被験体を、２つの薬用量レベルのグループと２種類の耐性試験との組合せに割り当てた。被験体は、クロスオーバーデザインに従い、連続微小注入ポンプを用いて、ＡＣ-０１３７および偽薬で処理した。これらの被験体を以下のように各々９人ずつの被験体からなる３つのグループに分割した。グループＡには、サスタカル（Sustacal^{R}）食と２５μｇ/時のＡＣ-０１３７量とを与えた。グループＢには、サスタカル食と５０μｇ/時のＡＣ-０１３７量とを与えた。グループＣには、静脈内グルコース負荷と５０μｇ/時のＡＣ-０１３７量とを与えた。

【００９２】

被験体は病院に３日間滞在させた。拘束の第１日目は、被験体を病院に順応させた。第

２日目および第３日目は、被験体にＡＣ-０１３７-対-偽薬の二期間クロスオーバーデザインを完了させた。さらに、被験体には、グループの割り当てによって決めたように、サスタカル食を与えるか、または、ＩＶグルコース耐性試験を行った。

【００９３】

第１日目の間、被験体の通常のインスリンおよびカロリー摂取は固定され、各被験体は、その後、病院に拘束されている間中、このインスリンおよび食事の献立に従った。

【００９４】

ほぼ０７００時（Ｔ＝０）に、連続注入による研究投薬を開始した。Ｔ＝３０分には、被験体に通常のＡＭ量のインスリンを投与した。Ｔ＝６０分には、被験体に、３５５カロリーを含む標準化サスタカル食を飲用させるか、または、注入ポンプを用い、５分間にわたるＤ５０ＷのＩＶ注入として、３００ｍｇ/ｋｇのＩＶグルコース負荷を投与した。耐性試験のタイプは、任意抽出法に従って決定した。グルコース、乳酸およびインスリンを測定し、かつ、ＡＣ-０１３７血漿濃度を決定するために、血液試料を規則的な間隔で採取した。研究薬物投与は、ｔ＝３００分に中止した。

【００９５】

第３日目の朝に、第２日目と同様にＩＶラインを再び取り付けた。被験体には、第２日目のように、通常の朝食前量のインスリンを投与した。被験体は、前日と同じＩＶ経路および用量を用いたクロスオーバー方式で、偽薬を投与するか、または、研究投薬を行った（すなわち、第２日目にＡＣ-０１３７を注入した被験体には、第３日目に偽薬を注入した）。第２日目に投与したのと同一の標準化サスタカル食耐性またはＩＶグルコース負荷を再び投与した。試料採取期間の最後に、ＩＶラインは取り外した。

【００９６】

図１１に示すように、ＩＶグルコース負荷を与えた場合、５０μｇ/時のＡＣ-０１３７で処理した被験体の血漿グルコースレベルは、偽薬で処理した被験体と有意には異ならなかった。これらの注入後グルコース濃度の差異は、グルコース曲線の下側の面積をベースライン値で補正して比較すると、統計的に有意（Ｐ＝０.００１５）であった。したがって、以前から用いられているものより有意に低い平均の血漿ＡＣ-０１３７濃度の存在下で標準化食を採用することによって、ＡＣ-０１３７投与の間に低減された食後過血糖症が観察されることを確認した。

【００９７】

しかしながら、図９および１０に示すように、サスタカル食を与え、ＡＣ-０１３７を２５μｇ/時または５０μｇ/時でＩＶ注入した被験体においては、偽薬と比較してＡＣ-０１３７で処理した被験体で血漿グルコースレベルが低下した。

【００９８】

ＡＣ-０１３７は、薬理学的な耐性量では、経口栄養素の摂取後に、インスリン依存性糖尿病患者の食後血漿グルコース濃度を減少させたが、静脈内グルコース負荷の投与後に、血漿グルコース濃度に対する測定可能な効果は有しなかった。これらの結果は、ＡＣ-０１３７が腸からの経口栄養素の摂取を変化させるという考えと矛盾せず、また、胃内容排出速度の変化が、この結果の少なくとも一部を説明することを示した。

【００９９】

実施例４

サスタカル標準化食（メッド-ジョンソン（Mead-Johnson））の摂取後の血漿グルコースレベルに対するトリプロ-アミリン（ＡＣ-０１３７）の効果を決定するために、偽薬を対照薬とする任意抽出二重盲検の並行グループを行った。インスリン依存性糖尿病に罹患している７２人の被験体が１４日間の臨床試験に参加した。各被験体を、偽薬、３０、１００または３００μｇのトリプロ-アミリンを、１日３回の割合で、１４日間皮下注射することによって投与する４つの処理グループの１つに無作為に割り当てた。これらの被験体は、研究の間中、通常のインスリン用量を維持した。第１日目（ベースライン）、第７日目および第１４日目に、標準化食耐性試験を実施した。

【０１００】

標準化食耐性試験の場合、被験体には、０８００時にサスタカル液状食（３６０カロリーを含有する３６０ｍｌ）を与えた。被験体は、２２００時から夜まで、食物や飲料（水を除く）を断った。被験体には、サスタカル食の３０分前まで、通常の朝用量のインスリンを投与しなかった。ベースライン試験の場合、第１日目は、試験の終了後まで、トリプロ-アミリン（または偽薬）を投与しなかった。第７日目および第１４日目には、通常の朝インスリン量と同時に別々の注射でトリプロ-アミリン（または偽薬）を投与した。血清グルコースレベルを決定するための試料は、試験の開始に対して、－３０、０、３０、６０、１２０および１８０分に採取した。時間ゼロは、被験体がサスタカル食を飲用し始めた時刻であるとした。

【０１０１】

以下の表１および図８、１２および１３に示すように、１４日後に、３０μｇおよび１００μｇの薬用量レベルで、統計的に有意な（ｐ＝０.０２）グルコース平滑化効果（グルコース曲線の下側の面積として測定）が観察された。曲線の下側の面積（ＡＵＣ）がトリプロ-アミリン（ＡＣ-０１３７）に誘発されて減少することに伴って、被験体の血中グルコース濃度のピーク値が平均して４５ｍｇ/ｄｌ～６０ｍｇ/ｄｌ低下した。

【０１０２】

【表１】

表　１

トリプロ－アミリンの１４日後の食事後のグルコース（ＡＵＣ）の変化

トリプロ－アミリンの用量（１日に３回投与）	プラセボ	３０mg	１００mg	３００mg
１４日目に試験した患者数	２１	１５	２２	１２
食事後のグルコースＡＵＣ（mg/dl 分）の平均変化量（ａ）	＋229	－6.645	－6.412	－7.316
「ｐ」値　ｖｓ．プラセボ（ｂ）	---	0.02	0.02	0.11
血漿中トリプロ－アミリン最大値（pmole/Ｌ）	---	22±4	44±14	173±40

【０１０３】

（ａ）ＡＵＣは、試験的な食事の開始と３時間後の間の、食事前のグルコース値に対するグルコース曲線下の面積である。ＡＵＣの変化は、試験した各対象についての投与前の値から１４日目の値を減じものである。

（ｂ）ｐ値は非母数ウイルコクスン試験より得た。

【０１０４】

実施例５

以下の実験を行い、自発性自己免疫性糖尿病の齧歯動物実験、インスリン処理ＢＢラットにおける胃の空腹に対するアミリン作動薬の効果を試験した。

【０１０５】

雄ハーラン・スプレーグ・ドーリー系（ＨＳＤ）ラット（１６１－２４４ｇ）およびバ

イオブリーディング（Biobreeding）（ＢＢ）ラット（１８１－４０５ｇ）（デンマーク、モレガード・ブリーディング・センターに由来のイン－ハウスコロニーより入手）を用いた。ＢＢラットを、少なくとも２日間、糖尿により糖尿病であることを確認してから、ウルトラレント（Uitralente）組換えヒトインスリン（Humulin-U、インディアナポリス、エリ・リリー（Eli Lilly））を毎日ｓ.ｃ.注射して処理した。インスリン療法は、低血糖性死亡を回避するため、尿中のグルコース濃度を維持するが、ケトンを最小とすることを目的とする。実際、尿中糖が８８％の測定値にて存在し、尿中ケトンが５２％にて存在する。糖尿病の平均持続期間は５３±３日であり、一日の必要なインスリン量は４.７±０.３単位である。動物をすべて、１２：１２時間の明：暗サイクル（実験は明サイクルの間に行った）中、２２.７±０.８Ｃで収容し、食べ物および水を自由に与えた（ダイエット ＬＭ－４８５、ウィスコンシン州、マジソン、テクラッド（Ｔeklad））。

【０１０６】

以下に記載の方法により胃が空であることの決定は、通常、～２０時間の絶食後に行い、分光測光学的吸収測定を干渉するキームスが胃に含まれないようにした。しかし、ウルトラレント・インスリンで処理した糖尿病ラットは２０時間絶食させることができなかった。絶食時間が６時間以上になると低血糖症となった。したがって、かかる動物では、胃の空腹を測定する前にわずか６時間絶食させた。非糖尿病ラットを、試験前の６または２０時間、食べ物から遠避けた。本発明者らは、非糖尿病ＢＢラットでさえ高グリケートヘモグロビン濃度を有し、あるいは潜在的インスリン炎を示すことに注目した。したがって、非糖尿病ハーラン・スプレーグ・ドーリー系ラットおよび非糖尿病ＢＢラット動物を共に糖尿病ラットとの比較において用いた。かくして、以下に示す５種の処理群がある：

（１）非糖尿病ハーラン・スプレーグ・ドーリー系ラット（６時間絶食、ｎ＝８）
（２）非糖尿病ＢＢラット（６時間絶食、ｎ＝６）
（３）糖尿病ラット（６時間絶食、ｎ＝６）
（４）非糖尿病ハーラン・スプレーグ・ドーリー系ラット（２０時間絶食、ｎ＝２０）
（５）非糖尿病ＢＢラット（２０時間絶食、ｎ＝７）

【０１０７】

意識のあるラットに、強制栄養により、１.５％メチルセルロース（Ｍ－０２６２、ミズリー州、セントルイス、シグマ・ケミカル社）および０.０５％フェノールレッド指示薬を含有する非カロリーゲル（１.５ｍｌ）を投与した。強制栄養から２０分経過後、ラットを５％ハロタンを用いて麻酔し、胃を暴露し、動脈鉗子を用いて幽門および下部食道括約筋でクランプし、摘出し、固定した容量にしたアルカリ性溶液にあけた。胃内容物を、アルカリ溶液中、フェノールレッドの強度から誘導し、５６０ｎｍの波長で吸光度を測定した。大部分の実験で、胃はきれいであった。他の実験にて粒子状の胃内容物を遠心分離に付し、吸光度を測定するために該溶液を清澄させた。希釈した胃内容物は混濁したままであり、分光吸光度をフェノールレッドによりアルカリ性ｖｓ酸性希釈体にある吸光度の間の差として誘導した。７匹のラットを用いる別個の実験にて、胃および小腸を摘出し、アルカリ溶液にあけた。強制栄養の２０分以内に上部胃腸管から回収できるフェノールレッドの量は８９±４％であった。最大色素回収が１００％以下であることを説明するのに、２０分後に残っている胃内容物を同一実験にて強制栄養の直後に殺した対照ラットより回収した胃内容物のフラクションとして表した。

【０１０８】

基線用実験（アミリンを注射せず）にて、２０分経過後に胃が空であることを、前記した５種の処理群にて測定した。用量応答実験にて、０.１５Ｍセイラインに溶かしたラットアミリン（カリフォルニア州、トランス、バケム（Bachem.）を、強制栄養の５分前、０、０.０１、０.１、１、１０または１００μｇの用量にて、０.１ｍｌの皮下ボーラスとして、２０時間絶食させた４６匹のハーラン・スプレーグ・ドーリー系（非糖尿病）ラット（各々、ｎ＝１７、２、８、８、６、５）にて、および６時間絶食させた２９匹の糖

尿病ＢＢラット（各々、ｎ＝１０、－、３、３、３、１０）にて投与した。

【０１０９】

有効量の皮下アミリンがもたらす血漿中アミリン濃度の変化を評価する別の実験にて、１μｇ（ｎ＝３）または１０μｇ（ｎ＝３）のラットアミリンをｓ．ｃ．ボーラス注射後の６匹のハロタン麻酔処理に付したラットの尾部から血液を摂取した。別の実験にて、血漿中アミリン濃度を非絶食ハーラン・スプレーグ・ドーリー系ラット（ｎ＝８）および非絶食糖尿病ＢＢラット（ｎ＝５）にて比較した。１０分間隔で収集した２５０μｌのサンプルから血漿を分離し、イン－ハウスにて開発した２－部位エンザイモメトリック検定による分析用に－２０℃で凍結させた。

【０１１０】

免疫検定を行うために、マイクロタイター黒プレート（ヴァージニア州、シャンティ、ダイナテック（Dynatech））を、５０ｍＭのカーボネート（ｐＨ９．６）中、２０μｇ／ｍｌの抗体と一緒に４℃で一夜インキュベートすることにより、抗体Ｆ０２４－４．４（フェルプス・ジェイ・エル、ブラーセ・イー、コダ・ジェイ・イー、非公開）で被覆した。プレートを０．０５Ｍトリス／０．１５Ｍ塩化ナトリウム／０．０２％ナトリウムアジド／０．１％ツゥーン２０（ＴＢＳ／ツゥーン）で洗浄し、室温で１時間、同一カーボネート緩衝液中、１．０％脱脂ドライミルク粉末で遮断した。サンプルを氷上で解凍し、要すれば、４％ＢＳＡ／２００ｍｇ／ｄｌのウシコレステロールスーパートレート（supertrate）（マイルス・ペンテックス・リージェント（Miles Pentex reagents）、イリノイ州、カンカケイ、マイルス・ラボラトリース（Miles Laboratories））に希釈した。サンプルおよび標体を被覆し、遮断したプレートに添加し、室温で１時間インキュベートした。洗浄後、アルカリ性ホスファターゼに結合したＦ０２５－２７検出抗体を加えた。抗体－酵素結合を、ピアス・イムノケミカル・カンパニー（Pierce Immunochemical Co）（イリノイ州、ロックフォード）に由来のマレイミドアルカリ性ホスファターゼ結合キットをを用いて行った。結合体を室温で３時間インキュベートし、その後、プレートをトリス緩衝セイラインで十分に洗浄した。結合酵素を、該プレートを、１Ｍジエタノールアミン／０．５ｍＭ塩化マグネシウム、ｐＨ９．８中、５０μｇ／ｍｌの蛍光性基質、４－メチルアンベリフェリルホスホネートと一緒に室温で４０分間インキュベートすることにより検出した。蛍光シグナルをダイナテック・マイクロフロアー・プレート・リーダーで測定し、データをマルチカルク・ソフトウェアー（ワラック（Wallac）、メリーランド州、ガイテルスバーグ）で分析した。血漿サンプル中アミリン濃度を、同一検定における標準曲線と比較することにより測定した。この方法にて行うと、該検定は２ｐＭの最小検出濃度を有する。

【０１１１】

胃が空であることの用量応答曲線を、最小二乗反復ルーチン（オールフィット（ALLFIT）、ｖ２．７、メリーランド州、ＮＩＨ）を用いて４－パラメーター対数モデルに適合させ、ＥＤ５０を誘導した。ＥＤ５０は対数-正規分布であるため、それを対数の±標準誤差として表す。変数を一方向性分析に付して対比較を行い、有意性のレベルとしてｐ＜０．０５を用いるスチューデント－ニューマン－コウルス（Student-Newman-Keuls）複数比較試験（サンディエゴ、グラップパッド・ソフトウェア、Instat v2.0）を行った。

【０１１２】

８匹の非絶食ハーラン・スプレーグ・ドーリー系ラットにて、循環するアミリン濃度は１１．７±１．４ｐＭ（９５％ＣＩ ８．４－１４．９ｐＭ）であった。比較しても、５匹の非絶食の自発的糖尿病ＢＢラットにおけるアミリン濃度は検出できなかった。

【０１１３】

強制栄養から２０分経過後に残っているフェノールレッドでの色素のフラクションを、関連する統計学的対照と一緒に表２に示す。ハーラン・スプレーグ・ドーリー系ラットおよび非糖尿病ＢＢラットにおいて、２０分経過後の色素の欠如は、動物を６時間または２０時間絶食させるかで同じであった。すなわち、絶食の期間（６～２０時間の範囲内）は、この技法により測定した胃の空腹に有意な影響を与えないようである。

【０１１４】
【表２】

表　２
強制栄養の２０分後に残っている胃内容物

	非糖尿病ＨＳＤ	非糖尿病ＢＢ	糖尿病ＢＢ
２０時間絶食	54.9±3.0％ ｎ＝２０	27.0±3.8％ ｎ＝７	行わず
６時間絶食	50.9±4.7％ ｎ＝８[a]	38.9±9.2％ ｎ＝６[a]	9.7[b,c]±1.7％ ｎ＝１０

【０１１５】
胃内容物を、同一検定にて、２～３の別のラット実験における強制栄養の直後に回収できる内容物のフラクションとして表す。
ａ＝２０時間絶食したラットと異ならない
ｂ＝６時間絶食したＨＳＤラットと異なる（ｐ＜０．００１）
ｃ＝６時間絶食した非糖尿病ＢＢラットと異なる（ｐ＜０．００１）
【０１１６】
糖尿病ＢＢラットにて胃が空になる速度が、４種の他の処理群（すなわち、非糖尿病動物）のいずれよりも有意に早かったこと（ｐ＜０．０１～０．００１）は何の価値もない。糖尿病ＢＢラットが非糖尿病ＢＢラットよりも早い速度で胃が空になるという観察は、該観察が糖尿病の存在と関連し、単にＢＢ系と関連するものでないことを示唆する。
【０１１７】
前記した方法論的制約のため、アミリンの効果を、２０時間絶食した非糖尿病ハーラン・スプレーグ・ドーリー系ラットにて、および６時間絶食した糖尿病ＢＢラットにて探求した。アミリン注射をフェノールレッド指示薬を強制栄養する５分前に皮下投与した場合、胃が空になることの用量依存性抑制があった。胃が空になることを抑制するとは、アミリン１μｇを投与した正常なＨＳＤラット、および１０μｇを投与した糖尿病ラットから回収できる色素が、強制栄養の直後に回収できる色素と同じであることをいう（ｐ＝０．２２、０．１４）。胃が空になることの最大変化の５０％（ＥＤ５０）が正常なラットにて観察される用量は０．４３μｇ（０．６０ナノモルのアミリン／体重ｋｇ）±０．１９対数単位であった。糖尿病ラットにおいて、胃が空になることを抑制するためのＥＤ５０は２．２μｇ（２．３ナノモル／ｋｇ）±０．１８対数単位であった。図１４に示す固定曲線から、糖尿病ラットに投与した～２μｇの用量のアミリンは、胃が空になる速度を、アミリンを投与していない正常なラットにて観察される速度にまで回復させた。
【０１１８】
図１５にて示されるように、３匹のラットに１μｇのアミリンを皮下注射した場合、１０分後に測定した血漿中濃度は６６±１０ｐＭであり、２０分での最大濃度は７４±２６ｐＭであった。１０μｇのｓ．ｃ．ボーラスを注射した３匹のラットにて、対応する１０および２０分の濃度は、各々、３４７±４３ｐＭおよび３０１±５７ｐＭであった。２０分経過後、～５０％まで胃が空になることを阻害する、１μｇの皮下アミリン用量（ＥＤ５０）は、２０分後に作用するために、注射後すぐに作動を開始しなければならない。注射後、約２０分で作動する効果は、例えばこの系にて検出されなかった。７４ｐＭの最大血漿中濃度に到達するかなり前に、胃が空になることを５０％阻害するのに効果的な血漿中濃度（ＥＣ５０）が得られ、したがってそれは７４ｐＭよりもかなり低い値である。
【０１１９】
これらの実験の結果は、アミリンが強力であり、用量に依存して胃が空になることを阻害することを示す。
【０１２０】
実施例６

この実施例において記載する実験は、経口グルコース耐性に対するアミリンレセプターアンタゴニストの作用および標識化した経口グルコース負荷に由来のトリチウムの吸収を試験するために行った。

【０１２１】

試験した標識化グルコース負荷の吸収を、２回、１４日離して、１１匹の意識のある２４時間絶食した肥満（５００～６００ｇ）ＬＡ／Ｎラットにて測定した。１回目に、ラットに３μｇの選択的アミリンアンタゴニストＡＣ－０１８７（ａｃ－^{10}Ｎ^{32}Ｙ８－３^{2}サーモン・カルシトニン、強制栄養の３分前）を皮下注射した。２回目には、ラットにセイラインビヒクルを単独で予備注射した。ラットを、１ｍｌの５０％グルコース中、５μＣｉの［^{3}Ｈ］グルコースで強制栄養した。血液サンプルを麻酔した尾部から摂取し、強制栄養の０、１５、３０、６０、９０および１２０分経過後、グルコース誘導トリチウムおよびグルコースについて検定した。

【０１２２】

図１６に示すように、アミリンアンタゴニスト、ＡＣ－０１８７の予備注射は、強制栄養の１５分後に４８％まで（ｐ＜０.０２）、強制栄養の３０分後に４５％まで（ｐ＜０.００１）の血漿中のグルコース誘導トリチウムの出現を促進した（対ｔ－試験）。図１７に示すように、ＡＣ－０１８７での予備注射はまた、０.５ｇグルコースでの強制栄養の１５分後の血漿中グルコースをより早い速度で上昇させた（５.８９±０.１７～８.３３±０.２８ｍＭ ｖｓ. ５.８３±０.２２～６.８３±０.２８ｍＭ、ｐ＜０.００１、対ｔ－試験）。加えて、ＡＣ－０１８７処理動物にて、血漿中グルコースはより早期に減退した（６.８９±０.２８ｍＭ ｖｓ. ８.１７±０.３９ｍＭ、グルコース強制栄養の６０分後の強制栄養後、ｐ＜０.００１、対ｔ－試験）。

【０１２３】

かくして、ＬＡ／Ｎ肥満ラットにおいて、選択的アミリンアンタゴニストは経口グルコースを負荷した後に、標識化したグルコースの血漿中の出現を速め、また、非標識化グルコースの血漿中濃度の上昇および降下の速度を増加させた。これらのデータは、内因的に分泌されたアミリンの効果を妨げ、それで胃が空になることを促進するアミリン・アンタゴニストと一致する。

【図面の簡単な説明】

【０１２４】

【図１】図１は、対照と比較した、経口グルコース負荷の後イヌにおいてアミリンが血漿グルコース値に及ぼす影響を示す。

【図２】図２は、プラセボまたは３０μｇのＡＣ－０１３７のIVボーラスを投与したヒト臨床志願者の食事後グルコースプロフィールを示す。

【図３】図３は、プラセボまたは１００μｇのＡＣ－０１３７IVボーラスを投与したヒト臨床志願者の食事後グルコースプロフィールを示す。

【図４】図４は、プラセボまたは３００μｇのＡＣ－０１３７のIVボーラスを投与したヒト臨床志願者の食事後グルコースプロフィールを示す。

【図５】図５は、プラセボ投与またはＡＣ－０１３７の１５μｇ／時間で２時間IV注入したヒト臨床志願者の食事後グルコースプロフィールを示す。

【図６】図６は、プラセボ投与またはＡＣ－０１３７の５０μｇ／時間で２時間IV注入したヒト臨床志願者の食事後グルコースプロフィールを示す。

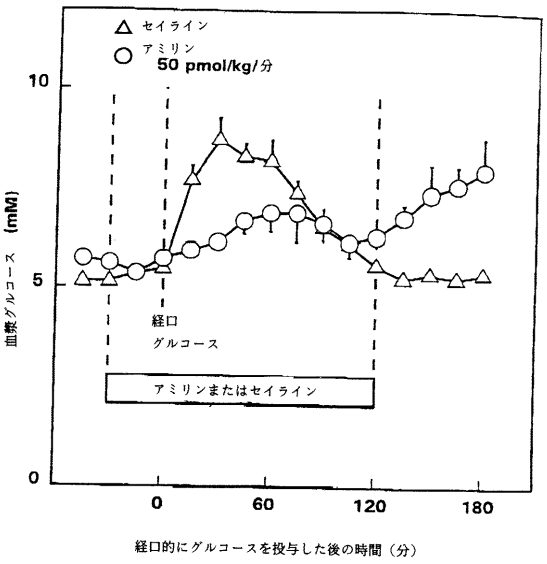
【図７】図７は、プラセボ投与またはＡＣ－０１３７の１５０μｇ／時間で２時間IV注入したヒト臨床志願者の食事後グルコースプロフィールを示す。

【図８】８a～８bは、食事前に１日３回、１４日間にわたり３０μｇのトリプロ-アミリン（ＡＣ－０１３７）を投与したヒト臨床志願者の基線（１日目）、７日目および１４日目のサスタカル（Sustacal、登録商標）寛容性試験のサスタカル（Sustacal、登録商標）食事後グルコースプロフィールを示す。

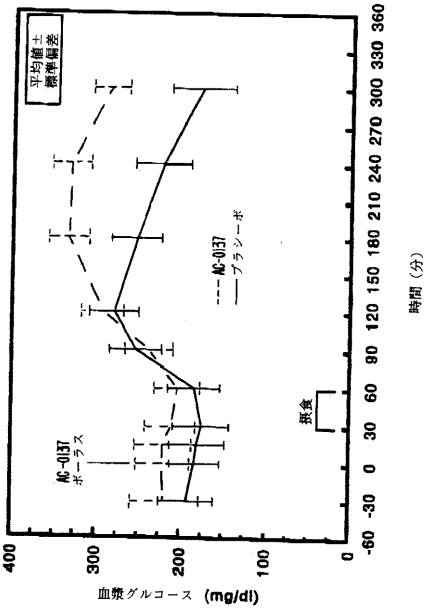
【図９】図９a～９cは、２５μｇ／時間のトリプロアミリンのIV注入開始前６０分からの血漿グルコース（ｍｇ／ｄｌ）、血漿トリプロアミリン（ｐＭ）および無血漿インスリン濃度

（μＵ／ml）を示す。トリプロアミリン注入の開始後６０分にサスタカル（Sustacal、登録商標）を食事として与えた。
【図１０】図１０a～１０cは、５０μg／時間のトリプロアミリンのIV注入開始前６０分からの血漿グルコース（mg／dl）、血漿トリプロアミリン（pM）および無血漿インスリン濃度（Ｕ／ml）を示す。トリプロアミリン注入の開始後６０分にサスタカル（Sustacal、登録商標）を食事として与えた。
【図１１】図１１a～１１cは、５０μg／時間のトリプロアミリンのIV注入開始前６０分からの血漿グルコース（mg／dl）、血漿トリプロアミリン（pM）および無血漿インスリン濃度（μＵ／ml）を示す。トリプロアミリン注入の開始後６０分にIVグルコース負荷（３００mg／kg）を与えた。
【図１２】図１２a～１２bは、食事前に１日３回、１４日間にわたり１００μgのトリプロ-アミリン（ＡＣ－０１３７）を投与したヒト臨床志願者の基線（１日目）、７日目および１４日目のサスタカル（Sustacal、登録商標）寛容性試験のサスタカル（Sustacal、登録商標）食事後グルコースプロフィールおよびトリプロ－アミリンレベルを示す。
【図１３】図１３a～１３bは、食事前に１日３回、１４日間にわたり３００μgのトリプロ-アミリン（ＡＣ－０１３７）を投与したヒト臨床志願者の基線（１日目）、７日目および１４日目のサスタカル（Sustacal、登録商標）寛容性試験のサスタカル（Sustacal、登録商標）食事後グルコースプロフィールおよびトリプロ－アミリンレベルを示す。
【図１４】図１４は、正常および糖尿病ＢＢラット（各点についてｎ＝３～９）のガベージ（強制栄養）後２０分後の胃内容物の保持に及ぼす、ラットアミリンの前皮下注射の用量反応効果を示す。表示は平均±ＳＥＭであり、曲線は、最も適合するロジスティック関数を規定する。「ゼロ」は、アミリンで処理されていない正常および糖尿病ラットで保持された胃内容物の画分を示す(Ｐ＜０.００１で相違)。
【図１５】図１５は、１μgまたは１０μgの合成ラットアミリン（各群ｎ＝３）の皮下注射後に測定された血漿アミリン濃度を示す。表示は、平均±ＳＥＭで示す。
【図１６】図１６は、食塩水またはＡＣ－０１８７のガベージ後の血漿中のグルコース由来トリチウム（cpm／１０μl）を示す。＊は、統計有意を示す。最下線（「バックグラウンド」と標識した破線）は、開腹および幽門結紮後にガベージされた４匹の麻酔されたラットから生じる。それは、トリチウムが胃壁から直接にはほとんど吸収されておらず、トリチウム取り込みがグルコースの小腸からの循環への通過を反映することを示す。
【図１７】図１７は、食塩水またはＡＣ－０１８７のいずれかをガベージした後の血漿グルコース（mg／dl）を示す。

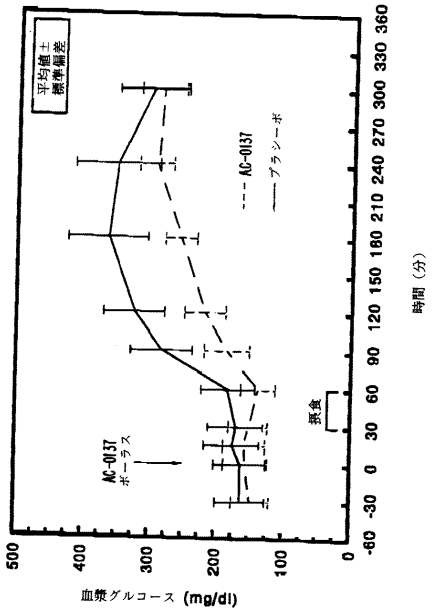
【図１】


△ セイライン
○ アミリン
50 pmol/kg/分
血漿グルコース (mM)
10
5
0
経口
グルコース
アミリンまたはセイライン
0
60
120
180
経口的にグルコースを投与した後の時間（分）

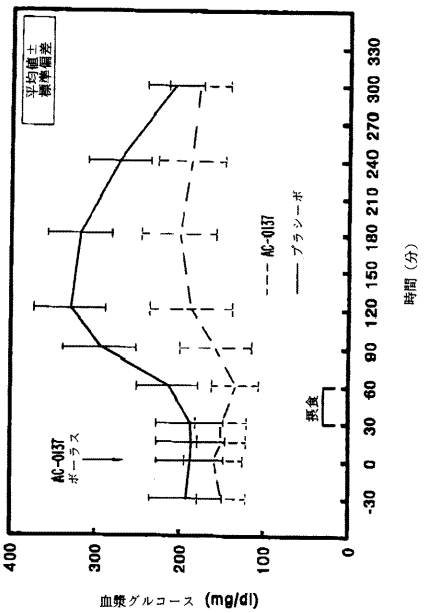
【図２】


平均値±
標準偏差
AC-0137
ボーラス
AC-0137
プラシーボ
摂食
血漿グルコース (mg/dl)
時間（分）

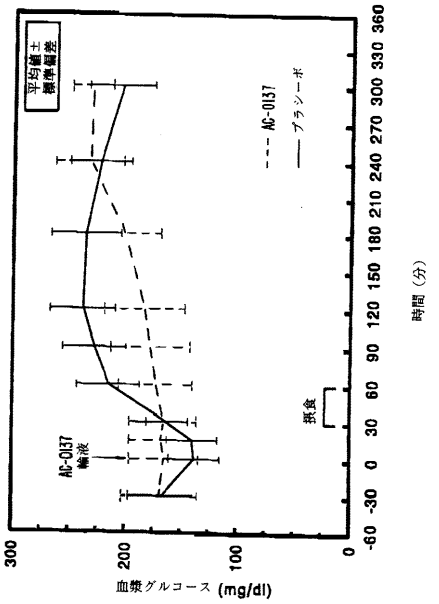
【図３】


平均値±
標準偏差
AC-0137
ボーラス
AC-0137
プラシーボ
摂食
血漿グルコース (mg/dl)
時間（分）

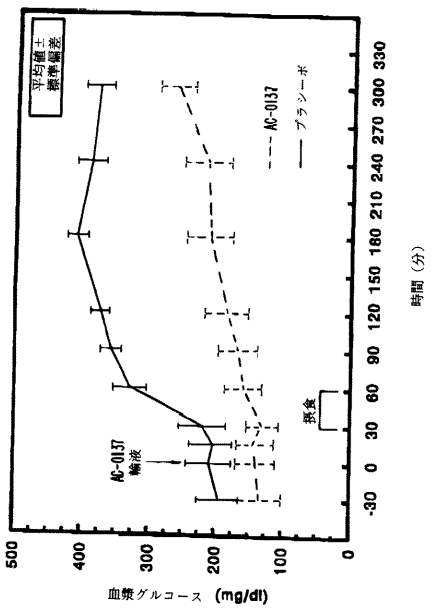
【図４】


平均値±
標準偏差
AC-0137
ボーラス
AC-0137
プラシーボ
摂食
血漿グルコース (mg/dl)
時間（分）

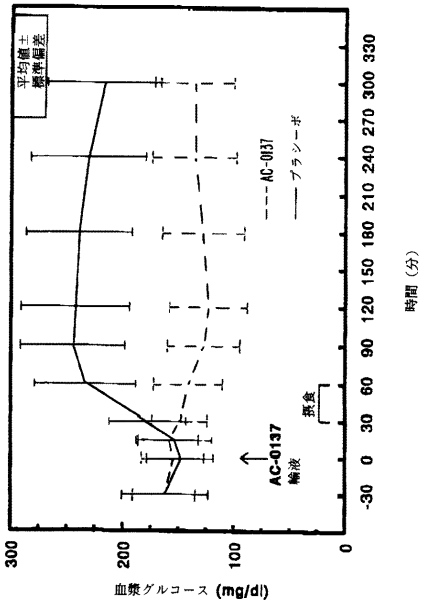
【図５】


平均値±
標準偏差
AC-0137
プラシーボ
AC-0137
輸液
摂食
血漿グルコース (mg/dl)
時間（分）

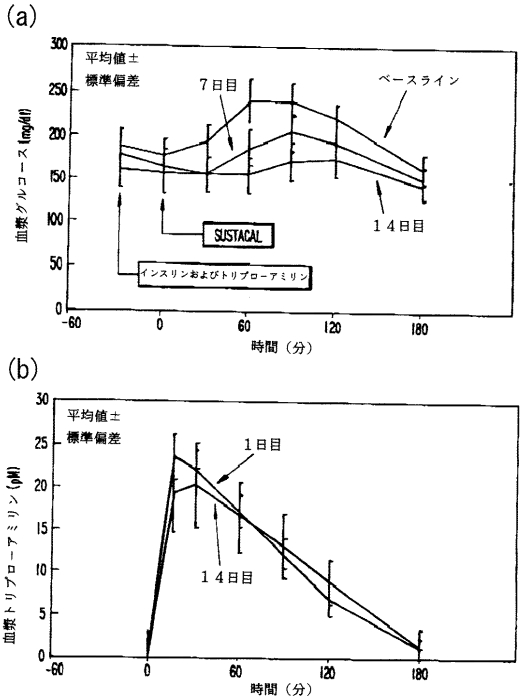
【図６】


平均値±
標準偏差
AC-0137
プラシーボ
AC-0137
輸液
摂食
血漿グルコース (mg/dl)
時間（分）

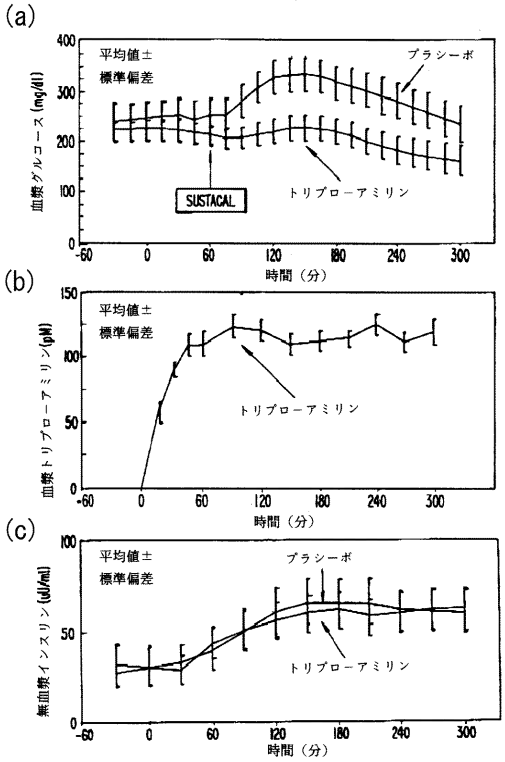
【図７】


平均値±
標準偏差
AC-0137
プラシーボ
AC-0137
輸液
摂食
血漿グルコース (mg/dl)
時間（分）

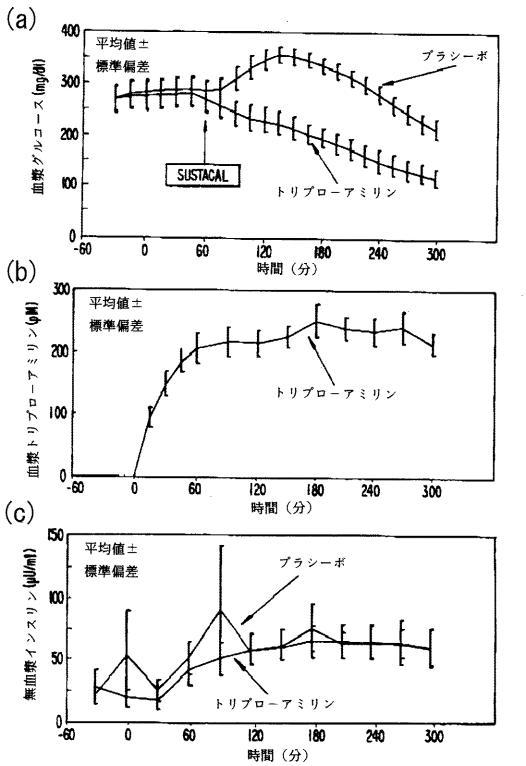
【図８】


(a)
平均値±
標準偏差
7日目
ベースライン
14日目
SUSTACAL
インスリンおよびトリプローアミリン
血漿グルコース (mg/dl)
時間（分）
(b)
平均値±
標準偏差
1日目
14日目
血漿トリプローアミリン (pM)
時間（分）

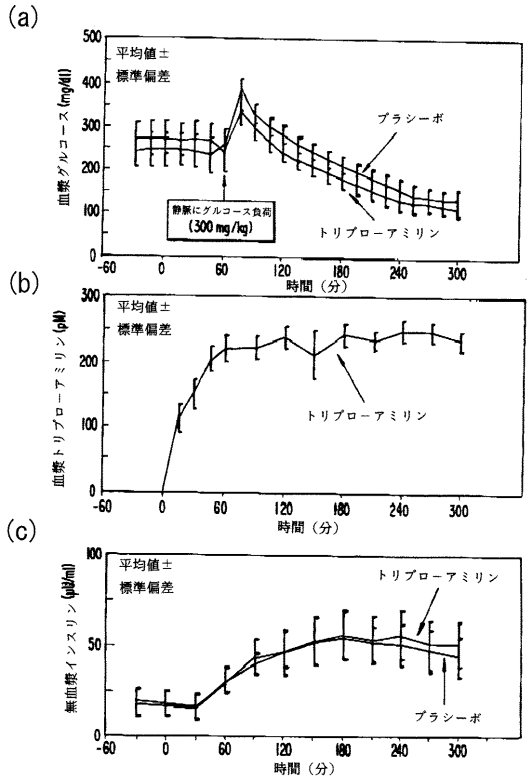
【図９】



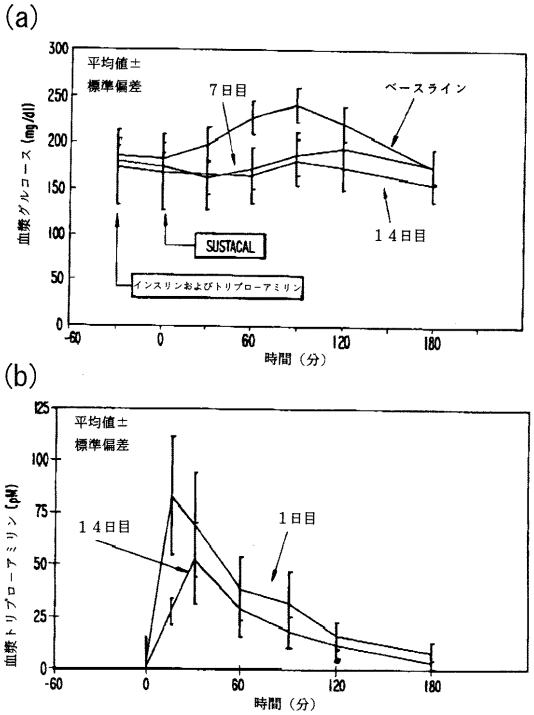
【図１０】



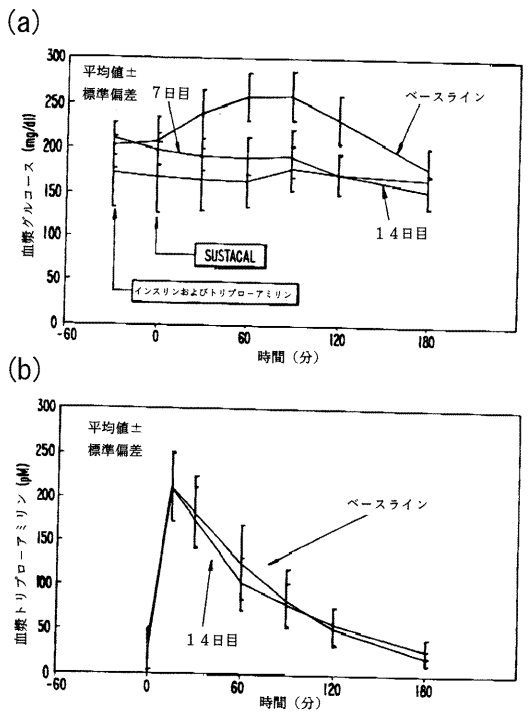
【図１１】



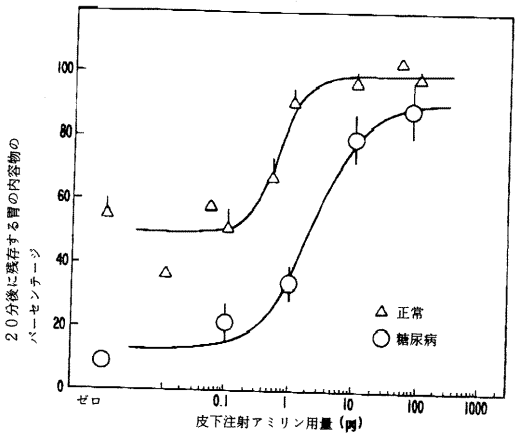
【図１２】



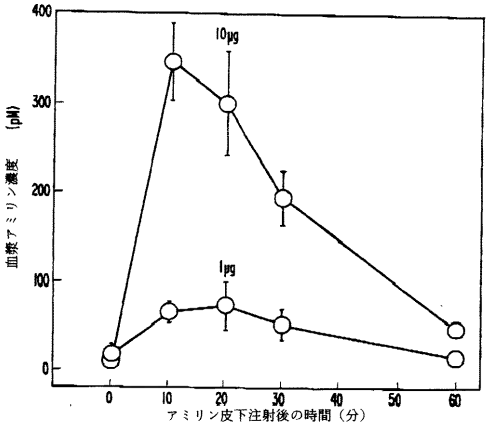
【図１３】



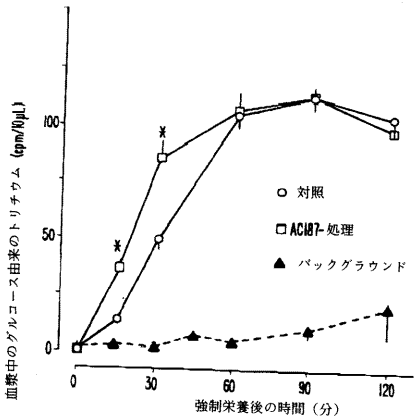
【図１４】



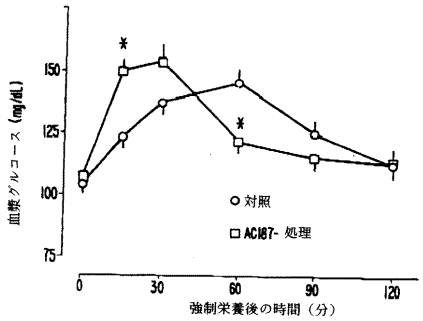
【図１５】



【図１６】



【図１７】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI	テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 43/00	Ａ６１Ｋ 37/24	
// Ｃ０７Ｋ 14/585	Ｃ０７Ｋ 14/585 ＺＮＡ	

(72)発明者 オービル・ジー・コルターマン
アメリカ合衆国カリフォルニア州９２０６４、ポウェイ、ヒドゥン・バレー・ドライブ１５７９３番
(72)発明者 アンドリュー・エイ・ヤング
アメリカ合衆国カリフォルニア州９１９０１、アルパイン、ジョシュ・ウェイ５１０番
(72)発明者 ティモシー・ジェイ・リンク
アメリカ合衆国カリフォルニア州９２０３７、ラ・ジョラ、ラ・ジョラ・ブールバード５６６６番
(72)発明者 キャスリーン・ケイティング・ブラウン
アメリカ合衆国ノースキャロライナ州２７５８７、ウェイク・フォレスト、オールド・スティル・ロード５５２５番

Ｆターム(参考) 4C084 AA02 AA17 BA01 BA08 BA19 DA31 DB70 MA52 MA55 MA66
NA14 ZA202 ZA662 ZC352 ZC422
4H045 AA30 BA10 BA18 CA52 DA36 EA20 FA33 GA21