

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-538898

(P2009-538898A)

(43) 公表日 平成21年11月12日 (2009. 11. 12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
<b>A 6 1 P 3/10 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
<b>A 6 1 P 3/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 3/10	
	A 6 1 P 3/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 17 頁)		

(21) 出願番号 特願2009-512684 (P2009-512684)  
 (86) (22) 出願日 平成19年6月1日 (2007. 6. 1)  
 (85) 翻訳文提出日 平成21年2月2日 (2009. 2. 2)  
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2007/050313  
 (87) 国際公開番号 W02007/138362  
 (87) 国際公開日 平成19年12月6日 (2007. 12. 6)  
 (31) 優先権主張番号 0610746.0  
 (32) 優先日 平成18年6月1日 (2006. 6. 1)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

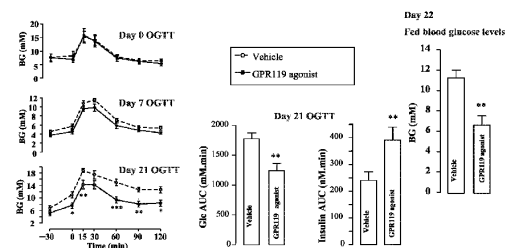
(71) 出願人 504326837  
 プロシディオン・リミテッド  
 Prosidion Limited  
 英国オーエックス4・6エルティ、オックス  
 スフォードシャー、オックスフォード、ワ  
 トリントン・ロード、ウィンドラッシュ・  
 コート  
 (74) 代理人 100068526  
 弁理士 田村 恭生  
 (74) 代理人 100100158  
 弁理士 鮫島 睦  
 (74) 代理人 100076521  
 弁理士 坪井 有四郎  
 (74) 代理人 100138900  
 弁理士 新田 昌宏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖尿病の進行を遅らせるためのGPCRアゴニストの使用

## (57) 【要約】

本発明は、細胞変性の処置のためのGタンパク質共役型レセプターアゴニストの使用に関する。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

必要とする患者に有効量の G P R 1 1 9 アゴニストを投与することを含んでなる、細胞変性の処置のための方法。

## 【請求項 2】

G P R 1 1 9 アゴニストが、細胞機能の悪化および / またはアポトーシスまたはネクローシスによる細胞の喪失を阻害または減少させることにより、細胞変性を処置する、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 3】

G P R 1 1 9 アゴニストが細胞の数またはサイズを増大させる、請求項 1 記載の方法。

10

## 【請求項 4】

G P R 1 1 9 アゴニストが、膵細胞をランゲルハンス島の機能的に活性な細胞に増殖させることにより、および / または非感受性のまたは傷害を受けた膵細胞をランゲルハンス島の機能的に活性な細胞に転換させる、請求項 3 記載の方法。

## 【請求項 5】

必要とする患者に有効量の G P R 1 1 9 アゴニストを投与することを含んでなる、前糖尿病状態の 2 型糖尿病への進行を遅らせる方法。

## 【請求項 6】

必要とする患者に有効量の G P R 1 1 9 アゴニストを投与することを含んでなる、2 型糖尿病の進行を遅らせる方法。

20

## 【請求項 7】

処置される患者がヒトである、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 8】

G P R 1 1 9 アゴニストが経口で作用する小分子である、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は G タンパク質共役型レセプター ( G P C R ) アゴニストの使用に関する。具体的には、本発明は、細胞変性の処置および前糖尿病状態もしくは 2 型糖尿病の進行を遅延させるための G P R 1 1 9 のアゴニストの使用に関する。

30

## 【背景技術】

## 【0002】

肥満は、体格に対して相対的に過剰な脂肪組織量により特徴付けられる。臨床では、体脂肪量はボディ・マス・インデックス ( B M I ; 体重 ( k g ) / 身長 ( m ) <sup>2</sup> ) または腰回りから推定される。B M I が 30 を超える人は肥満とされ、太り過ぎという医学的結果が出される。かなり以前から、体重の増加は、特に腹部の体脂肪の結果として、糖尿病の危険性を増加させるという医学的見解が受け入れられている。

## 【0003】

糖尿病は、高血糖状態 ( 血中グルコース濃度の上昇 ) の存在により特徴付けられる慢性的な代謝性疾患である。2 型糖尿病または非インスリン依存性糖尿病 ( N I D D M ) の罹患率は高く、憂慮すべき速度で増加している。糖尿病の全世界における疾病負担は、2005 年までに 3 億ドルに達すると予想され、2 型糖尿病を有する患者が 90 % を超える。

40

## 【0004】

しばしば耐糖能障害あるいは空腹時血糖異常とも称される前糖尿病状態 ( Definition and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications: Report of a WHO Consultation. Geneva, 1999, WHO/NCD/NCS 99.2 を参照 ) は、血糖値が正常値を超えているが 2 型糖尿病と診断されるほど高くない状態である。

## 【0005】

50

2 型糖尿病における高血糖につながる主な病態生理学的異常は、インスリンの働きが悪いこと（インスリン抵抗性）とインスリンの分泌が悪い（細胞機能障害）ことである。多尿症（過剰な排尿）、多渴症（過剰な口渇）等の血中グルコース濃度の上昇によって引き起こされる症状を予防するために、そして糖尿病の合併症の危険性を低減するために、高血糖を処置することは、糖尿病の治療として重要である。糖尿病の慢性的な高血糖状態は、眼、腎臓、神経および血管における、重大な、しばしば深刻で長期間の合併症を伴う。2 型糖尿病における薬物療法の最も大規模な試験である United Kingdom Prospective Diabetes Study (U K P D S) [Database 44:1249-1258, 1995] はまた、2 型糖尿病において、時間の経過と共に細胞機能の容赦ない低下が起こっていることを実証した。細胞変性は、患者の大部分において、経時的な血糖コントロールの悪化につながり、ひいてはその患者がインスリンの投与に依存するようになることにつながる疾患の進行につれて、ますます治療を追加する必要がある。この細胞機能の低下は、通常、前糖尿病状態の間に、その患者が2 型糖尿病と診断されるよりもずっと前に始まる。診断時には、患者は細胞機能を既に40%喪失していることもある。しかしながら、この時点で、患者は、血糖降下剤が処方される高血糖と診断されるに過ぎない。

10

20

30

40

50

#### 【0006】

2 型糖尿病を処置するための現在入手可能な経口薬は数多く存在する。一般に処方される薬剤は、メトホルミンとスルホニルウレアである。メトホルミンは、肝臓からのグルコース放出を減少させることにより作用し、多くの患者において消化器症状の副作用を伴い、経時的な細胞機能の低下に対しては効果がない。スルホニルウレアは、インスリンの分泌を増加させることにより作用し、体重増加と低血糖（低い血中グルコース濃度）の副作用を伴い、メトホルミンと同様、経時的な細胞機能の低下に対しては効果がない（U K P D S 参照）。

#### 【0007】

細胞変性を処置し、前糖尿病状態または2 型糖尿病の進行を遅らせることが可能な薬剤が依然として必要とされている。

#### 【0008】

G P R 1 1 9 は、ヒトおよびラットのレセプターを開示する W O 0 0 / 5 0 5 6 2、またマウスレセプターを開示する米国特許第 6, 4 6 8, 7 5 6 号において、S N O R F 2 5 として示される G P C R である（アクセスナンバー：A A N 9 5 1 9 4（ヒト）、A A N 9 5 1 9 5（ラット）および A A N 9 5 1 9 6（マウス））。ヒトにおいて、G P R 1 1 9 は、インスリン、インクレチンおよび食品摂取の調節の標的部位である、膵臓、小腸、大腸および脂肪細胞において発現している。ヒト G P R 1 1 9 レセプターの発現プロファイルは、肥満症および糖尿病の処置の標的としての潜在的な有用性を示している。

#### 【0009】

国際特許出願、W O 2 0 0 4 / 0 6 5 3 8 0、W O 2 0 0 4 / 0 7 6 4 1 3、W O 2 0 0 5 / 0 0 7 6 4 7、W O 2 0 0 5 / 0 0 7 6 5 8、W O 2 0 0 5 / 1 2 1 1 2 1、W O 2 0 0 5 / 0 6 1 4 8 9、W O 2 0 0 6 / 0 6 7 5 3 1、W O 2 0 0 6 / 0 6 7 5 3 2、W O 2 0 0 6 / 0 7 0 2 0 8、W O 2 0 0 6 / 0 8 3 4 9 1、W O 2 0 0 7 / 0 0 3 9 6 0、W O 2 0 0 7 / 0 0 3 9 6 1、W O 2 0 0 7 / 0 0 3 9 6 2、W O 2 0 0 7 / 0 0 3 9 6 4 および W O 2 0 0 7 / 0 3 5 3 5 5 は、小分子 G P R 1 1 9 アゴニストを開示している。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0010】

本発明は、細胞変性の処置および前糖尿病状態もしくは2 型糖尿病の進行を遅らせるための G P R 1 1 9 のアゴニストの使用に関する。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0011】

本発明は、必要とする患者に有効量の G P R 1 1 9 アゴニストを投与することを含んで

なる 細胞変性の処置のための方法を提供する。

【0012】

細胞変性には、細胞機能の悪化（細胞機能不全）および／またはアポトーシスまたはネクローシスによる細胞の喪失が含まれる。

【0013】

GPR119アゴニストは、細胞機能の悪化を阻害または低減することにより細胞変性を処置する。

【0014】

GPR119アゴニストは、また、細胞の数またはサイズを増大させることにより細胞変性を処置し得る。細胞の数および／またはサイズは、膵細胞をランゲルハンス島の機能的に活性な細胞に増殖させることにより、および／または非感受性のまたは傷害を受けた膵細胞をランゲルハンス島の機能的に活性な細胞に転換することにより、増大させることができる。

10

【0015】

このように、本発明の更なる態様によれば、必要とする患者に有効量のGPR119アゴニストを投与することを含んでなる、細胞の数またはサイズを増大させる方法を提供する。

【0016】

GPR119アゴニストは細胞変性を処置するので、前糖尿病状態から2型糖尿病への進行を遅らせるのに有用であり、また、2型糖尿病が、例えば患者が適切な血糖コントロールを達成するためにインスリンの投与に依存するようになるところまで進行するのを遅らせるのにも有用である。

20

【0017】

従って、本発明はまた、必要とする患者に有効量のGPR119アゴニストを投与することを含んでなる、前糖尿病状態から2型糖尿病への進行を遅らせる方法を提供する。

【0018】

本発明はさらに、必要とする患者に有効量のGPR119アゴニストを投与することを含んでなる、2型糖尿病の進行を遅らせる方法を提供する。

【0019】

本発明はさらに、上で定義した状態の処置において使用するためのGPR119アゴニストを提供する。

30

【0020】

本発明はさらに、上で定義した状態の処置のための医薬の製造におけるGPR119アゴニストの使用を提供する。

【0021】

本発明の方法において、「処置」なる用語には治療的処置と予防的処置が含まれる。

【0022】

本発明に従って処置される患者は好ましくはヒトである。

【0023】

本発明の方法において使用するためのアゴニストとしては、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、酵素、抗体、ならびに非ペプチド、例えば小分子が挙げられる。GPR119アゴニストは、好ましくは経口で作用する小分子、例えば、好ましくは分子量800未満、より好ましくは分子量600未満、特に500未満の有機小分子である。GPR119アゴニストは、WO2004/065380、WO2004/076413、WO2005/007647、WO2005/007658、WO2005/121121、WO2005/061489、WO2006/067531、WO2006/067532、WO2006/070208、WO2006/083491、WO2007/003960、WO2007/003961、WO2007/003962、WO2007/003964またはWO2007/035355に記載の化合物であってよい。

40

【0024】

50

本発明の方法における使用に関して、GPR119アゴニストは通常医薬組成物の形態で投与される。

【0025】

本発明はさらに、製薬的に許容し得る担体および治療上有効量のGPR119アゴニストを含有する、細胞変性の処置のための医薬組成物を提供する。

【0026】

医薬組成物は、場合により、その他の治療成分または助剤を含有していてもよい。組成物としては、経口、直腸、局所および非経口投与（皮下、筋肉内および静脈内を含む）が挙げられるが、与えられた症例における最も適当な経路は、その活性成分が投与される具体的な宿主、およびその病状の性質と重篤度に依存する。医薬組成物は便宜上、単位投与形態で提供することができ、調剤技術分野における周知の任意の方法により製造することができる。

10

【0027】

実際には、GPR119アゴニストは、慣用の製薬配合技術にしたがって製薬的な担体と緊密に混和された活性成分として混合される。担体は、投与に所望の調製物の形態（例えば経口または非経口（静脈内を含む））に依存して様々な形態であってよい。

【0028】

従って、医薬組成物は、カプセル、カシェ、または錠剤等の、各々予め決められた量の活性成分を含有する経口投与に適した個々の単位として提供することができる。さらに、組成物は、粉末、顆粒、溶液、水性の液体中の懸濁液、非水性の液体、水中油エマルジョンまたは油中水液体エマルジョンとして提供することができる。上記の一般的な形態に加え、GPR119アゴニストは、制御された放出手段および/またはデリバリーデバイスによって投与することもできる。組成物は調剤技術の任意の方法によって調製することができる。一般に、そのような方法としては、活性成分を1またはそれ以上の必要な成分から構成される担体と合する工程が挙げられる。一般に、組成物は、活性成分と、液体の担体または微細な固体の担体またはその両方とを、均一におよび緊密に混和することにより調製される。次いで、生成物を所望の形に成形する。

20

【0029】

GPR119アゴニストは、1またはそれ以上の他の治療的に活性な化合物と組み合わせて医薬組成物に含有させることもできる。

30

【0030】

用いられる製薬的な担体は、例えば、固体、液体または気体である。固体の担体としては、ラクトース、白土、スクロース、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、アカシア、ステアリン酸マグネシウムおよびステアリン酸が挙げられる。液体の担体としては、シュガーシロップ、ピーナッツオイル、オリーブオイル、および水が挙げられる。気体の担体としては、二酸化炭素および窒素が挙げられる。

【0031】

経口投与剤型用の組成物の調製においては、任意の慣用の製薬的な媒体を用いることができる。例えば、水、グリコール、油、アルコール、香料、保存料、着色料等を用い、懸濁液、エリキシルおよび溶液等の経口液体調製物を形成することができる。一方、デンプン、糖、微晶性セルロース等の担体、希釈剤、造粒剤、滑沢剤、結合材、崩壊剤等を用い、粉末、カプセルおよび錠剤等の経口の固体調製物を形成することができる。投与が容易であることから、錠剤およびカプセル剤は、それにより固体の製薬的な担体が用いられる好ましい経口投与単位である。場合により、錠剤に標準的な水性または非水性の技術によるコーティングを施してよい。

40

【0032】

本発明の組成物を含有する錠剤は、場合により1またはそれ以上の副成分または助剤とともに圧縮または成形することにより調製することができる。圧縮錠剤は、適当な機械にて、場合により結合剤、滑沢剤、不活性な希釈剤、表面活性剤または分散剤と混合した、粉末または顆粒等の自由に流動する形態の活性成分を圧縮することにより製造することが

50

できる。成形錠剤は、粉末化された化合物を不活性な液体の希釈剤で湿らせ、適当な機械にて成型することにより製造することができる。各々の錠剤は、好ましくは約 0.05 mg ~ 約 5 g の活性成分を含有し、カプセルまたはカプセルは、各々、好ましくは約 0.05 mg ~ 約 5 g の活性成分を含有する。

#### 【0033】

例えば、ヒトへの経口投与を企図する製剤は、組成物全体の約 5 ~ 約 95 % の間で変更できる適切で便利な量の担体物質と組み合わせて、約 0.5 mg ~ 約 5 g の活性成分を含有することができる。単位投与形態は、一般に約 1 mg ~ 約 2 g、典型的には 25 mg、50 mg、100 mg、200 mg、300 mg、400 mg、500 mg、600 mg、800 mg または 1000 mg の活性成分を含有する。

10

#### 【0034】

非経口投与に適当な本発明の医薬組成物は、水中の活性成分の溶液又は懸濁液として製造することができる。適当な表面活性剤としては、例えば、ヒドロキシプロピルセルロースが挙げられる。また、分散剤は、グリセリン、液体のポリエチレングリコールおよび油中のそれらの混合物中にて調製することができる。さらに、保存料を含有させて有害な微生物の繁殖を防止することができる。

#### 【0035】

注射用として適当な本発明の医薬組成物としては、滅菌された水溶液または水性分散液が挙げられる。さらに、組成物は、そのような滅菌された水溶液または水性分散液をその場で調製するための滅菌された粉末の形態であってよい。すべての場合において、最終の注射可能な形態は無菌であり、注射を容易にするのに有効な流動性を有していなければならない。医薬組成物は、製造および保存の際に安定でなければならない；従って、好ましくは細菌や真菌等の微生物の汚染を防止すべきである。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（グリセリン、プロピレングリコール、および液体のポリエチレングリコール）、植物油、およびその適当な混合物等の溶媒または分散媒体であってよい。

20

#### 【0036】

本発明の医薬組成物は、例えば、エアロゾル、クリーム、軟膏、ローション、散布剤等の局所使用に適当な形態であってよい。さらに、組成物は、経皮デバイスにおける使用に適当な形態であってよい。これらの製剤は、GPR119 アゴニストを用いて、慣用の加工法を介して調製することができる。一例として、クリームまたは軟膏は、親水性の物質と水とを、約 5 重量% ~ 約 10 重量% の化合物とともに混合し、所望の粘度を有するクリームまたは軟膏とすることによって調製することができる。

30

#### 【0037】

本発明の医薬組成物は、担体が固体の直腸投与に適当な形態であってよい。混合物が単位用量の坐剤を形成するのが好ましい。適当な担体としては、ココアバターや他の物質が挙げられる。坐剤は、最初に組成物を軟らかくしたまたは溶融した担体と混合した後、型に入れて冷却し成形することにより、便利に形成することができる。

#### 【0038】

上記の担体成分に加え、上記の医薬製剤は、適宜、希釈剤、緩衝剤、香料、結合剤、表面活性剤、増粘剤、滑沢剤、保存料（酸化剤を含む）等の 1 又はそれ以上のさらなる担体成分を含有してもよい。さらに、他の助剤も含有させて、意図する受容者の血液に対する等張性を製剤に与えることができる。また、GPR119 アゴニストを含有する組成物は、粉末または液体の濃縮形態に調製することができる。

40

#### 【0039】

一般に、投与量レベルは、一日あたり、0.01 mg / kg 体重のオーダーから約 150 mg / kg 体重、或いは、患者一人あたり 1 日に約 0.5 mg ~ 約 7 g が、上で示された状態の処置に有用である。例えば、肥満症は、1 日に体重 1 kg あたり約 0.01 ~ 50 mg、或いは 1 日に患者一人あたり約 0.5 mg ~ 約 3.5 g の GPR119 アゴニストの投与によって効果的に処置することができる。

#### 【0040】

50

但し、特定の患者についての具体的な投与量レベルは、年齢、体重、一般的な健康状態、性別、食事、投与の時間、投与経路、排泄の頻度、薬物の組み合わせおよび治療を受けている具体的な疾患の重篤度を含む様々な要因に依存することは理解される。

【0041】

GPR119アゴニストは、肥満症および/または糖尿病の処置のための他の活性化化合物、例えばインスリンおよびインスリンアナログ、胃リパーゼ阻害剤、膵リパーゼ阻害剤、スルホニルウレアおよびアナログ、ビッグアニド、例えばメトホルミン、 $\alpha$ 2アゴニスト、グリタゾン、PPAR- $\gamma$ アゴニスト、RXRアゴニスト、脂肪酸酸化阻害剤、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤、グルコキナーゼアクチベーター、ジペプチジルペプチダーゼIV阻害剤、GLP-1アゴニスト、例えばGLP-1アナログおよび模擬体、 $\beta$ -アゴニスト、ホスホジエステラーゼ阻害剤、脂質低下薬、グリコーゲンホスホリラーゼ阻害剤、抗肥満薬、例えば膵リパーゼ阻害剤、MCH-IアンタゴニストおよびCB-Iアンタゴニスト（または逆作動薬）、アミリンアンタゴニスト、リボキシゲナーゼ阻害剤、ソモスタチンアナログ、グルコキナーゼアクチベーター、グルカゴンアンタゴニスト、インスリンシグナル伝達アゴニスト、PTP1B阻害剤、糖新生阻害剤、抗脂肪分解剤、GSK阻害剤、ガラニンレセプターアゴニスト、食欲抑制剤、CCKレセプターアゴニスト、レプチン、セロトニン作動性/ドーパミン作動性抗肥満薬、再取り込み阻害剤、例えばシブトラミン、CRFアンタゴニスト、CRF結合タンパク質、甲状腺ホルモン様化合物、アルドースレダクターゼ阻害剤、グルココルチコイドレセプターアンタゴニスト、NHE-I阻害剤またはソルビトール脱水素酵素阻害剤と共に投与することができる。

10

20

【0042】

GPR119アゴニストおよび他の薬剤は、同時投与（co-administered）してよく、または逐次に（sequentially）もしくは別々に（separately）投与してもよい。

【0043】

同時投与としては、GPR119アゴニストおよび他の薬剤の両方を含有する製剤の投与、または各薬剤の異なる製剤の同時のまたは別々の投与が挙げられる。GPR119アゴニストおよび他の薬剤の薬理学的プロファイルが許容するならば、その2つの薬剤の同時投与（coadministration）が好ましい。

【0044】

本明細書に引用した、特許および特許出願を含みこれに限定されないすべての刊行物は、個々の刊行物が具体的におよび独立して全体が記載されるとして本明細書の一部を構成する。

30

【0045】

本発明はここに、以下の実施例を例示を目的として参考のために記載するが、本発明の限定と解釈されるものではない。

【図面の簡単な説明】

【0046】

【図1】若年db/dbマウスの糖尿病予防におけるGPR119アゴニストの効果を示す。

【発明を実施するための形態】

40

【実施例】

【0047】

GPR119アゴニストとしての化合物の活性は、以下のアッセイ系において試験することができる。

1) 酵母レセプターアッセイ

酵母細胞ベースのレセプターアッセイについては既に文献に記載されている（例えば、Miret J. J. et al, 2002, J. Biol. Chem., 277:6881-6887; Campbell R. M. et al, 1999, Bioorg. Med. Chem. Lett, 9:2413-2418; King K. et al, 1990, Science, 250:121-123); WO99/14344; WO00/12704; および米国特許第6,100,042号参照）。簡潔に言えば、酵母細胞を操作して内因性の酵母G-（GPA1）を除去

50

し、複数の技術を用いて構築された G タンパク質キメラで置き換えた。さらに、内因性の酵母細胞 GPCR、Set 3 を除去し、選択した哺乳類 GPCR の相同的発現を可能にした。酵母においては、真核細胞において保存されているフェロモンシグナル伝達経路のエLEMENT (例えば、マイトジェン活性化タンパクキナーゼ活性) は、Fus 1 の発現を指揮する。ガラクトシダーゼ (LacZ) を Fus 1 プロモーター (Fus 1 p) の制御下に置くことによって、レセプターの活性化が酵素の読み出しにつながるような系を開発した。

#### 【0048】

酵母細胞を、Agatepら (Agatep, R. et al, 1998, Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol (LiAc/ss-DNA/PEG) protocol. Technical Tips Online, Trends Journals, Elsevier) によって記載された酢酸リチウム法を適用することによって形質転換した。簡潔に言えば、酵母細胞を酵母トリブシプレート (YT) にて一晚培養した。キャリアー 1 本鎖 DNA (10 µg)、2 種類の Fus 1 p - LacZ レポータープラスミド各 2 µg (1 つは URA 分泌マーカーを有し、もう一方は TRP を有する)、酵母発現ベクター (2 µg複製起点) 中の GPR 116 (ヒトまたはマウスレセプター) 2 µg、および酢酸リチウム / ポリエチレングリコール / TE 緩衝液をエッペンドルフチューブにピペットで加えた。レセプターを含む / 含まない (対照) 酵母発現プラスミドは、LEU マーカーを有する。酵母細胞をこの混合物中でインキュベーションし、反応を 30 分に 60 分間行った。次いで、酵母細胞を 42 分に 15 分間ヒートショック処理した。次いで、細胞を洗浄し、選択プレートに広げた。選択プレートは、SD 酵母培地 (マイナス LEU、URA、および TRP (SD - LUT)) である。30 分に 2 ~ 3 日間インキュベーションした後、選択プレート上で増殖したコロニーを LacZ アッセイにおいて試験した。

#### 【0049】

- ガラクトシダーゼについて蛍光エンザイムアッセイを行うために、ヒトまたはマウス GPR 119 レセプターを有する酵母細胞を液体の SD - LUT 培地中で不飽和の濃度 (即ち、細胞がまだ分裂しており定常期に達していない) まで一晚培養した。それらを新鮮な培地で最適な分析濃度まで希釈し、酵母細胞 90 µL を 96 ウェルの黒いポリスチレンプレート (Costar) に加えた。DM SO に溶解し、10 % DM SO 溶液で 10 倍に希釈した化合物をプレートに加え、プレートを 30 分に 4 時間静置した。4 時間後、- ガラクトシダーゼの基質を各ウェルに加えた。これらの実験では、フルオレセインを放出する酵素の基質であるフルオレセインジ (-D - ガラクトピラノシド) (FDG) を用い、蛍光読み出しを可能にした。500 µM FDG / 2.5 % Triton X 100 をウェルあたり 20 µL 加えた (細胞を透過性にするために洗剤が必要であった)。細胞と基質を 60 分間インキュベーションした後、1 M 炭酸ナトリウムを加えて反応を止め、蛍光シグナルを増強した。次いで、プレートを蛍光光度計にて 485 / 535 nm で読み取った。

#### 【0050】

GPR 119 アゴニストは、一般に、少なくともバックグラウンドシグナル (即ち、化合物なしで 1 % DM SO の存在下で得られたシグナル) の約 1.5 倍の蛍光シグナルの増大を示す。

#### 【0051】

##### 2) cAMP アッセイ

組換えヒト GPR 119 を発現する安定な細胞系を確立し、この細胞系をサイクリック AMP (cAMP) の細胞内レベルに対する化合物の効果を調べるために用いた。単層細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、1 % DM SO を加えた刺激バッファー中の種々の濃度の化合物で 37 分に 30 分間刺激した。次いで、細胞を溶解し、cAMP 含量を Perkin Elmer AlphaScreen™ (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay) cAMP キットを用いて測定した。バッファーおよびアッセイ条件は、製造元のプロトコルに記載のとおりにした。

10

20

30

40

50



## 【0052】

GPR119アゴニストは、一般に、細胞内cAMPレベルの濃度依存的な増大を示し、例えば、 $EC_{50}$ は $<10\mu M$ である。

## 【0053】

若齢db/dbマウスの糖尿病の予防におけるGPR119アゴニストの効果は、以下のとおり実証することができる。

GPR119アゴニストを前糖尿病状態の6週齢のdb/dbマウスを用いて調べた。マウスを12時間の明暗周期(7時に点灯)で飼育した。毎日9時にピークル(25% a g . Gelucire 44/14, p.o.)またはGPR119アゴニスト(100 mg/kg p.o.(25% a g . Gelucire 44/14中))を21日間投与した。0、7、および21日目にグルコース(Glc)投与(1.5 g/kg p.o.)による経口グルコース耐性試験(OGTT)を行った。同日、OGTT(11時)後に化合物を投与した。OGTT中、血液サンプル(20  $\mu$ L)をGlc投与から25、50、80および120分後に採取した。Glcレベルの測定用に血液サンプル20  $\mu$ Lを尾から採取し、使い捨てのマイクロピペット(Dade Diagnostics Inc., Puerto Rico)に入れ、サンプルを480  $\mu$ Lの溶血剤に加えた。次いで、希釈した溶血血液のアリコート20  $\mu$ L(2本)を、96ウェルアッセイプレートの180  $\mu$ Lのトリンダーグルコース試薬(Sigma酵素(Trinder)比色法)に加えた。混合後、サンプルを室温にて30分間静置し、Glc標準(Sigmaグルコース/尿素窒素混合標準セット)に対して読み取った。Glc投与から30分後にインスリン試験用に血液サンプルを採取した。22日目に食後血糖値(Fed blood glucose level)を測定した。血漿5  $\mu$ Lを用い、インスリン濃度を使用説明書にしたがって96ウェルELISAキット(Crystal Chem. Inc. #INSKR020 96アッセイ)を用いて測定した。

## 【0054】

血漿グルコースおよびインスリンレベルの結果を、平均 $\pm$ SEM(それぞれ、mMおよびpM)で示した。各時点について、t検定と組み合わせた一元配置分散分析からなる統計学的解析を行った。差は、 $p < 0.05$ を有意とした。OGTT試験については、AUC(0~120分)を計算し、デルタ値を求めた。

## 【0055】

21日間の処置にわたって、GPR119アゴニストを投与したマウスは、前糖尿病状態のdb/dbマウスと同等の経口グルコース耐性プロファイルを示したが、ピークルを投与した対照マウスは空腹時血糖値の上昇と一定の耐糖能異常を示した。これらのデータは、ピークルを投与した動物における糖尿病の進行と一致するが、db/dbマウスが糖尿病になる境界期間のGPR119アゴニストによる処置によって、糖尿病の状態が阻止または遅延されている(図1)。さらに、21日間の治療後に、ピークルで処置した糖尿病db/dbマウスとの比較で、GPR119アゴニストで処置したdb/dbマウスがインスリン分泌を有意に増大させる能力によって、GPR119レセプターの持続的な活性化がグルコース投与に応答して膵細胞機能を増大することができることが示されており、細胞機能低下の抑制を示している。

## 【0056】

ZDFラットにおける糖尿病の進行に対するGPR119アゴニストの効果は、以下のとおり実証することができる。

## 【0057】

GPR119アゴニストを前糖尿病状態の6週齢のZDFラットにおいて調べた。ラットを12時間の明暗周期(6時に点灯)で飼育した。毎日8時15分にピークル(20% ヒドロキシプロピル - シクロデキストリン, u.i.d.経口)またはGPR119アゴニスト(10または30 mg/kg u.i.d.経口(20% ヒドロキシプロピル - シクロデキストリン中))を56日間投与した。1、29および56日目に、ピークルおよびGPR119アゴニストの投与から45分後に、グルコース(Glc)投与(2 g/kg p.o.)による経口グルコース耐性試験(OGTT)を行った。OGTTの間、血液サンプル(20  $\mu$ L)をGlc投与から0、15、30、45、60、90、120、150および180

0分後に採取した。血糖値の測定用に尾から採取した血液サンプル20 µLを使い捨てのマイクロピペットに入れ、溶血のため1 mL溶液で満たした標準チューブ（血糖値測定）に、そして血漿インスリンのためにサンプルチューブに入れた。血糖値はグルコースオキシダーゼ法（Super G Glukose Analyser, Dr Muller Geratebau, Freital, Germany）を用い、血漿インスリン濃度は、E L I S A（Mercodia AB, Uppsala, Sweden）により分析した。

#### 【0058】

試験の開始時では、ラットは6週齢であり、結果として糖尿病ではなかった。ピークルで処置したZDFラットは、食後血糖値の急激な上昇と、尿中へのグルコース損失を伴う多尿症に伴って起こる多渴症の結果である水摂取量の顕著な増加の両方によって示されるように、間もなくして糖尿病になった。試験して3週間で、ピークルで処置した対照ZDFラットの食後血糖値は2～3倍に増加した。対照的に、GPR119アゴニストで処置したラットにおける血糖値の上昇は、より緩やかであり、これらの動物が、ピークルで処置した対照のラットと比較して有意により低い食後血糖値を示していることが導かれる。例えば、試験の3～6週目の期間では、30 mg/kg/dのGPR119アゴニストを投与したラットでは、食後血糖値が、ピークルを投与したラットよりも6～7 mM低かった。GPR119アゴニストは、糖尿病の進行と相関するもうひとつのパラメーターである多渴症を低減した。また、GPR119アゴニストは、ピークルで処置したラットと比較して、Hb<sub>A1c</sub>のより小さい上昇によって示されるように、長時間のグルコース暴露を有意に抑制した。OGTTにおいて、GPR119アゴニストは、8週間の投与期間にわたり強い血糖降下効果を示した。GPR119アゴニストで処置したラットの糖耐能は、ピークルで処置した動物とは対照的に、反応性グルコースAUCの有意の減少によって示されるように、試験期間中は同程度に維持された。

10

20

#### 【0059】

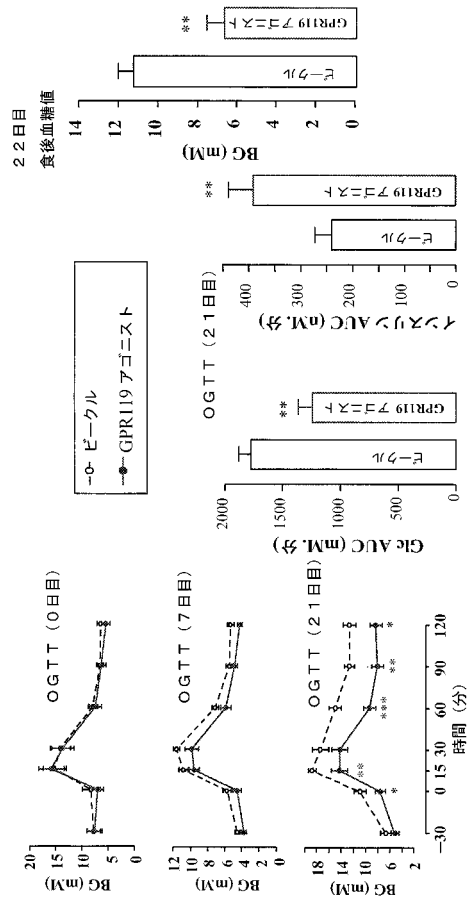
従って、GPR119の持続的な活性化により、ZDFラットにおいて糖尿病が発症する期間の疾患の進行を抑えると考えられる。

#### 【0060】

また、細胞機能に対するGPR119アゴニストの効果を、Dipeptidyl peptidase IV inhibitor treatment stimulates beta-cells survival and islet cell neogenesis in streptozotocin-induced diabetic rats (Popisilik et al, Diabetes, 52: 741- 750, 2003)に記載されているように、動物モデルにおいても測定することができる。

30

FIGURE 1



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2007/050313

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. A61K31/00 A61P5/48		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, CHEM ABS Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/061489 A (PROSIDION LTD [GB]; FYFE MATTHEW [GB]; GARDNER LISA [GB]; KING-UNDERWOOD) 7 July 2005 (2005-07-07) cited in the application page 2, line 9-10; page 20, line 20-34; table 1-12 ----- -/-	1-8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
20 September 2007		05/10/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Borst, Markus

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2007/050313

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MAYET S ET AL: "GPR119 activation increases glucose-dependent insulin secretion in insulin-producing cells and isolated rat islets" DIABETOLOGIA, vol. 48, no. Suppl. 1, 2005, page A166, XP002451808 & 41ST ANNUAL MEETING OF THE EUROPEAN-ASSOCIATION-FOR-THE-STUDY-OF-DIAB ETES; ATHENS, GREECE; SEPTEMBER 10 -15, 2005 ISSN: 0012-186X abstract -----	1-8
X	SOGA T ET AL: "Lysophosphatidylcholine enhances glucose-dependent insulin secretion via an orphan G-protein-coupled receptor" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 326, no. 4, 28 January 2005 (2005-01-28), pages 744-751, XP004682876 ISSN: 0006-291X page 746-750, paragraph entitled "Results and discussion" -----	1-8
X	OVERTON HILARY A ET AL: "Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents" CELL METABOLISM, vol. 3, no. 3, March 2006 (2006-03), pages 167-175, XP002451809 ISSN: 1550-4131 page 168-173, paragraph entitled "Results and Discussion" -----	1-8
A	FREDRIKSSON R ET AL: "Novel human G protein-coupled receptors with long N-terminals containing GPS domains and Ser/Thr-rich regions" FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 531, no. 3, 20 November 2002 (2002-11-20), pages 407-414, XP004392677 ISSN: 0014-5793 last full paragraph on page 409 ----- -/--	1-8

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2007/050313

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FYFE MATTHEW ET AL: "Discovery of novel, orally active, synthetic GPR119 agonists as potential agents for treatment of obesity and associated metabolic disorders" DIABETES, vol. 55, no. Suppl. 1, June 2006 (2006-06), page A81, XP009089696 & 66TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-DIABETES-ASSOCIATION; WASHINGTON, DC, USA; JUNE 09 -13, 2006 ISSN: 0012-1797 abstract	1-8
P,X	WO 2007/003960 A (PROSIDION LTD [GB]; BRADLEY STUART EDWARD [GB]; DAWSON GRAHAM JOHN [GB] 11 January 2007 (2007-01-11) cited in the application page 2, first and second paragraph; page 18, last full paragraph and paragraph bridging pages 18 and 19; table 3-8	1-8
T	RAYASAM G V ET AL: "Fatty acid receptors as new therapeutic targets for diabetes" EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC TARGETS 2007 UNITED KINGDOM, vol. 11, no. 5, 2007, pages 661-671, XP009089705 ISSN: 1472-8222 page 666, paragraph entitled "4.3 GPR119"	1-8

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/GB2007/050313

**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Rule 39.1(iv) PCT : Although claims 1-8 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2007/050313

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005061489 A	07-07-2005	AU 2004303604 A1 BR PI0418149 A CA 2549955 A1 CN 1898235 A EP 1711491 A1 JP 2007517010 T KR 20060127011 A	07-07-2005 17-04-2007 07-07-2005 17-01-2007 18-10-2006 28-06-2007 11-12-2006
WO 2007003960 A	11-01-2007	NONE	



## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 マシュー・コリン・ソーア・ファイフ

英国オーエックス4・6エルティ、オックスフォードシャー、オックスフォード、ワトリントン・ロード、ウィンドラッシュ・コート、プロシディオン・リミテッド

(72)発明者 ピーター・ウィドウソン

英国オーエックス4・6エルティ、オックスフォードシャー、オックスフォード、ワトリントン・ロード、ウィンドラッシュ・コート、プロシディオン・リミテッド

Fターム(参考) 4C084 AA17 MA52 NA14 ZA702 ZB212 ZC022 ZC352