

(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2014-504588

(P2014-504588A)

(43) 公表日 平成26年2月24日(2014.2.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 20 頁)

(21) 出願番号 特願2013-546337 (P2013-546337)
 (86) (22) 出願日 平成23年12月20日 (2011.12.20)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年7月19日 (2013.7.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/066251
 (87) 国際公開番号 W02012/088157
 (87) 国際公開日 平成24年6月28日 (2012.6.28)
 (31) 優先権主張番号 61/426,076
 (32) 優先日 平成22年12月22日 (2010.12.22)
 (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, リ
 ミテッド・ライアビリティ・カンパニー
 AMYLIN PHARMACEUTIC
 ALS, LLC
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92
 121, サンディエゴ, タウン センター
 ドライブ 9360
 9360 Towne Centre D
 rive, San Diego, CA
 92121 USA

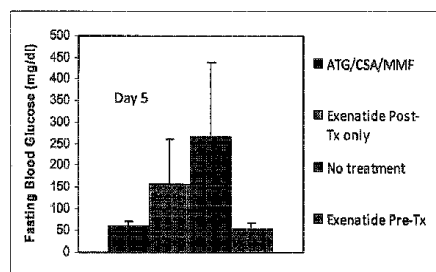
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膵島細胞移植のためのGLP-1受容体アゴニスト

(57) 【要約】

本開示は、膵島移植前に患者をGLP-1受容体アゴニスト化合物で処置することによって、膵島移植を受けている患者における移植片生着および移植片機能改善を促進することによる糖尿病の治療方法を提供する。方法は、患者に移植する前に膵島をGLP-1受容体アゴニスト化合物で処置することも含む。方法は、膵島移植において免疫抑制療法の必要性を無くす。当業界で知られているどのようなGLP-1受容体アゴニスト化合物でも本明細書に記載の方法に用いることができる。

Figure 1



B

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i)膵島移植前に、患者に治療有効量のGLP-1受容体アゴニスト化合物を投与すること；
次いで、

(ii)患者に膵島を移植すること；

を含む、それを必要とする患者における糖尿病の治療方法。

【請求項 2】

(iii)1日～1ヵ月の期間、患者に治療有効量のGLP-1受容体アゴニスト化合物を投与すること；

(iv)1日～1ヵ月の期間、患者への治療有効量の受容体アゴニスト化合物により膵島を処置すること；

(v)患者に膵島を移植すること；次いで、

(vi)膵島移植後に、患者に治療有効量のGLP-1受容体アゴニスト化合物を投与すること

；
を含む、それを必要とする患者における1型糖尿病の治療方法。

【請求項 3】

(i)膵島移植前に、患者に治療有効量のGLP-1受容体アゴニスト化合物を投与すること；

(ii)移植前に、治療有効量のGLP-1受容体アゴニスト化合物で膵島を処置すること；

(iii)患者に膵島を移植すること；次いで、

(iv)膵島移植後に、患者に治療有効量のGLP-1受容体アゴニスト化合物を投与すること

；
からなるステップを含む、膵島移植を受けている患者における移植片生着および移植片機能改善を促進する方法。

【請求項 4】

(v)1日～1ヵ月の期間、患者に治療有効量のGLP-1受容体アゴニスト化合物を投与すること；

(vi)1日～1ヵ月の期間、患者への治療有効量の受容体アゴニスト化合物により膵島を処置すること；

(vii)患者に膵島を移植すること；次いで、

(viii)膵島移植後に、患者に治療有効量のGLP-1受容体アゴニスト化合物を投与すること；

からなるステップを含む、膵島移植を受けている患者における移植片生着および移植片機能改善を促進する方法。

【請求項 5】

請求項 1～4のいずれか1つに記載の方法におけるいずれかのステップ前、中または後に、免疫抑制剤または免疫抑制療法を投与されない、請求項 1～4のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 6】

患者がヒトである、請求項 1～5のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 7】

GLP-1受容体アゴニスト化合物がエキセナチドである、請求項 1～6のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 8】

GLP-1受容体アゴニスト化合物がエキセンジン-4のアミノ酸配列を含む、請求項 1～6のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 9】

GLP-1受容体アゴニスト化合物がエキセナチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するペプチドである、請求項 1～6のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 10】

GLP-1受容体アゴニスト化合物がLeu¹⁴-エキセンジン-4のアミノ酸配列を含む、請求項

10

20

30

40

50

1 ~ 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 1 1】

GLP-1受容体アゴニスト化合物がリキシセナチドである、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 1 2】

GLP-1受容体アゴニスト化合物がリラグルチドである、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 1 3】

GLP-1受容体アゴニスト化合物がデュラグルチドである、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 1 4】

GLP-1受容体アゴニスト化合物がアルビグルチドである、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 1 5】

GLP-1受容体アゴニスト化合物がタスポグルチドである、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 1 6】

GLP-1受容体アゴニストがGLP-1(7-36)NH₂に対して少なくとも90%の配列同一性を有するペプチドである、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、糖尿病とともに生きる人々の健康および生活の質を改善するためのグルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)受容体アゴニストの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

1型糖尿病は、伝統的に、生涯インスリン治療または膵臓移植によって治療されている。しかしながら、低血糖が頻繁に起こることが、生涯インスリン治療中の患者に共通している。そして、全膵移植は、リスクの大きい侵襲的な外科治療である。膵島細胞移植は、1型糖尿病の伝統的な治療の魅力的な代替法である。しかしながら、膵島細胞移植の普及における、2つの主な臨床的制限因子は、十分な数の膵島の入手可能性および移植された膵島を長期間保護するための現在の免疫抑制処置の無力性である。

【0003】

2005年現在、アメリカ合衆国において、およそ1.4~2.8百万人の人々が、インスリン依存性糖尿病であると診断された(Collaborative Islet Transplant Registry, 5th Annual Report, Bethesda, MD: National Institutes of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, 2008)。全米臓器配分ネットワーク(United Network for Organ Sharing(UNOS))による2007年報告によれば、1,931人の膵臓ドナーが報告されたにすぎない(United Network of Organ Sharing; Donors Recovered in the U. S. by Donor Type, Washington, D.C.: United States Department of Health and Human Services, 2009)。それらのうち、1,363人分が全膵移植に用いられた。膵島移植は、依然として実験的手順であるので、ドナー膵臓の優先順位は、全膵移植に回される。したがって、2007年には、わずか568の膵臓しか膵島細胞移植に利用することができない。膵島移植のための膵臓の利用可能性がすでに限定されていることにくわえて、大部分の膵島移植レシピエントは、インスリン非依存性を達成するための十分な数の膵島細胞を獲得するために、1つ以上のドナーを必要とする。このことが、膵島細胞移植によって助けられ得た人々の数にさらに制限を加える。1型糖尿病の治療において、膵島細胞の別の源または細胞再生方法の開発が、膵島移植の普及にとって不可欠である。

【0004】

しかしながら、各レシピエントに対して2~3個の膵臓を用いるにもかかわらず、エドモ

10

20

30

40

50

ントングループによって報告された結果は、臨床状況における機能的膵島移植片の成功率は、1年後におよそ80%であるが、5年後にはわずか10%であることを示している(Ryanら、Diabetes、54(7)：2060-2069(2005)；Shapiroら、N Engl J Med、343(4)：230-238(2000))。自己および同種免疫応答の両方の影響は、豊富な数の膵島が移植された場合でさえ、膵島移植の長期的な成功を厳しく制限する。したがって、この手順の全体的な成功のためには、膵島を長期的に保護する免疫抑制治療方針の開発が必要である。

【 0 0 0 5 】

現在までの膵島細胞移植に用いられる多くの免疫抑制プロトコルは、膵島細胞機能およびインスリン感受性に悪影響を及ぼすことが分かっているカルシニューリンインヒビターを頼りにしている。したがって、宿主による免疫攻撃からの保護を提供するにもかかわらず、これらの作用剤自体が、移植片機能を低下させる可能性および移植された膵島の機能不全に寄与する可能性がある。したがって、膵島移植のレシピエントは、最初に彼らの疾患をもたらし、そのことによって移植された膵島の機能に長期的に影響を及ぼす糖尿病の進行という自己免疫作用を依然として示す。

10

【 0 0 0 6 】

GLP-1受容体アゴニスト(エキセナチド、リキシセナチド、リラグルチド、アルビグルチド、デュラグルチド、タスポグルチドなど)は、動物においてアポトーシスから細胞を保護すること、および細胞再生を促進することに加えて、細胞上のGLP-1受容体に結合し、グルコースに反応したインスリン分泌を改善することが明らかにされている。Shal evら、Horm Res、49(5)：221-225(1998)；Chenら、Biochem Biophys Res Comm、346：106 7-1074(2006)；Xuら、Diabetes、48：2270-2276(1998)；Tourrelら、Diabetes、50：1562 -1570(2001)；Coutoら、Metabolism Clinical and Experimental、56：915-918(2007)。N ODマウスにおける研究から、DPPIVインヒビターによる膵島レシピエントの前処置が、膵島へのT細胞遊走を変更しうることも明らかにされている。Kimら、Diabetes、58：641-65 1(2009)。

20

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 7 】

従来免疫抑制療法の欠点のせいで、当業界において、長期間にわたって膵島移植片が機能することを可能にする治療の有効な形態が必要とされている。本発明は、GLP-1受容体アゴニストがこの必要性を満たしうるという予期せぬ発見に関する。

30

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 8 】

概要

GLP-1受容体アゴニストによる治療が、同種移植レシピエントにおいて保護特性を示すかどうかはこれまで明らかにされていない。我々は、膵島ドナーおよび/またはレシピエントをGLP-1受容体アゴニストで前処置することが、移植後処置単独の場合と比較して移植片の生着を促進し、移植片の機能を改善することを明らかにする研究を提案し、実施した。さらに、この治療方法は、免疫抑制剤を使用することなく成功した。

40

【 0 0 0 9 】

本明細書に記載した実施例において、膵臓を摘出されたカニクイザルに、膵島同種移植を施し、GLP-1受容体アゴニストであるエキセナチドを、第0日(n=3)または第-2日(n=3)から開始して処置した(5 μg 皮下、1日2回)。第3の動物グループは、ウサギ抗胸腺細胞グロブリン、シクロスポリンおよびミコフェノール酸モフェチルの免疫抑制療法で処置した。動物の第4のグループは、非処置のままにした(n=4)。毎日、空腹時血糖値を測定し、静脈内グルコース負荷試験を行って、移植片機能を評価した。結果から、移植後第5日における前処置動物の平均空腹時血糖値は、52.7 ± 14.8 mg/dlであるが、移植後にエキセナチドで処置された動物の平均空腹時血糖値は、154.3 ± 105.5 mg/dlであることが示された。第5日の平均空腹時血糖値は、免疫抑制剤で処置された動物において、59.4 mg/dl ± 12.1であった。非処置動物の平均空腹時血糖値は、265.5 ± 172.3 mg/dlであった。ホメオ

50

スタシスモデル評価によって決定された 細胞機能は、エキセナチド前処置動物において、移植後を著しく改善され(53.3% vs. 107%)、免疫抑制剤で処置された動物において、移植後わずかに改善された(29.9% vs. 43.8%)が、非処置動物(20.2% vs. 1.89%)ならびに移植後のみにエキセナチドで処置された動物(22.2% vs. 13.8%)においては、著しく低下した。静脈内グルコース負荷試験は、エキセナチド前処置グループと免疫抑制剤グループのみにおいて、正常なグルコースおよびインスリン曲線を示した。予期せぬことに、これらの研究から、免疫抑制剤なしでのGLP-1受容体アゴニストであるエキセナチドの使用は、膵島移植片生着を維持することができることが明らかになった。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】図1A-B。移植された動物の空腹時血糖値モニタリング(A)。移植後第5日に測定された平均空腹時血糖値(B)。非処置動物は、移植後第1日までに血糖値の上昇を示し、移植後のみにエキセナチドで処置された動物は、移植後第4日から開始して、多少の血糖値の上昇を示したが、ATG/CSA/MMFで処置されたか、またはエキセナチドで前処置された動物は、実験期間を通して正常血糖を維持した。実際に、エキセナチド前処置グループからの2頭の動物は、移植後435日まで正常血糖を維持した。

【図2】図2A-B。静脈内グルコース投与後に測定された血糖値(静脈内グルコース負荷試験)およびグルコース応答についての測定値の曲線下面積測定(A)。ELISAによって検出された、静脈内グルコース負荷試験中に測定された血清インスリン値(B)。非処置および移植後エキセナチドグループに対し膵切除前のベースラインと移植後第10日にて；ならびにATG/CSA/MMFおよびエキセナチド前処置グループに対し移植後第90日にて、静脈内グルコース負荷試験を行った。エキセナチドで前処置されたか、またはATG/CSA/MMFで処置された動物は、膵切除前のものに類似したグルコースおよびインスリン応答を移植後に維持した。エキセナチドで前処置された動物は、ベースラインおよび移植後の両方において、すべての他のグループと比較して、インスリン生成の増加を示した。非処置レシピエントおよび移植後のみにエキセナチドを受けている動物は、ベースラインと比較して低下したインスリン値を示した。

【図3】図3A-B。静脈内グルコース投与に続く、第1相インスリン分泌の測定値としてのグルコースに対する急性インスリン応答($\mu\text{U/ml}$)(A)。ホメオスタシスモデル評価(HOMA-%B)によって決定された 細胞機能(B)。非処置動物および移植後のみにエキセナチドで処置された動物を第0日および第10日に試験した。ATG/CSA/MMFおよびエキセナチド前処置グループを第0日および第90日に試験した。

【図4】新たに単離した膵島において行ったインビトロ静的グルコース刺激アッセイは、インビボにてエキセナチドで前処置された膵島についてのインスリン放出の刺激指数において、非処置膵島と比較して、有意な改善を示した。*p 0.05

【発明を実施するための形態】

【0011】

詳細な記載

本開示は、膵島移植前に、患者に治療有効量のGLP-1受容体アゴニスト化合物を投与し、次いで、患者に膵島を移植することによる患者の糖尿病の治療方法を提供し、それによって糖尿病を治療する。1つの実施態様において、患者は、膵島移植前、移植中または移植後に、免疫抑制剤または免疫抑制療法(treatment regimen)を投与されない。1つの実施態様において、糖尿病は、1型糖尿病である。1つの実施態様において、患者はヒトである。

【0012】

本開示は、1日~1ヵ月の期間、患者に治療有効量のGLP-1受容体アゴニスト化合物を投与すること；1日~1ヵ月の期間、患者への治療有効量の受容体アゴニスト化合物により膵島を処置すること；患者に膵島を移植すること；および膵島移植後に、治療有効量のGLP-1受容体アゴニスト化合物の患者への投与を継続することによる、患者の糖尿病の治療方法を提供し、それによって患者の糖尿病を治療する。1つの実施態様において、患者は、

10

20

30

40

50

膵島移植前、移植中または移植後に、免疫抑制剤または免疫抑制療法を投与されない。1つの実施態様において、糖尿病は、1型糖尿病である。1つの実施態様において、患者はヒトである。

【0013】

本開示は、膵島移植前に、患者に治療有効量のGLP-1受容体アゴニスト化合物を投与すること；患者に膵島を移植すること；および膵島移植後に、治療有効量のGLP-1受容体アゴニスト化合物の患者への投与を継続することによる、膵島移植を受けている患者における移植片生着および移植片機能改善を促進する方法を提供し、それによって患者における移植片生着および移植片機能改善を促進する。1つの実施態様において、該方法は、患者への移植前に、治療有効量のGLP-1受容体アゴニスト化合物で膵島を処置することを含む。1つの実施態様において、患者は、膵島移植前、移植中または移植後に、免疫抑制剤または免疫抑制療法を投与されない。1つの実施態様において、糖尿病は、1型糖尿病である。1つの実施態様において、患者はヒトである。

10

【0014】

本開示は、1日~1ヵ月の期間、患者に治療有効量のGLP-1受容体アゴニスト化合物を投与すること；1日~1ヵ月の期間、患者への治療有効量の受容体アゴニスト化合物により膵島を処置すること；患者に膵島を移植すること；および膵島移植後に、治療有効量のGLP-1受容体アゴニスト化合物の患者への投与を継続することによる、膵島移植を受けている患者における移植片生着および移植片機能改善を促進する方法を提供し、それによって患者における移植片生着および移植片機能改善を促進する。1つの実施態様において、患者は、膵島移植前、移植中または移植後に、免疫抑制剤または免疫抑制療法を投与されない。1つの実施態様において、糖尿病は、1型糖尿病である。1つの実施態様において、患者はヒトである。

20

【0015】

以下にさらに詳述するように、どのようなGLP-1受容体アゴニスト化合物でも本明細書に記載の方法に用いることができる。

【0016】

「GLP-1受容体アゴニスト化合物」は、GLP-1受容体活性を有する化合物を意味する。このような化合物の例として、エキセンジン、エキセンジン類縁体、エキセンジンアゴニスト、GLP-1(7-37)、GLP-1(7-37)類縁体、GLP-1(7-37)アゴニストなどが挙げられる。

30

【0017】

用語「エキセンジン」は、アメリカドクトカゲの唾液分泌物中に見出される天然由来のエキセンジンペプチド(あるいは天然由来のものの合成バージョン)を包含する。特に興味深いエキセンジンとして、エキセンジン-3およびエキセンジン-4が挙げられる。本明細書に記載の方法において用いるエキセンジン、エキセンジン類縁体およびエキセンジンアゴニストは、必要に応じてアミド化されてもよく、酸の形態、医薬的に許容しうる塩の形態またはそれらのいずれかの他の生理的活性形態であってもよい。

【0018】

エキセンジン-4(HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH₂(配列番号:1))は、アメリカドクトカゲ(ヘロデルマ・ススペクツム)の唾液中に見出されるペプチドであり、エキセンジン-3(HSDGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGG PSSGAPPPS-NH₂(配列番号:2))は、メキシコドクトカゲ(ヘロデルマ・ホリヅム)の唾液中に見出されるペプチドである。エキセンジンは、グルカゴン様ペプチド(GLP)ファミリーのいくつかのメンバーに類似したアミノ酸配列を有する。たとえば、エキセンジン-4は、グルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)(7-37)(HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGRG(配列番号:22))と約53%の配列同一性を有する。しかしながら、エキセンジン-4は、GLP-1が発現される哺乳類のプログルカゴン遺伝子のアメリカドクトカゲ相同体ではない異なる遺伝子から転写される。さらに、合成エキセンジン-4ペプチドの構造はGLP-1の構造の一連の修飾によって生成されなかったため、エキセンジン-4はGLP-1(7-37)の類縁体ではない。Nielsenら、Current Opinion in Investigational Drugs、4(4):401-405(2003)。

40

50

【0019】

エキセナチドとしても知られている合成エキセンジン-4は、BYETTA(登録商標)(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およびイーライ リリー アンド カンパニー)として市販されている。BYETTA(登録商標)には、エキセナチド、保存剤(たとえば、メタクレゾール)、等張剤(たとえば、マンニトール)および緩衝液(たとえば、酢酸緩衝液)が含まれる。エキセナチドの週1回製剤が現在FDAの承認を待っており、WO 2005/102293(開示は、参照することによって本願に組み込まれる)に記載されている。この週1回製剤には、エキセナチドおよび生分解性ポリマー(たとえば、ポリ(ラクチド/グリコリド共重合体)マイクロスフェア)が含まれ、本明細書においてはEQW(BYDUREON(商標)、(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、イーライ リリー アンド カンパニーおよびアルカーメス, インコーポレイテッド)という。

10

【0020】

「エキセンジン類縁体」とは、エキセンジン参照ペプチド(exendin reference peptide)の生物活性を誘起し、好ましくはエキセンジン参照ペプチド(例えば、エキセンジン-4)と同等またはそれよりも良好な効力を有する、または開示によって本明細書に組み込まれる、Hargroveら、Regulatory Peptides, 141: 131-119(2007)によって記載されているような受容体結合および/または競合実験などの当該技術分野で知られている測定法によって評価した場合に、エキセンジン参照ペプチドと比較して5桁以内(プラスまたはマイナス)の効力を有するペプチドまたは他の化合物を意味する。エキセンジン類縁体が、1 μ M未満のアフィニティー、より好ましくは3nM未満または1nM未満のアフィニティーでかかるアッセイにおいて結合するのが好ましい。用語「エキセンジン類縁体」は、「エキセンジンアゴニスト」と称してもよい。

20

【0021】

エキセンジン類縁体は、化学的に誘導化または改変された本明細書に記載するペプチド、たとえば、非天然アミノ酸残基(たとえば、タウリン、 α -アミノ酸残基、 β -アミノ酸残基およびD-アミノ酸残基)、アミド、エステルおよびC末端ケトン修飾のようなC末端官能基修飾、ならびにたとえばアミノ酸、ピログルタミン酸に見出されるようなアシル化アミン、シッフ塩基または環化のようなC末端ケトン修飾およびN-末端官能基修飾を有するペプチドも包含する。エキセンジン類縁体は、ペプチド模倣体のような他の化学的部分を含んでもよい。

30

【0022】

例示的なエキセンジンおよびエキセンジン類縁体には、エキセンジン-4(配列番号: 1); エキセンジン-3(配列番号: 2); Leu¹⁴-エキセンジン-4(配列番号: 3); Leu¹⁴, Phe²⁵-エキセンジン-4(配列番号: 4); Leu¹⁴, Ala¹⁹, Phe²⁵-エキセンジン-4(配列番号: 5); エキセンジン-4(1-30)(配列番号: 6); Leu¹⁴-エキセンジン-4(1-30)(配列番号: 7); Leu¹⁴, Phe²⁵-エキセンジン-4(1-30)(配列番号: 8); Leu¹⁴, Ala¹⁹, Phe²⁵-エキセンジン-4(1-30)(配列番号: 9); エキセンジン-4(1-28)(配列番号: 10); Leu¹⁴-エキセンジン-4(1-28)(配列番号: 11); Leu¹⁴, Phe²⁵-エキセンジン-4(1-28)(配列番号: 12); Leu¹⁴, Ala¹⁹, Phe²⁵-エキセンジン-4(1-28)(配列番号: 13); Leu¹⁴, Lys^{17,20}, Ala¹⁹, Glu²¹, Phe²⁵, Gln²⁸-エキセンジン-4(配列番号: 14); Leu¹⁴, Lys^{17,20}, Ala¹⁹, Glu²¹, Gln²⁸-エキセンジン-4(配列番号: 15); オクチルGly¹⁴, Gln²⁸-エキセンジン-4(配列番号: 16); Leu¹⁴, Gln²⁸, オクチルGly³⁴-エキセンジン-4(配列番号: 17); Phe⁴, Leu¹⁴, Gln²⁸, Lys³³, Glu³⁴, Ile^{35,36}, Ser³⁷-エキセンジン-4(1-37)(配列番号: 18); Phe⁴, Leu¹⁴, Lys^{17,20}, Ala¹⁹, Glu²¹, Gln²⁸-エキセンジン-4(配列番号: 19); Val¹¹, Ile¹³, Leu¹⁴, Ala¹⁶, Lys²¹, Phe²⁵-エキセンジン-4(配列番号: 20); エキセンジン-4-Lys⁴⁰(配列番号: 21); リキシセナチド(lixisenatide)(Sanofi-Aventis/Zealand Pharma); CJC-1134(ConjuChem, Inc.); [N⁻(17-カルボキシヘプタデカン酸)Lys²⁰]エキセンジン-4-NH₂; [N⁻(17-カルボキシヘプタデカノイル)Lys³²]エキセンジン-4-NH₂; [デアミノ-His¹, N⁻(17-カルボキシヘプタデカノイル)Lys²⁰]エキセンジン-4-NH₂; [Arg^{12,27}, NLe¹⁴, N⁻(17-カルボキシヘプタデカノイル)Lys³²]エキセンジ

40

50

ン-4-NH₂ ; [N - (19-カルボキシ-ノナデカノイルアミノ) Lys²⁰] -エキセンジン-4-NH₂ ; [N - (15-カルボキシペンタデカノイルアミノ) Lys²⁰] -エキセンジン-4-NH₂ ; [N - (13-カルボキシトリデカノイルアミノ) Lys²⁰] エキセンジン-4-NH₂ ; [N - (11-カルボキシ-ウンデカノイル-アミノ) Lys²⁰] エキセンジン-4-NH₂ ; エキセンジン-4-Lys⁴⁰ (-MPA) -NH₂ ; エキセンジン-4-Lys⁴⁰ (-AEEA-AEEA-MPA) -NH₂ ; エキセンジン-4-Lys⁴⁰ (-AEEA-MPA) -NH₂ ; エキセンジン-4-Lys⁴⁰ (-MPA) -アルブミン ; エキセンジン-4-Lys⁴⁰ (-AEEA-AEEA-MPA) -アルブミン ; エキセンジン-4-Lys⁴⁰ (-AEEA-MPA) -アルブミンなどが含まれる。AEEAとは [2- (2-アミノ) エトキシ] エトキシ酢酸をいう。EDAとはエチレンジアミンをいう。MPAとはマレイミドプロピオン酸をいう。所望により、エキセンジンおよびエキセンジン類縁体はアミド化されていてもよい。

10

【 0 0 2 3 】

本明細書に記載する方法に有用な他のエキセンジンおよびエキセンジン類縁体には、開示が参照することによって本願に組み込まれるWO 98/05351 ; WO 99/07404 ; WO 99/25727 ; WO 99/25728 ; WO 99/40788 ; WO 00/41546 ; WO 00/41548 ; WO 00/73331 ; WO 01/51078 ; WO 03/099314 ; 米国特許第6,956,026号 ; 米国特許第6,506,724号 ; 米国特許第6,703,359号 ; 米国特許第6,858,576号 ; 米国特許第6,872,700号 ; 米国特許第6,902,744号 ; 米国特許第7,157,555号 ; 米国特許第7,223,725号 ; 米国特許第7,220,721号 ; 米国公開2003/0036504号 ; および米国公開2006/0094652号に記載されているものが含まれる。

【 0 0 2 4 】

「GLP-1 (7-37) 類縁体」とは、開示が参照することによって本願に組み込まれるHargroveら、Regulatory Peptides , 141 : 113-119 (2007) などによって記載されている受容体結合アッセイまたはインビボ血液グルコースアッセイのような当該技術分野で知られている測定法によって評価した場合に、GLP-1 (7-37) と同様の生物活性を誘起するペプチドまたは他の化合物を意味する。1つの実施態様において、「GLP-1 (7-37) 類縁体」なる語は、GLP-1 (7-37) のアミノ酸配列と比較した場合に1、2、3、4、5、6、7または8個のアミノ酸の置換、挿入、欠失またはそれらの2つ以上の組合せを有するアミノ酸配列を有するペプチドを意味する。1つの実施態様において、GLP-1 (7-37) 類縁体はGLP-1 (7-36) -NH₂である。GLP-1 (7-37) 類縁体には、該分子のアミド化形態、酸の形態、医薬的に許容しうる塩の形態およびそれらのいずれかの他の生理的活性形態が含まれる。

20

【 0 0 2 5 】

例示的なGLP-1 (7-37) およびGLP-1 (7-37) アナログには、GLP-1 (7-37) (配列番号 : 22) ; GLP-1 (7-36) -NH₂ (配列番号 : 23) ; リラグルチド (Novo NordiskからのVICTOZA (登録商標)) ; アルビグルチド (GlaxoSmithKlineからのSYNCRIA (登録商標)) ; デュラグルチド (LY2189265、免疫グロブリンG4に結合したGLP-1類縁体、Eli Lilly and Company) ; LY2428757 (ポリエチレングリコールに結合したGLP-1類縁体、Eli Lilly and Company) ; デスアミノ-His⁷,Arg²⁶,Lys³⁴ (N - (-Glu (N- -ヘキサデカノイル))) -GLP-1 (7-37) ; デスアミノ-His⁷,Arg²⁶,Lys³⁴ (N -オクタノイル) -GLP-1 (7-37) ; Arg^{26,34},Lys³⁸ (N - (-カルボキシペンタデカノイル)) -GLP-1 (7-38) ; Arg^{26,34},Lys³⁶ (N - (-Glu (N- -ヘキサデカノイル))) -GLP-1 (7-36) ; Aib^{8,35},Arg^{26,34},Phe³¹-GLP-1 (7-36) (配列番号 : 24) ; HXaa₈EGTFTSDVSSYLEXaa₂₂Xaa₂₃AAKEFIXaa₃₀WLXaa₃₃Xaa₃₄GXaa₃₆Xaa₃₇ ; 式中、Xaa₈はA、VまたはG ; Xaa₂₂はG、KまたはE ; Xaa₂₃はQまたはK ; Xaa₃₀はAまたはE ; Xaa₃₃はVまたはK ; Xaa₃₄はK、NまたはR ; Xaa₃₆はRまたはG ; およびXaa₃₇はG、H、Pまたは存在しない (配列番号 : 25) ; Arg³⁴-GLP-1 (7-37) (配列番号 : 26) ; Glu³⁰-GLP-1 (7-37) (配列番号 : 27) ; Lys²²-GLP-1 (7-37) (配列番号 : 28) ; Gly^{8,36},Glu²²-GLP-1 (7-37) (配列番号 : 29) ; Val⁸,Glu²²,Gly³⁶-GLP-1 (7-37) (配列番号 : 30) ; Gly^{8,36},Glu²²,Lys³³,Asn³⁴-GLP-1 (7-37) (配列番号 : 31) ; Val⁸,Glu²²,Lys³³,Asn³⁴,Gly³⁶-GLP-1 (7-37) (配列番号 : 32) ; Gly^{8,36},Glu²²,Pro³⁷-GLP-1 (7-37) (配列番号 : 33) ; Val⁸,Glu²²,Gly³⁶Pro³⁷-GLP-1 (7-37) (配列番号 : 34) ; Gly^{8,36},Glu²²,Lys³³,Asn³⁴,Pro³⁷-GLP-1 (7-37) (配列番号 : 35) ; Val⁸,Glu²²,Lys³³,Asn³⁴,Gly³⁶,Pro³⁷-GLP-1 (7-37) (配列番号 : 36) ; Gly^{8,36},Glu²²-GLP-1 (7-36) (配列番号

30

40

50

: 37) ; Val⁸,Glu²²,Gly³⁶-GLP-1 (7-36) (配列番号: 38) ; Val⁸,Glu²²,Asn³⁴,Gly³⁶-GLP-1 (7-36) (配列番号: 39) ; Gly^{8,36},Glu²²,Asn³⁴-GLP-1 (7-36) (配列番号: 40) が含まれる。所望により、各GLP-1 (7-37) およびGLP-1 (7-37) 類縁体はアミド化されていてもよい。

【0026】

1つの実施態様において、GLP-1 (7-37) またはGLP-1 (7-37) 類縁体は、免疫グロブリン(たとえば、IgG、IgE、IgGなど)のFc部に(直接的にまたは連結基によって)共有結合している。たとえば、配列番号: 25-40のいずれか1つは、AESKYGPPCPPAPXaa₁₆Xaa₁₇Xaa₁₈GGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFXaa₈₀STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLXaa₂₃₀(式中、Xaa₁₆はPまたはE; Xaa₁₇はF、VまたはA; Xaa₁₈はL、EまたはA; Xaa₈₀はNまたはA; およびXaa₂₃₀はKまたは存在しない(配列番号: 41))の配列を含む免疫グロブリンのFc部に共有結合していてもよい。連結基は、いずれの化学的部分(たとえば、アミノ酸および/または化学基)であってもよい。1つの実施態様において、連結基は(-GGGS-)_x(配列番号: 42)(式中、xは1、2、3、4、5または6; 好ましくは2、3または4; より好ましくは3)である。1つの実施態様において、免疫グロブリンのFc部に共有結合したGLP-1 (7-37) 類縁体は、アミノ酸配列: HEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFI AWLKGGGGGGGGGGGGGGGGGSAESKYGPPCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGL(配列番号: 43)を含む。

【0027】

もう1つの実施態様において、GLP-1 (7-37) またはGLP-1 (7-37) 類縁体は、1または2個のポリエチレングリコール分子に(直接的または連結基を介して)共有結合し得る。たとえば、GLP-1 (7-37) 類縁体は、アミノ酸配列: HXaa₈EGTFTSDVSSYLEXaa₂₂QAAKEFI AWLXaa₃₃KGGPSSGAPPPC₄₅C₄₆-Z(式中、Xaa₈は: D-Ala、G、V、L、I、SまたはT; Xaa₂₂はG、E、DまたはK; Xaa₃₃はVまたはI; およびZはOHまたはNH₂) (配列番号: 44)を含み得、所望により、(i)1つのポリエチレングリコール基がC₄₅に共有結合していてもよく、(ii)1つのポリエチレングリコール基がC₄₆に共有結合していてもよく、または(iii)1つのポリエチレングリコール基がC₄₅に共有結合し、かつ、1つのポリエチレングリコール基がC₄₆に結合していてもよい。1つの実施態様において、GLP-1 (7-37) 類縁体は、HVEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFI AWLKGGPSSGAPPPC₄₅C₄₆-NH₂(配列番号: 45)であり、所望により、(i)1つのポリエチレングリコール基がC₄₅に共有結合していてもよく、(ii)1つのポリエチレングリコール基がC₄₆に共有結合していてもよく、または(iii)1つのポリエチレングリコール基がC₄₅に結合し、かつ、1つのポリエチレングリコール基がC₄₆に結合していてもよい。

【0028】

GLP-1受容体アゴニスト化合物は、当該技術分野でよく知られている方法、たとえば、Engら、J. Biol. Chem., 265: 20259-62 (1990)に記載されているペプチド精製; Raufmanら、J. Biol. Chem., 267: 21432-37 (1992)に記載されている標準固相ペプチド合成技術; Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor (1989)に記載されている組換えDNA技術などによって調製することができる。

【0029】

本開示は、本明細書に記載のGLP-1受容体アゴニスト化合物および医薬的に許容しうる担体を含む医薬組成物も提供する。GLP-1受容体アゴニスト化合物は、医薬組成物中に医薬有効量で存在することができ、治療効力にとって必要なGLP-1受容体アゴニスト化合物の最小血漿濃度を提供する量で存在することができる。このような医薬組成物は当該技術分野で知られており、たとえば、開示は、参照することによって本願に組み込まれる米国特許第7,521,423; 米国特許第7,456,254; WO 2000/037098; WO 2005/021022; WO 2005/102293; WO 2006/068910; WO 2006/125763; WO 2009/068910

10

20

30

40

50

; 米国公開第2004/0106547などに記載されている。

【0030】

本明細書に記載のGLP-1受容体アゴニスト化合物を含む医薬組成物は、非経口(皮下、静脈内、筋肉内など)、持続注入(点滴、静脈内ボラス投与、静脈内注入など)、局所、鼻腔投与または経口投与などの末梢投与のために提供されてもよい。

適当な医薬的に許容しうる担体およびそれらの処方は、Remington's Pharmaceutical Sciences by Martin; and Wangら、Journal of Parenteral Science and Technology、Technical Report No. 10、Supp. 42: 2S(1988)などの標準的な製剤に関する文献に記載されている。

【0031】

本明細書に記載のGLP-1受容体アゴニスト化合物は、注射または点滴用非経口組成物で提供することができる。該化合物を、たとえば、水; 植物油(たとえば、ゴマ油、ピーナツ油、オリーブ油など)などの不活性油; または他の医薬的に許容しうる担体に懸濁させることができる。1つの実施態様において、該化合物は、たとえば、pHが約3.0~8.0、または約3.0~5.0の等張性緩衝液などの水性担体に懸濁させる。組成物を、従来の滅菌技術によって滅菌してもよく、あるいは滅菌しなくてもよい。組成物は、pH緩衝剤などの、生理的状态に近づけるのに必要な医薬的に許容しうる補助物質を含んでもよい。有用な緩衝液として、たとえば、酸性緩衝液が挙げられる。治療有効量の製剤が、皮下注射、経皮注射、皮下注射または他のデリバリー法の後、数時間または数日間にわたって血流中にデリバリーされるように、貯蔵型(repository)またはデポ(depot)除毒性製剤の形態を用いてもよい。塩化ナトリウム、あるいはデキストロース、ホウ酸、酒石酸ナトリウム、プロピレングリコール、ポリオール(マンニトールおよびソルビトールなど)または他の無機または有機溶質などの他の医薬的に許容しうる作用剤を用いて所望の等張性を達成することができる。静脈内輸液のための1つの実施態様において、製剤は、(1)GLP-1受容体アゴニスト化合物、(2)滅菌水、および必要に応じて、(3)塩化ナトリウム、デキストロースまたはそれらの組み合わせを含んでもよい。

【0032】

担体または賦形剤を用いて、GLP-1受容体アゴニスト化合物の投与を促進することもできる。担体または賦形剤の例として、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、ラクトース、グルコースまたはスクロースなどの様々な糖類、あるいは種々のデンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油、ポリエチレングリコールおよび生理的に適合しうる溶媒が挙げられる。

【0033】

GLP-1受容体アゴニスト化合物は、医薬的に許容しうる塩(たとえば、酸付加塩)および/またはその複合体として製剤化することもできる。医薬的に許容しうる塩は、投与される濃度で非毒性の塩である。医薬的に許容しうる塩として、硫酸塩、塩酸塩、リン酸塩、スルファミン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、乳酸塩、酒石酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、シクロヘキシルスルファミン酸塩およびキナ酸塩などの酸付加塩が挙げられる。医薬的に許容しうる塩は、塩酸、硫酸、リン酸、スルファミン酸、酢酸、クエン酸、乳酸、酒石酸、マロン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、シクロヘキシルスルファミン酸およびキナ酸などの酸から得ることができる。このような塩は、たとえば、遊離酸または塩基形態の生成物を、塩が不溶性である溶媒または媒体中、あるいは水などの溶媒中、1当量以上の適当な塩基または酸と反応させ、次いで、減圧除去するか、あるいは、凍結乾燥するか、あるいは適当なイオン交換樹脂上で、存在する塩のイオンを別のイオンと交換することなどによって製造することができる。

【0034】

GLP-1受容体アゴニスト化合物の例示の医薬製剤は、米国特許第7,521,423号、米国特許第7,456,254号、米国公開第2004/0106547号、WO 2006/068910、WO 2006/125763などに記載されており、その開示は、参照することによって本願に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【0035】

本明細書に記載の方法に用いるための本明細書に記載のGLP-1受容体アゴニスト化合物の治療有効量は、典型的に、約0.01 µg~約5 mg;約0.1 µg~約2.5 mg;約1 µg~約1 mg;約1 µg~約50 µg;または約1 µg~約25 µgである。あるいは、GLP-1受容体アゴニスト化合物の治療有効量は、体重70 kgの患者において、約0.001 µg~約100 µg;または体重70 kgの患者において、約0.01 µg~約50 µgであつてもよい。これらの治療有効用量を、1日1回、1日2回、1日3回、週1回、隔週1回(biweekly)または月1回、財形に応じて投与することができる。投与される正確な用量は、たとえば、速放性製剤または持続放出製剤などの財形によって決定される。経皮、経鼻または経口投与財形のために、投薬量を、約5倍~約10倍増加してもよい。

10

【実施例】

【0036】

材料および方法：

動物：2~4歳のカニクイザル(*Macaca fascicularis*)をチャールズ・リバー・ラボラトリーズ(ヒューストン、テキサス)またはコバンス・リサーチ(アリス、テキサス)から入手した。動物の開始時体重は、4.35 kg±1.00(範囲2.5-6.1)であった。動物は、個別のケージ(28x30x24インチ)で飼育し、継続的に水を与えた。動物を手術および静脈内グルコース負荷試験前の12時間絶食させたが、それ以外は、新鮮な食材を補った通常の霊長類食を給餌した。この実験で記載した手順は、“Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”に記載のガイドラインにしたがい、Institutional Animal Care and Use Committee(IACUC)およびUniversity Laboratory Animal Resources(ULAR)(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th Ed. Washington D.C.: National Academy Press(1996))によって行った。実験は、動物実験プログラムがAAALAC, Int.によって認可されているオハイオ州立大学で行った。

20

【0037】

実験デザイン：すべての動物を、膵全摘術に付して、糖尿病を誘発し、膵島同種移植片を移植した。移植された膵島の平均薬用量は、12,110 IEq/kg±7442.8であった(IEqは、膵島量(Islet equivalent)である)。グループ1(n=3)を5 µgのエキセナチド(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、サンディエゴ、カリフォルニア)で、2日前(すなわち、-2日間、ここで第0日は、移植日であった)から試験終点まで、1日2回皮下処置した。グループ2(n=3)も、エキセナチド(5 µg、1日2回、皮下)で、試験終点まで処置したが、開始は移植日(すなわち、第0日)であった。グループ3(n=5)は、免疫抑制療法で処置した：第0~第3日の間における、静脈内、1.5 mg/kgの用量でのウサギ抗胸腺細胞グロブリン(ATG)(サイモグロブリン(登録商標)、Genzyme、ケンブリッジ、マサチューセッツ)および第0~第3日にわたる25から5 mgへと漸減する用量でのプレドニゾン(ソル・メドロール(登録商標)、Pfizer、ニューヨーク、ニューヨーク)からなる導入療法。第0日~試験終点まで経口投与される、25 mgのシクロスポリン(CSA)(ネオラル(登録商標)、ノバルティス、イースト・ハノーバー、ニュージャージー)および250 mgのミコフェノール酸モフェチル(MMF)(セルセプト(登録商標)、ロシュ、ナットレー、ニュージャージー)からなる免疫抑制維持。グループ4(n=4)は、処置せず、コントロールグループとして用いた。

30

40

【0038】

外科手術：動物のミスマッチペアをイソフルランで一般的な麻酔下に置いた。膵全摘術を行うために、正中開腹を行った。膵臓および総胆管を保存したままで、脾動脈と静脈、門脈および十二指腸から膵臓を切開した。膵臓と十二指腸の間の血液供給を二重結紮し、膵島単離のために膵臓を摘出した。正常血糖を確保するために15分毎に血糖をモニターしながら膵島単離を行っている間中、動物を麻酔下に維持した。ミスマッチ同種異系ドナーから単離した膵臓を、レシピエントである膵臓を摘出された動物に迅速に移植した。グループ1については、ドナーとレシピエントの両方を、膵臓摘出および移植前の2日間エキセナチドで前処置した。グループ2、3および4のレシピエントは、前処置をしなかった膵島

50

を移植された。腸間膜静脈を見つけ、門脈に18ゲージの血管カテーテルを挿入した。ヘパリンなしで、50 mLのCMRL-1066移植媒体(メディアテック、ハーンドン、ヴァージニア)に懸濁した膵島を、10分間にわたってゆっくりと注入した。カテーテルを除去し、静脈を結紮した。切開を閉じ、意識を取り戻すまで近くで観察しながら動物を回復させた。術後鎮痛薬として、ブプレネックス(登録商標)(0.05 mg/kg、レキットベンキーザー、パークシア、イギリス)を投与した。

【0039】

膵島単離 : Rajabら、Cell Transplantation、17(9) : 1015-1023(2008)に記載の変更ヒト膵島単離プロトコルにしたがって、膵島単離を行った。ジチゾン染色および膵島量(IEq)への変換によって、膵島数を測定した。

10

【0040】

移植後の経過観察 : 移植後の最初の48時間の間、尾刺し法を用いて、1日2回血糖値を測定した。標準グルコメーター(アセンシア・エリート(登録商標)、バイエル・ヘルスケア、ミシャウォーカ、インドアナ)で測定するために、10 μ l 滴の血液を動物の尾から採取した。次いで、移植後7日間は1日1回、およびその後週1回(正常血糖値の動物に対して)、空腹時血糖値を測定した。空腹時血糖値は、朝、動物に給餌する前に測定した。空腹時血糖値が300 mg/dl以上の動物を毎日モニターし、NPHインスリン(イーライ リリー アンド カンパニー、インドアナポリス、インドアナ)を投与した。第0日の膵切除前、ならびに移植後の第10および第9日に、静脈内グルコース負荷試験を行った。グループ1~3については移植後90日、非処置グループ4については移植後10日(グループ4の動物において第10日に指摘された健康不良による)を試験終点とみなした。しかしながら、グループ1(エキセナチド前処置)の2匹の動物は、90日以上モニターし、第220日にさらなる静脈内グルコース負荷試験を行った。試験中を通して、動物の体重をモニターした。

20

【0041】

静脈内グルコース負荷試験 : 各静脈内グルコース負荷試験前の12時間、動物を絶食させた。-5および0時に、基準グルコースおよびインスリンを測定した。0時に、50%グルコース溶液を静脈内投与した。血糖値および血清インスリン値の測定のために、グルコース投与後、1、3、5、10、15、20、25および30分の時点で、血液を採取した。

【0042】

インビトログルコース刺激アッセイ : 新たに単離した膵島を手摘みし(一反復当たりの膵島数 $n = 5 \times 3$ 回反復)、“高”(16.7mM)グルコース中または“低”(1.67mM)グルコース中のいずれかにおいて、37 $^{\circ}$ Cにて1時間インキュベートした。遠心分離して上清を集め、ヒトインスリン用ELISAキット(ダコ(Dako)、カービンテリア、カリフォルニア)を用いてインスリン含量を測定した。各サンプルに対してインスリン刺激指数(S.I. = 高/低グルコースインスリン放出)を測定した。

30

【0043】

データ分析 : すべての静脈内グルコース負荷試験のグルコース曲線について曲線下面積(AUC)を測定した。静脈内グルコース負荷試験のためのグルコース耐性およびインスリン感受性の指標として、グルコース消失速度定数(k_G)を用いた。10~30分間からのグルコースの自然対数を用いる線形回帰の負のスロープとして k_G を計算した。静脈内グルコース負荷試験中の第一相インスリン分泌の指標として、グルコースに対する急性インスリン応答(AIRg)を用いた。3~5分間におけるインスリンの平均値からゼロ時点での平均値を引いて、AIRgを計算した。ホメオスタシスモデル評価(HOMA-%B)と呼ばれるグルコース調節の数学的評価によって、細胞機能を測定した。HOMA-%Bは、平均基礎インスリン(μ IU/mL) \times 20 / (平均基礎グルコース(mmol/L) - 3.5)として計算された。

40

【0044】

統計分析 : 他に特記しない限り、すべての結果は、平均 \pm SEMで表す。スチューデントt-検定および二元分散分析を用いて、パラメーター解析を行った。0.05未満の確率値(p)は、統計的に有意であるとみなされる。

【0045】

50

結果：空腹時血糖値：

非処置コントロールグループの動物は、移植後第1日までに、血糖値の上昇を示し（図1A）、移植後第5日に $265 \text{ mg/dl} \pm 172$ の平均空腹時血糖値を示した（図1B）。それに比べて、TG、CSAおよびMMFの免疫抑制療法で処置した動物は、90日間の追跡期間を通して正常血糖値を維持し、移植後第5日において $59.4 \text{ mg/dl} \pm 12.1$ の平均空腹時血糖値を示した（図1）。エキセナチドで前処置された動物もまた、正常血糖値を維持した。実際に、このグループの2匹の動物を、移植後435日間にわたって追跡したが、この期間中、正常血糖値を維持し続けた（図1A）。移植後第5日に、このグループの平均空腹時血糖値は、 $52.7 \text{ mg/dl} \pm 14.8$ であった（図1B）。最後に、移植後のみエキセナチドで処置された動物は、移植後第4日から、空腹時血糖値の中程度の上昇を示し（図1A）、第5日に $154 \text{ mg/dl} \pm 105$ の平均空腹時血糖値を示した（図1B）。

10

【0046】

静脈内グルコース負荷試験：

移植後の静脈内グルコース負荷試験結果は、非処置動物ならびに移植後のみにエキセナチドで処置された動物の両方において、損なわれた（図2）。移植後に有意に増加したAUCをもつ非処置動物において、血糖値は有意に上昇した。移植後のみにエキセナチドで処置された動物は、AUCには有意な差はなかったけれども、正常ではないグルコース曲線は正常ではなかった（図2A）。両方のグループについての移植後のインスリン曲線は、顕著な第2相インスリン分泌がなく、インスリン濃度は大きく低下し、ベースラインと比較して正常ではなかった（図2B）。一方、ATG/CSA/MMFで処置した動物ならびにエキセナチドで前処置した動物の静脈内グルコース負荷試験は、膵切除前のものに似ている血中グルコース応答を示す、機能性膵島移植片の指標であった（図2A）。これらのグループの動物のAUCにおいて移植後の有意な変化はなかった。ATG/CSA/MMFグループにおいて、移植後、インスリン濃度は実際に増加した。エキセナチドで前処置した動物では、移植後の時間とともにインスリンのいくらかの低下が見られたが、インスリン濃度は依然として、他の処置グループよりも高かった。第1相および第2相のインスリン応答は、また、これらのグループの両方の移植後において継続して注意すべきである。

20

【0047】

非処置レシピエントにおける第1相インスリン分泌(AIRg)は、ベースラインに比べて、移植後10日で大幅に低下した($9.53 \text{ } \mu\text{U/ml} \pm 19.2$ 対 $61.0 \text{ } \mu\text{U/ml} \pm 40.0$)（図3A）。ホメオスタシスモデル評価(HOMA-%B)によって測定される細胞機能は、非処置動物においても移植後有意に低下した（ベースラインにおいて、 $1.89\% \pm 9.14$ 対 $20.2\% \pm 8.3$; $p = 0.01$ ）（図3B）。移植後のみにエキセナチドを処置された膵島レシピエントの膵切除前の第0日における平均AIRgは、 $23.7 \text{ } \mu\text{U/ml} \pm 35.9$ であった。移植後10日において、平均AIRgは $16.6 \text{ } \mu\text{U/ml} \pm 18.1$ に低下した（図3A）。同様に、細胞機能は、移植後ベースラインにおいて $22.2\% \pm 46.4$ から、 $13.8\% \pm 26.1$ に低下した（図3B）。一方、ATG/CSA/MMFで処置されたレシピエントは、移植後、同等な第1相インスリン分泌を維持した。AIRgは、ベースラインにおいて、 $35.5 \text{ } \mu\text{U/ml} \pm 14.1$ であり、移植後90日間、 $39.7 \text{ } \mu\text{U/ml} \pm 26.6$ を維持した（図3A）。このグループにおいて、差異は有意ではなかったが、細胞機能はわずかに増加した。ATG/CSA/MMF処置動物におけるHOMA-%Bは、ベースラインにおいて $29.9\% \pm 24.3$ であり、第90日において $43.8\% \pm 29.5$ であった（図3B）。エキセナチドで前処置された動物は、すべての他のグループと比較して、ベースラインにおいて著しく高い第1相インスリン分泌を示した($211 \text{ } \mu\text{U/ml} \pm 150$)。これは、移植後に、90日間で $105 \text{ } \mu\text{U/ml} \pm 19.0$ に低下したが、他の処置グループと比較して、有意に高い状態を継続した（図3A）。ベースラインの細胞機能も、他のグループと比較して、エキセナチド前処置グループにおいて増加し($53.3\% \pm 5.55$)、このことは、実際に、移植後に、90日間で、 $107\% \pm 28.6$ まで有意な増加を示した（図3B）。

30

40

【0048】

インビトログルコース刺激：インビボエキセナチド前処置を受けている動物から分離し

50

た膵島に対する平均刺激指数は、 2.98 ± 1.85 であった。非処置ドナー動物(エキセナチドで前処置せず)から分離された膵島については、平均刺激指数は、 0.52 ± 0.32 であった。この値は、エキセナチド処置動物よりも有意に低かった($p = 0.04$)。

【0049】

考察：移植後の膵島移植片機能の決定因子として、空腹時血糖値を用いた。非処置レシピエントの移植後第5日における平均空腹時血糖値は、 $265 \text{ mg/dl} \pm 172$ であった。これらの動物においては拒絶反応が予測され、この高血糖は、生着不全を示すものであった。移植日から開始してエキセナチドを投与されている動物の第5日における平均空腹時血糖値は、 $154 \text{ mg/dl} \pm 105$ であった。このグループの動物は、移植後第4日から終点までやや上昇したままの変化する空腹時血糖値を示した。空腹時血糖値は、非処置動物と比較して、あまり大幅でなく上昇し、糖尿病判断の基準値(空腹時血糖値 250 mg/dl)を常に満たすわけではなかったが、このグループの血糖値は、実験中上昇したままであった。比較的、ATG/CSA/MMF処置動物ならびにエキセナチドで前処置した動物は、膵島細胞移植後に正常血糖値を維持し、試験期間中、膵島移植片が機能していることを示した。実際に、全体としての空腹時血糖値は、ATG/CSA/MMFで処置した動物と比較して、エキセナチドで前処置した動物において有意に低下した。この研究で用いた免疫抑制方策は、糖尿病誘発性があることがわかっているカルシニューリンインヒビターであるシクロスポリンを含むものであった。この免疫抑制療法の代わるエキセナチドの使用は、膵島細胞機能におけるシクロスポリンの与える損傷効果を減少させることができる。さらに、これらの結果は、エキセナチド単独で、移植片拒絶の防止にとって十分であることを示唆する。

10

20

【0050】

静脈内グルコース負荷試験の結果は、非処置動物においては、血糖値が上昇し、インスリン生成が低下したが、エキセナチドで前処置されるか、またはATG/CSA/MMFで処置された動物においては、機能している膵島同種移植片が存在することを示す。移植後のみにエキセナチド処置を受けている動物もまた、インスリン生成不全および異常なグルコース曲線を示した。第2相インスリン応答は、非処置または移植後のみエキセナチド処置グループにおいて顕著ではなかった。移植前にエキセナチドで処置された膵島細胞移植レシピエントは、ATG、CSAおよびMMFの免疫抑制療法のみを処置されたレシピエントと比較して、グルコースに応答したインスリン生成の増加を示した。第1相インスリン分泌も、移植後90日において、ATG/CSA/MMFグループと比較して、エキセナチド前処置グループにおいて有意に高かった。また、移植後90日において、エキセナチド単独で処置された動物は、ATG/CSA/MMF処置動物と比較して、有意に改善された細胞機能を示した。したがって、膵島を拒絶から保護することに加えて、エキセナチドは、通常の免疫抑制と比較して、実際に移植片機能を改善することができた。

30

【0051】

我々の実験設定により、エキセナチド前処置グループにおけるドナーおよびレシピエントの両方が、移植前2日から処置を開始した。この実験において新たに分離した膵島で行ったインビトログルコース刺激アッセイは、エキセナチド処置を受けなかった膵島と比較して、エキセナチドで前処置された膵島について膵島機能の有意な改善を示した。このことは、エキセナチドで前処置された膵島が、移植時により高品質であったことを示唆する。エキセナチドで前処置された動物における改善されたグルコース耐性、インスリン分泌および細胞機能が、このことをサポートする。さらに、移植前の第0日でさえ、インスリン分泌およびグルコース耐性は、他のグループと比較して、エキセナチドで前処置された動物において、より良好であった。静脈内グルコース投与に反応して生成された血清インスリン値もまた、エキセナチドで前処置された動物において有意に高かった。この改善は、第0日でさえも認められたので、このことは、エキセナチドによる前処置が、移植片機能の改善および長期的保護において重要である可能性があることを示唆する。移植後のみにエキセナチドで処置された動物は、前処置を受けている動物と比較して、同様の移植片機能の改善および/または維持を示さなかった。

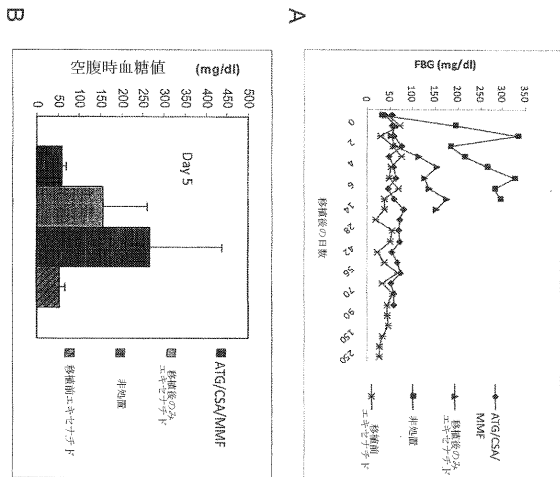
40

【0052】

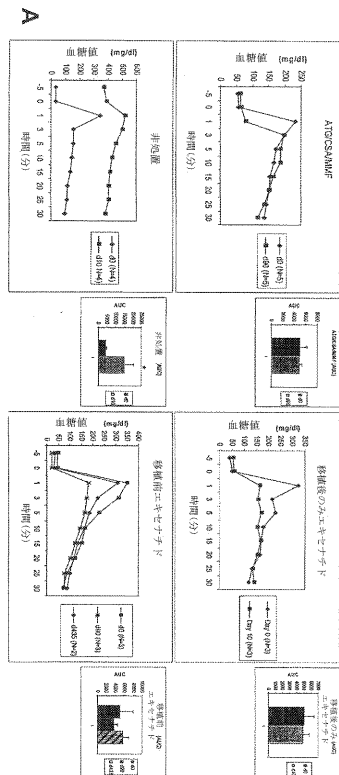
50

要約すると、我々は、この実験において、エキセナチドが、免疫抑制剤による処置と比較して、移植片機能を改善しうること、および、実際に、エキセナチド処置単独で、膵島同種移植片を拒絶反応から保護するのに十分であることを明らかにしている。しかしながら、ドナーおよび/またはレシピエントの前処置は、このレベルの移植片機能を達成するのに必要であると思われる。レシピエントのエキセナチド処置が第0日までに開始されず、移植された膵島もまた非処置である場合、移植片機能は損なわれ、非処置動物における移植片の機能にさらにより似たものとなる。膵島を自己免疫攻撃から保護する可能性とともに、このことから、エキセナチドは、1型糖尿病患者における膵島移植の長期的な成功のための有用な処置になる。

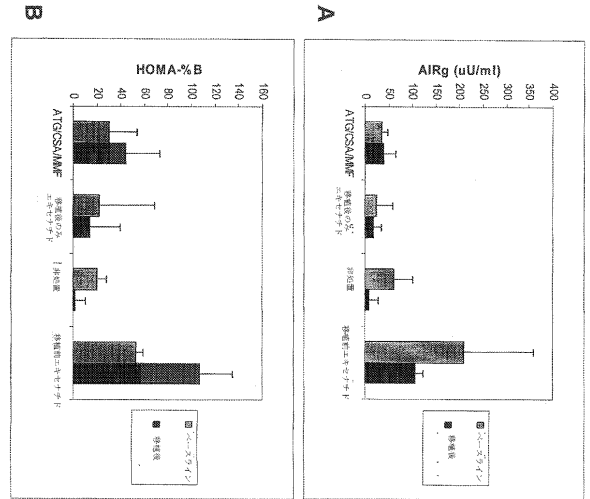
【図1】



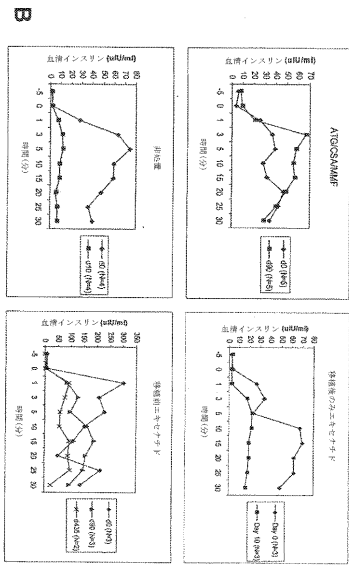
【図2A】



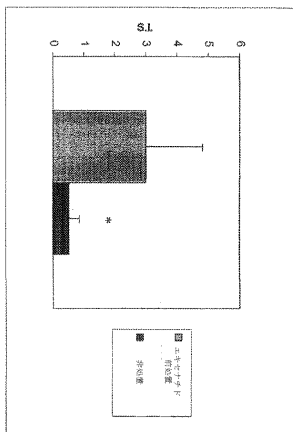
【 図 3 】



【 図 2 B 】



【 図 4 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 11/66251

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 38/00; A01N 63/00; C12N 5/00; C12N 5/071 (2012.01) USPC - 514/6.7, 514/6.9; 424/93.7; 435/325; 435/366 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 38/00; A01N 63/00; C12N 5/00; C12N 5/071 (2012.01) USPC - 514/6.7, 514/6.9; 424/93.7; 435/325; 435/366 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched IPC(8) - A61K 38/00; A01N 63/00; C12N 5/00; C12N 5/071 (2012.01) - see keyword below USPC - 514/6.7, 514/6.9; 424/93.7; 435/325; 435/366 - see keyword below Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(USPT,PGPB,EPAB,JPAB); Medline, Google: glucagon-like peptide-1, receptor, GLP-1, GLP-1R, agonist, analog, exendin-4, Ex4, Exanatide, islet, transplant, lixisenatide, treating, diabetes, without, not, no, immunosuppressive, therapeutic, effective amount, side effect, administer, prior, before, Suthanthiran, dendritic cell		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2008/0287423 A1 (MUSSMANN et al.) 20 November 2008 (20.11.2008), Abstract, para [0004], [0047], [0048], [0059], [0064], [0065], [0070], [0071], and [0093]	1
Y		5/(1)
Y	TRANSPLANT_eNEWS, Successful Islet Cell Transplant Without Immunosuppressive Therapy In Mice With Type 1 Diabetes. Poster, Transplant eNews, 2007, [online]. [Retrieved on 2012.03.14]. Retrieved from the Internet: <URL: http://www.trannews.com/wordpress/?p=216> PDF file: pg 1-2, pg 1, para 1-3, and pg 2, para 2	5/(1)
A	CRUTCHLOW et al. EXENDIN-4 DOES NOT PROMOTE BETA CELL PROLIFERATION OR SURVIVAL DURING THE EARLY POST-ISLET TRANSPLANT PERIOD IN MICE. Transplant Proc. 2008, Vol. 40(5), p.1650?1657. PDF file: pg 1-15: Abstract; pg 6, para 3, pg 7, last para	1, 5/(1)
A	KING et al. Islet transplantation outcomes in mice are better with fresh islets and exendin-4 treatment. Diabetologia. 2005, Vol. 48(10), p. 2074-9. Abstract; pg 2075, col 2, para 3,	1, 5/(1)
A	MERANI et al. Liraglutide, a long-acting human glucagon-like peptide 1 analog, improves glucose homeostasis in marginal mass islet transplantation in mice. Endocrinology 2008, Vol. 149, p. 4322-4328. Abstract	1, 5/(1)
A	US 2006/0062769 A1 (HABENER et al.) 23 March 2006 (23.03.2006), para [0005], [0145], [0156], [0159], and [0245]	1, 5/(1)
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 application or patent 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
31 May 2012 (31.05.2012)		02 JUL 2012
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 11/66251

Box No. 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:

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.: 6-16
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. 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:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: claims 1, 5, drawn to a method for treating diabetes in a patient in need thereof comprising: (i) administering a therapeutically effective amount of a GLP-1 receptor agonist compound to the patient prior to islet transplant; (ii) transplanting islets into the patient; thereby treating diabetes in the patient.

Group II, claims 2-5, drawn to a method for treating Type 1 diabetes, or a method for promoting graft survival and improved graft function in a patient receiving an islet transplant comprising the steps of: (i) administering a therapeutically effective amount of a GLP-1 receptor agonist compound to the patient prior to islet transplant; (ii) treating islets with a therapeutically effective amount of a GLP-1 receptor agonist compound prior to transplant; (iii) transplanting the islets into the patient; (iv) administering a therapeutically effective amount of the GLP-1 receptor agonist compound to the patient after the islet transplant; as indicated in claims 2-4.
*****Continued in the extra sheet*****

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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

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.:
1, 5/(1)

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/66251

Continuation of:

Box No III (unity of invention is lacking)

The inventions listed as Groups I-II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Group I does not include the inventive concept of treating islets with a therapeutically effective amount of a GLP-I receptor agonist compound prior to transplant, as required by Group II.

The inventions of Groups I and II share the technical feature of (i) administering a therapeutically effective amount of a GLP-I receptor agonist compound to the patient prior to islet transplant; (ii) transplanting islets into the patient. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art as being anticipated by US 2008/0287423 A1 to MUSSMANN et al. (hereinafter 'Mussmann') as follows:

Mussmann discloses a method for treating diabetes in a patient in need thereof (Abstract - 'treatment of pancreatic autoimmune disorders, e.g. type I diabetes') comprising:

(i) administering a therapeutically effective amount of a GLP-I receptor agonist compound to the patient (para [0059] - 'the compositions may be administered together with ... GLP-1 or derivatives... exendin-4', wherein 'exendin-4' is 'GLP-I receptor agonist compound'; para [0004] - 'exendin-4, a long-acting form of glucagon-like peptide 1 (GLP-1)... the effects of exendin-4 administered', - indicating an effective amount of exendin-4 is administered; para [0048] - 'administering a therapeutically effective amount of compositions'; Specification: pg 5, ln 26-31 - 'A "GLP-I receptor agonist compound" refers to ... exendin analogs'. The term "exendin" includes ... exendin-4')

— prior to islet transplant (para [0047] - 'In the context of islet transplantation the agent may be used to promote survival and growth ... islets ... prior to ... their transfer into recipients'; para [0064]-[0065]-[0070] - 'The compositions may be administered in patients suffering from...Type I diabetes...Islet+duct cell transplantation-treatment of recipients before ... transplantation'; para [0059]; para [0004]);

(ii) transplanting islets into the patient (para [0070] - 'Islet+duct cell transplantation-treatment of recipients before ... transplantation', which indicates islet transplant is performed after administering the GLP-I receptor agonist compound; para [0071] - 'Treatment of islets before transplantation/during pre-transplantation culture'; para [0059]; para [0004]);

—thereby treating diabetes in the patient (para [0047] - 'In the context of islet transplantation the agent may be used to promote survival and growth as well as differentiation of donor duct cells and islets in culture prior to or after their transfer into recipients'; para [0004] - 'in the field of islet transplantation where the gradual deterioration of beta cell function of transplanted islets poses a major challenge'; para [0059] - 'the compositions may be administered together with ... GLP-1 or derivatives... exendin-4'; para [0004] - 'the effects of exendin-4 administered'; Abstract - 'treatment of pancreatic autoimmune disorders, e.g. type I diabetes'). Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Groups I-II therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Note re item 4: Claims 6-16 are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4 (a). These claims are improper multiple dependent claims.

フロントページの続き

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

(71)出願人 594197872

イーライ リリー アンド カンパニー

アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 2 8 5 インディアナポリス リリー コーポレイト セ
ンター (番地なし)

(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 100138900

弁理士 新田 昌宏

(74)代理人 100162684

弁理士 呉 英燦

(74)代理人 100176474

弁理士 秋山 信彦

(72)発明者 クワメ・オセイ

アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォルニア州サンディエゴ、タウン・センター・ドライブ 9 3 6 0
番、アミリン・ファーマシューティカルズ・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー、インテレ
クチュアル・プロパティグループ内

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA17 BA01 BA08 BA19 BA23 CA59 DC50 NA06 ZB08

ZC35 ZC41