

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006年4月20日 (20.04.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/041150 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 45/00 (2006.01) A61K 31/787 (2006.01)
A61K 31/785 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/018927
- (22) 国際出願日: 2005年10月14日 (14.10.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2004-301027
2004年10月15日 (15.10.2004) JP
特願2005-152124 2005年5月25日 (25.05.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三菱ウェルファーマ株式会社 (MITSUBISHI PHARMA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5410046 大阪府大阪市中央区平野町二丁目6番9号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 鈴木 一夫 (SUZUKI, Kazuo) [JP/JP]; 〒2278502 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 ゾイジーン株式会社内 Kanagawa (JP). 坂井 薫 (SAKAI, Kaoru) [JP/JP]; 〒1038405 東京都中央区日本橋本町二丁目2番6号 三菱ウェルファーマ株式会社 東京オフィス内 Tokyo (JP). 石井 伸一 (ISHII, Shinichi) [JP/JP]; 〒1038405 東京都中央区日本橋本町二丁目2番6号 三菱ウェルファーマ株式会社 東京オフィス内 Tokyo (JP). 杉本 佳奈美 (SUGIMOTO, Kanami) [JP/JP]; 〒1038405 東京都中央区日本橋本町二丁目2番6号 三菱ウェルファーマ株式会社 東京オフィス内 Tokyo (JP). オーバックス ヨハン (AUWERX, Johan) [FR/FR]; 67404 フランス共和国 ストラスブール、イルキルシュ、BP 10142、ローランフリエ通り1、ルイ・
- パスツール大学 細胞分子生物学遺伝学研究所内 Strasbourg (FR). 渡辺 光博 (WATANABE, Mitsuhiro) [JP/FR]; 67404 フランス共和国 ストラスブール、イルキルシュ、BP 10142、ローランフリエ通り1、ルイ・パスツール大学 細胞分子生物学遺伝学研究所内 Strasbourg (FR).
- (74) 代理人: 高柳 昌生 (TAKAYANAGI, Masau); 〒1038405 東京都中央区日本橋本町二丁目2番6号 三菱ウェルファーマ株式会社 知的財産部 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PREVENTIVE AND/OR THERAPEUTIC AGENT FOR DIABETES

(54) 発明の名称: 糖尿病の予防および/または治療薬

(57) Abstract: A preventive and/or therapeutic agent for diabetes, comprising a substance capable of inhibiting the activity of farnesoid X receptor as an active ingredient.

(57) 要約: 本発明によれば、farnesoid X receptorの活性を抑制する物質を有効成分とする糖尿病予防および/または治療薬を提供することができる。

WO 2006/041150 A1

明 細 書

糖尿病の予防および／または治療薬

技術分野

[0001] 本発明は、新規な糖尿病予防および／または治療薬に関するものである。

背景技術

[0002] farnesoid X receptor(FXR)は胆汁酸をリガンドとする核内受容体であり、コレステロールを胆汁酸に変換する際の律速酵素であるコレステロール7 α 水酸化酵素(cyp7 α)の遺伝子発現を負に制御することが知られている(非特許文献1)。その制御機構としては、FXRの活性化により抑制性核内受容体small heterodimer partner (SHP)の発現が増加し、SHPがcyp7 α の発現を抑制するという経路が知られている(非特許文献2、3)。

[0003] FXRの活性を変化させるような薬剤は、コレステロールレベルの異常高値または異常低値を示す疾患に対して有効であると考えられており、コレステロール低下剤として知られる陰イオン交換樹脂は、FXRの内因性リガンドである胆汁酸を吸着することによりFXR活性を抑制してcyp7 α の発現を増加させる(非特許文献4)。その結果、コレステロールから胆汁酸への合成が促進され、コレステロール低下剤として有用であることが示されている。

[0004] また、FXRは核内受容体retinoic acid receptor(RXR)とヘテロダイマーを形成することが知られている。このRXRは、peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR) γ やPPAR α 等の核内受容体と相互作用することが知られており、FXR活性の変化がPPAR γ やPPAR α 等の関与する肥満、糖尿病または脂質異常等様々な疾患に対して作用を及ぼすことが示唆されている(特許文献1)。しかし、FXR活性を抑制することにより、PPAR γ またはPPAR α を介して肝糖新生が抑制されるという報告はない。

[0005] また、FXR活性化によりSHPを介して肝糖新生酵素のphosphoenolpyruvate carboxy kinase(PEPCK)やglucose-6-phosphatase(G6Pase)の発現が抑制されるという報告がある(非特許文献5、特許文献2)。

[0006] しかし、逆にFXR活性が抑制されることにより肝糖新生が抑制されるという報告はな

い。

- [0007] また、FXR活性化によりエネルギー代謝が亢進されるという報告がある(特許文献3)。
- [0008] しかし、逆にFXR活性が抑制されることによりエネルギー代謝が亢進されるという報告はない。
- [0009] コレステロール低下剤として知られる陰イオン交換樹脂であるコレスチミド(商品名: コレバイン、三菱ウェルファーマ株式会社)に関しては、これまで一定期間投与した後の血糖降下に関する報告(非特許文献6)および2型糖尿病を合併した高コレステロール血症患者における血糖日内変動に対する影響に関する報告(特許文献4)がある。しかし、その作用機序については明らかにされていない。
- [0010] また、現在使用されている血糖降下を示す薬剤であるインスリン製剤、スルフォニル尿素剤、即効型インスリン分泌促進剤、ビッグアナイド系薬剤、アルファグルコシダーゼ阻害剤またはグリタゾン系薬剤がFXR活性を抑制するという報告はない。
- [0011] すなわち、FXR活性抑制剤が肝糖新生を抑制させ、エネルギー代謝を亢進することに関しては、本願発明者の知る限りこれまで一切報告されていない。

特許文献1: 国際公開パンフレットWO02/20463号

特許文献2: 国際公開パンフレットWO03/59253号

特許文献3: 国際公開パンフレットWO03/80803号

特許文献4: 国際公開パンフレットWO03/11308号

非特許文献1: Science 1999, 284(5418):1362-5

非特許文献2: Mol. Cell 2000, 6, 507-515

非特許文献3: Mol. Cell 2000, 6, 517-526

非特許文献4: J Biol Chem.2002, 277(45):42588-95.

非特許文献5: J Biol Chem.2004, 279(22):23158-65.

非特許文献6: 臨床医薬12巻8号1996年6月1641頁

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0012] 本発明の課題は、新規な糖尿病予防および／または治療薬を提供することにある

。

課題を解決するための手段

- [0013] 本発明者らはかかる状況を鑑み鋭意研究を重ねた結果、farnesoid X receptor の活性を抑制する物質が糖尿病の予防および／または治療に有効であることを見出し本発明を完成するに至った。
- [0014] 即ち、本発明の要旨は以下の通りである。
- (1) farnesoid X receptorの活性を抑制する物質を有効成分とする、肝糖新生を抑制する糖尿病の予防および／または治療薬。
 - (2) farnesoid X receptorの活性を抑制する物質を有効成分とする、エネルギー代謝を亢進する糖尿病の予防および／または治療薬。
 - (3) エネルギー代謝の亢進が、基礎代謝の増加である上記2に記載の糖尿病の予防および／または治療薬。
 - (4) エネルギー代謝の亢進が、熱産生の増加である上記2に記載の糖尿病の予防および／または治療薬。
 - (5) コレステロール7 α 水酸化酵素の遺伝子発現量を上昇させる上記1または2に記載の糖尿病の予防および／または治療薬。
 - (6) small heterodimer partnerの遺伝子発現量を抑制させる上記1または2に記載の糖尿病の予防および／または治療薬。
 - (7) farnesoid X receptorの活性を抑制する物質が、薬学的に許容される陰イオン交換樹脂またはfarnesoid X receptorのアンタゴニストである上記1から6に記載の糖尿病の予防および／または治療薬。
 - (8) 薬学的に許容しうる陰イオン交換樹脂が、胆汁酸吸着能を有するものである上記7に記載の糖尿病の予防および／または治療薬。
 - (9) 薬学的に許容し得る陰イオン交換樹脂が、コレステリド、コレステラミンレジン、コレステポール、塩酸セベラメル及び塩酸コレセベラムから選ばれるものである上記7または8に記載の糖尿病の予防および／または治療薬。
 - (10) 薬学的に許容し得る陰イオン交換樹脂が、エピクロロヒドリン誘導体とイミダゾール誘導体に代表されるアミン類の重合反応にて合成される陰イオン交換樹脂である

上記7または8に記載の糖尿病の予防および／または治療薬。

(11)薬学的に許容し得る陰イオン交換樹脂が、コレステリドである上記7から10のいずれかに記載の糖尿病の予防および／または治療薬。

発明の効果

[0015] 本発明によれば、farnesoid X receptorの活性を抑制する物質を有効成分とする糖尿病予防および／または治療薬を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]体重変化を示す図である。

[図2]摂餌量変化を示す図である。

[図3]糖負荷後の血漿中グルコース濃度推移を示す図である。

[図4]肝臓におけるcyp7 α およびSHPの遺伝子発現量を示す図である。

[図5]肝臓における糖新生酵素の遺伝子発現量を示す図である。

[図6]肝臓におけるcyp7 α およびSHPの遺伝子発現量を示す図である。

[図7]肝臓における糖新生酵素の遺伝子発現量を示す図である。

[図8]体重変化を示す図である。

[図9]組織重量を示す図である。

[図10]インスリン負荷後の血漿中グルコース濃度推移を示す図である。

[図11]糖負荷後の血漿中グルコース濃度推移を示す図である。

[図12]酸素消費量を示す図である。

[図13]肝臓におけるcyp7 α およびSHPの遺伝子発現量を示す図である。

[図14]褐色脂肪組織におけるPGC-1 α 、UCP-1、およびDio2の遺伝子発現量を示す図である。

[図15]糖負荷後の血漿中グルコース濃度推移を示す図である。

[図16]肝臓におけるcyp7 α およびSHPの遺伝子発現量を示す図である。

[図17]糖負荷後の血漿中グルコース濃度推移を示す図である。

[図18]肝臓におけるcyp7 α およびSHPの遺伝子発現量を示す図である。

[図19]糖負荷後の血漿中グルコース濃度推移を示す図である。

[図20]肝臓におけるcyp7 α およびSHPの遺伝子発現量を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

[0017] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0018] 本発明において、farnesoid X receptorとは、胆汁酸をリガンドとする核内受容体であり、抑制性核内受容体small heterodimer partner (SHP)の遺伝子発現を正に制御し、コレステロールを胆汁酸に変換する際の律速酵素であるコレステロール7 α 水酸化酵素(cyp7 α)の遺伝子発現を負に制御するものである(Science 1999, 284(5418):1362-5)。ここで、FXRの活性は、cyp7 α の遺伝子発現量またはSHPの遺伝子発現量により測定することができる。cyp7 α の遺伝子発現量およびSHPの遺伝子発現量はリアルタイム定量PCR法(TaqMan Universal PCR Master Mix(Applied Biosystems社))等によって測定することができる。

[0019] 本発明において、farnesoid X receptorの活性を抑制する物質とは、cyp7 α の遺伝子発現量を2倍から15倍程度増加させる物質および/またはSHPの遺伝子発現量を20%から70%程度減少させる物質である。好ましくはcyp7 α の遺伝子発現量を4倍から10倍程度増加させる物質および/またはSHPの遺伝子発現量を30%から60%程度減少させる物質が挙げられ、より好ましくはcyp7 α の遺伝子発現量を8倍程度増加させる物質および/またはSHPの遺伝子発現量を50%程度以上減少させる物質が挙げられる。

[0020] 本発明において、肝糖新生を抑制するとは、肝糖新生酵素であるglucose-6-phosphatase (G6Pase)および/またはphosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)等の遺伝子発現量をそれぞれ20%から70%程度減少させることであり、好ましくはそれぞれ30%から70%程度減少させることである。最も好ましくはそれぞれ40%程度減少させることである。ここで、G6Paseの遺伝子発現量およびPEPCK等の遺伝子発現量は、前述のリアルタイム定量PCR法等によって測定することができる。

[0021] 本発明において、エネルギー代謝の亢進とは基礎代謝や熱産生が増加することであり、基礎代謝とは、体表面積あたりの酸素消費量、あるいは単位体重あたりの酸素消費量のことである。

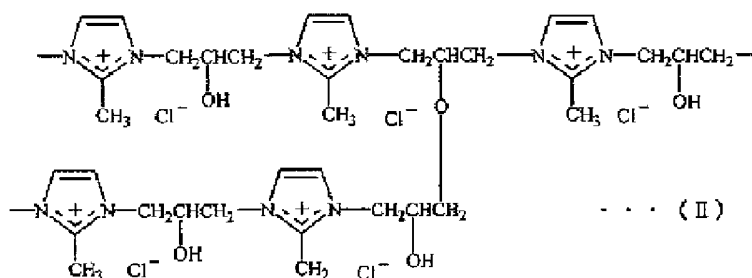
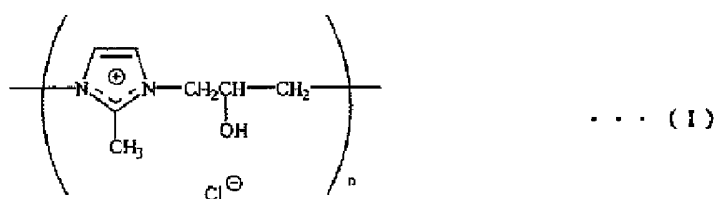
[0022] 本発明において、基礎代謝が増加するとは、単位体重あたりの酸素消費量が5%程度増加することであり、好ましくは10%から15%程度増加することである。

[0023] 本発明において、熱産生が増加するとは、褐色脂肪組織(Brown Adipose Tissue(BAT))に存在する熱産生に関与するタンパクをコードする遺伝子の発現が、それぞれ1.3倍から2倍程度増加することであり、好ましくはそれぞれ3倍から4倍程度増加することである。ここで、小動物のBATにおける熱産生に関与するタンパクとしては、Deiodinase 2 (Dio2)、Uncoupler Protein 1(UCP-1)、PPAR gamma coactivator 1a (PGC-1a)などが挙げられる。Dio2とは、甲状腺ホルモンのT4(サイロキシン)をT3(トリヨードチロニン)に変換する酵素である。T3の主たる作用は代謝亢進(基礎代謝量、熱産生の増加)である。また、UCP-1はADPの酸化的リン酸化の不共役(uncoupling)、すなわち異化によって発生したエネルギーをATPなどの高エネルギーリン酸化合物に変えずに直接熱にする役割を持つ。PGC-1aは核内転写因子のcoactivatorであり、UCP-1やDio2の遺伝子発現を正に制御している。

[0024] 本発明において、薬学的に許容し得る陰イオン交換樹脂とは、医薬品として投与可能な陰イオン交換樹脂であり、好ましくは胆汁酸吸着能を有する陰イオン交換樹脂が挙げられる。なお、以下の実施例に示すように、当該陰イオン交換樹脂を投与した場合に、肝糖新生の抑制やエネルギー代謝の亢進を示すものであれば特に限定はされない。

[0025] その一例としては、コレスチミド(2-メチルイミダゾール-エピクロロヒドリン共重合体)が最も好ましいものとして挙げられる。コレスチミドは、不規則に入り乱れた複雑な立体構造を有するが、下記式(I)の基本構造で示され、また、その構造は部分的には下記式(II)で示され、エピクロロヒドリン誘導体とイミダゾール誘導体に代表されるアミン類の重合反応、すなわち、特開昭60-209523号公報に記載の製造方法によって得られる。

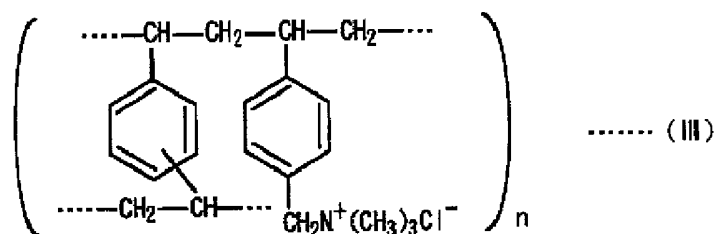
[0026] [化1]



[0027] なおコレステミドはJANでは一般名colestimide (化学名:2-methylimidazole-epichlorohydrin copolymer)として登録されているが、INNでは一般名colestilan (化学名:2-methylimidazole polymer with 1-chloro-2,3-epoxypropane)として登録されている。

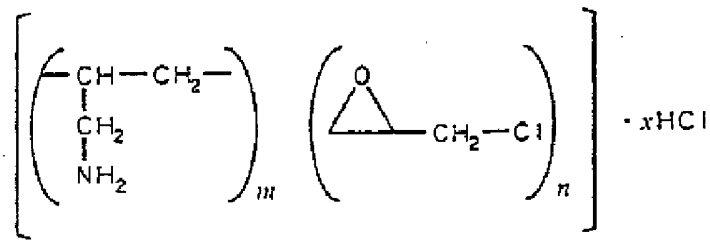
[0028] その他の好ましい陰イオン交換樹脂としては、前述のコレステラミンレジジンやコレステポール((クロロメチル)オキシランを付加したN-(2-アミノエチル)-N'-[2-[(2-アミノエチル)アミノ]エチル]-1,2-エタンジアミン重合体)等が挙げられ、これらはシグマ社から市販されている。なお、コレステラミンレジジンとは4級アンモニウム基を付加したスチレン-ジビニルベンゼン共重合体を含む強塩基性陰イオン交換樹脂で、その基本構造は下記式(III)で表される。

[0029] [化2]



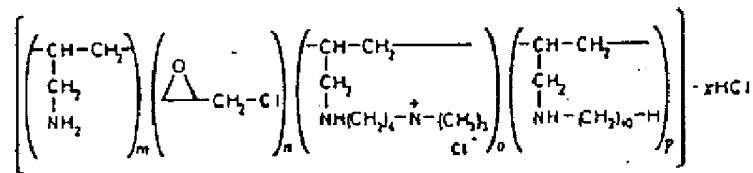
[0030] また、塩酸セベラメルの基本構造は下記式で表され、米国特許第5496545号公報に記載の方法、またはそれに準ずる方法により製造することができる。

[0031] [化3]



[0032] 塩酸コレセベラムの基本構造は下記式で表され、米国特許第5607669号公報に記載の方法、またはそれに準ずる方法により製造することができる。

[0033] [化4]



[0034] なお、その他、特表平9-504782号、9-500368号、10-501264号、10-501842号、11-507093号、11-512074号及び5-512332号、並びに、特開平8-208750号、9-202732号、10-114661号及び11-228449号各号公報等に記載の陰イオン交換樹脂も、本発明の要旨を超えない限り、本発明において使用することができる。

[0035] 本発明においてfarnesoid X receptorのアンタゴニストとは、投与した場合に肝糖新生の抑制やエネルギー代謝の亢進を示すものであればよく、特に制限はされず、低分子化合物でもよい。さらに、FXRの内因性リガンドである胆汁酸の腸管から肝臓への再吸収(腸肝循環)に関与することが知られているトランスポーターや胆汁酸結合タンパクを阻害する物質も本発明の糖尿病予防および/または治療薬に含まれると考えられる。トランスポーターの具体例としては、ileal apical sodium co-dependent bile acid transporter/ileal bile acid transporter (ASBT/IBAT)やNa⁺/Taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)等が挙げられ、胆汁酸結合タンパクとしては、ileal bile acid binding protein (IBABP)等が挙げられる。

[0036] 本発明の糖尿病予防および/または治療薬は、有効成分である上記化合物それ自体を用いてもよいが、汎用の製剤用添加物を用いて上記有効成分を含む医薬組

成物を製造して用いることが好ましい。

- [0037] このような医薬組成物としては、錠剤、カプセル剤、細粒剤、丸剤、トローチ剤、液剤等を挙げることができ、これらは経口的(舌下投与を含む)に投与される。
- [0038] 経口用の医薬組成物は、混合、充填または打錠等の従来汎用の方法により製造することができる。また反復配合操作を用いて、多量の充填剤を使用した医薬組成物中に有効成分を分布させてもよい。例えば、経口投与に用いられる錠剤またはカプセル剤は単位投与物として提供されることが好ましく、結合剤、充填剤、希釈剤、打錠剤、滑沢剤、崩壊剤、着色剤、香味剤および湿潤剤等の通常使用される製剤用担体含有していてもよい。錠剤は、当業界において周知の方法に従って、例えばコーティング剤を用いてコーティング錠としてもよい。
- [0039] 好ましい充填剤としては、セルロース、マンニトール、ラクトース等を挙げることができ、崩壊剤であるでん粉、ポリビニルピロリドン、ナトリウムでん粉グリコラート等のでん粉誘導体等や、滑沢剤であるラウリル硫酸ナトリウム等を製剤用添加物として用いることができる。経口用の液剤形態の医薬組成物は、例えば、水性または油性懸濁液、溶液、エマルジョン、シロップ剤もしくはエリキシル剤等の医薬組成物、あるいは使用前に水または適当な媒体により再溶解され得る乾燥医薬組成物として提供される。
- [0040] このような液剤には、通常の添加剤、例えばソルビトール、シロップ、メチルセルロース、ゼラチン、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ステアリン酸アルミニウムゲルまたは水素化食用脂肪のような沈殿防止剤；レシチン、ソルビタンモノオレエート、アラビアゴムのような乳化剤；アーモンド油、精留ココナツ油、グリセリンエステル等の油状エステル；プロピレングリコール、エチルアルコールのような(食用油も包含し得る)非水性媒体；p-ヒドロキシ安息香酸のメチルエステル、エチルエステル若しくはプロピルエステル、またはソルビン酸のような保存剤、および必要に応じて通常の香味剤または着色剤等を配合することができる。
- [0041] 上記経口用の医薬組成物、例えば錠剤、カプセル剤、細粒剤等の場合は、通常5～95%重量、好ましくは25～90%重量の有効成分を含有する。
- [0042] なお、コレステミドは三菱ウエルファーマ(株)より商品名コレバインとして市販されて

おり、本発明においてはコレバインをそのまま使用しても良い。

- [0043] 本発明の糖尿病予防および／または治療薬の投与量は、使用する有効成分、患者の年齢、健康状態、体重、疾患の重篤度、同時に行う治療・処置の種類や頻度、所望の効果の性質等により適宜決定すればよい。一般的には、コレステリドを例にすると、成人1日あたりの投与量を、有効成分量として1～60gとして、1日あたり1回ないしは数回投与すればよい。

実施例

- [0044] 以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は、これらの記載に限定されるものではない。なお、以下で使用したコレステリドは、特開昭60-209523号公報に記載の方法に準じて製造したものを使用した。

- [0045] 実施例1

試験方法

KKAyマウス(雄性、日本クレア、5週齢、N=4-5)を使用した。コントロール群には正常食、コレステリド群には2%のコレステリドを含有した正常食(UAR社(Villemoison sur Orge, France)を与えた。

- [0046] 12日後、経口糖負荷試験を、通常の方法に従って実施した。グルコース負荷前の採血を実施した後、グルコース溶液を2g/kg体重の割合で経口投与し、30、60、90、120分後の血糖値を測定した。

- [0047] その1週間後、マウスより肝臓を摘出し、胆汁酸合成酵素のcyp7 α 、抑制性核内受容体SHP、糖新生酵素のPEPCKおよびG6Paseの遺伝子発現量(relative mRNA level)をリアルタイム定量PCR法にて測定した。

- [0048] リアルタイム定量PCR反応に供したプライマー配列は、Cyp7 α に対しては配列表の配列番号1および2、SHPに対しては配列表の配列番号3および4、PEPCKに対しては配列表の配列番号5および6、G6Paseに対しては配列表の配列番号7および8をそれぞれ用いた。

- [0049] 結果

(1) 体重

図1にコントロール群(■)およびコレステリド群(●)の体重変化を示す。図1に示す

とおり、コレステリド群の体重はコントロール群の体重と比較して低値を示した。

(2) 摂餌量

図2にコントロール群(■)およびコレステリド群(●)の摂餌量変化を示す。図2に示すとおり、コレステリド群の摂餌量とコントロール群の摂餌量は投与期間中、ほぼ同様の推移を示した。

(3) 糖負荷試験

図3にコントロール群(■)およびコレステリド群(●)の糖負荷後の血漿中グルコース濃度(mg/ml)の推移を示す。図3に示すとおり、コレステリド群ではコントロール群と比較してグルコース負荷前の血糖値が約30%低下していた。

[0050] また、グルコース負荷後の血糖値もコレステリド群ではコントロール群と比較して速やかに低下した。

(4) 肝臓におけるcyp7 α とSHPの遺伝子発現

図4に結果を示す。コレステリド群ではコントロール群と比較してcyp7 α の遺伝子発現量が約8倍以上と顕著に増加し、SHPの遺伝子発現量が50%以上減少していた。この結果は、コレステリドにより肝臓におけるFXR活性が抑制され、胆汁酸合成の負の制御が解除されていることを示している。

(5) 肝臓における糖新生酵素の遺伝子発現

図5に結果を示す。コレステリド群ではコントロール群と比較してPEPCKおよびG6Paseのいずれも遺伝子発現量が抑制されていた。この結果は、コレステリドにより肝臓における糖新生反応が抑制されることを示している。

[0051] 以上の結果から、コレステリドは肝臓におけるFXRの活性抑制を引き起こし、肝糖新生を抑制することが示された。

[0052] 実施例2

試験方法

KKAyマウス(雄性、日本クレア、5週齢、N=6)を使用した。FXRアゴニストであるGW-4064(J. Med. Chem. 2000 vol.43 (16) p2971-2974)を10mg/kgの用量で4日間経口投与した。5日目にマウスを解剖し肝臓を摘出した。肝臓におけるcyp7 α 、SHPおよびPEPCKの遺伝子発現量を定量PCR法にて測定した。なお、リアルタイム定量PCR

反応に供したプライマー配列は実施例1に示したものと同様である。

[0053] 結果

(1) 肝臓におけるcyp7 α とSHPの遺伝子発現

図6に結果を示す。GW-4064群ではコントロール群に比べて、cyp7 α の遺伝子発現量を減少させ(図6-1)、SHPの遺伝子発現量を増加させた(図6-2)。この結果はFXRアゴニストであるGW-4064が肝臓においてFXRの活性上昇を介した胆汁酸合成の負の制御を行っていることを示している。

(2) 肝臓における糖新生酵素の遺伝子発現

図7に結果を示す。GW-4064群ではコントロール群と比較してPEPCKの遺伝子発現量を増加させた。この結果は、FXRアゴニストであるGW-4064が肝臓において糖新生反応を亢進させたことを示している。

[0054] 以上の結果から、FXRのアゴニストであるGW-4064は肝臓におけるFXRの活性上昇を引き起こし、肝糖新生を亢進させることが示された。

[0055] 実施例3

試験方法

C57BL6マウス(雄性、Charles River Laboratories France社 (l'Arbresle, France)、5週齢、N=4-5)を使用した。guggulipidは、高脂血症薬として汎用されている薬剤であり、本発明においてはSyntrax Innovations社から販売されているものを使用した。

[0056] コントロール群(HFD-cont)には高脂肪食(35.9%fat、UAR社 (Villemoison sur Orge, France))、guggulipid群(HFD-guggulipid)には2.5%のguggulipidを含有した高脂肪食、コレステミド群(HDF-コレステミド)には2%のコレステミドを含有した高脂肪食を与えた。

[0057] 投与8週目にインスリン負荷試験を通常の方法に従って実施した。インスリン負荷前の採血を実施した後、インスリンを腹腔内投与し、30、60、90分後の血糖値を測定した。

[0058] 投与9週目に経口糖負荷試験を通常の方法に従って実施した。グルコース負荷前の採血を実施した後、グルコース溶液を経口投与し、30、60、90、120分後の血糖値を測定した。

[0059] 投与12週目に基礎代謝測定装置(Oxymax、Columbus Instruments社)にて酸素消費量を測定した。

[0060] 投与13週目にマウスより肝臓、副腎丸周囲白色脂肪組織、褐色脂肪組織を摘出し、重量を測定した。また、肝臓における胆汁酸合成酵素のcyp7 α 、抑制性核内受容体SHPの遺伝子発現量、褐色脂肪組織における3つの熱産生関連タンパク(1.PPAR gamma coactivator 1a (PGC-1a)、2.uncoupler protein 1(UCP-1)、3.deiodinase 2 (Dio2))の遺伝子発現量をリアルタイム定量PCR法にて測定した。

[0061] リアルタイム定量PCR反応に供したプライマー配列は、Cyp7 α に対しては配列表の配列番号1および2、SHPに対しては配列表の配列番号3および4、PGC-1aに対しては配列表の配列番号9および10、UCP-1に対しては配列表の配列番号11および12、Dio2に対しては配列表の配列番号13および14をそれぞれ用いた。

[0062] 結果

(1) 体重

図8にコントロール群(●)、guggulipid群(■)、およびコレステリド群(▲)の体重変化を示す。図8に示すとおり、guggulipid群、コレステリド群の体重はコントロール群の体重と比較して低値を示した。

(2) 臓器重量

図9に結果を示す。guggulipid群、コレステリド群ではコントロール群と比較して副腎丸周囲脂肪組織の重量(図9-1)、褐色脂肪組織の重量(図9-2)が低下し、コレステリド群では肝臓の重量(図9-3)も低下した。

(3) インスリン負荷試験

図10にコントロール群(●)、guggulipid群(■)、およびコレステリド群(▲)のインスリン負荷後の血漿中グルコース濃度(mg/ml)の推移を示す。図10に示すとおり、guggulipid群、コレステリド群ではコントロール群と比較してインスリン負荷後の血糖値が低下した。

(4) 糖負荷試験

図11にコントロール群(●)、guggulipid群(■)、およびコレステリド群(▲)の糖負荷後の血漿中グルコース濃度(mg/ml)の推移を示す。図11に示すとおり、guggulipid群

、コレステリド群ではコントロール群と比較してグルコース負荷後の血糖値が速やかに低下した。

(5) 酸素消費量

図12に結果を示す。guggulipid群、コレステリド群ではコントロール群と比較して単位体重あたりの酸素消費量が増加していた。

[0063] この結果は、guggulipid、コレステリドにより基礎代謝が増加していることを示している。

(6) 肝臓におけるcyp7 α とSHPの遺伝子発現

図13に結果を示す。guggulipid群、コレステリド群ではコントロール群と比較してcyp7 α の遺伝子発現量が顕著に増加し、SHPの遺伝子発現量が約50%減少していた。

[0064] この結果は、guggulipid、コレステリドにより肝臓におけるFXR活性が抑制され、胆汁酸合成の負の制御が解除されていることを示している。

(7) 褐色脂肪組織におけるPGC-1 α 、UCP-1、Dio2の遺伝子発現

図14に結果を示す。guggulipid群、コレステリド群ではコントロール群と比較してのいずれも遺伝子発現量が増加していた。

[0065] この結果は、guggulipid、コレステリドにより褐色脂肪組織における熱産生反応が増加していることを示している。

[0066] 以上の結果から、コレステリドは肝臓におけるFXRの活性抑制を引き起こし、エネルギー代謝を亢進することが明らかになった。

実施例4

試験方法

KKAyマウス(雄性、日本クレア、N=8)を使用した。コントロール群には高脂肪食(23.6% fat)、コレステリド群にはコレステリドを2%含有した高脂肪食を与えた。投与4週目に、糖負荷試験を通常の方法に従って実施した。マウスを一晩絶食させ、グルコース負荷前の採血を実施した後、グルコース溶液を1g/kg体重の割合で経口投与し、30、60、90、120分後の血糖値を測定した。投与6週目にマウスを解剖し肝臓を摘出した。肝臓におけるcyp7 α 、SHPの遺伝子発現量を定量PCR法にて測定した。なお、リアルタイム定量PCR反応に供したプライマー配列は実施例1に示したものと同様であ

る。

[0067] 結果

(1)糖負荷試験

図15にコントロール群(●)、およびコレステリド群(▲)の糖負荷後の血漿中グルコース濃度(mg/ml)の推移を示す。

[0068] 図15に示すとおり、コレステリド群ではコントロール群と比較してグルコース負荷後の血糖値が速やかに低下した。

(2)肝臓におけるcyp7 α とSHPの遺伝子発現

図16に結果を示す。コレステリド群ではコントロール群と比較してcyp7 α の遺伝子発現量が約5.5倍増加し、SHPの遺伝子発現量が約60%減少していた。

[0069] この結果は、コレステリドにより肝臓におけるFXR活性が抑制され、胆汁酸合成の負の制御が解除されていることを示している。

実施例5

試験方法

KKAyマウス(雄性、日本クレア、N=8)を使用した。コントロール群には高脂肪食(23.6% fat)、塩酸コレセベラム群には塩酸コレセベラムを2%含有した高脂肪食を与えた。投与4週目に、糖負荷試験を通常の方法に従って実施した。マウスを一晩絶食させ、グルコース負荷前の採血を実施した後、グルコース溶液を1g/kg体重の割合で経口投与し、30、60、90、120分後の血糖値を測定した。投与6週目にマウスを解剖し肝臓を摘出した。肝臓におけるcyp7 α 、SHPの遺伝子発現量を定量PCR法にて測定した。なお、リアルタイム定量PCR反応に供したプライマー配列は実施例1に示したものと同様である。

[0070] 結果

(1)糖負荷試験

図17にコントロール群(●)、および塩酸コレセベラム群(▲)の糖負荷後の血漿中グルコース濃度(mg/ml)の推移を示す。

[0071] 図17に示すとおり、塩酸コレセベラム群ではコントロール群と比較してグルコース負荷後の血糖値が速やかに低下した。

(2) 肝臓におけるcyp7 α とSHPの遺伝子発現

図18に結果を示す。塩酸コレセベラム群ではコントロール群と比較してcyp7 α の遺伝子発現量が約5.4倍増加し、SHPの遺伝子発現量が約20%減少していた。

[0072] この結果は、塩酸コレセベラムにより肝臓におけるFXR活性が抑制され、胆汁酸合成の負の制御が解除されていることを示している。

実施例6

試験方法

KKAyマウス(雄性、日本クレア、N=8)を使用した。コントロール群には高脂肪食(23.6% fat)、塩酸セベラマー群には塩酸セベラマーを2%含有した高脂肪食を与えた。投与4週目に、糖負荷試験を通常の方法に従って実施した。マウスを一晩絶食させ、グルコース負荷前の採血を実施した後、グルコース溶液を1g/kg体重の割合で経口投与し、30、60、90、120分後の血糖値を測定した。投与6週目にマウスを解剖し肝臓を摘出した。肝臓におけるcyp7 α 、SHPの遺伝子発現量を定量PCR法にて測定した。なお、リアルタイム定量PCR反応に供したプライマー配列は実施例1に示したものと同様である。

[0073] 結果

(1) 糖負荷試験

図19にコントロール群(●)、および塩酸セベラマー群(▲)の糖負荷後の血漿中グルコース濃度(mg/ml)の推移を示す。

[0074] 図19に示すとおり、塩酸セベラマー群ではコントロール群と比較してグルコース負荷後の血糖値が速やかに低下した。

(2) 肝臓におけるcyp7 α とSHPの遺伝子発現

図20に結果を示す。塩酸セベラマー群ではコントロール群と比較してcyp7 α の遺伝子発現量が約5.9倍増加し、SHPの遺伝子発現量が約60%減少していた。

[0075] この結果は、塩酸セベラマーにより肝臓におけるFXR活性が抑制され、胆汁酸合成の負の制御が解除されていることを示している。

産業上の利用可能性

[0076] 本発明によれば、新規な糖尿病予防および/または治療剤を提供することができ

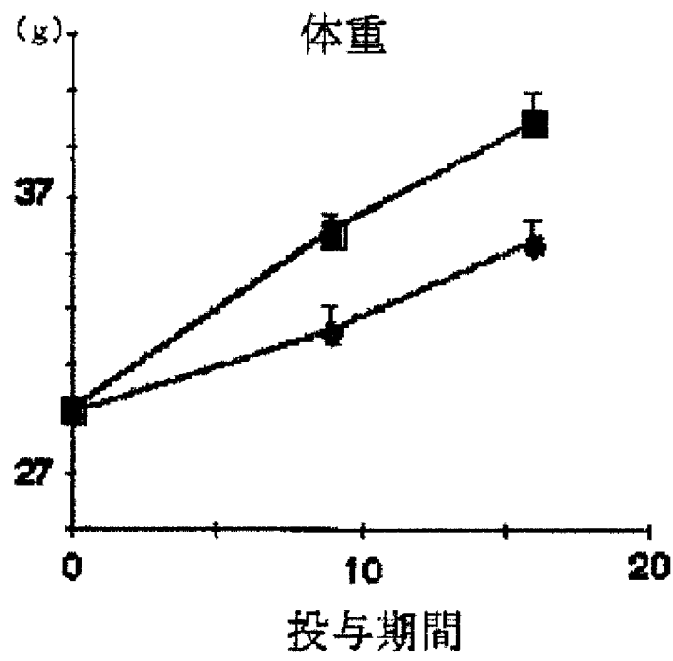
る。

[0077] なお、本出願は、日本特許出願 特願2004-301027号及び特願2005-152124を優先権主張して出願されたものである。

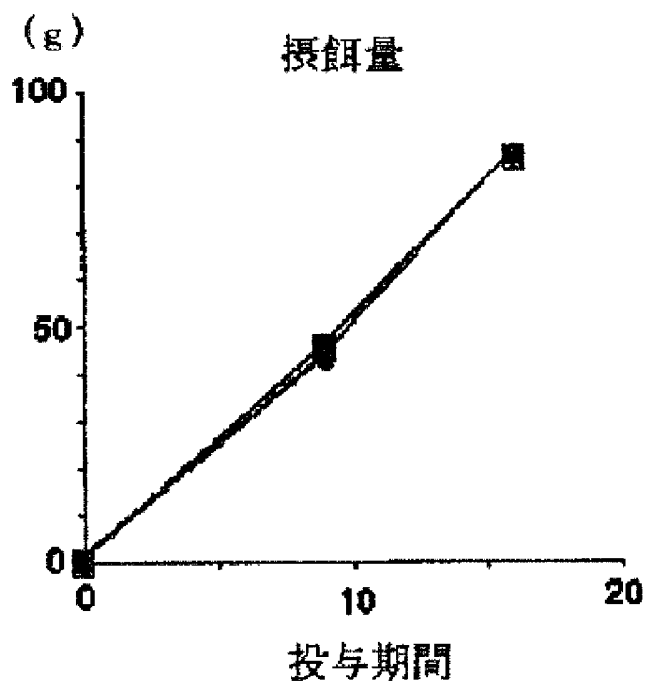
請求の範囲

- [1] farnesoid X receptorの活性を抑制する物質を有効成分とする、肝糖新生を抑制する糖尿病の予防および／または治療薬。
- [2] farnesoid X receptorの活性を抑制する物質を有効成分とする、エネルギー代謝を亢進する糖尿病の予防および／または治療薬。
- [3] エネルギー代謝の亢進が、基礎代謝の増加である請求項2に記載の糖尿病の予防および／または治療薬。
- [4] エネルギー代謝の亢進が、熱産生の増加である請求項2に記載の糖尿病の予防および／または治療薬。
- [5] コレステロール7 α 水酸化酵素の遺伝子発現量を上昇させる請求項1または2に記載の糖尿病の予防および／または治療薬。
- [6] small heterodimer partnerの遺伝子発現量を抑制させる請求項1または2に記載の糖尿病の予防および／または治療薬。
- [7] farnesoid X receptorの活性を抑制する物質が、薬学的に許容される陰イオン交換樹脂またはfarnesoid X receptorのアンタゴニストである請求項1から6に記載の糖尿病の予防および／または治療薬。
- [8] 薬学的に許容しうる陰イオン交換樹脂が、胆汁酸吸着能を有するものである請求項7に記載の糖尿病の予防および／または治療薬。
- [9] 薬学的に許容し得る陰イオン交換樹脂が、コレスチミド、コレスチラミンレジン、コレスチポール、塩酸セベラメル及び塩酸コレセベラムから選ばれるものである請求項7または8に記載の糖尿病の予防および／または治療薬。
- [10] 薬学的に許容し得る陰イオン交換樹脂が、エピクロロヒドリン誘導体とイミダゾール誘導体に代表されるアミン類の重合反応にて合成される陰イオン交換樹脂である請求項7または8に記載の糖尿病の予防および／または治療薬。
- [11] 薬学的に許容し得る陰イオン交換樹脂が、コレスチミドである請求項7から10のいずれかに記載の糖尿病の予防および／または治療薬。

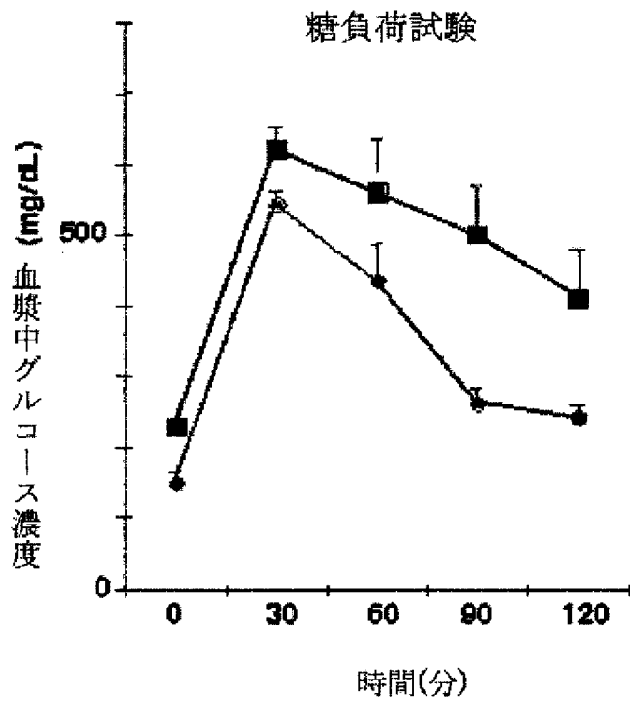
[図1]



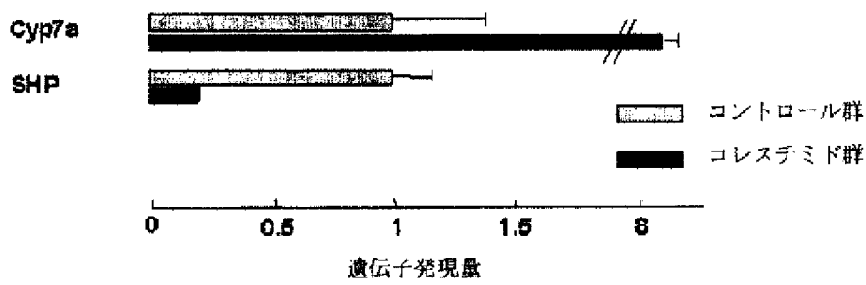
[図2]



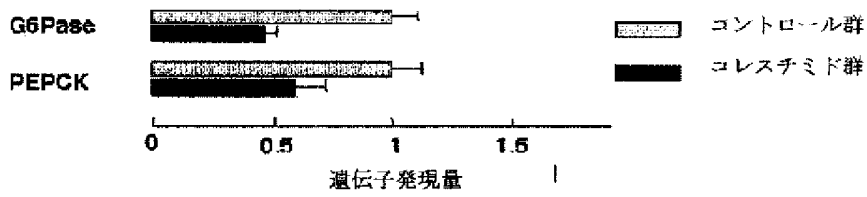
[図3]



[図4]



[図5]



[図6]

図6-1

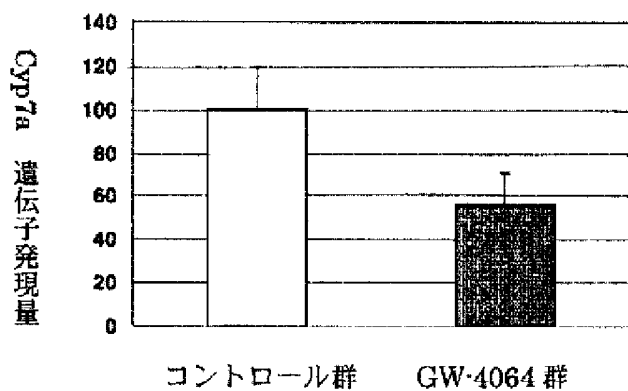
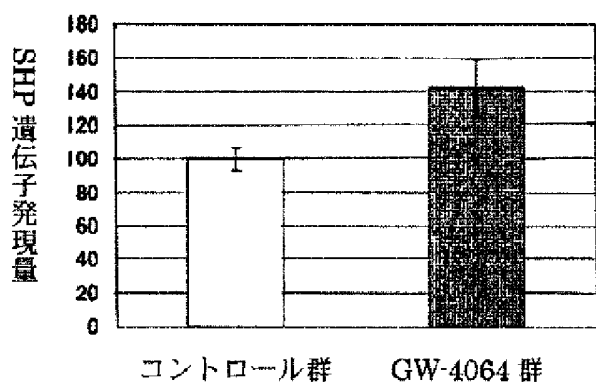
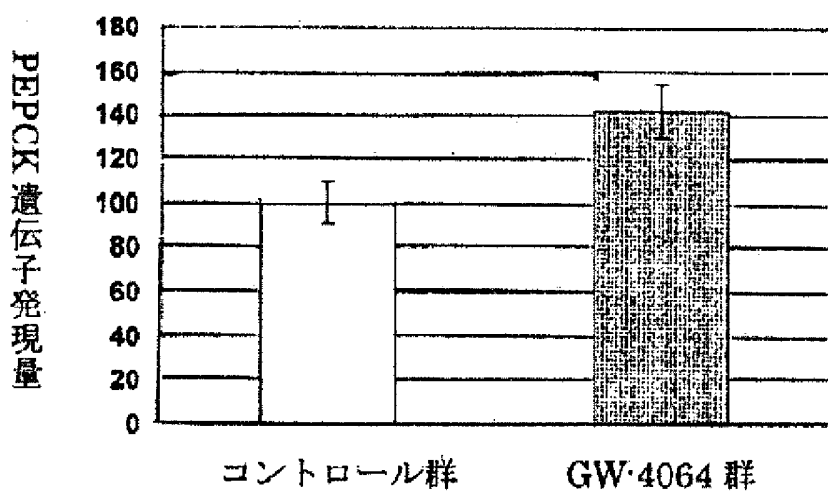


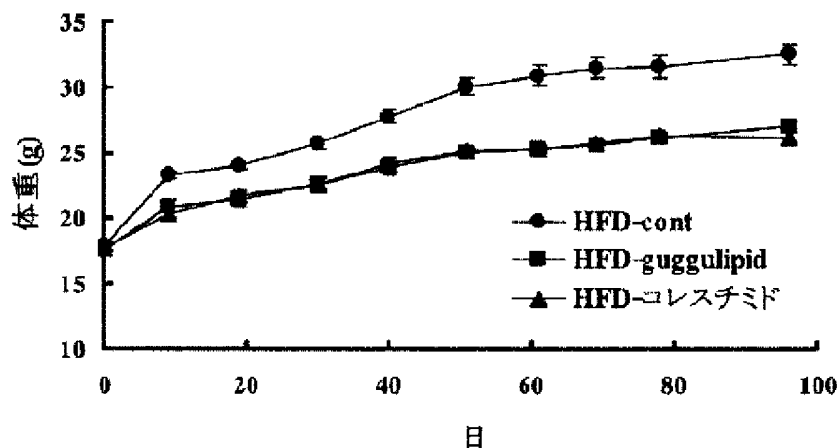
図6-2



[図7]



[図8]



[図9]

図 9-1

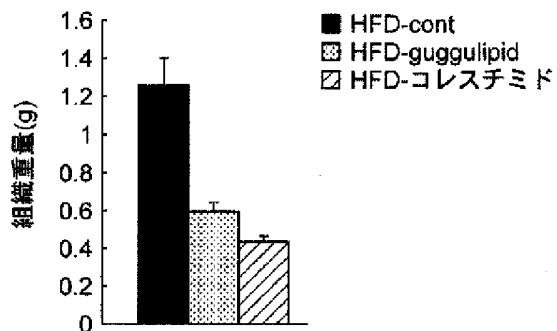


図 9-2

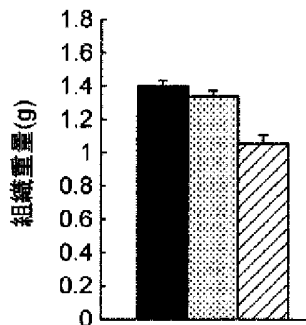
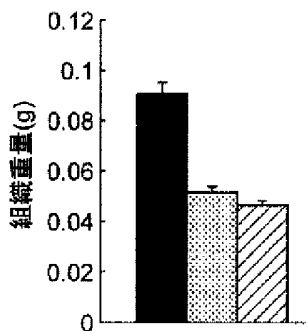
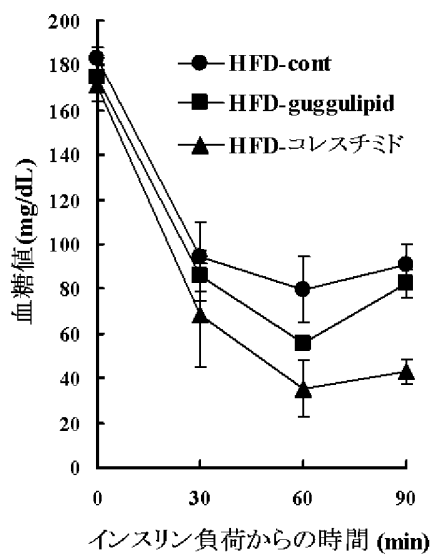


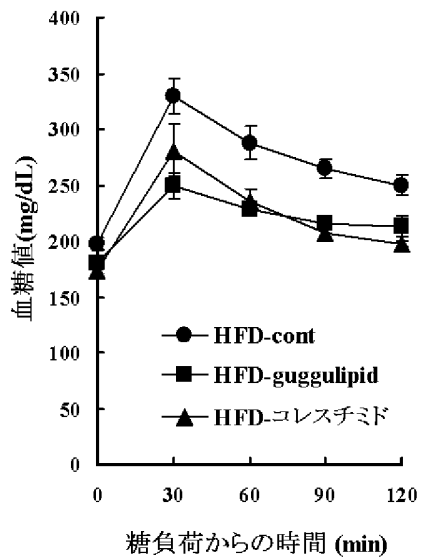
図 9-3



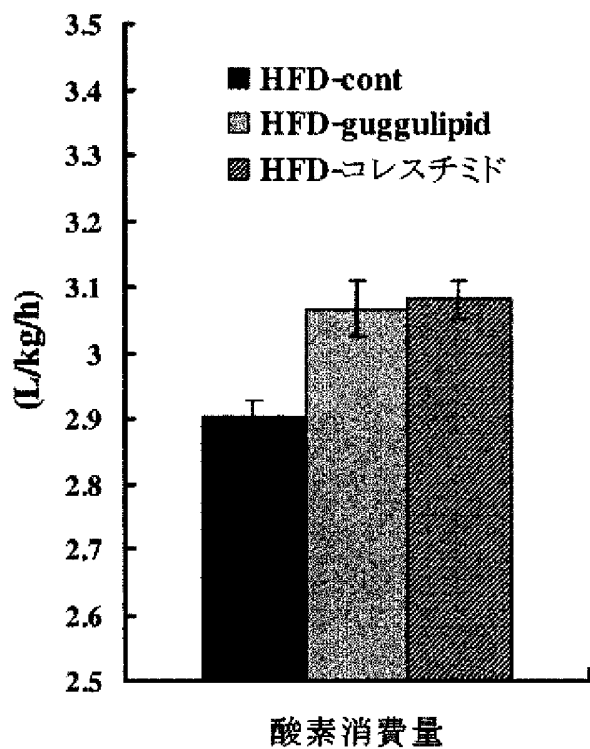
[図10]



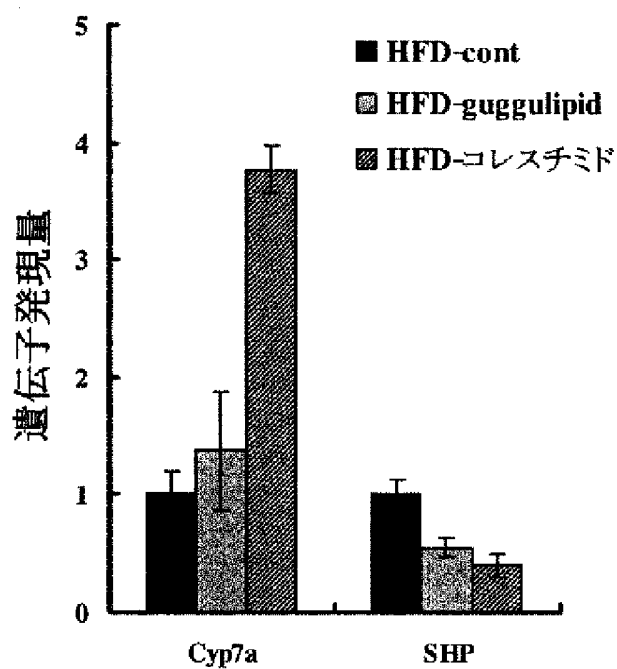
[図11]



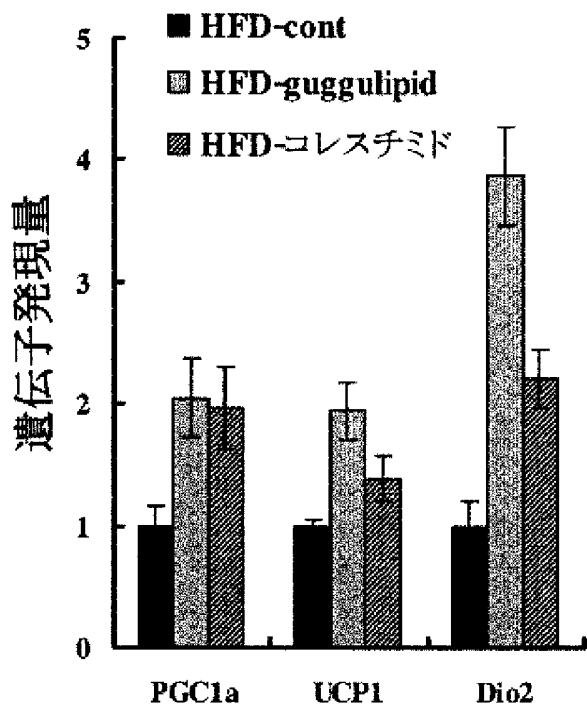
[図12]



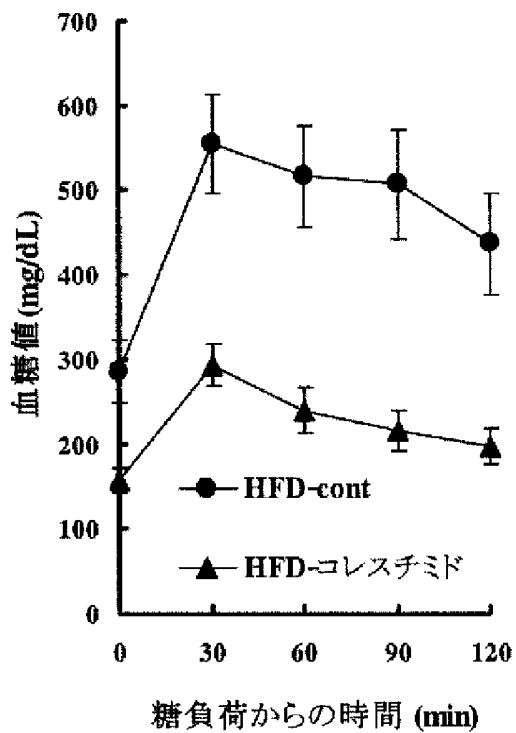
[図13]



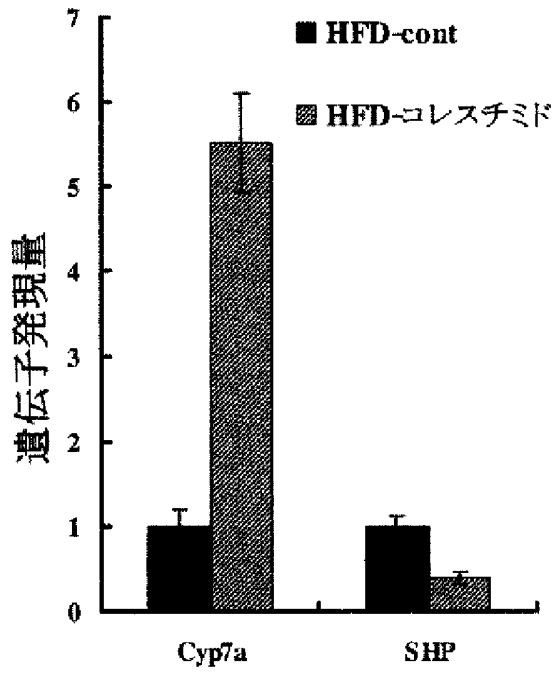
[図14]



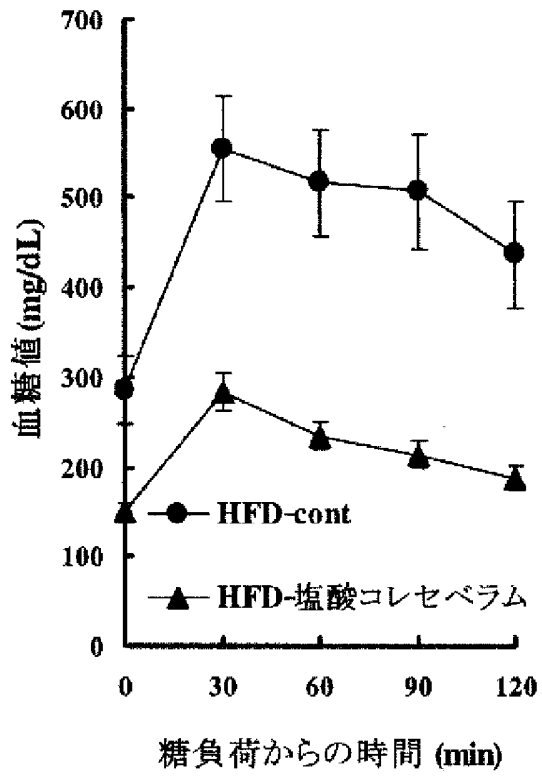
[図15]



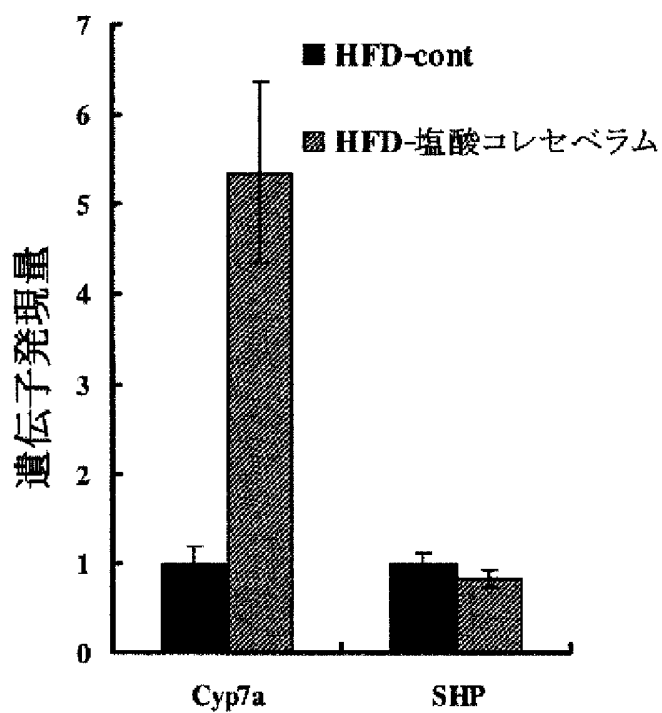
[図16]



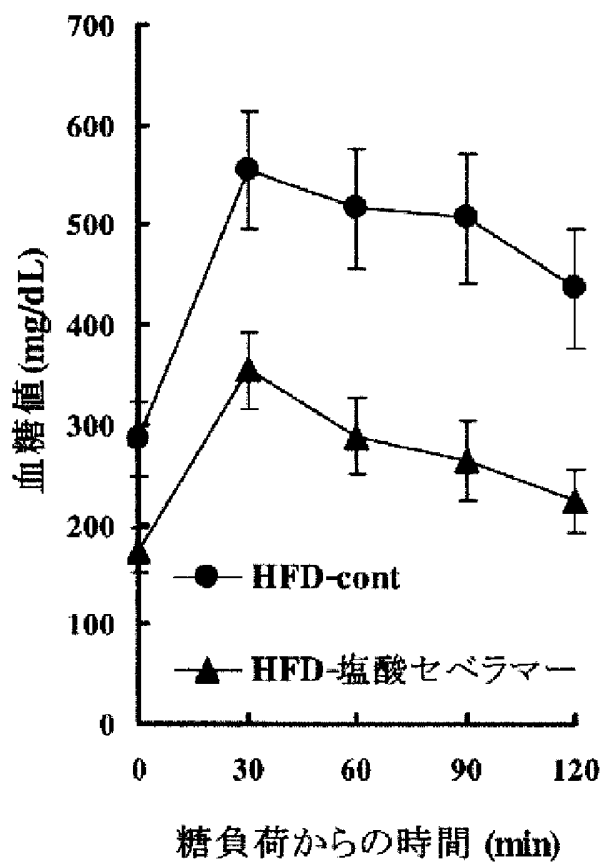
[図17]



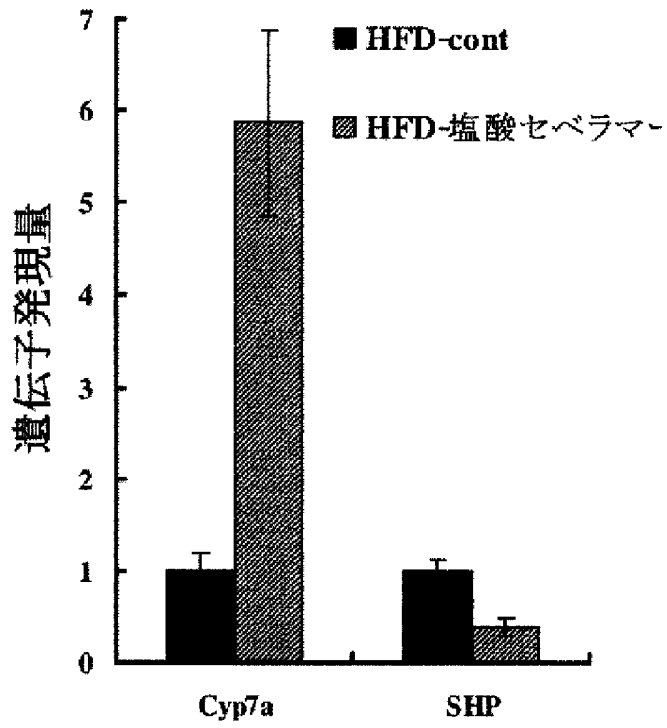
[図18]



[図19]



[図20]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/018927

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K45/00 (2006.01), A61K31/785 (2006.01), A61K31/787 (2006.01), A61P3/10 (2006.01) 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) A61K45/00 (2006.01), A61K31/785 (2006.01), A61K31/787 (2006.01), A61P3/10 (2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS (STN), CAPlus (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN), JMEDPlus (JOIS), JSTPlus (JOIS)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/11308 A1 (Mitsubishi Pharma Corp.), 13 February, 2003 (13.02.03), Claims 1 to 23 & EP 1413309 A1 & US 2004/191209 A1	1-11
X	WO 02/20463 A2 (TULARIK INC.), 14 March, 2002 (14.03.02), Claims 1 to 35, page 7, lines 20 to 26; page 2, line 31 to page 3, line 3 & US 2002/120137 A1	1-7
A	JP 2003-508529 A (Glaxo Group Ltd.), 04 March, 2003 (04.03.03), Full text & WO 01/17994 A1	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 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 09 November, 2005 (09.11.05)		Date of mailing of the international search report 22 November, 2005 (22.11.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/018927

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 03/80803 A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORP.), 02 October, 2003 (02.10.03), Full text & US 2005/107475 A1	1-11
A	WO 02/64125 A2 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS COM., LIM.), 22 August, 2002 (22.08.02), Full text & US 2002/119958 A1	1-11
A	GOODWIN Bryan, A Regulatory Cascade of the Nuclear Receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 Represses Bile Acid Biosynthesis, Molecular Cell, 2000, Vol.6, 517-526	1-11
A	DURAN-SANDOVAL Daniel, Glucose Regulates the Expression of the Farnesoid X Receptor in Liver, DIABETES, 2004, Vol.53, No.4, pages 890 to 898	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/018927

<Subject of search>

Claims 1-7 relate to a preventive and/or therapeutic agent for diabetes, comprising as an active ingredient a compound defined by the desired property "substance capable of inhibiting the activity of farnesoid X receptor" and "antagonist against farnesoid X receptor". Although the claims 1-7 encompass all compounds with the above property, only some of the claimed compounds are disclosed within the meaning of PCT Article 5. Consequently, it appears that the support by the disclosure in description within the meaning of PCT Article 6 is lacking.

Further, with respect to the "substance capable of inhibiting the activity of farnesoid X receptor" and "antagonist against farnesoid X receptor", the scope of compounds having such a property cannot be specified even if the technical common knowledge at the time of filing of this application is taken into account. Consequently, the claims 1-7 also fail to satisfy the requirement of clarity within the meaning of PCT Article 6.

Therefore, search has been restricted to the relationship between "farnesoid X receptor" and diabetes and to rational scope based on the description made in the Examples. Complete search has been carried out on claims 8-11.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl.⁷ **A61K45/00** (2006.01), **A61K31/785** (2006.01), **A61K31/787** (2006.01), **A61P3/10** (2006.01)

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl.⁷ **A61K45/00** (2006.01), **A61K31/785** (2006.01), **A61K31/787** (2006.01), **A61P3/10** (2006.01)

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 BIOSIS(STN), CAplus(STN), EMBASE(STN), MEDLINE(STN), JMEDPlus(JOIS), JSTPlus(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 03/11308 A1 (三菱ウェルファーマ株式会社) 2003.02.13, 請求項1-23 & EP 1413309 A1 & US 2004/191209 A1	1-11
X	WO 02/20463 A2 (TULARIK INC.) 2002.03.14, 請求項1-35、第7頁第20~26行、第2頁第31行~第3頁第3行 & US 2002/120137 A1	1-7
A	JP 2003-508529 A (グラクソ グループ ミリテッド) 2003.03.04, 全文 & WO 01/17994 A1	1-11

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 09.11.2005	国際調査報告の発送日 22.11.2005
--------------------------	--------------------------

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 榎本 佳子 電話番号 03-3581-1101 内線 3452	4C	3229
--	--	----	------

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 03/80803 A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION) 2003. 10. 02, 全文 & US 2005/107475 A1	1-11
A	WO 02/64125 A2 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY, LIMITED) 2002. 08. 22, 全文 & US 2002/119958 A1	1-11
A	GOODWIN Bryan, A Regulatory Cascade of the Nuclear Receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 Represses Bile Acid Biosynthesis, Molecular Cell, 2000, Vol. 6, 517-526	1-11
A	DURAN-SANDOVAL Daniel, Glucose Regulates the Expression of the Farnesoid X Receptor in Liver, DIABETES, 2004, Vol. 53, No. 4, Pages 890-898	1-11

<調査の対象について>

請求の範囲1-7は、「farnesoid X receptor の活性を抑制する物質」及び「farnesoid X receptor のアンタゴニスト」という所望の性質により定義された化合物を有効成分とする糖尿病の予防及び/又は治療薬に関するものである。そして、請求の範囲1-7は、そのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT第5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分にすぎず、PCT第6条の意味での明細書の開示による裏付けを欠くものと認められる。

また、「farnesoid X receptor の活性を抑制する物質」及び「farnesoid X receptor のアンタゴニスト」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求の範囲1-7は、PCT第6条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は、「farnesoid X receptor」と糖尿病との関係について、及び、実施例の記載に基づいた合理的な範囲について行った。また、請求の範囲8-11については、完全な調査を行った。