(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3579048号
(P3579048)
(45)発行日　平成16年10月20日(2004.10.20)　(24)登録日　平成16年7月23日(2004.7.23)

(51)Int.Cl.[7]　F I
A61K 38/26　A61K 37/28
A61K 31/64　A61K 31/64
A61P 3/10　A61P 3/10

請求項の数 3　(全 9 頁)

(21)出願番号　特願平5-516182
(86)(22)出願日　平成5年3月18日(1993.3.18)
(65)公表番号　特表平7-504670
(43)公表日　平成7年5月25日(1995.5.25)
(86)国際出願番号　PCT/DK1993/000099
(87)国際公開番号　WO1993/018786
(87)国際公開日　平成5年9月30日(1993.9.30)
審査請求日　平成12年3月14日(2000.3.14)
(31)優先権主張番号　363/92
(32)優先日　平成4年3月19日(1992.3.19)
(33)優先権主張国　デンマーク(DK)

(73)特許権者
ノボ　ノルディスク　アクティーゼルスカブ
デンマーク国，デーコー―２８８０　バグスバエルト，ノボ　アレ（番地なし）
(73)特許権者
エフェンディク，スアト
スウェーデン国，エス―１８１　３４　リンディンゴェー，ストイェールンベーゲン　１６ベー
(73)特許権者
グトニアク，マルク
スウェーデン国，エス―１６５　６５　ヘーセルビュー，ヘーセルビュー　ストラントベーグ　２６

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ペプチドの使用

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
スルホニルウレア（sulfonylurea）による治療をさらに含んで成る養生法におけるタイプ２糖尿病の治療における使用のための医薬組成物であって、GLP－１（７－36）アミドもしくはGLP－１（７－37）又はこれらのペプチドのアナログを含んで成る医薬組成物。
【請求項２】
GLP－１（７－36）アミド又はGLP－１（７－37）を含んで成る請求項１に記載の医薬組成物。
【請求項３】
前記スルホニルウレアが、グリベンクラミド（glibenclamide）である、請求項１又は２に記載の医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
発明の分野
本発明は、経口の低血糖症（hypoglycaemic）剤による治療をさらに含んで成る養生法における糖尿病の治療における使用のための医薬の製造のために、GLP－１（７－37）、GLP（７－36）アミド、又は特定の関連化合物を使用することに関する。本発明は、その医薬を使用することによる糖尿病の治療方法にも関する。
発明の背景
糖尿病は、それ自体を明示するグルコース代謝障害、とりわけ糖尿病患者において上昇した血液グルコース・レベルによるものを特徴とする。根元的な欠陥は、糖尿病の分類を２

つの主要なグループに導く：タイプ１の糖尿病、又はインシュリン要求性真性糖尿病（insulin demanding diabetes mellitus（IDDM）であって患者が彼らの膵臓腺内のインシュリン生産β－細胞を欠いているときに生じるもの、及びタイプ２の糖尿病、又は非インシュリン依存性真性糖尿病（non－insulin dependent diabetes mellitus（NIDDM）であってあるレンジの他の機能不全（abnormalities）以外のβ－細胞機能障害をもつ患者において生じるもの。

タイプ１糖尿病患者は、現在インシュリンにより治療されており、一方、タイプ２糖尿病患者の大部分は、β－細胞機能を刺激する剤又はインシュリンに対する患者の組織感受性を強化する剤のいずれかにより治療されている。

β－細胞機能の刺激のために使用される剤の中で、β－細胞のATP－依存性カリウム・チャンネルに対して作用するものが最近の治療において最も広く使用されている。いわゆるスルホニルウレア、例えば、トルブタミド（tolbutamide）、グリベンクラミド（glibenclamide）、グリピジド（glipizide）、及びグリクラジド（gliclazide）が広く使用されており、そして他の剤、例えば、AG－EE 623 ZWであって上記分子部位においても作用するもの、が開発中である（AG－EE 623 ZWは、（Ｓ）－（＋）－２－エトキシ－４－［２－［［３－メチル－１－［２－（１－ピペリジニル）フェニル］ブチル］－アミノ］－２－オクソエチル］安息香酸のための会社コードであり、（Karl Thomae GmbH博士への）欧州特許出願第147,850号中に記載されている化合物である。）。インシュリンに対する組織感受性を強化するために使用される剤の中では、メトホルミン（metformin）が代表的な例である。

たとえスルホニルウレアがNIDDMの治療において広く使用されるとしても、この治療は、ほとんどの場合において、満足できるものではない：多数のNIDDM患者においては、スルホニルウレアは、血糖レベルを正常化するのに十分ではなく、そしてそれ故に患者は、糖尿病合併症の高い危険にある。また、多くの患者は、徐々に、スルホニルウレアによる治療に応答する能力を失い、そしてこのように、だんだんとインシュリン治療を受けるようになる。経口低血糖症剤からインシュリン治療への上記のような患者のシフトは、普通には、NIDDM患者におけるβ－細胞の消耗に帰することができる。

それ故、数年にわたり、NIDDM患者に改善された治療を提供するためにβ－細胞の機能を刺激する新規の剤を提供する試みが行われてきた。最近、グルカゴン様ペプチド－１（glucagon－like peptide－１）から誘導される一連のペプチドが治療的用途のためのインスリン向性（insulinotropic）剤として考えられるようになった。

GLP－１ともいわれるグルカゴン様ペプチド－１は、哺乳類のプログルカゴンのＣ－末端部分において発見されたペプチド配列である。1985年までは、GLP－１の定められた生物学的活性は、全く報告されていない。しかしながら、1985年において、GLP－１の断片のアミド、すなわちGLP－１（１－36）アミドが、投与量に依存したやり方でグルコースの存在中に単離された前培養ラット膵臓島からのインシュリンの放出を刺激することが証明された（Schmidt,W.E.et al.Diabetologia 28（1985）704－７）。この発見は、GLP－１（１－36）アミド及び関連ペプチドがタイプ２の糖尿病の治療において有用であるかもしれないことを示唆している。グルカゴン及びGIPともいわれるグルコース依存性インシュリン向性ペプチドに対するその実質的に近い配列の相同性により、Schmidt et al.は、より強いグルカゴン－様及び／又はGIP－様の生物学的活性がその無傷のペプチドによるよりもGLP－１（７－36）により期待されることができたことを示唆した。近年、特定の興味がGLP－１断片のGLP－１（７－37）及びGLP－１（７－36）アミド並びにそれらのアナログ及び機能的な誘導体に集中した。名称GLP－１（１－36）は、親ペプチド、すなわちGLP－１のＮ－末端から数えられたとき問題のペプチド断片が番号１から（これを含む）番号36までの（これを含む）アミノ酸残基を含んで成ることを示している。同様に、名称GLP－１（７－37）は、親ペプチド、すなわちGLP－１のＮ－末端から数えられたとき問題のペプチド断片が番号７から（これを含む）番号37までの（これを含む）アミノ酸残基を含んで成ることを示している。GLP－１（７－36）アミド及びGLP－１（７－37）のアミノ酸配列を、以下の式（Ｉ）に与える：

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-
Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-
Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-X

（Ｉ）

［ここで、ＸがNH$_2$であるときGLP－１（７－36）アミドを示し、そしてＸがGly－OHであるときGLP－１（７－37）を示す。］。

GLP－１（７－36）アミドが実際にヒトにおいてインシュリン向性剤であることがKreymann,B.et al.により証明された。彼は、このペプチドを健康なボランティアに注入し、そして血漿インシュリンにおける有意な上昇を観察した（Lancet 2（1987）1300－304）。

糖尿病患者及び非糖尿病患者におけるGLP－１（７－37）のインシュリン向性作用は、Nathan,D.M.et al.Diabetes Care 15（1992）270－76により証明された。

（The General Hospital Corporationへの）国際特許出願第WO87/06941号は、GLP－１（７－37）及びそれらの機能的誘導体を含んで成るペプチド断片並びにインシュリン向性剤としてのその使用に関するものである。

（The General Hospital Corporationへの）国際特許出願第WO90/11296号は、GLP－１（７－36）及びそれらの機能的誘導体を含んで成り、且つGLP－１（１－36）又はGLP－１（１－37）のインシュリン向性活性を超えるインシュリン向性活性をもつペプチド断片並びにインシュリン向性剤としてのその使用に関するものである。

（Buckley et al.への）国際特許出願第WO91/11457号は、活性GLP－１ペプチド７－34、７－35、７－36、及び７－37の有効なアナログに関するものである。

ラットの膵臓島からのインシュリンの分泌に対するグリベンクラミド（glibenclamide）との組み合わせにおけるGLP－１（７－37）の効果が、インビトロにおいてParker,J.C.et al.により研究されている（Diabetes 40（suppl.1）（1991）237 A）。この２つの剤の追加の効果のみが観察された。

しかしながら、本発明者の知る限りにおいて、経口低血糖症剤とGLP－１の断片又はアナログあるいはそれらの機能的誘導体の組み合わせ使用により達成されるインビボにおける驚くべき相乗効果は、先には開示されていない。

発明の要約

本発明は、GLP－１関連ペプチドが特にタイプ２の糖尿病の治療のために一般的に経口低血糖剤及びスルホニルウレアとの組み合わせにおいて投与されるときに、相乗効果（synergistic effect）が観察されるという驚くべき発見に関する。この驚くべき観察は、スルホニルウレアを単独で投与されるとき応答に失敗するタイプ２の糖尿病患者においてさえ見られた。

したがって、その最も広い態様においては、本発明は、GLP－１（７－37）、GLP－１（７－36）アミド、又はGLP－１（７－37）配列の断片を含む医薬として許容されるペプチド、あるいはこのようなペプチドのアナログ又は機能的誘導体を、経口低血糖症剤による治療をさらに含んで成る養生法におけるタイプ２糖尿病の治療における使用のための医薬の製造のために、使用することに、並びにタイプ２糖尿病の治療方法であって、有効量のGLP－１（７－37）、GLP－１（７－36）アミド、又はGLP－１（７－37）配列の断片を含む医薬として許容されるペプチド、あるいはこのようなペプチドのアナログ又は機能的誘導体を、経口低血糖症剤による治療をさらに含んで成る養生法において患者に投与することを含んで成る方法に、関する。

第一の好ましい態様においては、本発明は、経口低血糖症剤による治療をさらに含んで成る養生法におけるタイプ２糖尿病の治療における使用のための医薬の製造のためのGLP－１（７－36）アミドの使用に関する。

さらなる好ましい態様においては、本発明は、経口低血糖症剤による治療をさらに含んで成る養生法におけるタイプ２糖尿病の治療における使用のための医薬の製造のためのGLP－１（７－37）の使用に関する。

さらなる好ましい態様においては、本発明は、経口低血糖症剤による治療をさらに含んで成る養生法におけるタイプ２糖尿病の治療における使用のための医薬の製造のためのGLP－１（７－37）のアナログの使用に関する。
さらなる好ましい態様においては、本発明は、経口低血糖症剤による治療をさらに含んで成る養生法におけるタイプ２糖尿病の治療における使用のための医薬の製造のためのGLP－１（７－37）の機能的誘導体の使用に関する。
さらなる好ましい態様においては、本発明は、トルブタミド（tolbutamide）による治療をさらに含んで成る養生法におけるタイプ２糖尿病の治療における使用のための医薬の製造のためのGLP－１（７－36）アミドを含む、GLP－１（７－37）又はそれらの断片あるいはこれらのいずれかのアナログ又は機能的誘導体の使用に関する。
さらなる好ましい態様においては、本発明は、グリベンクラミド（glibenclamide）による治療をさらに含んで成る養生法におけるタイプ２糖尿病の治療における使用のための医薬の製造のためのGLP－１（７－36）アミドを含む、GLP－１（７－37）又はそれらの断片あるいはこれらのいずれかのアナログ又は機能的誘導体の使用に関する。
さらなる好ましい態様においては、本発明は、グリピジド（glipizide）による治療をさらに含んで成る養生法におけるタイプ２糖尿病の治療における使用のための医薬の製造のためのGLP－１（７－36）アミドを含む、GLP－１（７－37）又はそれらの断片あるいはこれらのいずれかのアナログ又は機能的誘導体の使用に関する。
さらなる好ましい態様においては、本発明は、グリクラジド（gliclazide）による治療をさらに含んで成る養生法におけるタイプ２糖尿病の治療における使用のための医薬の製造のためのGLP－１（７－36）アミドを含む、GLP－１（７－37）又はそれらの断片あるいはこれらのいずれかのアナログ又は機能的誘導体の使用に関する。
さらなる好ましい態様においては、本発明は、ビグアニド（biguanide）による治療をさらに含んで成る養生法におけるタイプ２糖尿病の治療における使用のための医薬の製造のためのGLP－１（７－36）アミドを含む、GLP－１（７－37）又はそれらの断片あるいはこれらのいずれかのアナログ又は機能的誘導体の使用に関する。
さらなる好ましい態様においては、本発明は、メトホルミン（metformin）による治療をさらに含んで成る養生法におけるタイプ２糖尿病の治療における使用のための医薬の製造のためのGLP－１（７－36）アミドを含む、GLP－１（７－37）又はそれらの断片あるいはこれらのいずれかのアナログ又は機能的誘導体の使用に関する。
さらなる好ましい態様においては、本発明は、（Ｓ）－（＋）－２－エトキシ－４－［２－［［３－メチル－１－［２－（１－ピペリジニル）フェニル］ブチル］－アミノ］－２－オクソエチル］安息香酸による治療をさらに含んで成る養生法におけるタイプ２糖尿病の治療における使用のための医薬の製造のためのGLP－１（７－36）アミドを含む、GLP－１（７－37）又はそれらの断片あるいはこれらのいずれかのアナログ又は機能的誘導体の使用に関する。
本明細書中では、GLP－１（７－37）のアナログ又はGLP－１（７－36）アミドのアナログは、それぞれ、GLP－１（７－37）又はGLP－１（７－36）アミドとは異なるペプチドであって、GLP－１（７－37）又はGLP－１（７－36）アミドのアミノ酸残基の中の少なくとも１がそれぞれ独立して、他のアミノ酸残基、好ましくはその遺伝子コードによりコードされるとができるものにより交換されているようなものを意味する。この定義は、また、アミノ酸残基がそのペプチドのＮ－末端及び／又はＣ－末端に付加され又はそれから欠失されるときの場合を含んで成る。好ましくは、このような付加、欠失及び交換の全体数は、５を超えず、より好ましくは、それは３を超えない。
発明の詳細な説明
先に記載したように、スルホニルウレアにより治療された患者は、だんだんとスルホニルウレアの治療に応答しなくなる。この失敗がグルコース刺激に対する応答においてこれによりインシュリンを放出することができないβ－細胞の消耗を原因とするということが当業者の中で一般的に受け入れられている。また、β－細胞がインシュリンを生産し且つ放出する能力によりスルホニルウレアの効果が限定されるということが一般的に受け入れら

れている。したがって、ある者は、スルホニルウレア及び同様にβ－細胞の機能を刺激する他の剤によりNIDDM患者を治療することによるいずれかの追加の治療的利点を予測することはできないであろう。

NIDDM患者を、GLP－１関連ペプチドによりスルホニルウレア又は他の経口低血糖症剤との組み合わせにおいて有利に治療することができるという我々の発見は、それ故に、実際に、驚くべきことである。事実、我々は、経口低血糖症剤とGLP－１関連ペプチドとによる同時治療がNIDDM患者に相乗応答をもたらし：経口低血糖症剤とGLP－１関連ペプチドとによる治療が単独で使用された時のそれぞれの応答の合計よりも大きな代謝応答を引き起こす、ということを発見した。スルホニルエレアの失敗の場合においてさえ、その経口剤がGLP－１関連ペプチドの効果をかなり増強することが発見された。

GLP－１関連ペプチド及び経口低血糖症剤による組み合わせ治療は、このように新規で、治療的に有用、且つ驚くべきことである。予測できなかった治療的利点が、両方のタイプの医薬によるNIDDM患者の治療により得ることができる。

このようにタイプ２糖尿病の治療において使用されることができるGLP－１関連ペプチドの中で、GLP－１（７－37）及びGLP－１（７－36）アミドが特に有利である。なぜなら、それらが天然のホルモンと同一であるからである。GLP－１（７－37）配列の一部を含んで成るより短いペプチド又はこのような短いペプチドのアナログ又はGLP－１（７－37）それ自体のアナログ又はこれらのいずれかの機能的誘導体を、有利に使用することもできる。なぜなら、薬理動態（pharmacodynamic and pharmacokinetics）の性質を、そのGLP－１関連断片を修飾することにより患者の要求に従って変更することができる。

GLP－１関連ペプチドを、ペプチドの投与のための発明に従って最近入手可能な方法により投与することができる。鼻への適用が、患者の承諾の点から特に有利である。これに関しての詳細は、本出願と同時に出願されたGLP－１関連ペプチドを含んで成る医薬の鼻への投与に関する我々の同時係属中のデンマーク特許出願第DK0364/92号中に見ることができる。この出願の内容を、その全体として引用によりここに取り込む。その活性ペプチドの特別に遅延性の血漿特性が必要とされる場合においては、注射又は注入による投与が好ましいであろうし、そして吸収の程度及び動態が決定的な論点でない場合には、経口投与が好ましい。

本発明に従って使用される経口低血糖症剤は、グルコース低下効果を示すいずれかの経口剤であることができる。これらの剤の中では、β－細胞のATP－依存性カリウム・チャンネルに対して作用するもの、例えば、グリベンクラミド（glibenclaimde）、グリピジド（glipizide）、グリクラジド（gliclazide）及びAG－EE 623 ZWが好ましい。本発明に従ったペプチドは、有利には、他の経口剤、例えば、メトホルミン（metformin）及び関連化合物又はグルコシダーゼ阻害剤、例えば、アカルボース（acarbose）との組み合わせにおいて提供されることもできる。

本発明の説明、実施例及び請求の範囲中に開示する特徴は、別々にそしてそれらのいずれかの組み合わせの両方において、それらの多様な形態において本発明を具体化するための材料であることができる。本発明をさらに、限定として解釈されてはならず、単に本発明の幾つかの好ましい特徴の説明としての以下の実施例により、説明する。

実施例１

NIDDM患者におけるGLP－１（７－36）アミド及びグリベンクラミド（glibenclamide）の相乗効果

検定

血液サンプルをEDTA（0.048ml,0.34M）及びTrasylol▲R▼（Bayer,West Germanyから得られた1000IU Kallikrein阻害）を含むプラスチック・チューブ内に採取し、そして直ちに氷上に置いた。このサンプルを４℃において遠心分離し、そしてその血漿を－20℃において保存した。血液グルコースをA.S.Hugget and D.A.Nixon,Lancet 2（1957）368－370に従うグルコース・オキシダーゼ法により測定した。血漿のＣ－ペプチド濃度を商業的に入手可能なキット（Novo Research Institute,Denmark）を使用してラジオイムノアッセイ（RIA）により測定した。血漿グルカゴン濃度をB.M.Jaffe and Behrman,eds.Methods o

f Hormone Radioimmunoassay,Academic Press,New York（1974）317－330中にG.R.Faloona and R.H.Ungerにより記載されているような抗体30Kを使用するRIAにより測定した。
さらなる実験の詳細については（例えば、等血糖値食事関連インシュリン応答（isoglycaemic meal－related insulin response）,IMIRの計算に対するもの）、類似の条件下で行われた様々な実験が記載されているM.Gutniak,C.Orskov,J.J.Hollst,B.Ahren and S.efendic,The New England Journal of Medicine 326（29）（1992）1316－1322を参照できる。

方法

それぞれの４日間にわたり、1mgの静脈内へのグルベンクラミド（glibenclamide）の注射又は１分間当たり体重１キログラム当たりの0.75pモルの速度におけるGLP－１（７－36）アミドの注入のいずれかの又はそれらの組み合わせの効果を、６人のインシュリン処理肥満NIDDM患者（体重質量係数:30.1±2.4kg/$m^2$）の同一群において研究し、そして対照として生理食塩水の投与と比較した。インシュリンの普通の投与を、テスト化合物の又は生理食塩水の投与の開始24時間前に停止し、そして全ての患者を一夜断食させた。Biostator（Miles,Diagnostic Division,Elkhart,Ind.）を、テスト化合物の投与が開始される前に血液グルコース・レベルを正常化し、そしてまた、ゆで卵、ボイルド・ビーフ、調理人参、0.5%のバター脂肪を含む一杯の牛乳、及び小麦及びライ小麦粉の混合物からベークされた１スライスのパンを含んで成る標準的なテスト食事の採取の180分後に正常な食後の血液グルコース特性を維持するために、上記時間内のインシュリン投与のために使用した。この食事においては、エネルギーの28、26、及び46%がそれぞれタンパク質、脂肪及び炭水化物から生じる。テスト化合物の投与を行い（グリベンクラミド、生理食塩水）又は正常の血糖値が達成された30分後にそれぞれGLP－１（７－36）アミドを開始した。GLP－１（７－36）アミドの注入を210分間続けた。30分後（時刻０）、患者にテスト食事を与え、これを15分以内で終わらせた。血液サンプルを－30、０、15、30、90、120、150及び180分目において得た。

結果

食事の摂取後、食事関連Ｃ－ペプチド応答グルカゴン応答及び等血糖値食事関連インシュリン要求（IMIR）を測定した。結果を表１中に要約する。

表1

| | C-ペプチド応答 (pg/ml/210分) | グルカゴン応答 (pg/ml/210分) | IMIR (U) |
|---|---|---|---|
| 対照（生理食塩水） | 7.4±3.6 | 269345±6299 | 17.4±2.8 |
| GLP-1(7-36) アミド | 25±9.8 | 10451±5126 | 6.3±2.0 |
| グリベンクラミド | 105±53.9 | *） | 8.3±1.0 |
| GLP-1(7-36) アミド＋グリベンクラミド | 184±55.1 | 2526±4873 | 2.7±0.7 |

*）グリベンクラミドは、グルカゴン放出に対して有意な効果をもたなかった。

表中に示すように、GLP－１（７－36）アミド及びグリベンクラミドの両方は食事関連Ｃ－ペプチド応答をかなり増加させ（ｐ＜0.02）、そして組み合わせにおいて投与したとき、明らかな相乗効果を発揮した。GLP－１（７－36）アミドは、グルカゴン応答を抑制し（ｐ＜0.01）、一方グリベンクラミドは、有意な効果をもっていなかった。しかしながら、GLP－１（７－36）アミドとの組み合わせにおいて、グルカゴン応答は、殆ど廃止され

た。最後に、グリベンクラミド及びGLP－１（７－36）アミドの両方がIMIRを低下させ、そして組み合わせにおいてIMIRは2.7±0.7と低かった。
簡単に言えば、本実験は、GLP－１（７－36）アミドとグリベンクラミド（glibenclamide）との組み合わせの強い相乗効果を証明している。

実施例２

スルホニルウレア治療に対する二次的な失敗をもつNIDDM患者におけるGLP－１（７－36）アミド及びグリベンクラミドの相乗効果

方法

NIDDMをもち且つスルホニルウレア治療に二次的に失敗した８人の患者が本研究に参加した（年齢57.6±2.7歳、体質量係数28.7±1.5kg/$m^2$、糖尿病期間7.6±1.2年、$HbAb_{1C}$ 5.8±0.5）。本糖尿病患者は、USA National Diabetes Data Groupに従うNIDDM及びIDDMのための基準を満たした。患者のいずれも、腎臓機能障害、自律神経障害、又は増殖性網膜症をもたず、そしてすべてが正常の肝臓機能をもっていた。彼（彼女）らは、本試験の少なくとも２週間前及びその間糖尿病患者のための標準的な食事を食べるように指導された。スルホニルウレアにより治療された患者は、本実験の１週間前に彼らの投薬を中止した。インシュリンにより治療された患者は、本研究の24時間前にNPHインシュリンの注射を停止するように指示された。血液グルコース濃度を、定期的なインシュリンの皮下注射により制御した。
すべての患者を、一夜断食後に検査した。それぞれの検査の朝の07.30hにおいて、３つのカニューレを挿入した。１つのカニューレは、肘前の静脈内に入れ、そしてホルモン検定のために断続的に血液をサンプル採取するために使用した。それぞれのサンプリングの後に生理食塩水によりそれをフラッシュした。背面の手の静脈内に逆行して挿入した第二カニューレを血液グルコース濃度を連続監視するために使用した。静脈血液を45℃において熱調節スリーブ（Kanthal Medical Heating AB,Stockholm,Sweden）内で前腕及び手を加熱することにより動脈血化（arterialized）した。第三カニューレを対側性の肘前静脈中に挿入し、そしてすべての注入のために使用した。約08.00時から、血液グルコース濃度を正常化するために患者をBiostatorに接続した。底の血液グルコース・レベルを正常化するためにBiostatorのアルゴリズムを調整した。血液グルコース濃度のための標的は、４－5mモル/lであった。標的に達したとき、Biostatorのアルゴリズムをモニタリングのために変更し、そしてインシュリン注入のフィードバックを停止した。実験を正常血糖血に達した30分後に、Biostatorへの接続の約90分後に開始した。次に生理食塩水又は0.75pモル/kg/分のGLP－１（７－36）アミド（Peninsula Laboratories,St.Helens,Merseyside,England）を注入を開始し、そして210分間続けた。グリベンクラミド（glibenclamide）実験においては、1mgのグリベンクラミド（Hoechst AG,Germany）の静脈内注射を上記と同時に与えた。これらの４つの研究を、その実験間に２－４週間の経過を伴って、でたらめな順番で行った。時刻０において、患者に、ベッド内に座りながら15分以内で食べられる実施例１中に記載したような標準的な昼食を与えた。血液サンプルをFVにおいて、－60、－30、－15、０、15、30、90、120、150、及び180分目に採取した。血液グルコースを連続的に測定した。

結果

基底状態において、血液グルコース及びＣ－ペプチド・レベルに対する効果を先に述べたGLP－１（７－36）アミド、グリベンクラミド又はそれらの組み合わせの投与後に監視した。結果を表２中に要約する。

表2

| | 血液グルコース mmol/l | C-ペプチド pmol/l |
|---|---|---|
| 対照（生理食塩水） | 6.0±0.3 | 0.53±0.06 |
| GLP-1(7-36) アミド | 5.1±0.4 | 0.63±0.1 |
| グリベンクラミド | 6.0±0.3 | 0.56±0.007 |
| GLP-1(7-36) アミド＋グリベンクラミド | 4.5±0.1 | 0.72±0.1 |

これらの結果は上記２つの化合物の相乗効果を明確に証明している。なぜなら、グリベンクラミドがそれ自体に対して有意な効果をもたず、一方GLP－１（７－36）アミドとグリベンクラミドとの組み合わせの効果が明らかにGLP－１（７－36）アミド単独のものを超えるからである。

食事の摂取後、インシュリン生成係数（insulinogenic indices）（合成インシュリン（integrated insulin）／合成グルコース応答）を計算し、再び、２つの化合物のシナジー効果を強調し、表３中に示した。

表3

| | インシュリン生成係数 |
|---|---|
| 対照（生理食塩水） | 1.6±0.6 |
| GLP-1(7-36) アミド | 21.0±7.2 |
| グリベンクラミド | 10.6±2.8 |
| GLP-1(7-36) アミド＋グリベンクラミド | 37.5± 9 |

フロントページの続き

(74)代理人
弁理士 石田 敬
(74)代理人
弁理士 吉田 維夫
(74)代理人
弁理士 戸田 利雄
(74)代理人
弁理士 西山 雅也
(72)発明者 エフェンディク，スアト
スウェーデン国，エス－１８１ ３４ リンディンゴェー，ストイェールンベーゲン１６ベー
(72)発明者 グトニアク，マルク
スウェーデン国，エス－１６５ ６５ ヘーセルビュー，ヘーセルビュー ストラントベーグ ２６
(72)発明者 キルク，オレ
デンマーク国，デーコー－２２００ コペンハーゲン エン，３／テーベー，ステファンスガゼ ３８

審査官 瀬下 浩一

(56)参考文献 特表平０１－５０２７４６（ＪＰ，Ａ）
国際公開第９０／０１１２９６（WO，Ａ１）
国際公開第９１／０１１４５７（WO，Ａ１）
特開昭６０－１５８１７１（ＪＰ，Ａ）
Diabetes，1991，Vol.40，Suppl.１，pp.237A，947
新訂 病気と薬剤 新訂版 第3刷，日本，株式会社 薬事日報社，１９８６年 6月１５日，pp.341-345

(58)調査した分野(Int.Cl.$^{7}$，ＤＢ名)
A61K 38/26
A61K 31/64
A61K 31/155
A61K 31/445
A61P 3/10
BIOSIS(STN)
CAPLUS(STN)
MEDLINE(STN)