

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5161412号  
(P5161412)

(45) 発行日 平成25年3月13日(2013.3.13)

(24) 登録日 平成24年12月21日(2012.12.21)

(51) Int.Cl.

F I

<b>A 6 1 K</b>	<b>38/22</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>37/24</b>
<b>A 6 1 P</b>	<b>19/10</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>19/10</b>
<b>A 6 1 P</b>	<b>5/18</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>5/18</b>
<b>A 6 1 P</b>	<b>19/08</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>19/08</b>

請求項の数 4 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2002-526401 (P2002-526401)	(73) 特許権者	506280557
(86) (22) 出願日	平成13年9月17日 (2001.9.17)		サノス・バイオサイエンス・アクティーゼ
(65) 公表番号	特表2004-508410 (P2004-508410A)		ルスカブ
(43) 公表日	平成16年3月18日 (2004.3.18)		デンマーク国、デーカー-2730 ヘル
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/010714		レフ、ヘルレフ・ホーフエデガーデ、20
(87) 国際公開番号	W02002/022151		7
(87) 国際公開日	平成14年3月21日 (2002.3.21)	(74) 代理人	100099623
審査請求日	平成20年9月4日 (2008.9.4)		弁理士 奥山 尚一
(31) 優先権主張番号	0022844.5	(74) 代理人	100096769
(32) 優先日	平成12年9月18日 (2000.9.18)		弁理士 有原 幸一
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100107319
(31) 優先権主張番号	0029920.6		弁理士 松島 鉄男
(32) 優先日	平成12年12月7日 (2000.12.7)	(72) 発明者	ヘンリックセン、デニス・バンダ
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		デンマーク国、ディーケー-3450 ア
			レロード、フビデフスベ、13番
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 GLP-1 及び GLP-2 ペプチドの使用法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

グルカゴン様ペプチド - 2 (GLP-2)、

GLP-2 レセプターに結合し、前記レセプターを活性化して、GLP-2 が結合した場合に産生されるものと同等である出力メッセージャー又はシグナルを生成する能力を維持するように、一つ以上のアミノ酸残基が欠失している、一つ以上のアミノ酸残基が付加されている、若しくは一つ以上のアミノ酸残基が構造的に類似し而も抗ペプチダーゼ性のアミノ酸模倣残基で置換されている GLP-2 の類縁体、若しくは、

GLP-2 の酸付加塩、GLP-2 の C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub> アルキルエステル、若しくは GLP-2 の C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub> アルキルアミド

を含んで成る組成物を含む、骨粗しょう症、上皮小体機能亢進症、パジェット病、悪性高カルシウム血症、骨転移により生じる骨分解性病変、不動化又は性ホルモン欠乏に起因する骨損失及び骨軟化症から成る群から選択される疾患を治療するための薬剤。

【請求項 2】

経口投与または皮下、筋肉内、腹腔内又は静脈内注入により投与されることを特徴とする、請求項 1 において記載された薬剤。

【請求項 3】

前記骨粗しょう症が、閉経後骨粗しょう症であることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載された薬剤。

【請求項 4】

ヒトに対して投与されるための、請求項 1 ~ 4 に記載された薬剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する分野】

本発明は、骨吸収又は不十分な骨形成が一つの要因である疾患、例えば骨粗しょう症を処置するための方法及び組成物、特に医薬製剤に、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1)、及びGLP-1の誘発・誘導物質、類縁体及び誘導体、並びにグルカゴン様ペプチド-2 (GLP-2)、及びGLP-2の誘発・誘導物質、類縁体及び誘導体を使用する方法に係わる。

【0002】

10

【発明の背景】

グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 及びグルカゴン様ペプチド-2 (GLP-2) は、プログルカゴン分子の断片であって、かかるプログルカゴン分子は、160個のアミノ酸配列を有する。プログルカゴンは、遠位回腸のL-細胞、膵臓及び脳において合成されるプログルカゴン前駆体由来する。プログルカゴン前駆体のプロセッシングによるGLP-1及びGLP-2の産生は、主としてL-細胞で生起する。

【0003】

プログルカゴン断片72-117のアミノ酸配列は、例えばBell, G. I. et al. (Nature 304 368-371 (1983))によって報告されている。このプログルカゴン断片78-108は、通常はGLP-1 (7-37) と称される。この事実に関連して、かかるプログルカゴン断片72-108は、本明細書本文においてもGLP-1 (1-37) とも称することとする。

20

【0004】

GLP-1 (7-36) アミド誘導体なるプログルカゴン断片は、ヒトの天然型であり、通常GLP-1 と称される - Gutniak, M., N., N. Engl. J. Med., 326: 1326-22(1992)。

【0005】

かかるGLP-1関連ペプチドの断片類及び類縁体を記述するために、単純なシステムが用いられる。即ち、例えば、Gly8-GLP-1 (7-37) は、位置8におけるアミノ酸残基 (Ala) をGlyで置換することによってGLP-1から形式的に誘導されるGLP-1の断片を意味する。

30

【0006】

GLP-1 (7-37) の変異体及びその類縁体は、既に関示されており、例えば、Gln9-GLP-1 (7-37)、D-Gln9-GLP-1 (7-37)、Acetyl-Lys9-GLP-1 (7-37)、Thr16-Lys18-GLP-1 (7-37)、Lys18-GLP-1 (7-37) など及びこれらの誘導体であって、例えば酸付加塩、カルボン酸塩、低級アルキルエステルやアミドなどが開示されている (例えばWO 91/11457を参照のこと)。

【0007】

グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) は、インシュリン分泌を刺激したグルカゴン分泌を阻害・抑制し、かくして血糖値を低下させることが知られている - Andreasen, J. J. et al. (Digestion 55 221-228 (1994))。一般的に、開示されているGLP-1の種々の型の化合物は、インシュリン分泌及びcAMP生成を刺激することが知られている (例えば、Mojsov, S. (Int. J. Peptide Protein Research 40, 333-343 (1992)) を参照のこと)。

40

【0008】

グルカゴン様ペプチド-2 (GLP-2) は、プログルカゴン断片126-158の配列に相当する、プログルカゴンの33個のアミノ酸ペプチド断片である。GLP-2は、アミノ酸配列がグルカゴン及びグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) と高い相同性を示す。さらには、GLP-2の哺乳類種毎に異なる型のものについて保存度は高い。例えば

50

ヒト G L P - 2 ( h G L P - 2 ) 及び d e g u ( 南アメリカ産のげっ歯類動物 ) G L P - 2 は、ラット G L P - 2 ( r G L P - 2 ) とはそれぞれ一つ及び三つのアミノ酸において異なる。

【 0 0 0 9 】

種々の脊椎動物型の G L P - 2 が、多くの報告者、例えば Buhl et al., J. Biol. Chem., 1988, 263(18): 8261, Nishi and Steiner, Mol. Endocrinol., 1990, 4:1192-8 及び Irwin and Wong, Mol. Endocrinol., 1995, 9(3): 267-77 によって報告されている。これらの著者により報告されている配列は、参考文献として本明細書に合体される。

【 0 0 1 0 】

外因性化合物として投与された場合、G L P - 2 は、試験マウスの小腸上皮細胞の増殖を著しく増大させ、而も一見して好ましくない副作用は一切認められない (Drucker et al., 1996, PNAS: USA, 93 7911-7916)。さらには、G L P - 2 はまた、小腸の基底外側膜を貫通する D グルコース輸送最大速度を増大させることが示されている (Cheeseman and Tse ng, 1996, American Journal of Physiology 271 G477-G482)。

【 0 0 1 1 】

骨粗しょう症は、ヒトに最も広く認められる骨疾患であり、重篤で而も頻度の高い、世界的に発生する疾患である。骨粗しょう症の最も重要な単一のリスクファクターは、エストロゲンの欠乏であり、治療しないまま放置された場合閉経後婦人の三分の一までが罹患するものと推定される - Sclemmer, A. et al., Eur. J. Endocrinol. 140: 332-337 (1999)。骨粗しょう症による骨損失に到る主要な事象は、閉経に関連した骨代謝回転の増大である。内因性エストロゲンの低下に伴ない急激な骨吸収増大が認められるが、その後これに関連するものの強度の低下した骨形成が行なわれる。骨吸収と骨形成との間においてこのようなネットの不均衡が生起する結果、骨損失に至り、かくして骨折のリスクが増加するのである。

【 0 0 1 2 】

骨構造の損失をもたらすその他の疾患及び代謝性障害としては例えば、上皮小体機能亢進症、ページェット病、悪性過カルシウム血症、骨転移により発症する骨分解性傷害、不動化又は性ホルモン不足による骨損失、ベーチェット病、骨軟化症、過骨形成症及び骨粗しょう症が挙げられる。

【 0 0 1 3 】

驚くべきことに、G L P - 1 ペプチド又は G L P - 2 ペプチドを投与した場合、ヒトにおける骨質量の損失及び/又は不十分な骨形成に影響を及ぼすことが発見されたのである。かかる知見に基いて、骨吸収及び/又は不十分な骨形成が要因となる疾患又は障害、例えば骨粗しょう症を予防するか又は治療するための医薬及び方法を提供することが可能となったのである。

【 0 0 1 4 】

発明の要旨

【 0 0 1 5 】

本発明は一つの局面において、グルカゴン様ペプチド-1 ( G L P - 1 ) 又はその類縁体若しくは誘導体下及び/又はグルカゴン様ペプチド-2 ( G L P - 2 ) 又はその類縁体若しくは誘導体を含んで成る組成物を骨吸収を阻害・抑制し及び/又は骨形成を促進させるために使用する方法に係わる。

【 0 0 1 6 】

本明細書において、“類縁体”なる名称は、元のペプチドの一つ又はそれ以上のアミノ酸残基が、別のアミノ酸によって置換されている及び/又は元のペプチドの一つ又はそれ以上のアミノ酸残基が欠失している及び/又は一つ又はそれ以上のアミノ酸残基が元のアミノ酸に付加されている、ペプチドを意味するために使用される。

【 0 0 1 7 】

更に“類縁体”なる用語は、ペプチドのレセプターに結合した前記レセプターを活性化して、G L P - 1 又は G L P - 2 にそれぞれ結合した場合産生されるものと種類において

10

20

30

40

50

同等である出力メッセージャー又はシグナルを生成する前記ペプチドのミメティクスを含むものである。このような類縁体は、生体内での分解に対してG L P - 1又はG L P - 2よりも抵抗度が高くなり、その結果半減期がより長くなるか又は経口的に投与可能であるように適合させてもよい。かかる類縁体は、G L P - 1又はG L P - 2に基き形成されたプソイドペプチドであって、一つ又はそれ以上のアミノ酸が構造的に類似し而も抗ペプチダーゼ性のアミノ酸模倣残基で置換された前記プソイドペプチドを含むこととする。

【0018】

本明細書においては、“アミノ酸残基”なる名称は、遺伝暗号によりヌクレオチドのトリプレット暗号(“コドン”)を介してコード可能であるアミノ酸の残基を意味する。本明細書においては、本発明に係わるペプチド類は、“G L P - 1ペプチド”と総称した“G L P - 2ペプチド”と総称する。

10

【0019】

本明細書において称する“誘導体”としては、例えば酸付加塩、カルボン酸エステル塩、低級アルキル(例えば、 $C_1 - C_6$ 、更に好ましくは $C_1 - C_3$ )エステルやアミドが挙げられる。またG L P - 2ペプチドを化学修飾することによって形成され、而も同等又はそれ以上の濃度準位で骨吸収低減性能及び/又は骨形成増大性能を保持している物質も含まれる。

【0020】

もう一つの局面においては、本発明は、グルカゴン様ペプチド-1(G L P - 1)又はその類縁体若しくは誘導体、及び/又はグルカゴン様ペプチド-2(G L P - 2)又はその類縁体若しくは誘導体を含んで成る組成物を骨吸収及び/又は不十分な骨形成が要因となる疾患を治療するための医薬を構成・製造するために使用する方法に係わる。

20

【0021】

好ましくは該疾患は、骨粗しょう症である。

【0022】

第三の局面においては、本発明は、G L P - 1, G L P - 2, G L P - 1類縁体, G L P - 2類縁体, G L P - 1誘導体, G L P - 2誘導体, G L P - 1又はG L P - 2の受容体のアゴニスト, G L P - 1又はG L P - 2のシグナルトランスダクションカスケードのアゴニスト、内因性のG L P - 1又はG L P - 2の合成を刺激する化合物群、内因性のG L P - 1又はG L P - 2の遊離・放出を刺激する化合物群、及びこれらの薬学的に許容可能な塩類、エステル類又はアミド類から成る群から選択される化合物の一種を被験者に投与することから成る、骨吸収を阻害・抑制する及び/又は骨形成を促進する方法に係わるのである。

30

【0023】

本発明の一つの好ましい実施態様は、当該組成物が、G L P - 2, G L P - 2類縁体、及びこれらの薬学的に許容可能な塩類、エステル類又はアミド類から成る群から選択されることを特徴とする、治療・処置方法に係わる。

【0024】

更に好ましい実施態様においては、本発明は、該組成物が経口により投与されることを特徴とする方法に係わる。

40

【0025】

本発明の別の局面は、骨吸収又は不十分な骨形成が一つの要因である疾患を発症するリスクのある被験者を予防的に治療する方法であって、該方法が、下記する工程を含んで成る前記方法：

- a) かかる疾患を発症するリスクのある被験者を同定すること；及び
- b) G L P - 1, G L P - 2, G L P - 1類縁体, G L P - 2類縁体, G L P - 1誘導体, G L P - 2誘導体, G L P - 1又はG L P - 2の受容体のアゴニスト, G L P - 1又はG L P - 2のシグナルトランスダクションカスケードのアゴニスト、内因性のG L P - 1又はG L P - 2の合成を刺激する化合物群、内因性のG L P - 1又はG L P - 2の遊離・放出を刺激する化合物群、及びこれらの薬学的に許容可能な塩類、エステル類又はアミド

50

類から成る群から選択される一種の化合物を前記疾患の発症を阻害・抑制するに十分な量だけ該被験者に投与すること。

【0026】

一つの好ましい実施態様においては、本発明は、該疾患が骨粗しょう症であることを特徴とする治療・処置方法にかかわる。

【0027】

更に好ましい実施態様においては、本発明は、被験者がヒトであることを特徴とする方法に係わる。

【0028】

本発明のまた別の局面は、骨吸収を阻害・抑制する及び/又は骨形成を促進するために使用する組成物であって、GLP-1、GLP-2、GLP-1類縁体、GLP-2類縁体、GLP-1誘導体、GLP-2誘導体、GLP-1又はGLP-2の受容体のアゴニスト、GLP-1又はGLP-2のシグナルトランスダクションカスケードのアゴニスト、内因性のGLP-1又はGLP-2の合成を刺激する化合物群、内因性のGLP-1又はGLP-2の遊離・放出を刺激する化合物群、及びこれらの薬学的に許容可能な塩類から成る群から選択される一種の化合物を含んで成る前記組成物に係わる。

10

【0029】

好ましくは、該化合物は、経口的に有効である類縁体又は誘導体である。好ましくは、かかる化合物が、GLP-1又はGLP-2の内因性生成又は遊離・放出を刺激するものである場合は、該化合物は、栄養学的に効果的ではなく又は食品の成分とは見なされない。

20

【0030】

更なる実施態様においては、本発明は、骨吸収又は不十分な骨形成が一つの要因である疾患を治療的又は予防的に治療・処置するための医薬組成物であって、GLP-1、GLP-2、GLP-1類縁体、GLP-2類縁体、GLP-1誘導体、GLP-2誘導体、GLP-1又はGLP-2の受容体のアゴニスト、GLP-1又はGLP-2のシグナルトランスダクションカスケードのアゴニスト、内因性のGLP-1又はGLP-2の合成を刺激する化合物群、内因性のGLP-1又はGLP-2の遊離・放出を刺激する化合物群、及びこれらの薬学的に許容可能な塩類から成る群から選択される一種の化合物を含んで成る前記組成物に係わる。

【0031】

30

【詳細な発明の説明】

本発明は、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1)、その類縁体及び誘導体、グルカゴン様ペプチド-2 (GLP-2)、その類縁体若しくは誘導体を、骨吸収及び/又は不十分な骨形成が要因となる疾患、つまり骨粗しょう症を治療するために使用する方法を含んで成るものである。

【0032】

骨構造の損失をもたらす疾患及び代謝性障害が、かかる治療により利益を受けるであろう。例えば、上皮小体機能亢進症、ページェット病、悪性過カルシウム血症、骨転移により発症する骨分解性傷害、不動化又は性ホルモン不足による骨損失、ページェット病、骨軟化症、過骨形成症及び骨化石症は、GLP-1ペプチド及び/又はGLP-2ペプチドを投与することから利益・便宜を受けることが出来るであろう。

40

【0033】

将来の骨折リスクを評価するために、生化学的マーカーを使用することによって骨吸収及び骨形成の程度を生化学的に検定・定量することが可能であることは、既に公知である。しかしながら、早朝でのピーク値と午後での最低値となる相当な概日性の日内変動があり、このような変動は通常は、測定時の絶食により考慮されている。

【0034】

なおかかる変動は、性、年齢及び骨粗しょう症の病期とは無関係であるが、高いベースライン値が閉経後の婦人において認められる。また肉体活動とは依存関係があり、即ち3日間のベッドでの安静は、閉経前婦人における概日性変動を変化させることはない。血漿中

50

コルチゾールの概日性変動について可能性のある要因として研究されたことがある。

【 0 0 3 5 】

概日性変動を除去するために、コルチゾール欠乏個人にコルチゾールを代替補充しても、また健常な閉経後婦人でのコルチゾールクランピング研究の何れの結果からも、骨吸収における概日性変動に影響を及ぼすこと一切実証されなかった。閉経前及び閉経後婦人によるPTHクランピング研究を行なった結果、骨代謝の概日性変動もまた、血清PTH濃度には依存しないことが明らかとなっている。最近、閉経前婦人での研究の結果、I型コラーゲン分解による骨C-テロペプチド断片の尿内排出値で測定した骨吸収における概日性変動は、絶食期間中では有意に減少することが判った - Schlemmer, A, et al., Eur. J. Endocrinol. 140: 332-337(1999)。

10

【 0 0 3 6 】

骨吸収における概日性変動の根底となる生化学的機構については、依然として殆ど理解されていない。

【 0 0 3 7 】

健常な閉経後婦人においてインシュリン値とOGTT/経口投与グルコースとの間に一定の関連性が認められている - Reid, I.R. et al., The American Physiological Society E 655-E659 (1993)。さらには、ロッテルダム研究(Rotterdam Study)に基くベースラインデータから、このような関連性は、高齢の男女の双方においても認められることが判ったのであるが、BMIについて補正を行なうと低減することが判っている - Stolk, R.P. et al., Bone 6:545-549(1996)。このコホートにおいて、以前の非脊椎骨折は、負荷後のインシュリン値が低くなったことと関連づけられている。この研究の予備的フォローアップデータから、BMI及び骨質量について補正を行なった後の負荷後ベースラインインシュリン濃度は、非脊椎骨折リスクの低減と関連づけられることが示唆されている - Hendrikse, J. et al., ASBMR-IBMS Second Joint Meeting S501。最後に、19,000人の、糖尿病に罹患していないスウェーデン人男女におけるOGTT/経口グルコースに基くデータから、非糖尿病個人における負荷後S-グルコース値が高くなることは、股関節骨折リスクが低減したことと関連づけられることが示唆される - Johnell, O. et al., ASBMR-IBMS Second Joint Meeting S170。即ち、インシュリン応答と骨質量及びその後の骨折リスクの間には一定の関連性があるように思われる。このような関連性は、部分的ではあるがインシュリンが骨吸収に及ぼす影響によって説明されることが可能である。このような関係が存在する可能性は、破骨細胞様細胞上のインシュリン受容体について最近実証されたことから支持される - Thomas, D. M. et al., J. Bone Miner. Res. 11:1312-1320(1996)。

20

30

【 0 0 3 8 】

骨格は、(特に)カルシウムやリン酸塩などのミネラルを含む栄養素の貯蔵庫である。この貯蔵庫は、通常は保護されているが、栄養素へのアクセスが不十分となった結果栄養素の細胞外濃度が低下する状況下にあっては、骨格中のこれら栄養素の貯蔵分を動員することが出来るのである。同様に栄養素へのアクセスが充分である状況下では、身体の代謝装置が、これら栄養素の貯蔵分を保存するようにセットされるのである。

【 0 0 3 9 】

骨格については、このような貯蔵分の動員は、破骨細胞による骨吸収を刺激することによって行なうことが出来るのであって、同様に食事による栄養素利用度が増大すれば、骨吸収は低下させることが出来る。

40

【 0 0 4 0 】

骨代謝の調節は、カルシウムの食事による摂取について以前に実証されている。最近になって、経口摂取グルコースも骨吸収を低減させることが出来て而も2時間以内に完全に明瞭な低下を伴うことが観察されている - イギリス特許出願第0007492.2号。

【 0 0 4 1 】

この応答は、性及び年齢に依存しない。比肩し得る同様の効果がタンパク質についても実証されている。即ち、食事による摂取によって、部分的にであるがインシュリン刺激試験

50

で示されているインシュリン分泌を経由して骨吸収が調節できる可能性がある。

【 0 0 4 2 】

イギリス特許出願第 0 0 0 7 2 4 9 . 2 号においては、栄養素の経口摂取により、骨吸収速度が短時間低下することが、記述されている。更には、インシュリン耐性試験 ( I T T ) においてインシュリン投与によっても同様に骨吸収速度の測定値が短時間低下するのである。

【 0 0 4 3 】

骨吸収を阻害・抑制することが出来る栄養素は、砂糖、タンパク質、若しくは脂肪酸即ち中性脂肪又はミネラルである可能性がある。使用する脂肪酸は好ましくは長鎖脂肪酸であった。

10

【 0 0 4 4 】

骨粗しょう症を治療するための市販薬は、好ましくない副作用を有することが示され且つ記載されている。アレンドロネート ( Alendronate Fosamax ) は胃潰瘍を形成することが、Graham, D.Y.et al., Aliment Pharmacol. Ther. 4:515-9(1999)によって結論づけられている。更には、広く用いられているホルモン補充・代替療法 ( H R T ) は、乳癌のリスクを高めることが述べられている - Persson, I. et al., Int. J. Cancer 72(5):758-2561(1997)。

【 0 0 4 5 】

従って、骨吸収及び/又は不十分な骨形成が要因となる疾患、例えば骨粗しょう症を治療するための医薬であって、上記したような望ましくない副作用を示さない医薬に対する要望が強い。

20

【 0 0 4 6 】

本発明に従えば、驚くべきことに小腸内で産生されたプログルカゴンの断片が、骨吸収を阻害・抑制することにおいて一定の役割を果たし、また骨形成を促進する ( 骨同化作用 ) 上でも一定の役割を演じることが判明したのである。

【 0 0 4 7 】

内分泌系膵臓の細胞及び小腸の小腸内分泌系 L 細胞の内部で発現したプログルカゴンは、これら二つの組織内における単一遺伝子の転写及び同一 m R N A の翻訳により生成するものである。プログルカゴン遺伝子の発現における生物学的多様性は、高度に組織特異的な、複式翻訳後処理のレベルで生起し、その結果膵臓内において生物活性の高いペプチドグルカゴンが生成しまた小腸内において相互的インシュリン刺激性の G L P - 1 を生成することになる。

30

【 0 0 4 8 】

小腸及び膵臓内におけるグルカゴン及び G L P 配列は、小腸内におけるアンブロセド ( 未処理 ) のプログルカゴン断片：エンテログルカゴン ( グリセチン ) 及び膵臓内における主要プログルカゴン断片として保持される - Habener, J. F., Diabetes Mellitus 68-78(1996)。

【 0 0 4 9 】

グリセチン ( g l i c e t i n ) 又はプログルカゴン断片 1 - 6 9 は、膵臓内で切断されて、G R P P ( g l i c e t i n - r e l a t e d p a n c r e a t i c p o l y p e p t i d e ) 及びグルカゴンになるが、一方主要プログルカゴン断片 7 2 - 1 5 8 は切断 ( 処理 ) されて G L P - 1 ( プログルカゴン断片 7 8 - 1 0 7 ) 及び G L P - 2 ( プログルカゴン断片 1 2 6 - 1 5 8 ) になる。

40

【 0 0 5 0 】

小腸及び膵臓内における同一プログルカゴンの複式プロセッシングによって、生理学的機能が対抗するペプチド類が産生されることは、注目に価することである。小腸の G L P - 1 は、アナボリックホルモンであって、特にインシュリン分泌の刺激と摂食時におけるグルコース摂取を容易にするホルモンであるが、他方膵臓由来のグルカゴンは、最も重要な分解性 ( c a t a b o l i c ) ホルモンであって、絶食時にグリコーゲンを分解し ( 従って肝臓によるグルコース産生を増大する ) また骨格筋や脂肪組織を分解する作用を有する。

【 0 0 5 1 】

50

小腸内におけるプログルカゴンのタンパク分解的切断は、複雑なプロセスの一部である。少なくとも四種のGLP-1断片が、このプロセッシングから生じる：即ち、37個と36個のアミノ酸からなるペプチド、GLP-1(1-37)とGLP-1(1-36)；及び二種のアミノ末端切断イソペプチド、GLP-1(7-37)とGLP-1(7-36)アミドである。これら二種の切断GLP-1だけが、インシュリン刺激活性を有するのである。以前は、これらのアミノ末端伸張型のGLP-1のいずれについても生物学的活性は一切見出されていなかった。GLP-1の二種のイソペプチド、即ちGLP-1(7-37)とGLP-1(7-36)アミドとも、ヒトを含む、これまでに検討された系の全てにおいてインシュリン刺激能を有するのである - Habener, J.F., Diabetes Mellitus 68-78(1996)。ヒトの場合、主要な産生物は、GLP-1(7-36)アミドであり、他の型のものは殆ど産生されることはない。

10

#### 【0052】

GLP-1は、GIPとは異なって、強力なグルコース依存性のインシュリン刺激性ペプチドであることが判明している。GIP (Gastric Inhibitory Polypeptide - 胃抑制ポリペプチドであるが、現在はGlucose-dependent Insulinotropic Polypeptide - グルコース依存性インシュリン刺激性ポリペプチドに変更されている)は、グルコース依存態様で直接的にインシュリン分泌を刺激するインクレチンの一種である。

#### 【0053】

GIPのアミノ酸配列は、1981年にJoernvall et al., FEBS Lett. 123:205(1981)によって決定されている。しかしながら、これら二種類のホルモンGIP及びGLP-1の組合せは、インクレチン効果のうちの関連該当するホルモン成分の全てではないが、かかる成分の大半を構成するように思われる - Nauck, M. A. et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 1993;76(4):912-917.

20

#### 【0054】

プログルカゴンの小腸内プロセッシングによってもまた、プログルカゴン126-158に相当するGLP-2が産生される。単一の型のものしかヒトでは知られていない - Hartmann B. et al., Peptides 2000; 21(1): 73-80。

#### 【0055】

GLP-2は、胃腸運動及び分泌に及ぼすGLP-1の効果・作用の幾つかを共有しているように見える - Wojdemann, M. et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 1999;84(7): 2513-2517及びWojdemann, M. et al., Scand. J. Gastroenterol. 1998; 33(8):828-832 のであるが、膵臓のランゲルハンス島には直接的な作用は示さない。逆に、GLP-2は、小腸粘膜に対して刺激作用を有し、生理学的には外科手術や栄養素変化に対する腸管の適応応答に関与する成長因子として機能する可能性がある - Drucker, D.J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996; 93(15): 7911-7916及びThulesen, J. et al., Gut. in press。このものは、小腸内においてアポトーシスを抑制・阻害・抑制しまた上皮増殖を引き起こす - Tsai, C.H. et al., Am. J. Physiol. 1997; 273(1Pt1): E77-E84 ので、小腸症候群の患者を治療するために臨床的に使用出来る可能性がある - Jeppesen, P. B. et al., Gastroenterology, in press。またこのものは、身体の幾つかの領域、特に小腸粘膜内で発現されるGタンパク質結合レセプターを経由して機能を発揮するのである - Munroe, D. G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999; 96(4): 1596-1573。

30

40

#### 【0056】

本発明に従ったGLP-1ペプチドとして有用であり得る化合物は、GLP-1(7-37)及びその機能的な誘導体を含むペプチド断片並びにインシュリン刺激剤としてのその使用方法とに係わる国際特許出願WO 87/06941において記載されている。

#### 【0057】

更には、GLP-1類縁体は、GLP-1(7-36)及びその機能的な誘導体を含み而もGLP-1(1-36)又はGLP-1(1-37)のインシュリン刺激活性を凌駕するインシュリン刺激活性を有するペプチド断片及びインシュリン刺激剤としてのその使用方法とに係わる国際特許出願WO 90/11296において記載されている。

50



## 【 0 0 5 8 】

国際特許出願 W O 9 1 / 1 1 4 5 7 において、活性のある G L P - 1 ペプチド 7 - 3 4、7 - 3 5、7 - 3 6 及び 7 - 3 7 の類縁体が開示されており、これらもまた、本発明に従った G L P - 1 ペプチドとして有用であり得る。

天然の G L P - 1 分子の誘導体は、天然の配列を断片化することによって得られるか又はかかる配列をコードする遺伝材料 ( D N A 又は R N A ) の配列に関する知識に基いて合成される誘導体である。“誘導体”なる用語はまた、天然又は非天然の G L P - 1 又は G L P - 2 分子を化学的に修飾するものをも包含する。これらの誘導体を調製する方法は、当業界の通常の知識を有する有機又はペプチド化学者にはよく知られている (例えば W O 9 1 / 1 1 4 5 7 を参照)。

10

## 【 0 0 5 9 】

本明細書において使用される“G L P - 1 受容体アゴニスト”及び“G L P - 2 受容体アゴニスト”なる用語は、G L P - 1 受容体及び G L P - 2 受容体にそれぞれ結合した場合、G L P - 1 受容体及び G L P - 2 受容体をそれぞれ活性化させる分子の如何なるものをも意味し、例えば G L P - 1、G L P - 2 又は G L P - 1 や G L P - 2 のペプチド類縁体を包含する。即ち、G タンパク質結合受容体アゴニストを同定するためにこの分野で通常使用される方法は、G L P - 1 受容体及び G L P - 2 受容体にそれぞれ有用に適用することが可能である。G L P - 2 受容体アゴニスト活性について化合物を評価する一つの有用な方法論は、アメリカ合衆国特許第 6 0 7 7 9 4 9 号に開示されている。

20

## 【 0 0 6 0 】

G L P - 1 及び G L P - 2 の作用機作は、未だ完全には解明されていない。恐らくは、これらの一つ又は二つとも、当該 G L P ペプチドの上流若しくは下流又はその両側において活性を有する構成成分が存在するシグナル伝達カスケードを介して作動するのも知れない。本発明に従えば、かかるカスケードにおける如何なるポイントにおいても介入して、その結果カスケードの機構によって骨吸収速度を低下させる及び/又は骨形成速度を加速させることが許容され得る。このことは、内因性 G L P ペプチドの合成又は遊離/放出を刺激するか又は該 G L P ペプチドの下流でかかるカスケードにおいて活性を有する他の化合物、例えば G L P ペプチドが受容体に結合したことに応答して産生される化合物、を投与するか若しくはかかる化合物の内因性合成又は遊離・放出の引き金を引くことを含んでもよい。

30

## 【 0 0 6 1 】

骨形成及び骨成長は、骨の直径と形状が種々に変化することから成る複雑なプロセスである。このプロセスは、二種類の細胞が連続的に活性化されることによって生起する：即ち、破骨細胞と骨芽細胞である。骨芽細胞は、軟骨細胞、筋肉細胞や脂肪細胞と同様に、線維芽細胞頃に形成単位から誘導される中胚葉由来の細胞である。骨芽細胞は、破骨細胞の発生に影響を及ぼし得る多数の因子 (例えば、インターロイキン-6 や 1 1 ; M C S - F 及び G M - C S F ) を分泌する能力を有する。破骨細胞は、顆粒球 マクロファージ形成ユニットから発生し、その発生は、インターロイキン 1、3、6 及び 1 1 を含む多数の因子によって調節される。最近になって、インターロイキン 6 に対して多大な関心が、集められているが、その理由は、骨芽細胞からの産生が、P T H 及びビタミン D によって刺激されるからでありまた原発性上皮小体機能亢進症、多発性骨髄腫、リウマチ性関節炎、ページェット病や性機能低下骨粗しょう症などの幾つかの疾患に関連している可能性があるためである。骨芽細胞からのインターロイキン-6 産生は、I L - 6 プロモータに作用する性ホルモン (アンドロゲンやエストロゲン) によって調節される。健全な破骨細胞機能における I L - 6 の役割は (I L - 1 1 とは異なって)、不明瞭であるが、幾つかの病原状態においては、I L - 6 は、上方制御され、その場合に効果を及ぼす可能性がある。性機能不全マウス由来の骨細胞においては、g p 8 0、g p 1 3 0 及び I L - 6 m R N A の全てが、健全細胞と比較して増加している。即ち、I L - 6 は、閉経後骨粗しょう症に関連した骨損失の促進に重要な役割を果たしている可能性がある。

40

## 【 0 0 6 2 】

50

その結果帰結されることは、G L P - 1 及び G L P - 2 が、子供における骨格成長と共に成人における骨格再構築の双方の調節において重要な役割を果たす、ということである。G L P は、骨由来細胞内に存在する受容体に作用し、これらの細胞が G L P で刺激されたため、細胞内カルシウムイオン及び細胞性 c A M P 含量が増加することになり、その結果 I 型コラーゲン合成が増大した P T H - 刺激による骨吸収が抑制・阻害されるのである。

#### 【 0 0 6 3 】

本発明は、G L P 様活性を有する主要プログルカゴン断片の切断によって得られるその他の断片の使用法をも包含する。

#### 【 0 0 6 4 】

“被験者”なる用語は、ヒト又は家畜やペットを含む哺乳動物を包含する。

#### 【 0 0 6 5 】

投与は、通常の知識を有する医者によって有効である経路であれば如何なる経路を経由してもよい。非経口投与は、滅菌注射器、選択的にはペン型注射器又は点滴ポンプなどその他の機械的装置を用いて製剤を体内に皮下、筋肉内、腹腔内又は静脈内注入することによって行なうことが出来る。更なる選択は、鼻腔内又は肺内噴霧剤の形状での投与のための粉剤又は液剤であればよい組成物である。なお更なる選択として、かかる投与は、例えばパッチから経皮的に行なってもよい。経口、口腔内、直腸内や膣内投与に適した組成物が、経口的に有効である、本発明において使用する化合物に対しては好ましい。

#### 【 0 0 6 6 】

本発明を下記する実施例によってさらに詳細に説明するが、かかる実施例は、保護範囲を制限するものと解釈されるべきではない。前記記載及び下記する実施例において開示された特徴は、それぞれ単独でもまた如何なる組合せにおいても、本発明を種々の形態で実施するために重要である。

#### 【 0 0 6 7 】

##### 【実施例】

これらの実施例においては、グルコースを含む血液学及び血清化学数値は、オートアナライザー ( V i t r o s ) を用いて測定した。血清 F S H は I R M A ( C o a t - A - C o u n t <sup>(R)</sup> , D P C , L o s A n g e l e s , C A ) によって測定した。I 型コラーゲン分解の血清 C - テロペプチド断片 ( S - C T X ) は、E L I S A である血清 C r o s s L a p s <sup>TM</sup> 検定測定法 ( O s t e o m e t e r B i o T e c h A / S - D e n m a r k ) によって測定した。血清オステオカルシンは、分子の N 末端中間部を決定する、E L I S A 検定測定法によって求めた。血清インシュリン及び C - テロペプチドは何れも、R I A ( インシュリン及び C - ペプチドに対する二重抗体 C - ペプチド用の C o a t - A - C o u n t <sup>(R)</sup> 、何れも D P C , L o s A n g e l e s , C A ) によって分析した。

#### 【 0 0 6 8 】

##### 実施例 1

経口投与果糖 ( フルクト ス ) が G L P - 1 、 G I P 及び骨吸収速度に及ぼす影響

それぞれ 30 - 45 才と 30 - 60 才である、12 人の健常な女性及び男性を、無作為化対照比較交差試験に参入させて、経口投与果糖が G L P - 1 、 G I P 及び骨代謝回転に及ぼす影響を比較した。これらの個人は、例えばガン、リウマチ性関節炎など骨代謝回転に影響を及ぼすと疑われる疾患又は消化管からの吸収若しくは腎臓からの分泌 / 再吸収を妨害する疾患に罹患しておらず、また本試験の実施に影響を及ぼす重篤な疾患の病歴を有さないものであった。血液学及び血清化学を含む一般的検査スクリーニングを行なったところ、特異的な臓器機能不全の徴候は全くなかった。これらの個人は、骨活性の投薬の影響を受けたものはなかった。即ち、カルシウム、ビタミン D、エストロゲン又はプロゲステンによる、如何なる投与形態での以前の治療から三ヶ月以上経過しており、またこれらの個人は、ビスホスホネート又はフッ化物によって治療を受けたことはなかった。

#### 【 0 0 6 9 】

##### 試料採取

実験に先立つ晩午後 10 時から絶食させた後、採血を午前 7 時 30 分と 8 時 30 分との間に行なった。その後直ちに経口果糖投与を開始した。第一回目の採血の後正確に 1、2、3、6 及び 9 時間後に、採血を行なった。2 週間のウォッシュアウト期間を各実験間に設けた。

【0070】

#### 介入

経口投与果糖は、半分のレモンジュースを添加した 300 ml の水に 75 g の果糖を溶解したものであった。

経口投与果糖は、2 時間後に S-CTX を 36 % 低下させたが、一方 GLP-1 の生成は、2 時間後に  $T_0$  におけるベースライン 100 % と比較して 220 % にまで倍加した。GLP-1 の断片は、小腸内で切断されて活性化される主要プログルカゴン断片の一つの断片である。従って、他の部分又は断片の生成も GLP-1 と類似したレベルにまで倍加することになり、S-CTX の低下と関連性に関与する可能性がある。GIP の数値は、ベースラインに殆ど維持された。

10

【0071】

#### 実施例 2

経口投与長鎖脂肪酸、LCFA が GLP-1、GIP 及び骨吸収速度に及ぼす影響

それぞれ 30 - 45 才と 30 - 60 才である、12 人の健常な女性及び男性を、実施例 1 における同一の臨床試験参入・排除基準に従って無作為化対照比較交差試験に参入させて、経口投与長鎖脂肪酸が GLP-1、GIP 及び骨代謝回転に及ぼす影響を比較した。

20

【0072】

#### 試料採取

実験に先立つ晩午後 10 時から絶食させた後、採血を午前 7 時 30 分と 8 時 30 分との間に行なった。その後直ちに経口長鎖脂肪酸投与を開始した。第一回目の採血の後正確に 30 分、1、2、3、6 及び 9 時間後に、採血を行なった。2 週間のウォッシュアウト期間を各実験間に設けた。

【0073】

#### 介入

経口投与タンパク質は、600 ml の水に溶解した 40 g のタンパク質粉末 (Casilan) から成るものであった。

30

経口投与タンパク質は、2 時間後に S-CTX を 45 % 低下させた (図 1C) が、他方 GLP-2 及び GIP の生成は何れも増加した。GIP の数値は、8 pM から 57 pM にまで増加し、また GLP-2 の生成は、1 時間後に 36 pM から 57 pM にまで増加したが、2 時間後に 51 pM のレベルにまで低下した。これらの結果は、実施例 2 において得られた結論と同様の結論の理由を構成する。

【0074】

#### 実施例 4

通常の混合食が GLP-1、GLP-2 及び骨吸収速度に及ぼす影響

7 人の腸の短い患者 (< 140 mm 残留小腸) を加入させ、4 人の女性及び 3 人の男性を検討対象として、通常の混合食が GLP-1、GLP-2 及び骨代謝回転に及ぼす影響を比較した。

40

GLP-1 及び GLP-2 の測定法及び試験対象者の叙述は、Jeppesen, P. B. et al., Gut 2000; 47(3):370-376 において詳細に記載した通りである。

【0075】

#### 試料採取

入院に先立って一晩絶食させた後、試験食の前 15 分及び食事 15 分で終了した一開始後 10、20、30、45、60、120 及び 180 分に末梢静脈血を採取した。

【0076】

#### 介入

通常混合食は、ライ麦パン、トースト、バター、チーズ、ジャム、ヨーグルト、バナナ及

50

びオレンジジュースから成り（全量 755 g）、そのエネルギー量は 3.9 MJ でありまたタンパク質：炭水化物：脂肪のエネルギー比率は、10%：52%：37%であることが食品分析表から推定された。

通常の混合食は、2 時間後に S-CTX を 40% 低下させた（図 2）が、他方 GLP-1 及び GLP-2 の生成は何れも増加させた。GLP-1 の数値は、3 時間後に 70 pM から 98 pM にまで増加し、また GLP-2 の生成は、3 時間後に 10 pM から 22 pM にまで増加した。これらの結果は、GLP-1 及び/又は GLP-2 は、S-CTX の減少への関連性に関与していることを示す。

【0077】

#### 実施例 5

GLP-2 注射が GLP-2<sub>intact</sub> 及び骨吸収速度に及ぼす影響

年齢が 24 乃至 53 歳である、6 人の健常な女性及び 3 人の健常な男性を試験に加入させ、GLP-2 注射が GLP-2<sub>intact</sub> 及び骨代謝回転に及ぼす影響を比較した。

GLP-2<sub>intact</sub> 及び全 GLP-2 測定法の叙述及び試験対象者の記述は、Hartmann, B. et al., J. Endocrinol. Metab. 2000;85(8): 2884-2888 において詳細に記載した通りである。

【0078】

#### 試料採取

採血は、注射の前、その過程及び終了後に定期的に行なった。

【0079】

#### 介入

この GLP-2 注射を行なうことによって、2 時間後に S-CTX は 33% 低下したが、他方 GLP-2 の数値は当然ながら注射の後 1 時間後にピークにまで増加し、GLP-2 と S-CTX の低下との間の関連性を示唆した。

【図面の簡単な説明】

図 1 はグラフ A、B 及び C において実施例 1 乃至 3 で得られた結果を示す。

【図 1 A】経口投与フラクトスに应答した、2 乃至 3 時間の期間に渉る GLP-1、GIP 及び S-CTX の数値を示す。GIP (Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide) は、グルコース依存態様で直接的にインシュリン分泌を刺激するインクレチン (Incretin) の一種である。S-CTX は、I 型コラーゲン分解による血清中 C-テロペプチド断片である。

【図 1 B】経口投与した長鎖脂肪酸、即ち LCF A に应答した、2 乃至 3 時間の期間に渉る GLP-1、GIP 及び S-CTX の数値を示す。

【図 1 C】経口投与したタンパク質に应答した、2 乃至 3 時間の期間に渉る GLP-2、GIP 及び S-CTX の数値を示す。

【図 2】実施例 4 で得られた結果を示す。この図は、小腸が短いが結腸は保存されている患者において通常の食事に応答した、3 時間の期間に渉る S-CTX、GLP-1 及び GLP-2 の数値を示す。

【図 3】実施例 5 で得られた結果を示す。この図は、GLP-2 注射に応答した、7 時間の期間に渉る未変化の S-CTX 及び GLP-2 の数値を示す。

10

20

30

40

【図 1 A】

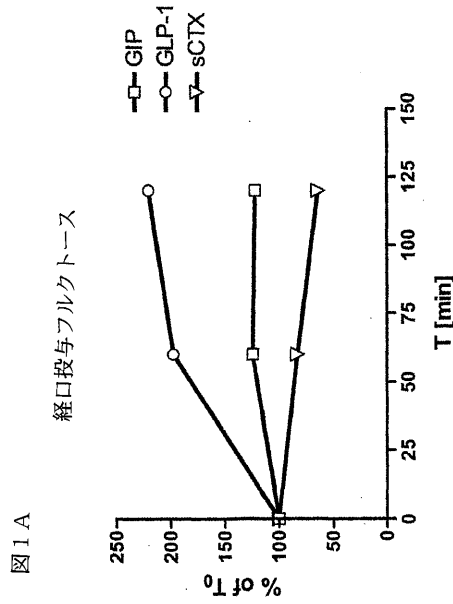


図 1 A

【図 1 B】

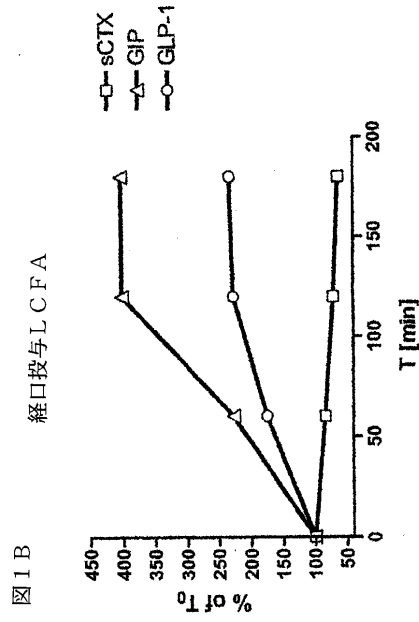


図 1 B

【図 1 C】

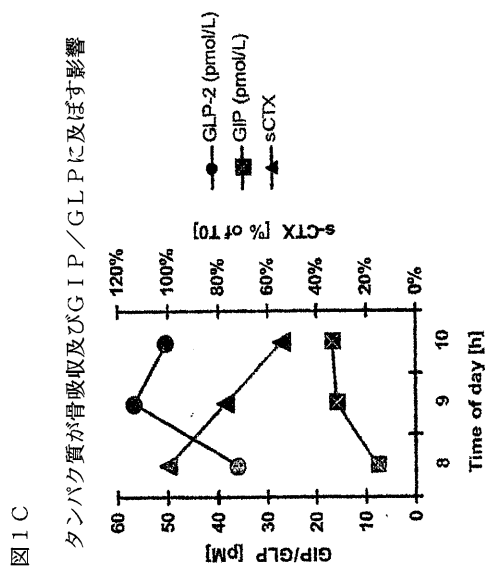


図 1 C

【図 2】

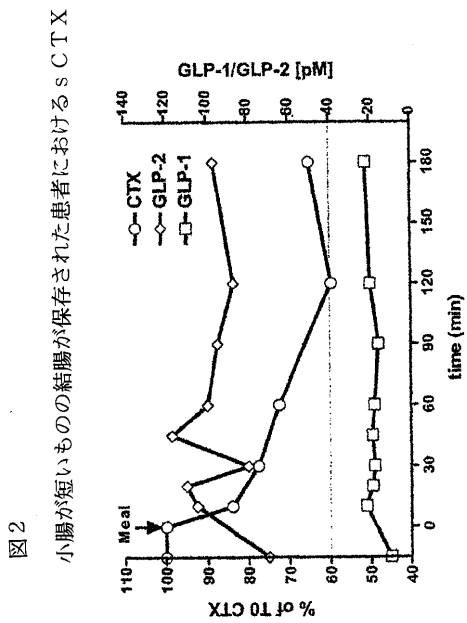
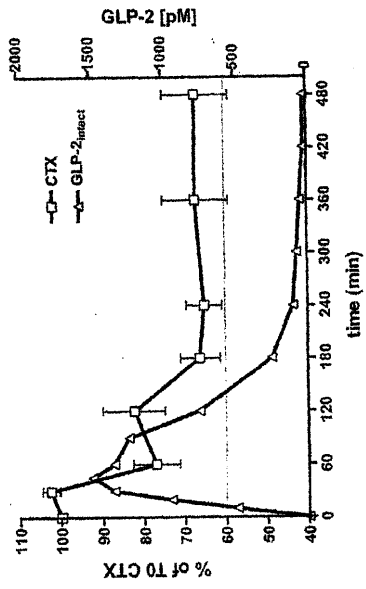


図 2

【図 3】

図 3 GLP-2 注射後の sCTX



---

フロントページの続き

(72)発明者 ホルスト、ジェンス・ジュール

デンマーク国、デイーケー - 2 9 0 0 ヘレルプ、オレ・オルセンス・アレ、3 0 番

審査官 小松 邦光

(56)参考文献 特表 2 0 0 4 - 5 2 4 2 6 8 ( J P , A )

特表 2 0 0 4 - 5 0 9 0 7 9 ( J P , A )

特表 2 0 0 0 - 5 0 5 4 6 0 ( J P , A )

特表 2 0 0 2 - 5 0 2 3 6 9 ( J P , A )

特表 2 0 0 2 - 5 3 1 5 7 8 ( J P , A )

特表 2 0 0 2 - 5 3 8 0 8 1 ( J P , A )

国際公開第 0 2 / 0 1 0 1 9 5 ( WO , A 1 )

HADERSLEV K V , SCANDINAVIAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY , 2 0 0 2 年 4 月 , V37N4 , P392  
-398

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61K 38/22

A61P 5/18

A61P 19/08

A61P 19/10

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed