

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6680759号  
(P6680759)

(45) 発行日 令和2年4月15日(2020.4.15)

(24) 登録日 令和2年3月24日(2020.3.24)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 31/357 (2006.01)	A 6 1 K 31/357 Z N A
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10
A 6 1 P 5/50 (2006.01)	A 6 1 P 5/50
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 38/22 (2006.01)	A 6 1 K 38/22

請求項の数 10 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-504266 (P2017-504266)  
 (86) (22) 出願日 平成27年4月9日(2015.4.9)  
 (65) 公表番号 特表2017-513936 (P2017-513936A)  
 (43) 公表日 平成29年6月1日(2017.6.1)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/057755  
 (87) 国際公開番号 W02015/155303  
 (87) 国際公開日 平成27年10月15日(2015.10.15)  
 審査請求日 平成30年4月9日(2018.4.9)  
 (31) 優先権主張番号 14164471.6  
 (32) 優先日 平成26年4月11日(2014.4.11)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 516302823  
 ツェーエーエムエム・フォルシュングスツ  
 エントルム・フュア・モレクラーレ・メデ  
 イツィン・ゲーエムペーハー  
 オーストリア・A-1090・ウィーン・  
 ラツァレートガッセ・14/アーカーハー  
 ・ペーテ・25.3  
 (74) 代理人 100108453  
 弁理士 村山 靖彦  
 (74) 代理人 100110364  
 弁理士 実広 信哉  
 (74) 代理人 100133400  
 弁理士 阿部 達彦

最終頁に続く

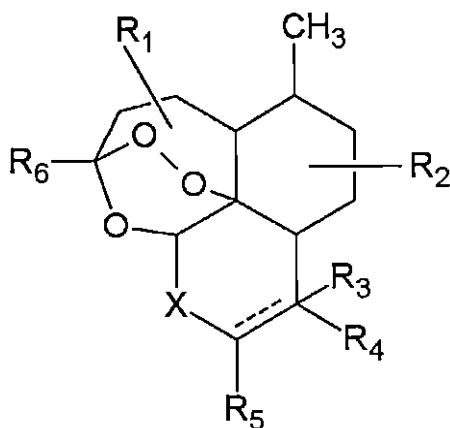
(54) 【発明の名称】 アルテミシニン化合物及びゲフィリンアゴニストの医学的使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

インスリンレベルを増加させるための糖尿病患者の処置に使用するためのアルテミシニン化合物を含む医薬組成物であって、前記アルテミシニン化合物が一般式I

【化1】



(I)

[式中、  
【化2】

=====

は、単結合又は二重結合であり、

$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 及び $R_6$ は、互いに独立して、H、ハロゲン、 $-CF_3$ 、 $=CH_2$ 、 $-OR^a$ 、 $-NR^aR^b$ 、 $-(CH_2)_nCOOR^a$ 、 $-(CH_2)_nC(=O)R^a$ 、 $-(CH_2)_nCONR^aR^a$ 、 $C_{1-6}$ アルキル、 $C_{2-6}$ アルケニル、 $C_{2-6}$ アルキニル、 $C_{3-7}$ シクロアルキル、 $C_{3-7}$ ヘテロシクロアルキル、アリーール又はヘテロアリーールを表し、並びに、

$R_5$ は、H、ハロゲン、 $=O$ 、 $-OR^a$ 、 $-NR^aR^b$ 、 $-(CH_2)_nCF_3$ 、 $-(CH_2)_nCHF_2$ 、 $-(CH_2)_nC(=O)R^a$ 、 $-O(CH_2)_nCOOR^a$ 、 $-OC(=O)(CH_2)_nCOOR^a$ 、 $-OC(=O)R^a$ 、 $C_{1-6}$ アルキル、 $C_{2-6}$ アルケニル、 $C_{2-6}$ アルキニル、 $C_{3-7}$ シクロアルキル、 $C_{3-7}$ ヘテロシクロアルキル、アリーール又はヘテロアリーールを表し、並びに、

Xは、O又は $-NR^a$ を表し、

$R^a$ は、H又は場合により置換されている $C_{1-6}$ アルキル、 $C_{2-6}$ アルケニル若しくは $C_{2-6}$ アルキニルを表し、並びに、

$R^b$ は、H又は場合により置換されている $C_{1-6}$ アルキル、 $C_{2-6}$ アルケニル、 $C_{2-6}$ アルキニル、シクロアルキル、アリーール、ヘテロアリーール若しくはアラルキルを表すか、或いは

$R^a$ 及び $R^b$ は、介在する窒素原子と一緒に複素環基を表し、複素環原子は、N、O又はSであって、及び、前記複素環原子は場合により置換されており(アルテミソン)、並びに、

nは、0、1、2又は3である]

の化合物又はその医薬的に許容される塩であり、

ただし、前記アルテミシニン化合物は、アルテミシニンではない、  
医薬組成物。

【請求項2】

患者が、1型糖尿病、2型糖尿病、C-ペプチド陰性若しくはC-ペプチド陽性糖尿病、又は糖尿病関連障害に罹患している、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

低インスリン血症を処置するための治療有効量の前記化合物を含み、及び、好ましくは全身又は局所投与用である、請求項1又は2に記載の医薬組成物。

【請求項4】

前記化合物が、アルテリン酸、アルテメテル、アルテモチル、アルテニモル、アルテミソン及びアルテスネートからなる群から選択される化合物、又はその医薬的に許容される塩である、請求項1から3のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項5】

前記化合物が、リガンド又は担体部分と結合している、請求項1から4のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項6】

前記医薬組成物が、経口、非経口、全身、粘膜、局所、直腸、舌下、頬側又は埋め込み用であり、及び、医薬的に許容される担体を含み、好ましくは、前記医薬組成物が、錠剤、皮膚若しくは経皮製剤、軟膏、ゲル、クリーム、ローション、パッチ、溶液、注射剤、点眼液、分散系、エマルジョン、マイクロカプセル化薬物システム、浸透圧ポンプ、皮下インプラント、顆粒、マイクロスフェア、放出調節システム、標的指向型放出システム、顆粒又はビルである、請求項1から5のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項7】

前記医薬組成物が、少なくとも1日1回の用量で、好ましくは、0.01~2000mg/日の前記

化合物、好ましくは0.1～500mg/日の前記化合物の用量で、単回投与若しくは複数回の投与で投与されるためのものであり、又は前記用量が、持続放出製剤若しくはデバイスで提供される、請求項1から6のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項8】

処置が、別の抗糖尿病治療、好ましくは、抗糖尿病薬、好ましくはインスリン、スルホニル尿素、インクレチン、他の分泌促進物質、グリタゾン、メトホルミン、GLP-1アゴニスト若しくはDPP4阻害剤、グルコシダーゼ阻害剤、アミリン類似体、SGLT2阻害剤、胃バイパス手術又は膵島移植のいずれかによる処置と併用される、請求項1から7のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項9】

別のゲフィリンアゴニスト又はBTBD9阻害剤と併用で投与するためのものである、請求項1から8のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項10】

インスリンレベルを増加させるために糖尿病患者を処置するための組合せ医薬調製物であって、

a) 請求項1において定義された一般式Iのアルテミシニン化合物又はその医薬的に許容される塩と、

b) 別のBTBD9阻害剤又はゲフィリンアゴニストとを含み、

別のBTBD9阻害剤又はゲフィリンアゴニストが、

i) BTBD9のCUL3との結合を阻害する、及び/又は

ii) ゲフィリンのレベル若しくはクラスター形成を増加させる、及び/又は

iii) ゲフィリンの  $\gamma$ -アミノ酪酸受容体(GABAR)との結合を増加、強化、刺激若しくは促進する、及び/又は

iv) GABARのゲフィリン媒介シグナル伝達を増加させる

薬剤である、組合せ医薬調製物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、糖尿病患者の処置に使用するためのアルテミシニン化合物、及び更にゲフィリンアゴニスト剤の医学的使用に関する。

【背景技術】

【0002】

1型糖尿病患者は、血清のインスリンC-ペプチドの完全欠如によって示されるように、全ての機能性  $\beta$  細胞を失っていることが多い。膵島移植は、本質的に根治的であることが証明されているが、ドナー膵島の入手可能性、免疫学的合併症及び移植片生着によって制限される。それ故、胚性幹細胞(ES)、誘導多能性幹細胞(iPS)、肝、外分泌及び  $\beta$  細胞をはじめとする様々な組織源を使用して患者特異的なインスリン産生細胞を再生する試みが行われてきた(Al-Hasaniら、2013; Collombatら、2009; Zhouら、2008)。殆どの場合、細胞量を増加させるためのアプローチは、正常な膵臓発生に関与する主要転写調節因子の過剰発現に依存しており、ほんの少数の例で、小分子又は生物製剤が使用されている。細胞は、発達上  $\beta$  細胞と近縁であるので、特に魅力的な出発点である。これらの細胞は、極度な  $\beta$  細胞喪失後にインスリン産生細胞量を補充できることが証明されている。遺伝モデルにおいて、転写因子Pax4の過剰発現は、発生中(Collombatら、2009)、及び成人期に誘発されたとき(Al-Hasaniら、2013)、マウス  $\beta$  細胞を  $\beta$  細胞に変換することができる。分子的には、 $\beta$  細胞因子Pax4は、 $\beta$  細胞主要転写調節因子Arxを直接抑制することによって作用し、Arxを失うだけで、十分、 $\beta$  細胞は  $\beta$  細胞に変換される(Courtneyら、2013)。

【0003】

一部の抗糖尿病処置では、植物抽出物を使用する。800種より多くの植物が、合成化合物と比較して少ない有害作用及び低い毒性で抗高血糖効果を有すると報告されている。例

10

20

30

40

50

えば、ヨモギ(*Artemisia indica*)の地上部の抽出は、例えば、Ahmadら(2014)によって記載されている。そのような抽出物の主要機能は、腎臓、肝臓及び膵臓等の主要組織の保護効果に基づくことが分かっている。

【 0 0 0 4 】

アルテミシニン、クソニンジン(*Artemisia annua*)の葉から抽出及び単離されるセスキテルペンラクトンエンドペルオキシドであり、抗マラリア薬として周知である。アルテミシニン及びその誘導体は、クソニンジン(*Artemisia annua* L.)についての適正農業採集規範(GACP)に関するWHOモノグラフ(WHO monograph 2006)に記載されている。

【 0 0 0 5 】

全く異なる分野、すなわち、イオンチャネル型受容体及びリガンドゲート型イオンチャネルであるGABA受容体(すなわち、 $\gamma$ -アミノ酪酸の受容体、本明細書ではGABARと呼ぶ)、並びに $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)であるその内因性リガンドの分野では、CNS機能を理解するために、GABA作動性シナプス形成及び可塑性の機序、並びに成体神経新生の調節におけるGABA受容体の役割が研究されている(Tyagarajanら、2010)。ゲフィリンは、阻害性シナプスの足場分子と考えられており、GABARクラスター形成に寄与すると考えられている。BTBドメインタンパク質は、カリンファミリーユビキチンリガーゼと相互作用することが公知であり、ユビキチン化及びその後の分解のための特異的基質タンパク質に対する標的指向化に参与する。(Stogiosら、Genome biology 2005、Genauら、Mol. Cell 2015)。GABA受容体がユビキチン化されることも公知である(Arancibia-Carcamoら、PNAS 2009)。

【 0 0 0 6 】

WO 2012/033266 A1には、特異的糖脂質ハイブリッド誘導体である特異的アルテミシニン誘導体、それらの抗血管新生活性、並びに血管新生性疾患、中でも糖尿病に関連する血管新生性疾患の予防及び処置における使用が記載されている。

【 0 0 0 7 】

Davisら(Br. J. Clin. Pharmacol. 1997、44(1):1~7頁)は、血漿中グルコース及びインスリン濃度に対する抗マラリア薬の潜在的効果を記載している。

【 0 0 0 8 】

Sureshら(International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research 2011、3 081頁)は、ダバナとして一般に知られており、インドで見つけられる芳香ハーブであり、糖尿病の処置に使用されてきた、アルテミシア・パレンス、ウォールズ、*Artemisia pallens*, Walls. Ex DC)の植物化学的及び薬理学的特性を記載している。

【 0 0 0 9 】

Ahmadら(Journal of Ethnopharmacology 2014、151 (1): 618~623頁)は、ストレプトゾシン誘発糖尿病ラットにおけるアルテミシア・インディカ・リン(*Artemisia indica* Linn)(地上部)の抗糖尿病活性を記載している。

【 0 0 1 0 】

Ribnickyら(International Journal of Pharmaceutics 2009、370(1-2):87~92頁)は、タラゴン(*Artemisia dracunculoides*)の抗糖尿病性抽出物を記載している。

【 0 0 1 1 】

Mannanら(Archives of Pharmaceutical Research 2011、34(10):1657~1661頁)は、幾つかのヨモギ属(*Artemisia*)種におけるアルテミシニンの生合成を記載している。

【 0 0 1 2 】

WO 2014/048788 A1には、膵細胞集団におけるArxの発現又は活性を阻害することによる膵細胞の産生が記載されている。

【 0 0 1 3 】

Suckowら(Endocrinology 2008、149(12):6006~6017頁)は、膵細胞細胞外機構、及び細胞の発生経路を記載している。

【 0 0 1 4 】

WO 2014/007853 A1には、グルタミン酸作動性の系の疾患及び障害の処置のためのジヒドロミリセチンが記載されている。

10

20

30

40

50

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

【0015】

【特許文献1】WO 2012/033266 A1

【特許文献2】WO 2014/048788 A1

【特許文献3】WO 2014/007853 A1

## 【非特許文献】

【0016】

【非特許文献1】WHO monograph 2006

【非特許文献2】Stogiosら、Genome biology 2005

【非特許文献3】Genauら、Mol. Cell 2015

【非特許文献4】Arancibia-Carcamoら、PNAS 2009

【非特許文献5】Davisら、Br. J. Clin. Pharmacol. 1997、44(1):1~7頁

【非特許文献6】Sureshら、International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research 2011、3081頁

【非特許文献7】Ahmadら、Journal of Ethnopharmacology 2014、151 (1): 618~623頁

【非特許文献8】Ribnickyら、(International Journal of Pharmaceutics 2009、370(1-2):87~92頁

【非特許文献9】Mannanら、Archives of Pharmaceutical Research 2011、34(10):1657~1661頁

【非特許文献10】Suckowら、Endocrinology 2008、149(12):6006~6017頁

【非特許文献11】REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES

【非特許文献12】Martinez Molinaら、Science 2013

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

【0017】

本発明の目的は、膵臓細胞におけるインスリン産生を誘導又は強化する可能性がある、及び新規作用様式に基づいて薬物として使用される可能性がある、化合物を同定することである。

## 【課題を解決するための手段】

【0018】

目的は、本発明の主題によって解決される。

【0019】

本発明に従って、糖尿病患者の処置、例えば、インスリンレベルを増加させるための処置、特に、細胞の数、インスリン発現、又は患者のグルコース依存性血中インスリンレベルを増加させるための処置に使用するためのアルテミシニン化合物であって、一般式I

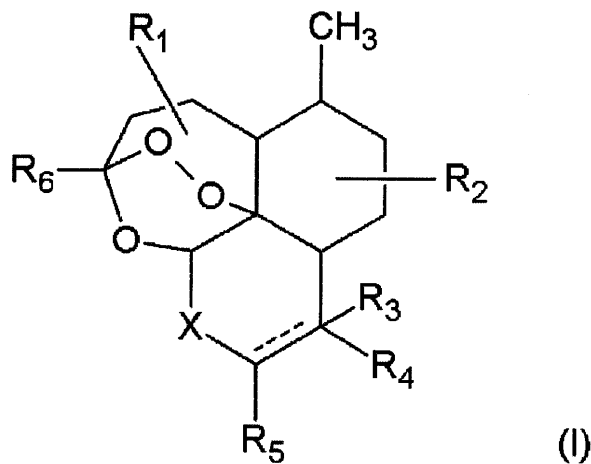
【0020】

10

20

30

## 【化1】



10

## 【0021】

[式中、

## 【0022】

【化2】

20

-----  
=====

## 【0023】

は、単結合又は二重結合であり、

$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 及び $R_6$ は、互いに独立して、H、ハロゲン、 $-CF_3$ 、 $=CH_2$ 、 $-OR^a$ 、 $-NR^aR^b$ 、 $-(CH_2)_nCOOR^a$ 、 $-(CH_2)_nC(=O)R^a$ 、 $-(CH_2)_nCONR^aR^a$ 、 $C_1-6$ アルキル、 $C_2-6$ アルケニル、 $C_2-6$ アルキニル、 $C_3-7$ シクロアルキル、 $C_3-7$ ヘテロシクロアルキル、アリール及びヘテロアリールを表し、

30

$R_5$ は、H、ハロゲン、 $=O$ 、 $-OR^a$ 、 $-NR^aR^b$ 、 $-(CH_2)_nCF_3$ 、 $-(CH_2)_nCHF_2$ 、 $-(CH_2)_nC(=O)R^a$ 、 $-O(CH_2)_nCOOR^a$ 、 $-OC(=O)(CH_2)_nCOOR^a$ 、 $-OC(=O)R^a$ 、 $C_1-6$ アルキル、 $C_2-6$ アルケニル、 $C_2-6$ アルキニル、 $C_3-7$ シクロアルキル、 $C_3-7$ ヘテロシクロアルキル、アリール及びヘテロアリールを表し、

$X$ は、O又は $-NR^a$ を表し、

$R^a$ は、H又は場合により置換されている $C_1-6$ アルキル、 $C_2-6$ アルケニル若しくは $C_2-6$ アルキニルを表し、及び

$R^b$ は、H又は場合により置換されている $C_1-6$ アルキル、 $C_2-6$ アルケニル、 $C_2-6$ アルキニル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール若しくはアラルキルを表すか、或いは

$R^a$ 及び $R^b$ は、介在する窒素原子と一緒に複素環基を表し、複素環原子は、N、O又はSであり、複素環原子は、場合により置換されており(アルテミソン)、

40

$n$ は、0、1、2又は3である]

である、アルテミシニン化合物を提供する。

## 【0024】

具体的には、アルテミシニン化合物は、糖脂質成分とのハイブリッドであるアルテミシニン誘導体ではない。

## 【0025】

アルテミシニン化合物は、糖尿病又は糖尿病関連障害、例えば、1型糖尿病、2型糖尿病、C-ペプチド陰性若しくは陽性糖尿病、又は糖尿病関連障害に罹患している患者を処置するための方法に特に使用される。

50

## 【0026】

具体的には、化合物は、患者に、インスリン発現又はレベルを増加させるための、特に、低インスリン血症を処置するための治療有効量で、好ましくは全身又は局所投与によって、投与される。

## 【0027】

特定の態様に従って、化合物は、アルテリン酸、アルテメテル、アルテモチル(アルテエーテル、 $\alpha$ -アルテエーテル)、アルテニモル(ジヒドロアルテミシニン、 $\beta$ -ジヒドロアルテミシニン)、アルテミソン及びアルテスネートからなる群から選択されるか、又はその医薬的に許容される塩である。

## 【0028】

具体的には、化合物は、リガンド又は担体部分と結合している。

## 【0029】

特定の実施形態は、化合物が、医薬的に許容される担体を含む経口、非経口、全身、粘膜、局所、直腸、舌下、頬側又は埋め込み用の医薬調製物で投与され、好ましくは、医薬調製物が、錠剤、皮膚若しくは経皮製剤、軟膏、ゲル、クリーム、ローション、パッチ、溶液、注射剤、点眼液、分散システム、エマルジョン、マイクロカプセル化薬物システム、浸透圧ポンプ、皮下インプラント、顆粒、マイクロスフェア、放出調節システム、標的指向型放出システム、顆粒又はピルである、処置に関係する。

## 【0030】

特定の態様に従って、化合物は、ある用量で少なくとも1日1回、好ましくは、0.01~2000mg/日、好ましくは0.1~500mg/日の用量で、単回投与若しくは複数回の投与で投与されるか、又は用量が、持続放出製剤若しくはデバイスで与えられる。そのような用量は、特に、経口投与用に指示される。

## 【0031】

特定の実施形態に従って、処置は、別の抗糖尿病治療、好ましくは、抗糖尿病薬、好ましくはインスリン、スルホニル尿素、インクレチン、他の分泌促進物質、グリタゾン、メトホルミン、GLP-1アゴニスト若しくはDPP4阻害剤、グルコシダーゼ阻害剤、アミリン類似体、SGLT2阻害剤のいずれかでの処置、胃バイパス手術又は膵島移植と併用される。

## 【0032】

別の特定の実施形態に従って、処置は、免疫調節薬と併用され、したがって細胞自己抗原、抗CD3抗体、抗CD20抗体、抗CTLA4抗体、ニコチンアミド、ラバマイシン、シクロスポリンA、アザチオプリン、抗胸腺細胞グロブリン(ATG)、又はプレドニゾロンを使用するワクチンベースのアプローチを含む。

## 【0033】

具体的には、化合物は、別のゲフィリンアゴニスト、又はヒトBTB(POZ)ドメイン含有9(BTBD9、遺伝子ID 114781)の阻害剤と併用で投与される。

## 【0034】

本発明に従って、組合せ医薬調製物、特に、糖尿病患者の処置又はインスリンレベルを増加させるための他の任意の医学的使用のための組合せ医薬調製物であって、

- a) 一般式Iのアルテミシニン化合物と、
- b) 別のBTBD9阻害剤又はゲフィリンアゴニストと

を含み、

別のBTBD9阻害剤又はゲフィリンアゴニストが、

- i) BTBD9のCUL3(ヒトカリン3、遺伝子ID: 8452)との結合を阻害する、及び/又は
- ii) ゲフィリンのレベル若しくはクラスター形成を増加させる、及び/又は
- iii)  $\alpha$ -アミノ酪酸(GABAR、遺伝子ID: 2550、2554、\_2555、2556、2557、2558、2559、2560、2561、2562、2563、2564 2565、2566、2567、2568、2569、2570、\_9568、5587 9、200959によってコードされているタンパク質のサブセットの様々な組合せで構成されているマルチサブユニット複合体)の受容体とゲフィリンの結合を増加、強化、刺激若しくは促進する、及び/又は

10

20

30

40

50

iv) GABARのゲフィリン媒介シグナル伝達を増加させる薬剤である、組合せ医薬調製物を更に提供する。

【0035】

本発明に従って、患者の糖尿病の処置に有効であるリード候補薬剤を同定するための方法であって、

- a) ARXを過剰発現する膵細胞又は膵細胞を準備する工程と、
- b) 細胞を試験薬と接触させる工程と、
- c) 試験薬が、
  - i) 前記細胞によるインスリン発現を増加させるかどうか、及び/又は
  - ii) 前記細胞においてARXを抑制するかどうか、及び/又は
  - iii) BTBD9とCUL3の相互作用を阻害するかどうか、
  - iv) ゲフィリンのレベル若しくはクラスター形成を増加させるかどうか、及び/又は
  - v) GABARのゲフィリン媒介シグナル伝達を増加させるかどうか

10

を検出することにより糖尿病を処置するためのリード候補薬剤を同定する工程とを含む、細胞ベースのアッセイで1つ又は複数の試験薬をスクリーニングする工程を含む、方法を更に提供する。

【0036】

具体的には、試験薬は、小分子、ペプチド、タンパク質、抗体又は抗体断片等のタンパク質ドメイン、アプタマー、及び核酸からなる群から選択され、好ましくは、試験薬のライブラリーをスクリーニングすることによって得られる試験薬である。

20

【0037】

本発明に従って、医学的使用のためのリード候補薬剤を同定する方法であって、

- a) 哺乳動物細胞と試験薬とを、試験薬とBTBD9との又は細胞によって産生されるゲフィリンとの相互作用を可能にする条件下で接触させる工程と、
- b) 試験薬が、
  - i) BTBD9の熱安定性を増大させるかどうか、及び/又は
  - ii) BTBD9のCUL3との結合を阻害するかどうか、及び/又は
  - iii) ゲフィリンのレベル若しくはクラスター形成を増加させるかどうか、及び/又は

は

iv) ゲフィリンのGABARとの結合を増加、強化、刺激若しくは促進するかどうか、及び/又は

30

- v) GABARのゲフィリン媒介シグナル伝達を増加させるかどうか

を判定することにより医学的使用のための、特に、糖尿病の処置又は抗糖尿病使用のためのリード候補薬剤を同定する工程と

を含む、細胞ベースのアッセイで1つ又は複数の試験薬をスクリーニングする工程を含む、方法を更に提供する。

【0038】

本発明に従って、インスリンレベルを増加させるための糖尿病患者の処置に使用するためのBTBD9結合又はゲフィリン結合活性薬剤、好ましくは、小分子である活性薬剤を更に提供する。例示的BTBD9結合又はゲフィリン結合小分子は、例えば、本発明のアルテミシニン化合物のいずれかである。結合アッセイ及び機能試験を用いて適切な源、例えば、小分子の大きなライブラリーから代替小分子をスクリーニングしてもよい。詳細には、そのような活性薬剤は、BTBD9を阻害して、ゲフィリンを機能的に活性化その分解を阻害することによりゲフィリンを間接的に刺激することになるか、又はゲフィリンに直接結合し、刺激することになる。

40

【0039】

本発明に従って、抗感染又は抗菌使用のためのアルテミシニン化合物である薬剤を除く、医学的使用のためのBTBD9結合又はゲフィリン結合活性薬剤を更に提供する。任意選択の更なる除外は、皮膚疾患、癌、外傷性出血及び関連症状、心筋梗塞及び冠動脈心疾患、痔核、アルツハイマー病、クローン病の処置のための先行技術アルテミシニン化合物であ

50



ろう。

【0040】

特に、感染性疾患以外の疾患の処置に使用するためのBTBD9結合又はゲフィリン結合活性薬剤を提供する。

【0041】

具体的な除外は、抗感染若しくは抗菌使用のための、又は場合により、皮膚疾患、癌、外傷性出血及び関連症状、心筋梗塞及び冠動脈心疾患、痔核、アルツハイマー病及びクローン病からなる群から選択される1つ若しくは複数の疾患の処置に使用するための、アルテミシニン化合物であって、アルテリン酸、アルテメテル、アルテモチル、アルテニモル、アルテミソン及びアルテスネートからなる群から選択されるアルテミシニン、若しくはその医薬的に許容される塩、又は特に、式Iの任意のアルテミシニン化合物である前記アルテミシニン化合物に当てはまるであろう。具体的には、前記ゲフィリン結合活性薬剤は、マラリア又は感染性疾患の処置に使用するためのアルテミシニン化合物以外のいずれかである。

10

【0042】

一態様に従って、アルテミシニン化合物を含む任意のそのようなゲフィリン結合活性薬剤、及び/又は任意の他のBTBD9結合若しくはゲフィリン結合活性薬剤は、糖尿病患者の処置に使用されうる。

【0043】

更なる特定の態様に従って、アルテミシニン化合物を含む任意のそのようなBTBD9結合若しくはゲフィリン結合活性薬剤、及び/又は任意の他のゲフィリン結合活性薬剤は、糖尿病以外の医学的障害又は疾患に罹患している患者の処置に使用されうるが、抗感染又は抗菌使用は除外され、場合により更に皮膚疾患又は癌の処置が除外される。

20

【0044】

抗糖尿病使用以外の例示的医学的使用は、自己免疫疾患、神経障害の処置のための使用であり、神経障害には、側頭葉てんかん、睡眠障害、パニック発作、てんかん発作、筋痙縮、Moco欠損症又はアルコール依存症が含まれる。

【0045】

更なる特定の態様に従って、アルテミシニン化合物以外の任意の上述のBTBD9結合又はゲフィリン結合活性薬剤は、糖尿病患者又は任意の他の医学的障害若しくは疾患に罹患している患者の処置に使用されうる。抗糖尿病使用以外の例示的医学的使用は、例えばマラリア等の感染性疾患の処置を含む、抗感染若しくは抗菌使用であるか、又は自己免疫疾患、神経障害の処置のための使用であり、神経障害には、側頭葉てんかん、睡眠障害、パニック発作、てんかん発作、筋痙縮、Moco欠損症又はアルコール依存症が含まれる。

30

【0046】

したがって、有効量のBTBD9結合又はゲフィリン結合活性薬剤、特に、BTBD9阻害剤又はゲフィリン刺激剤、好ましくは有機小分子を投与することによって、糖尿病患者のインスリンレベルを増加させるために糖尿病患者を処置する、又は感染性疾患以外の疾患に罹患している患者を処置する方法を提供する。

【0047】

特定の態様に従って、活性薬剤としてのBTBD9結合又はゲフィリン結合剤と医薬的に許容される担体とを含む医薬調製物であって、結合剤が、アルテミシニン化合物以外のいずれか、例えば、アルテリン酸、アルテメテル、アルテモチル、アルテニモル、アルテミソン及びアルテスネートからなる群から選択されるアルテミシニン化合物若しくはその医薬的に許容される塩を除くBTBD9若しくはゲフィリンと結合する能力がある小分子、又は特に、式Iの任意のアルテミシニン化合物であるアルテミシニン化合物以外のいずれかである、医薬調製物を更に提供する。

40

【0048】

特定の態様に従って、本発明は、

a) BTBD9結合若しくはゲフィリン結合剤、例えば、好ましくはアルテミシニン化合物

50

b) 抗糖尿病薬、例えば、好ましくはインスリン、スルホニル尿素、インクレチン、他の分泌促進物質、グリタゾン、メトホルミン、GLP-1アゴニスト、DPP4阻害剤、グルコシダーゼ阻害剤、アミリン類似体若しくはSGLT2阻害剤のいずれか、及び/又は

c) 免疫調節薬(細胞自己抗原、抗CD3抗体、抗CD20抗体、抗CTLA4抗体、ニコチンアミド、ラパマイシン、シクロスポリンA、アザチオプリン、抗胸腺細胞グロブリン(ATG)若しくはプレドニゾロンを使用するワクチンベースのアプローチを含む)を含む、組合せ医薬製品を更に提供する。

【0049】

そのような組合せ製品は、具体的には、混合物として、又はキット・オブ・パーツとして提供されうる。

【図面の簡単な説明】

【0050】

【図1】PAX4及びARXによる膵分化転換の細胞モデルを示す図である。a. コンディショナルMin6-tet on細胞株における1ug/mlドキシソルピシンによるMycタグ付き過剰発現コンストラクトの24時間誘導後のGFP(対照)、PAX4及びARXの誘導能。ヒストンH2Bを負荷対照として使用する。b. 過剰発現されたARX及びPAX4タンパク質を検出する抗体でのウェスタンブロット。ARX過剰発現は、長時間曝露後に検出された通り、内因性PAX4レベルを低減させるようである。c. 100万個のリード配列をマッピングし転写産物の長さを1000塩基としたときのマッピングされたリード配列の数(RPKM)として判定したPAX4及びARXの転写物存在量を示す、これらの細胞株に関するRNAシーケンシングデータの解析。d. 24時間の時点の転写因子誘導細胞とGFP誘導細胞の間で有意に変化した(p値<0.05)遺伝子を表すベン図。e. Ngn3 RNAレベルは、24時間ARX及びPAX4過剰発現後、逆に調節される。f. 免疫蛍光によって検出されるNgn3タンパク質は、24時間のARX過剰発現後、アップレギュレートされる。g. 3つの異なる単個細胞クローンにおいてRNA-seqによって調査した、144時間のARX過剰発現に基づく膵内分泌因子のlog2倍発現変化。

【図2】ARXの機能性リプレッサーのハイスループットスクリーニングを示す図である。a. Min6細胞における3日間のARX過剰発現は、免疫蛍光染色によって検出された通り、インスリンタンパク質レベルを低下させる。\*、非誘導細胞と比較してp<0.01。b. ARXを過剰発現するように誘導されたMin6細胞におけるスクリーニングデータの概要。c. インスリンタンパク質についての細胞株aTC1の免疫蛍光染色による一次スクリーニングからのヒットの検証。d. アルテメテル処置は、TC1細胞内のインスリンタンパク質レベルを増加させ、それを免疫蛍光によって検出した。\*、対照と比較してp<0.01。

【図3】細胞におけるアルテミシニンの活性を示す図である。a. アルテスネートも、細胞におけるインスリン発現の誘導に関して活性である。b. エンドペルオキシド部分がないアルテミシニン類似体デオキシアルテエーテルは不活性である。c. 免疫蛍光によって検出された、ARXを過剰発現するMin6細胞におけるアルテメテルの用量反応。d. 免疫蛍光によって検出された、細胞におけるインスリン発現の誘導に関するアルテメテルの用量反応。

【図4】Btbd9及びゲフィリンがアルテミシニンの哺乳動物標的であることを示す図である。a. ケミカルプロテオミクスアッセイの要旨。b. 比較実験と比べて有意な濃縮があると同定されたタンパク質のリスト。c. アルテメテルは、細胞のサーマルシフトアッセイにおいてBtbd9及びCuI3の熱安定性の変化をもたらす。d. アルテメテルは、細胞のサーマルシフトアッセイにおいてゲフィリンの熱安定性を低下させる。

【図5】アルテミシニンが、Btbd9-CuI3相互作用を阻害し、ゲフィリンを安定化し、GABAシグナル伝達を活性化することを示す図である。a. アルテメテルで処置したaTC1細胞におけるゲフィリン及びGABA受容体サブユニットのウェスタンブロット。b. アルテメテルで処置したaTC1細胞におけるGABARのウェスタンブロット。c. aTC1溶解物での免疫沈降が、Btbd9とCuI3間の相互作用を阻害するアルテメテルを同定する。d. aTC1細胞のアルテメテル処置によってアップレギュレートされた遺伝子に関連するG0期の遺伝子セット濃縮解

10

20

30

40

50

析。e. アルテメテルは、免疫蛍光によって検出された通り、細胞中のゲフィリンタンパク質レベルを増加させる。f. アルテメテル処置は、ゲフィリンのMocoシンターゼ活性を増加させる。g. アルテメテルは、細胞内塩化物濃度を増加させる。h. GABARアンタゴニストピククリンは、aTC1細胞に対するアルテメテルの作用を阻害し、それを免疫蛍光によって検出した。\*、アルテメテルのみで処置した細胞と比較して $p < 0.01$ 。i. GABARアンタゴニストガバジンは、aTC1細胞に対するアルテメテルの作用を阻害し、それを免疫蛍光によって検出した。\*、アルテメテルのみで処置した細胞と比較して $p < 0.01$ 。j. GABARアゴニストチアガピンは、aTC1細胞におけるインスリン産生を増加させ、それを免疫蛍光によって検出した。\*、対照と比較して $p < 0.01$ 。

【図6】アルテメテルがヒト膵島の細胞タイプ変化を誘導することを示す図である。a. アルテメテル及び対照DMSOで72時間処置したヒト膵島におけるインスリン及びグルカゴンについての免疫蛍光染色。b. アルテメテル及び対照DMSOでの72時間の処置後にヒト膵島の免疫蛍光染色によって測定したゲフィリン及びGABA受容体存在量の定量。c. アルテメテル及び対照DMSOでの72時間の処置後にヒト膵島からの上清のELISAによって測定したグルコース刺激インスリン分泌。d. ヒト膵島におけるインスリン/グルカゴン二重陽性細胞の定量。

【図7】プライマー配列を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0051】

用語「活性薬剤」は、本明細書では次のように解される。医学的使用のための本明細書に記載の活性薬剤は、特に、小分子、又はポリペプチドを含む任意の好適なペプチド、タンパク質の断片、例えばタンパク質ドメインを含むタンパク質、特に、抗体及び抗体断片若しくは抗体ドメイン、代替足場結合剤、アプタマー並びに核酸が含まれる。

【0052】

例えば、活性薬剤は、有機化学技術によって又は分子生物学若しくは生化学技術によって合成されうる分子であってもよく、好ましくは、5000ダルトン未満のものでありえ、水溶性でありうる小分子である。本明細書に記載の活性薬剤は、アルテミシニン化合物であることがあり、及び/又はゲフィリンとの選択的相互作用の特徴、例えば、本発明のアルテミシニン化合物のアゴニスト活性と同様の特徴を特に示すことができる。

【0053】

本明細書で用いる場合の用語「投与」は、本発明のアルテミシニン化合物又は候補薬剤等の活性薬剤を、それらの所期の機能を果たすために、それを必要とする対象に導入する経路を含むものとする。用いることができる投与経路の例としては、経口投与が挙げられる。薬剤を他の任意の適便な経路によって、例えば、持続注入若しくはボラス注射によって、上皮内層若しくは粘膜皮膚内層(例えば、経口、直腸、膣及び腸粘膜等)による吸収によって投与してもよく、又は別の治療薬と一緒に投与することもできる。投与は、全身的事業であることもあり、又は局所的であることもある。リポソーム、マイクロ粒子、マイクロカプセル及びカプセルへの封入をはじめとする、様々な公知送達システムを使用することができる。特定の送達システムは、局所、経皮若しくは粘膜送達用のパッチ、又はインプラントを用いる。持続放出調製物又は製剤、及び長時間作用する処置を施すための送達システムが特に好ましい。

【0054】

本発明の活性薬剤の投与の方法としては、皮内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、静脈内投与、皮下投与、鼻腔内投与、硬膜外投与、経口投与、舌下投与、脳内投与、膣内投与、経皮投与、直腸投与、吸入による投与、又は局所投与が挙げられるが、これらに限定されない。活性薬剤を単独で投与することができ、又はその適応症に使用される、例えば、糖尿病患者を処置するために使用される、別の薬剤若しくは任意の他の治療的処置と併用で若しくは共に投与することができる。活性薬剤を、他の薬剤の投与前に、薬剤と同時に、又は薬剤の投与後に投与することができる。更に、本発明の活性薬剤は、インビボで活性代謝物に又はより活性の高い代謝物に変換されるプロドラッグ形態で投与することもでき

10

20

30

40

50

る。代替送達システムは、担体分子と会合又は結合している活性薬剤であって、例えば、特異的作用部位を標的にしている活性薬剤を提供する。例示的送達システムは、鉄結合分子と、標的疾患細胞への治療有効量の選択的送達のための細胞受容体標的指向性分子、標的送達のための上述の担体分子とに結合しているアルテミシニン化合物を用いる。更なる例は、少なくとも2つのアルテミシニン化合物を含む結合体、又は他の薬剤[例えば、(プロ)ホルモン若しくはペプチド、例えばグルカゴン様ペプチド1(GLP-1)を含む]との結合体の送達に関する。

【0055】

本明細書で用いる場合のBTBD9活性に関連する用語「阻害剤」は、BTBD9と組み合わさって(例えば、結合して、相互作用して)薬理作用を開始させる能力がある、特に、ゲフィリンのレベル及び/又は活性を増加させる能力がある化合物又は薬剤を特に指すものとする。試験薬のアゴニスト活性は、本明細書に記載の例示的アッセイのいずれかによって特異的に証明される。

10

【0056】

本明細書で用いる場合のゲフィリン又はゲフィリン活性に関連する用語「アゴニスト」は、ゲフィリンと組み合わさって(例えば、結合して、相互作用して)薬理作用を開始させる能力がある、例えば、ゲフィリンレベル若しくは活性を直接刺激する、又はBTBD9等の任意のアンタゴニストを阻害することによりゲフィリンのレベル若しくは活性を間接的に増加させる能力がある化合物又は薬剤を特に指すものとする。試験薬のアゴニスト活性は、本明細書に記載の例示的アッセイのいずれかによって特異的に証明される。

20

【0057】

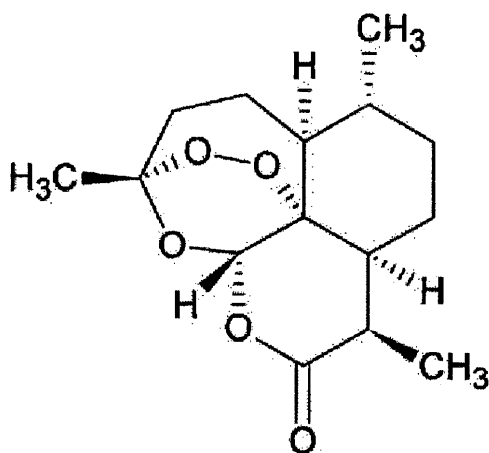
本明細書で用いる場合の用語「アルテミシニン化合物」は、特に、アルテミシニン及びアルテミシニン誘導体を指すものとする。

【0058】

アルテミシニン{(3R,5aS,6R,8aS,9R,12S,12aR)-オクタヒドロ-3,6,9-トリメチル-3,12-エポキシ-12H-ピラノ[4,3-j]-1,2-ベンゾジオキセピン-10(3H)-オン}は、1,2,4-トリオキサン環構造を含有し、クソニンジン(*Artemisia annua*)及び類縁ヨモギ属種が唯一の天然源であることは公知である。アルテミシニンは、次の構造を有する：

【0059】

【化3】



30

40

【0060】

アルテミシニン誘導体は、具体的には、本明細書中の式Iに記載のもの等の様々な残基を有するエンドペルオキシドと解される。例示的化合物は、アルテリン酸、アルテメテル、アルテモチル(アルテエーテル、 $\alpha$ -アルテエーテルとも呼ばれる)、アルテニモル(ジヒドロアルテミシニン、 $\beta$ -ジヒドロアルテミシニンとも呼ばれる)及びアルテスネートからなる群から選択されるか、その医薬的に許容される塩、又はそれらの誘導体若しくは単純

50

化された類似体である。

【0061】

天然アルテミシニン化合物に加えて、例えば溶解度又は生物学的利用能が向上した、半合成又は合成誘導体を使用することができる。特に、類似のトリオキソラン構造を有する合成化合物、例えばアルテロランも、使用することができる。

【0062】

具体的な誘導体としては、アルテミソン、ヘミコハク酸ジヒドロアルテミシニン、コハク酸ジヒドロアルテミシニン、ジヒドロアルテミシニングルクロニド、アルテスニン酸ナトリウム、安定化された形態のアルテスネート、安定化された形態のアルテスニン酸ナトリウム、ジヒドロアルテミシテン二量体、11-アザ-アルテミシニン誘導体、アミノ官能化1,2,4-トリオキサン類、アルテミシニンエンドペルオキシド類、デオキシアルテミシニン類、スピロ及びジスピロ1,2,4-トリオキソラン、混合ステロイド性1,2,4,5-テトラオキサン化合物、置換1,2,4-トリオキサン類、クソニンジン(*Artemisia annua*)抽出物若しくはそのような抽出物の画分、アルテミシニンに基づくトリオキサン誘導体、セコアルテミシニン類、トリオキサン二量体化合物、アルテリン酸とジヒドロアルテミシニンからのアルテエーテルとの結合体、アルテミシニン若しくはアルテミシニン誘導体、C-10炭素置換アルテミシニン様トリオキサン化合物、水溶性トリオキサン アルテエーテル、アルテミシニン二量体、(+)-デオキシ及び(+)-デオキシアルテミシニンの類似体、並びにジヒドロアルテミシニンの10置換誘導体、並びに当業者に公知のその塩又はそれらの他の誘導体が挙げられる。

【0063】

特定の誘導体は、リンカーを用いる又は用いない二量体化又はオリゴマー化によって得られることもあり、ペプチド、担体又は送達剤(受容体標的指向性分子を含む)等の他の部分との結合によって得られることもあり、金属イオンに結合するキレート剤と組み合わせることによって得られることもある。

【0064】

本明細書で用いる場合の用語「糖尿病」は、起源に関係なく、真性糖尿病に関連した疾患又は障害と特に解され、疾患又は障害には、具体的には、I型糖尿病及びII型糖尿病、C-ペプチド陰性及び陽性糖尿病、並びに関連障害(糖尿病性ケトアシドーシス、高血糖高浸透圧状態、糖尿病性心筋症、糖尿病性腎症、糖尿病性脳症、糖尿病性ニューロパチー、糖尿病性網膜症、冠動脈疾患、末梢血管疾患、糖尿病性筋壊死、脳卒中、糖尿病性昏睡、及び肥満を含む)が含まれる。

【0065】

I型真性糖尿病(若年性糖尿病とも呼ばれる)は、膵臓のインスリン産生細胞の自己免疫破壊に起因する真性糖尿病の一形態である。II型真性糖尿病は、インスリン依存型とインスリン非依存型の両方を有し、典型的には、遺伝的素因、不適当な食事、運動不足、又はこれらの組合せの結果として人生の後半に出現する。両方の形態の真性糖尿病が、血糖を取り込み、代謝する身体能力を改変し、その結果、血糖値が上昇する。慢性的に高い血糖値は、糖尿病関連障害、例えば、長期血管合併症、例えば冠疾患、心臓発作、脳卒中、心不全、腎不全、失明、勃起不全、ニューロパチー(特に足の、感覚喪失)、壊疽、及び胃不全麻痺(胃排出遅延)のリスクを増大させうる。不適当な血糖制御もまた、創傷治癒不良等の、術後の短期合併症のリスクを増大させる。

【0066】

結合ペプチド、すなわちC-ペプチドは、プロインスリン分子内のインスリンのA鎖をB鎖と連結する短鎖31アミノ酸タンパク質である。新たに診断される糖尿病患者は、I型糖尿病とII型糖尿病を区別する手段としてC-ペプチドレベルを測定されることが多い。

【0067】

本発明の特定の実施形態は、糖尿病、特に、I型若しくはII型糖尿病、又はC-ペプチド陰性糖尿病、或いは血糖値増加に関連する障害(例えば、代謝障害及びインスリン抵抗性障害、例えば、上述の糖尿病関連障害のいずれか又は肥満を含む)を、糖尿病又はそれぞ

10

20

30

40

50

れの障害に罹患している患者において処置することに関係する。そのような抗糖尿病処置は、具体的には、本発明のアルテミシニン化合物のいずれか又は任意の他のゲフィリンアゴニストの医薬調製物を、具体的には、投与されたときに徐放及び患者の血液循環への緩徐な取り込みを示す、並びにそのような徐放及び取り込みのために処方された、ゲフィリンアゴニストのレジメンによって用いる。

【0068】

活性薬剤又は候補薬剤に関連する用語「リード」は、当技術分野において周知であり、幾つかのアッセイによってその可能性が証明されたため薬剤が医薬製品の開発に選択されたが、薬物として使用されることへのその適合性を確認するために更なる試験及び(前臨床又は臨床)研究による更なる特性評価が必要であろうという意味に該当する。

10

【0069】

試験薬は、通常は、それらが医学的使用のための活性薬剤として好適に使用されるかどうかを適切な試験システムによって特性評価される。

【0070】

通常は、候補薬剤がBTBD9を阻害する、若しくはゲフィリンと、例えばその活性を刺激するように、相互作用する場合、又は例えば本明細書に更に記載する試験システムでその候補薬剤の不在下での活性若しくは発現と比較して判定して、膵臓細胞によるインスリン発現増加を生じさせる場合、その候補薬剤は、「リード候補薬剤」と特性評価される。更に、有利な活性及び特性を立証する能力があるアッセイを使用してリード候補薬剤を検証して、治療活性薬剤として使用されるその可能性を判定することができる。

20

【0071】

そのような試験は、定性的であることもあり、定量的であることもあり、又は半定量的であることもある。

【0072】

本明細書で用いる場合の用語「対象」は、温血哺乳動物、特に、ヒト又は非ヒト哺乳動物(イヌ、ネコ、サル、ブタ、ヒツジ及びウマを含む)を指すものとする。特に、本発明の医学的使用又はそれぞれの処置方法は、病状(疾患又はそのような疾患に関連する障害を含む)の予防又は処置を必要とする対象に適用される。対象は、早期又は後期疾患を含む、疾患に罹患している患者であることもある。用語「患者」は、予防的処置又は治療的処置のいずれかを受けているヒト及び他の哺乳動物対象を含む。したがって、用語「処置」は、予防的処置と治療的処置の両方を含むことを意図したものである。

30

【0073】

対象は、例えば、糖尿病又は糖尿病に関連する障害の予防又は治療のために処置される。したがって、特定の実施形態は、糖尿病に罹患している患者の処置に関係する。

【0074】

本明細書で用いる場合の用語「医薬的に許容される」は、例えば、ヒト及び動物と接触して使用すること又はヒト及び動物において使用することに適しており、過度の毒性、刺激、アレルギー反応又は他の問題若しくは合併症を伴わず、妥当な損益比に見合っている、化合物、材料、組成物及び/又は剤形を指す。

【0075】

本発明の活性薬剤は、例えば、医薬的に許容される担体又は希釈剤を用いて有効量で製剤化されうる。医薬的に許容される担体は、一般に、本発明によって提供される活性薬剤又は関連組成物又は組合せと生理学的に適合性である任意の及び全ての好適な溶媒、分散媒、塗料、抗菌及び抗真菌剤、等張剤並びに吸収遅延剤等を含む。医薬的に許容される担体の更なる例としては、滅菌水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール等、及びそれらのうちのいずれかのものの組合せが挙げられる。

40

【0076】

1つのそのような態様では、活性薬剤を所望の投与経路に適切である1つ又は複数の担体と併用することができ、活性薬剤は、例えば、ラクトース、スクロース、デンプン、アルカン酸のセルロースエステル、ステアリン酸、タルク、ステアリン酸マグネシウム、酸化

50

マグネシウム、リン酸及び硫酸のナトリウム及びカルシウム塩、アラビアゴム、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコールと混合されることがあり、場合により、従来の投与のために錠剤化又はカプセル化されることもある。

【0077】

非経口投与に使用する場合の例示的製剤としては、例えば滅菌溶液又は懸濁液のような、皮下、筋肉内又は静脈内注射剤が挙げられる。局所適用のための製剤には、クリーム又は軟膏、パッチ、ペースト及びゲル等の、多数の形態が含まれる。

【0078】

好ましい医薬的に許容される担体としては、ビヒクル、例えば、糖類、例えばラクトース、グルコース及びスクロース、デンプン類、例えばトウモロコシデンプン及びジャガイモデンプン、セルロース及びその誘導体、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース及び酢酸セルロース、又はポリオール類、例えばグリセリン、ソルビトール、マンニトール及びポリエチレングリコール、又は医薬製剤に用いられる当技術分野において公知の他の希釈剤及び賦形剤が挙げられる。経口及び非経口投与用の液体担体の好適な例としては、水、特に、上記の添加剤、例えばセルロース誘導体、を含有する水(カルボキシメチルセルロース溶液を含む)、アルコール類(一価アルコール及び多価アルコール並びにそれらの誘導体を含む)、及び油が挙げられる。生理的に許容される賦形剤は、食塩水、ゼラチン、デンプン、タルク、ケラチン、コロイド状シリカ、尿素等でありうる。加えて、助剤、安定剤、増粘剤、滑沢剤及び着色剤を使用することができる。

【0079】

活性薬剤は、例えば、所望の放出プロファイルをもたらすために様々な比率でヒドロキシメチルセルロース、他のポリマーマトリックス、ゲル、透過性膜、浸透圧システム、多層コーティング、マイクロ粒子、リポソーム、マイクロスフェア又はそれらの組合せを使用して、中の活性成分の徐放又は制御放出をもたらすように製剤化されることもある。活性薬剤は、上記賦形剤の1つ又は複数でマイクロカプセル化された形態で存在することもできる。

【0080】

例えば、医薬的に許容される製剤であって、医薬的に許容される製剤を対象に投与した後12時間、24時間、36時間、48時間、1週間、2週間、3週間又は4週間にわたって本発明の化合物の対象への持続的送達をもたらすものである医薬的に許容される製剤で、有効量が提供される。

【0081】

特定の実施形態において、錠剤、口内剤、パッカル形、トローチ、水性若しくは油性懸濁液若しくは溶液、顆粒、粉末、ペースト、エマルジョン、カプセル、シロップ、エリキシル錠、リポソーム製剤、薬物-ポリマー結合体、又はナノ粒子製剤を含む、持続放出処方医薬組成物は、対象への粘膜、皮下ポラス又はインプラント、局所又は経口投与に好適である。

【0082】

更なる医薬的に許容される担体及び医薬組成物が当技術分野において公知であり、例えば、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCESに記載されている。

【0083】

本発明のアルテミシニン化合物等の活性薬剤と、1つ又は複数の医薬的に許容される担体と、場合により1つ又は複数の更なる治療活性薬剤とが配合されている、具体的な医薬組成物が企図される。活性薬剤の好適な製剤は、保管のために、所望の純度を有する前記薬剤と任意選択の医薬的に許容される担体、賦形剤又は安定剤を混合することによって凍結乾燥製剤又は水溶液の形態で調製される。

【0084】

本明細書で用いる場合の用語「スクリーニング」は、候補薬剤、具体的には、候補薬剤が糖尿病等の疾患又は障害の処置に有用でありうる治療活性薬剤である可能性があることを示すスクリーニング試験に合格する、例えば、BTBD9活性を阻害する又はゲフィリン活

10

20

30

40

50

性を刺激する候補薬剤の同定を指すものとする。例えば、本明細書に記載するスクリーニングアッセイは、複数の試験薬からのリード候補薬剤の同定に有用である。特定の態様に従って、試験薬とゲフィリンの相互作用を判定する直接結合アッセイを提供する。

【0085】

BTBD9又はゲフィリンと結合又は相互作用する試験薬の能力を、タンパク質/タンパク質相互作用又は他の化合物/タンパク質相互作用を検出/測定するいずれの方法によって測定してもよい。BTBD9又はゲフィリンと結合する能力がある薬剤を同定する具体的な方法は、BTBD9又はゲフィリンを薬剤に曝露し、薬剤のゲフィリンとの何らかの結合を検出及び/又は測定する方法である。薬剤のBTBD9又はゲフィリンとの結合についての結合定数を決定してもよい。薬剤のBTBD9又はゲフィリンとの結合の検出及び/又は測定(定量)に好適な方法は当技術分野において周知であり、例えば、共精製、ELISA、免疫共沈降、等温滴定熱量測定、示差走査蛍光定量法(Thermofluor)、蛍光偏光、蛍光共鳴エネルギー移動、シンチレーション近接アッセイ及び表面プラズモン共鳴法、並びに特に、ハイスループット操作が可能な方法、例えばチップベースの方法を用いて行うことができる。

10

【0086】

ポリペプチド/ポリペプチド相互作用を検出する更なる方法としては、限外濾過とイオンスプレー質量分析/HPLC法又は他の物理的方法及び分析方法が挙げられる。例えば、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)法も使用することができ、この方法では、蛍光標識された2つの実体の結合を、互に極近接しているときの蛍光標識の相互作用を測定することによって測定することができる。

20

【0087】

特定の態様に従って、BTBD9の活性は、BTBD9に対する抗体と、フルオロフォア若しくは他の適切なシグナル生成分子(例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ)で直接標識された、CUL3を特異的に認識する一次抗体で、結合したCUL3の量を検出すること、又は同様に標識された二次抗体での間接的検出とを用いる免疫共沈降により、BTBD9のCUL3との結合を測定することによって判定される。或いは、免疫沈降は、CUL3に対する抗体と、フルオロフォア若しくは他の適切なシグナル生成分子(例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ)で直接標識された、BTBD9を特異的に認識する一次抗体で、結合したBTBD9の量を検出すること、又は同様に標識された二次抗体での間接的検出とで行われる。代替検出法としては、同じ結合相互作用の、同じ結合相互作用に対する、免疫化学定量又は質量分析定量が挙げられる。更なる代替法は、内在性ゲフィリン遺伝子座へのコード配列のノックインによる緑色蛍光タンパク質又は細胞にコードされた別のフルオロフォア又はその他の容易に検出可能なタグでのゲフィリンの直接標識、別のフルオロフォアでのCUL3の標識、及びフェルスター共鳴エネルギー移動による相互作用の検出を含む。更なる代替法としては、表面プラズモン共鳴、等温熱量測定又は同等の生物物理学的方法によるBTBD9とCUL3の相互作用の定量が挙げられる。

30

【0088】

BTBD9結合剤(例えば、本明細書に記載のアルテミシニン化合物)は、BTBD9とE3ユビキチンリガーゼCUL3との相互作用を特異的に阻害して、ゲフィリンのユビキチン化及びその後の分解を防止することになる。それによって、これらの化合物はBTBD9阻害剤として作用するが、ゲフィリンタンパク質レベル増加をもたらすので、間接的にゲフィリンのアゴニストとしても作用する。

40

【0089】

別の特定の態様に従って、ゲフィリンのレベル又はクラスター形成は、フルオロフォア若しくは他の適切なシグナル生成分子(例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ)で直接標識された、ゲフィリンを特異的に認識する一次抗体を使用する又は同様に標識された二次抗体での間接的検出を使用する免疫蛍光アッセイでゲフィリンの量及び細胞内位置を測定することによって判定される。代替検出方法としては、全細胞又は特異的膜濃縮画分から生成された溶解物中のゲフィリンの免疫化学的定量又は試料分析定量が挙げられる。更なる代替法としては、内在性ゲフィリン遺伝子座へのコード配列

50



のノックインによる緑色蛍光タンパク質又は細胞にコードされた別のフルオロフォア又はその他の容易に検出可能なタグでのゲフィリンの直接標識が挙げられる。

【0090】

別の特定の態様に従って、ゲフィリンのGABARとの結合の増加、強化、刺激又は促進は、次のよう判定される:免疫共沈降法を用いて、抗ゲフィリン抗体を使用してゲフィリンを免疫沈降させ、会合しているGABA受容体をウェスタンブロット又はELISAによって測定する。代替法は、タグ付きタンパク質の使用、及び蛍光共鳴エネルギー移動FRET又は代替アッセイ、例えばLUMIEREによる検出を含む。

【0091】

別の特定の態様に従って、GABARのゲフィリン媒介シグナル伝達の増加は、次のように判定される:塩化物イオンの細胞への結果として生じる流入を、例えば塩化物感受性色素、例えばN-(6-メトキシキノリル)-アセトエチルエステル(MQAE)を使用して測定することによって直接判定されるか、又は細胞の膜電位若しくは結果として生じる細胞内遺伝子発現変化の電気生理学的測定によって間接的に判定される。

10

【0092】

試験薬のゲフィリンアゴニスト活性を試験するための例示的アッセイは、

- i) BTBD9の熱安定性を増大させる、及び/又は
- ii) BTBD9のCUL3との結合を阻害する、及び/又は
- iii) ゲフィリンのレベル若しくはクラスター形成を増加させる、及び/又は
- iv) ゲフィリンのGABARとの結合を増加、強化、刺激若しくは促進する、及び/又は
- v) GABARのゲフィリン媒介シグナル伝達を増加させる

20

その試験薬の活性の判定に基づく。

【0093】

そのようなアッセイは、例えば、直接結合アッセイ、免疫蛍光染色アッセイ、免疫化学的方法、生物物理学的方法又は電気生理学的方法である。

【0094】

例えば、好適な結合アッセイを下の実施例において更に説明する。

【0095】

特定の試験薬を、糖尿病の処置に使用される可能性についてスクリーニングしてもよい。したがって、細胞ベースのアッセイである特定のスクリーニング試験を使用してもよい。試験薬の抗糖尿病活性を試験するための例示的アッセイは、膵臓細胞、特に、ARXを過剰発現する細胞又は細胞において、インスリンを発現するその試験薬の能力に基づいて、その試験薬が、

30

- i) 前記細胞によるインスリン発現を増加させるかどうか、及び/又は
- ii) 細胞においてARXを抑制するかどうか、及び/又は
- iii) BTBD9のCUL3との結合を阻害するかどうか、及び/又は
- iv) ゲフィリンのレベル若しくはクラスター形成を増加させるかどうか、及び/又は
- v) GABARのゲフィリン媒介シグナル伝達を増加させるかどうか

を判定する。

【0096】

例えば、好適なインスリン発現アッセイを下の実施例において更に説明する。

40

【0097】

場合により、スクリーニング法は、例えばハイスループットスクリーニングでは、試験の方法工程の反復を含むこともある。それによって、複数の候補薬剤を試験して、医学的使用のためのリード候補薬剤を同定することができる。

【0098】

例えば、化学合成又は生物学的合成によって生成された多様な化合物のコレクションを含む、コンビナトリアル化合物ライブラリー又は化合物ライブラリー、例えばリニアコンビナトリアル化合物ライブラリー、例えばポリペプチド又はペプチドライブラリーを試験薬源として使用してもよい。所望の特徴的活性を提示する、例えば、ゲフィリンとアゴニ

50

スト的に結合する能力がある、又は(インビトロ若しくはエキスピボアッセイで)膵臓細胞におけるインスリンの発現を増加させることができるようなライブラリーメンバー、化学種又はサブクラスを選択することができる。

【0099】

BTBD9又はゲフィリンと結合又は相互作用する薬剤の同定が薬物スクリーニング経路の最初の工程でありうること、並びに同定された薬剤が、例えばゲフィリン活性を刺激する能力について、更に特性評価及び選択されうることは、解される。したがって、本発明の方法は、活性アッセイでリード候補薬剤をアッセイして、そのリード候補薬剤が治療活性薬剤に適格であるかどうかを判定することを更に含むことがある。

【0100】

本明細書で用いる場合の用語「有効量」は、上述の疾患又は障害を処置、予防又は阻害するのに十分である化合物の量を意味することを意図したものである。疾患との関連で、本明細書に記載の活性化合物の治療有効量は、例えば、BTBD9又はゲフィリンとの相互作用を含む、細胞成分又は分子との活性薬剤の相互作用の恩恵を受ける疾患若しくは状態、特に糖尿病を予防する、処置する、修飾する、減弱する、改善する、又はそのような疾患若しくは状態に作用するために、特に使用される。この用語は、具体的には、治療有効量と予防有効量の両方を含む。

【0101】

用語「予防有効量」は、患者に単回又は複数回投与されたとき疾患又は障害の予防又は処置に有効である、活性化合物の量を特に指す。

【0102】

そのような有効量に対応するであろう活性薬剤の量は、様々な因子、例えば、所与の薬物又は化合物、医薬製剤、投与経路、疾患又は障害のタイプ、処置を受ける対象又はホストの素性等に依存して変わることになるが、それにもかかわらず、当業者はその量を常例的に決定することができる。

【0103】

本明細書に記載のアルテミシニン化合物である活性薬剤の治療有効量、例えば、それを必要とするヒト患者に提供される有効量は、具体的には、単回投与又は複数回の投与で、0.01~2000mg/日、好ましくは0.1~500mg/日の範囲でありうる。特定の実施形態は、慢性疾患の処置、例えば、少なくとも2週間、少なくとも3週間又は少なくとも4週間のわたる処置のためのもの等の、長期間にわたる活性薬剤の投与に有利に使用することができる、持続放出製剤又はデバイスに関係する。特定の実施形態において、持続放出製剤は、全処置期間にわたって常に0.01~500mg/日の範囲である、アルテミシニン化合物の血中レベルを提供する。別の特定の態様において、そのような濃度は、間欠的に、例えば、1週間オントリートメント、1オフトリートメントの反復レジメンで達成される。別の実施形態において、特定の製剤は、活性薬剤の選択的濃縮を、検出可能な血中レベルがない状態の膵臓又は膵島において生じさせる結果となる。

【0104】

治療有効量の本発明の活性物質での対象の処置又は予防レジメンは、単回投与からなることもあり、又は代替的に一連の適用を含むこともある。例えば、活性薬剤は、少なくとも年に1回、少なくとも半年に1回、又は少なくとも月に1回投与されることがある。しかし、別の実施形態では、活性薬剤は、ある一定の処置については週に約1回から毎日の投与で対象に投与されることもある。処置期間の長さは、様々な因子、例えば、疾患の重症度、急性疾患又は慢性疾患のいずれか、患者の年齢、活性薬剤の濃度及び活性に依存する。処置又は予防に使用される有効投薬量が特定の処置又は予防レジメンの過程を通じて増加又は減少することがあることも理解されるであろう。投薬量の変化が生じることがあり、その変化は、当技術分野において公知の標準診断アッセイによって明らかになりうる。場合によっては、慢性投与を必要とすることもある。

【0105】

本発明のアルテミシニン化合物又は活性薬剤及び医薬調製物の生物学的特性を細胞、組

10

20

30

40

50

織、及び生物全体の実験においてエキスビボで特性評価することができる。当技術分野において公知であるように、薬物は、疾患若しくは疾患モデルに対する処置についての薬物の有効性を測定するために、又は薬物の薬物動態、薬力学、毒性及び他の特性を測定するために、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ及びサルをはじめとする(しかしこれらに限定されない)動物においてインビボで試験されることが多い。動物は、疾患モデルと呼ばれることがある。治療薬は、ヌードマウス、SCIDマウス、非肥満糖尿病(NOD)マウス、異種移植マウス、及びトランスジェニックマウス(ノックイン及びノックアウトを含む)をはじめとする(しかしこれらに限定されない)マウスで試験されることが多い。そのような実験は、治療薬として又は予防薬として使用される活性薬剤の可能性を判定するための意義にあるデータをもたらすことができる。いずれの生物、好ましくは哺乳動物を、試験に使用してもよい。例えば、ヒトとの遺伝的類似性のため、霊長類、サルは、好適な治療モデルであることができ、したがって、対象薬剤又は組成物の有効性、毒性、薬物動態、薬力学、半減期又は他の特性を試験するために使用されることがある。薬物としての認可のためには最終的にヒトでの実験が必要とされ、したがって、勿論、これらの実験を企図している。したがって、本発明の活性薬剤及びそれぞれの医薬組成物をヒトで試験して、それらの治療若しくは予防有効性、毒性、免疫原性、薬物動態及び/又は他の臨床的特性を判定することができる。

#### 【 0 1 0 6 】

本発明に従って、好ましい活性薬剤、例えば小分子アルテミシニン化合物は、異なる目的のために抗マラリア又は抗ウイルス治療に使用されている市販の化合物、例えば、アル  
 テエーテル、アルテモチル、アルテメテル、アルテミソン、アルテスネート、アルテミシ  
 ニン、アルテミシテン、アルテリン酸、9-エピ-アルテミシニン、ジヒドロアルテミシニ  
 ン、ジヒドロアルテミシニン二量体、ジヒドロアルテミシニングルクロニド、3,6,9-トリ  
 メチルデカヒドロ-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-オール;(3R  
 ,5aS,6R,8aS,9R,12R,12aR)-デカヒドロ-3,6,9-トリメチル-3,12-エポキシ-12H-ピラノ[4;  
 3,12-エポキシ-12H-ピラノ[4,3-j]-1,2-ベンゾジオキセピン-10(3H)-オン、オクタヒドロ  
 -3,6,9-トリメチル-;(3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H  
 -3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-オール;3,12-エポキシ-12H-  
 ピラノ[4,3-j]-1,2-ベンゾジオキセピン-10(3H)-オン、オクタヒドロ-3,6,8-トリメチル-  
 、(3R,5aS,6R,8R,12S,12aR)-;3,12-エポキシ-12H-ピラノ[4,3-j]-1,2-ベンゾジオキセピ  
 ン-10-オール、デカヒドロ-3,6,9-トリメチル-、(3S,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-;(3R  
 ,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-デカヒドロ-10-エトキシ-3,6,9-トリメチル-3,12-エポキ  
 シ-12H-ピラノ[4,3-j]-1,2-ベンゾジオキセピン;3,12-エポキシ-12H-ピラノ[4,3-j]-1,2-  
 ベンゾジオキセピン、10-フルオロデカヒドロ-3,6,9-トリメチル-、(3R,5aS,6R,8aS,9R,1  
 0R,12S,12aR)-;3,12-エポキシ-12H-ピラノ[4,3-j]-1,2-ベンゾジオキセピン-10-オール、  
 デカヒドロ-10-d-3,6,9-トリメチル-、(3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-(9CI);4-オキ  
 ソ-4-(((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキ  
 シ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル)オキシ)ブタン酸;ブタン二酸、1-[(3  
 R,5aS,6R,8aS,9R,10R,12R,12aR)-デカヒドロ-3,6,9-トリメチル-3,12-エポキシ-12H-ピラ  
 ノ[4,3-j]-1,2-ベンゾジオキセピン-10-イル]エステル;(3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR  
 )-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメ  
 ン-10-イル4-(イソブチルアミノ)-4-オキソブタノエート;2,5-ジオキソピロリジン-1-イ  
 ル((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1  
 ,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル)スクシネート;N,N-ジメチル-N-[2-[(3R,5  
 aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルペルヒドロ-3,12-エポキシピラノ[4,3-j]  
 -1,2-ベンゾジオキセピン-10-イルオキシ]エチル]アミンオキサレート;(3R,5aS,6R,8aS,9  
 R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3  
 -i]イソクロメン-10-イル4-オキソ-4-((1-フェニルエチル)アミノ)ブタノエート;(3R,5aS  
 ,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキ  
 セピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル4-((4-メトキシベンジル)アミノ)-4-オキソブタノエ  
 50

10

20

30

40

50

ート;6-(4-オキソ-4-(((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル)オキシ)ブタンアミド)ヘキサン酸;(3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル4-((シクロヘキシルメチル)アミノ)-4-オキソブタノエート;(3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル4-((フラン-2-イルメチル)アミノ)-4-オキソブタノエート;2-(4-オキソ-4-(((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル)オキシ)ブタンアミド)プロパン酸;(3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル4-((4-フルオロフェネチル)アミノ)-4-オキソブタノエート;(3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル4-((2,2-ジメトキシエチル)アミノ)-4-オキソブタノエート;(3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-0-イル4-((4-ヒドロキシフェネチル)アミノ)-4-オキソブタノエート;(3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル4-((4-メトキシフェネチル)アミノ)-4-オキソブタノエート;(3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル4-オキソ-4-((ピリジン-4-イルメチル)アミノ)ブタノエート;3-ヒドロキシ-2-(4-(4-オキソ-4-(((5aS,6R,12S)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル)オキシ)ブタンアミド)ブタンアミド)ブタン酸;(3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル4-((2-(1H-インドール-3-イル)エチル)アミノ)-4-オキソブタノエート;4-((4-オキソ-4-(((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル)オキシ)ブタンアミド)メチル)安息香酸;4-(4-オキソ-4-(((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル)オキシ)ブタンアミド)-3-フェニルブタン酸;(3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル4-((2-(1H-イミダゾール-5-イル)エチル)アミノ)-4-オキソブタノエート;(5aS,6R,12S)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル4-((4-(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)オキシ)-4-オキソブチル)アミノ)-4-オキソブタノエート;(3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル4-((4-(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)オキシ)-4-オキソブチル)アミノ)ブタノエート;3-(1H-インドール-3-イル)-2-(4-(4-オキソ-4-(((5aS,6R,12S)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル)オキシ)ブタンアミド)ブタンアミド)プロパン酸;4-(メチルチオ)-2-(4-オキソ-4-(((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル)オキシ)ブタンアミド)ブタン酸;5-アミノ-5-オキソ-2-(4-オキソ-4-(((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル)オキシ)ブタンアミド)ペンタン酸;2-((S)-4-メチル-2-(4-オキソ-4-(((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル)オキシ)ブタンアミド)酢酸;(S)-3-メチル-2-(4-(4-オキソ-4-(((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル)オキシ)ブタンアミド)ブタンアミド)ブタン酸;ブタン酸、4-[[2-(3,4-ジヒドロキシフェニル)エチル]アミノ]-4-オキソ-、(3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-デカヒドロ-3,6,9-トリメチル-3,12-エポキシ-12H-ピラノ[4,3-j]-1,2-ベンゾジオキセピン-10-イルエステル;(3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12a

R)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル4-(((S)-3-(1H-インドール-3-イル)-1-メトキシ-1-オキソプロパン-2-イル)アミノ)-4-オキソブタノエート;(S)-2-((S)-4-メチル-2-(4-オキソ-4-(((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル)オキシ)ブタンアミド)ペンタンアミド)プロパン酸;(S)-2-((S)-4-メチル-2-(4-オキソ-4-(((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル)オキシ)ブタンアミド)ペンタンアミド)ペンタン二酸;(S)-3-メチル-2-((S)-4-メチル-2-(4-オキソ-4-(((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル)オキシ)ブタンアミド)ペンタンアミド)ブタン酸;(S)-2-((S)-4-メチル-2-(4-オキソ-4-(((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル)オキシ)ブタンアミド)ペンタンアミド)-3-フェニルプロパン酸;(S)-4-メチル-2-((S)-4-メチル-2-(4-オキソ-4-(((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル)オキシ)ブタンアミド)ペンタンアミド)ペンタン酸;3-(2,2-ジメチルテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)-3-(4-オキソ-4-(((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル)オキシ)ブタンアミド)プロパン酸;(3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル4-(((S)-1-((4-ヒドロキシフェネチル)アミノ)-4-メチル-1-オキソペンタン-2-イル)アミノ)-4-オキソブタノエート;(R)-3-メルカプト-2-((S)-4-メチル-2-(4-オキソ-4-(((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル)オキシ)ブタンアミド)ペンタンアミド)プロパン酸;(2S,3R)-3-メチル-2-((S)-4-メチル-2-(4-オキソ-4-(((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル)オキシ)ブタンアミド)ペンタンアミド)ペンタン酸;(S)-3-(1H-インドール-3-イル)-2-((S)-4-メチル-2-(4-オキソ-4-(((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル)オキシ)ブタンアミド)ペンタンアミド)プロパン酸;(3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル4-(((S)-1-((S)-1-エトキシ-3-(4-ヒドロキシフェニル)-1-オキソプロパン-2-イル)アミノ)-4-メチル-1-オキソペンタン-2-イル)アミノ)-4-オキソブタノエート;(3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-3H-3,12-エポキシ[1,2]ジオキセピノ[4,3-i]イソクロメン-10-イル4-(((S)-1-((S)-3-(1H-インドール-3-イル)-1-メトキシ-1-オキソプロパン-2-イル)アミノ)-4-メチル-1-オキソペンタン-2-イル)アミノ)-4-オキソブタノエート;又は抗糖尿病活性が証明されているそれらの機能性誘導体である。

## 【0107】

アルテミシニンの更なる機能性誘導体、又は本明細書に記載の任意の特異的アルテミシニン化合物は合成してもよく、又はBTBD9結合活性、ゲフィリン結合活性、ゲフィリンアゴニスト活性若しくはBTBD9阻害活性についての試験を用いる適切なスクリーニング技術によって機能性誘導体を同定することができる。

## 【0108】

アルテミシニン化合物若しくは別のゲフィリン結合パートナーの構造を模倣する活性薬剤、又はアゴニスト抗体若しくは抗体断片のような、ゲフィリンの特異的リガンドである活性薬剤も好ましい。

## 【0109】

本発明の一実施形態において、活性薬剤は、対象に例えば疾患修飾又は予防用単剤療法として投与される唯一の治療活性薬剤である。

## 【0110】

10

20

30

40

50

別の実施形態では、活性薬剤は、カクテルで更なる活性薬剤と併用され、例えば、混合物又はキット・オブ・パーツに併用され、したがって、カクテルは、対象に例えば疾患修飾又は予防用併用療法として投与される1種より多くの治療活性薬剤を含有する。

【0111】

具体的には、活性薬剤は、同じ標的適応症を処置するための標準処置、例えば、糖尿病を処置するための活性薬剤(インスリン、スルホニル尿素、インクレチン、他の分泌促進物質、グリタゾン、メトホルミン、GLP-1アゴニスト若しくはDPP4阻害剤、グルコシダーゼ阻害剤、アミリン類似体、SGLT2阻害剤のいずれかを含む)、胃バイパス手術、又は膵島移植を含めて(しかしこれらに限定されない)、1つ又は複数の他の治療又は予防薬と併用で投与されることもある。

10

【0112】

併用療法において、活性薬剤は、混合物として投与されることもあり、又は1つ若しくは複数の治療レジメンと同時に、例えば、同時療法の前に、同時療法と同時に、若しくは同時療法の後に投与されることもある。

【0113】

特定の実施形態において、本発明の方法は、本発明のアルテミシニン化合物又は別のBD9阻害剤若しくはゲフィリンアゴニストのような活性薬剤である活性薬剤の治療有効量を、別の治療活性薬剤又は従来処置方法と併用で対象に投与することを含む。医薬活性抗糖尿病化合物の例としては、インスリン、スルホニル尿素、他の分泌促進物質、グリタゾン、メトホルミン若しくは他のビッグアニド類、GLP-1アゴニスト若しくはDPP4阻害剤、他のインクレチン類、グルコシダーゼ阻害剤、アミリン類似体、SGLT2阻害剤、胃バイパス手術又は膵島移植が挙げられる。本発明は、本発明の活性薬剤と併用療法に使用されるような薬物とを含むキットに更に関する。

20

【0114】

本発明の活性薬剤及び他の医薬活性化合物は、対象に同じ医薬組成物で投与されることもあり、又は異なる医薬組成物で、例えば同時に若しくは異なるときに、投与されることもある。

【0115】

用語「Moco欠損症」は、活性亜硫酸オキシダーゼ、キサンチンデヒドロゲナーゼ/オキシダーゼ、アルデヒドオキシダーゼ、又は起源に関係なくその活性がモリブデン補因子の存在及び十分なレベルを必要とする任意の更なる酵素が欠如している疾患を指す。Moco欠損症の診断は、早期てんかん発作、低い血中尿酸値、並びに高い尿中亜硫酸、キサンチン及び尿酸値を含むが、これらに限定されない。

30

【0116】

用語「側頭葉てんかん」は、側頭葉に由来する再発性てんかんを記述するために用いている。側頭葉は、哺乳動物の脳の両方の大脳半球における外側溝の真下に位置する、大脳皮質の領域である。てんかんは、てんかん発作を生じさせる永続的な素因を特徴とし、この状態の神経生物学的、認知的、心理的及び社会的因果関係を特徴とする、脳の障害である。てんかんの定義には、少なくとも1つのてんかん発作の発生が必要である。

40

【0117】

Moco欠損症は、キサンチンデヒドロゲナーゼ/オキシダーゼ及びアルデヒドオキシダーゼ活性の欠如に至るMCOS1、MCOS2又はゲフィリンの突然変異によって引き起こされる遺伝性疾患である(Reiss及びJohnson, 2003)。これまでにMoco欠損症の少数の症例が報告されており、1名の患者しか治療していない。Moco欠損症に使用可能な承認されている治療薬が存在しないことから、アルテメテルには、ゲフィリンに対するアルテメテルのそのアゴニスト作用のため、Moco欠損症の希少疾病用医薬品(オーファンドラッグ)となる可能性がある。

【0118】

最近の研究は、側頭葉てんかんにおけるゲフィリンの独特な役割を明らかにしている。低レベルのゲフィリンレベルが実験マウスモデルばかりでなく側頭葉てんかん患者におい

50

ても検出され、これらは、ゲフィリンmRNAの不適切なスプライシングに起因する可能性があった(Forsteraら、2010)。本発明者らの研究に基づき、アルテメテル処置は、マウス細胞とヒト細胞の両方においてゲフィリンの安定性を増大させることができる。これらの結果は、アルテメテルは側頭葉てんかんに対する治療薬に含められる可能性があることを示している。

#### 【0119】

本発明の更に別の態様では、抗糖尿病処置に好適な活性薬剤を同定する方法を提供する。機能性アッセイは、ARXを過剰発現する膵臓細胞、例えば膵細胞又は膵細胞を、試験薬が、

- i) 前記細胞によるインスリン発現を増加させるかどうか、及び/又は
- ii) 細胞においてARXを抑制するかどうか、及び/又は
- iii) BTBD9のCUL3との結合を阻害するかどうか、及び/又は
- iv) ゲフィリンのレベル若しくはクラスター形成を増加させるかどうか、及び/又は
- v) GABARのゲフィリン媒介シグナル伝達を増加させるかどうか

を試験するために、エクスピボで使用することを含む。

#### 【0120】

BTBD9相互作用又はゲフィリン相互作用、例えば、ゲフィリンアゴニスト活性をインビトロで判定する方法としては、共精製、ELISA、免疫共沈降、等温滴定熱量測定、示差走査蛍光定量法(Thermofluor)、蛍光偏光、蛍光共鳴エネルギー移動、シンチレーション近接アッセイ及び表面プラズモン共鳴法、並びに特に、ハイスループット操作が可能な方法、例えばチップベースの方法が挙げられる。

#### 【0121】

BTBD9又はゲフィリン結晶構造内又は上の化合物のモデルをコンピュータで作成してもよい。可能性のある修飾化合物が同定されたら、インビトロ、インビボ又はエクスピボ細胞アッセイを用いてそれらの化合物をスクリーニングしてもよい。この要領で同定された化合物は、本発明の好ましい活性薬剤の類似体として有用である。

#### 【0122】

上述の説明は、以下の実施例を参照することによって更に十分に理解されるであろう。しかし、そのような実施例は、本発明の1つ又は複数の実施形態を実施する方法の代表に過ぎず、本発明の範囲を限定すると読み取るべきではない。

#### 【実施例】

#### 【0123】

材料及び方法

試薬

このプロジェクトで使用した抗体は、インスリン(Sigma社、18510)、グルカゴン(Sigma社、G2654)、Pax4 (R&D社、AF2614、ロット番号UZYO110121)、Pax4 (Santa Cruz社、98942、ロット番号H1610)、Arx (R&D社、AF7068、ロット番号CFOM0211121)、Myc (Cell Signaling Technology社、CST2276、ロット19)、ヒストンH2B(Cell Signaling Technology社、CST2934、ロット1)、ゲフィリン(Abcam社、ab25784)、ゲフィリン(Synaptic Systems社、147 111)、Cul3(Abcam社、ab75851)、Btd9(Abnova社、H00114781-D01)、Btd9(Abcam社、ab174976)である。アルテメテル及びプライマーは、Sigma社から入手した。プライマーの配列を図7に示す。Jackson ImmunoResearch社からのCy-3標識ロパ- -モルモット抗体。他の全ての蛍光標識抗体は、Life Technologies社から購入した。全てのHRP標識抗体は、Jackson Lab社から購入した。

#### 【0124】

細胞培養

10%FBS、50U/mLのペニシリン及び50 µg/mLのストレプトマイシンを補足した低グルコースDMEM中で、マウス膵臓細胞株 TC1(Novo Nordisk社によって提供されたもの)及び TC3(Novo Nordisk社によって提供されたもの)を増殖させた。15%Tetシステム承認FBS(Clonetech社、631106)、71uM 2-メルカプトエタノール、50U/mLのペニシリン及び50ug/mLのスト

10

20

30

40

50

レプトマイシンを補足した高グルコースDMEM中で、マウス膵臓細胞株Min6(Novo Nordisk社によって提供されたもの)をドキシサイクリン誘導性コンストラクトと共に増殖させた。ヒト膵島の細胞培養は、確証されたプロトコル(Walpitaら、2012)に従った。

#### 【 0 1 2 5 】

##### ハイスループットスクリーニング

音響伝達(Labcyte社)を用いてDMSOストックプレートから光学処理に適している黒色384ウェルプレート(Corning社3712)に化合物(50nL)を移した。Min6細胞(3000細胞/ウェル)を化合物の上、50ul培地にプレATINGした。処置の3日後、細胞を3.7%ホルムアルデヒド中で10分間、室温で固定した。BPS洗浄後、細胞を-20℃で10分間、冷純メタノールで固定し、PBS中の1%トリトンX-100によって30分間、透過処理し、PBS中の3% BSAによって30分間ブロックした。1.5%BSA中1:2000で希釈した20マイクロリットルの一次抗インスリン抗体をウェルごとに添加し、4℃で一晩インキュベートした。PBSで2回洗浄した後、PBS中1:1000で希釈した20µL Cy-3標識ロバ-モルモット抗体とPBS中の10ug/mL Hoechst社、3342とをウェルごとに添加し、1時間インキュベートした。PBSで2回洗浄した後、分析までプレートを4℃で、暗所で保管した。

10

#### 【 0 1 2 6 】

20倍対物レンズを使用して自動顕微鏡(Perkin Elmer社、Operetta)によって画像を撮影した。Hoechstチャンネルで10ミリ秒間、及びAlexa Fluor 548チャンネルで500ミリ秒間、画像を露光した。Harmony(Perkin Elmer社)ソフトウェアによって画像を解析した。核を同定し(Harmony方法C)、その核に基づいて細胞質を規定した(Harmony方法C)。対照ウェルと共に、三つ組で、固有の構造を有する臨床承認薬のコレクション(CeMM社、Vienna、Austria)からの280種の化合物が入っているウェルを合計1152個スクリーニングした。Alexa Fluor 548チャンネルでのインスリンの強度及びHoechstチャンネルでの細胞数に基づいてヒットを選択した。

20

#### 【 0 1 2 7 】

##### RNA-seq

ドキシサイクリンと共に又はなしで24、72及び144時間インキュベートした後、RNeasy Miniキット(Qiagen社)をその製造業者のプロトコルに従って使用して細胞を溶解し、RNAを単離した。RNA-seqのライブラリーは、Ribo-zeroキット及びScrtptseq v2キット(Epicenter社)を用いて、又は完全自動ロボットライブラリー調製によって調製した。CeMM社のBiomolecular Sequencing Facilityでディープシーケンシングを行った。TopHat及びBowtie 2.0によって生データをアラインし、定量した。

30

#### 【 0 1 2 8 】

##### RT-qPCR

RNeasy Miniキット(Qiagen社)でRNAを単離した後、高容量cDNA逆転写キット(Applied Biosystems社)を使用してランダムプライマーでそれを逆転写した。Lightcycler 480 qPCRマシン(Roche社)でPower SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems社)を用いて定量的PCRを行った。

#### 【 0 1 2 9 】

##### ウェスタンブロット

プロテアーゼ阻害剤カクテル(Roche社)を補足した、150mM塩化ナトリウム、1.0%NP-40及び50mM Tris、pH8.0を含有するNP-40緩衝液に細胞を溶解することによって全細胞抽出物を生成した。30mAでの電気泳動のためにSDS-ポリアクリルアミドゲル上に全細胞溶解物(30µg)をゲルごとに負荷し、そしてその後、電気泳動によってニトロセルロース膜(GE Healthcare Life Science社)に転写した。全てのブロットを、5%ミルク中1:1000で希釈した対応する一次抗体と共に4℃で一晩、そしてHRP標識二次抗体(1:20000希釈したもの)と共に1時間インキュベートした。ECL Primeウェスタンブロット検出試薬(Amersham社)を使用してシグナルを検出した。

40

#### 【 0 1 3 0 】

##### ケミカルプロテオミクス

50



NMRスペクトルをBruker Avance III 400(Bruker社、Billerica、MA、U.S)で記録した。化学シフトをppmで与え、カップリング定数をヘルツで与える。質量スペクトルは、XeVo-UPLC-TQ-MSシステム(Waters社、Milford、MA、U.S.)を使用して記録した。シリカゲル60(Merck社、Darmstadt、Germany)を使用してフラッシュカラムクロマトグラフィー(FCC)による精製を行い、Biotage Isoleraシステム(Biotage社、Uppsala、Sweden)でMPLCを行った。合成した化合物の純度は、UPLC分析によって判定し、確認した。

**【 0 1 3 1 】**

全ての合成化学薬品は、Sigma-Aldrich社から購入し、更に精製せずに使用した。

**【 0 1 3 2 】**

薬物アフィニティマトリックスは、本質的には以前に記載された(Huberら、2014)通りに調製した。簡単に言うと、エチレンジアミン(2.7  $\mu$ L、40  $\mu$ mol)、エタノールアミン(9.7  $\mu$ L、160  $\mu$ mol)及びトリエチルアミン(15  $\mu$ L、108  $\mu$ mol)を500  $\mu$ L NHS活性化セファロース4 Fast Flowビーズ(GE Healthcare Bio-Sciences社、Uppsala、Sweden)に添加し、その反応物を24時間、ロータリーシェーカーにかけた。ビーズを洗浄し、DMSOに再懸濁させ、NHS活性化アルテスネート(100  $\mu$ L、1.00  $\mu$ mol)をその懸濁液に添加し、その混合物を24時間、ロータリーシェーカーにかけた。NHS-アセタート(10  $\mu$ mol)及びトリエチルアミン(25  $\mu$ L、180  $\mu$ mol)の添加、続いてロータリーシェーカーでの24時間の攪拌によって、未反応ビーズをブロックした。DMSO及び溶解緩衝液で洗浄した後、ビーズを細胞溶解物と共にインキュベートした。

**【 0 1 3 3 】**

アフィニティークロマトグラフィー及び溶出を以前に報告された(Huberら、2014)通りに2回ずつ行い、反復するごとに10mgの全細胞溶解物をタンパク質インプットとして使用した。

**【 0 1 3 4 】**

溶離後、濃縮されたタンパク質をジチオトレイトールで還元し、システイン残基をヨードアセトアミドとのインキュベーションによってアルキル化し、それらの試料を変性ブタトリプシン(Promega社、Madison、WI)で消化した。消化された溶離物の3%(及びその倍数)を、ゲルフリー次元液体クロマトグラフィー質量分析(1D-LCMS)による後続の二重分析のためにC18逆相物質によって精製し、濃縮した。このLCMS方法論の詳細は以前に記載された通りである。

**【 0 1 3 5 】**

後続のタンパク質同定のためのピーク抽出及びRAWファイルのMGF形式への変換をmsconvert(ProteoWizard Library v2.1.2708)で行った。初期データベース検索をより広い質量許容度で行って、最適な最終タンパク質同定のための質量リストを再校正した。初期タンパク質データベース検索には、Mascot version 2.3.02(Matrix Science社、London、UK)を使用した。前駆体及びフラグメントイオンに対する誤差許容度は、それぞれ $\pm 10$ ppm及び $\pm 0.6$ Daであり、データベース検索を切断ミス数最大1で完全トリプシンペプチドに限定し、カルバミドメチルシステイン及びメチオニン酸化をそれぞれ固定及び変動修飾として設定した。Mascotペプチドイオンスコア閾値を30に設定し、1タンパク質につき少なくとも3ペプチド同定を要求した。全てのタンパク質アイソフォームを収録しているヒトUniProtKB/SwissProtデータベース、リリース2012~05に対する検索を行った。

**【 0 1 3 6 】**

初期ペプチド同定を用いて、質量測定値の理論値からの平均二乗偏差を最少にすることになる前駆体及びフラグメント質量の独立線形変換を推定した。より狭い質量許容度( $\pm 4$ ppm及び $\pm 0.3$ Da)を用いるMascot検索エンジンとPhenyx検索エンジン(GeneBio, SA, version 2.5.14)検索エンジンの併用によって同じヒトタンパク質データベースに対して再校正質量リストファイルを検索した。トリプトファン切断ミス部位1カ所を許容した。カルバミドメチルシステインを固定修飾として設定し、酸化メチオニンを変動修飾として設定した。タンパク質を検証するために、Mascot及びPhenyx出力ファイルを社内開発パーサーによって処理した。スコアがT1より上である固有ペプチドを2つ以上有するタンパク質、又

10

20

30

40

50

はスコアがT2より上であるペプチドを1つだけ有するタンパク質を明確な同定として選択した。スコア>T3であるこれらの検証タンパク質には追加のペプチドも許容した。Mascot検索には次の閾値を用いた：T1=14、T2=40、及びT3=10。Phenyx閾値をそれぞれ、4.2、4.75及び3.5に設定した(P値<10<sup>-3</sup>)。2つのアルゴリズムによって検索された検証タンパク質を統合し、一切のスペクトル不一致を破棄し、共通ペプチドに基づいてグループ分けした。逆向きのタンパク質配列のデータベースに対して同じ手順を適用することによって、タンパク質同定については<1%及びペプチドについては<0.1%の偽陽性率(FDR)(より低スコアでエクスポートされたものを含む)を決定した。

#### 【0137】

SAINTソフトウェア(バージョン2.3.4)を使用して薬物プルダウンから非特異的結合をフィルタリングした。タンパク質存在量の尺度としてタンパク質スペクトルカウントを用い、実際のプルダウンのデータを陰性対照実験のデータに対して比較することによって、SAINTは実際の餌食相互作用因子である釣り餌タンパク質の尤度を算定する。本発明者らは、SAINT尤度と、作用の大きさを表す遊離化合物競合に基づくスペクトルカウントの低減倍数との比較も行った。低減倍率は、競合があるプルダウンにおいて観察されたスペクトルカウント中央値/競合がないプルダウンにおいて観察されたスペクトルカウント中央値の比としてコンピュータ計算した。各条件で、4つのスペクトルカウント(各々について生物学的な反復2及び技術的な反復2)を中央値に使用できた。

#### 【0138】

##### 細胞のサーマルシフトアッセイ

細胞のサーマルシフトアッセイを文献(Martinez Molinaら、Science 2013)に記載の通りに行った。簡単に言うと、細胞溶解物を摂氏40~64度の範囲の指示温度に加熱し、沈殿したタンパク質を遠心分離によって除去した。上清をウェスタンブロット分析に使用し、特異的抗体でBtbd9(Abcam社)、Cul3、及びゲフィリン(Synaptic system社)のレベルをプローブした。

#### 【0139】

##### 免疫共沈降

アルテメテル又は対照DMSOのいずれかで前処置した細胞溶解物を使用し、Btbd9(Abnova社)に対する特異的抗体を用いて免疫沈降を行った。抗体複合体をProtein A Dynabeadsで固定化し、洗浄し、SDS含有負荷緩衝液で溶離した。結合したタンパク質量を5%インブロット試料との比較によって推定した。CUL3に対する特異的抗体でのウェスタンブロットティングを用いて、BTBD9とCUL3間の相互作用を判定した。

#### 【0140】

##### 統計法

全てのp値は、他の方法と明記していない限り、スチューデントt検定によって算出した。遺伝子オントロジータームの濃縮は、Gorillaを用いて行った。

#### 【0141】

##### 結果

Pax4及びArx過剰発現の細胞自律的作用と隣島微小環境におけるパラ分泌及び内分泌シグナル伝達を必要とする表現型とを区別するために、本発明者らは、PAX4、ARX又は対照GFPの誘導性過剰発現を可能ならしめるようにマウス細胞株Min6を操作した(図1a及び図1b)。これらの細胞株において、本発明者らは、転写因子過剰発現によって誘導された遺伝子発現変化を1日(図1c)、3日間及び6日間測定した。800を超える遺伝子が早い24時間時点でPAX4及びARXによって逆に調節され、これは、これら2つの因子による直接調節を示している(図1d)。興味深いことに、これら2つの転写因子によって別様に調節される最上位遺伝子の中に内分泌前駆細胞因子Ngn3があった。PAX4過剰発現はNgn3を抑制したが、ARX過剰発現はこの因子を一時的に活性化した(図1e及び図1f)。Ngn3活性化の1つの可能な解釈は、細胞がARX過剰発現後に可塑性増加を獲得するという解釈である。更に、ARX誘導は、24時間後にPax4を抑制し、より遅い6日の時点でグルカゴンを含む幾つかの細胞遺伝子の転写を活性化した(図1g)。これらの変化は、動物モデルにおいて以前に唯一観察された

10

20

30

40

50

ARX過剰発現に基づく から への運命決定スイッチを忠実にモデル化する本発明者らのシステムを示している。その結果、本発明者らは、ARXの機能性リプレッサーのハイスループットでハイコンテツなスクリーニングを可能ならしめる細胞システムを生成した。そのような化合物を同定するために、本発明者らは、化合物を添加すると同時にARX発現を誘導し、次いで72時間後にインスリンレベルを測定した。対照DMSO処置試料において、本発明者らは、非誘導細胞と比較してインスリンレベルの50%降下を観察した(図2a)。その後、本発明者らは、280の臨床承認された小分子のライブラリーをスクリーニングし、それらの構造及び標的の多様性について選択した。ヒットした化合物を、細胞生存率に影響を及ぼさない上にARXの不在下でも高いインスリンレベルを維持するそれらの能力について選択した(図2b)。興味深いことに、ARX過剰発現表現型を完全に阻害する2種のアルテミシニン、アルテメテル及びジヒドロアルテミシニンが、最上位ヒットの中にあつた。これらは、ARXの機能性阻害剤についての予測通り、膵 細胞においてインスリン及びPax4発現も誘導する唯一のヒット化合物である(図2c、図2d)。これらの発見に基づき、本発明者らは、及び 細胞における更なるアルテミシニン類似体の効果を研究した。アルテスネートは同様の効果を示す(図3a)が、デオキシアルメテルのようなエンドペルオキシド部分がない類似体は、細胞におけるインスリン発現に対して効果を示さなかつた(図3b)。用量反応アッセイは、ARXを過剰発現するMin6細胞では1uM未満(図3c)、及び 細胞では10uM未満(図3d)の半最大有効濃度を示した。

#### 【 0 1 4 2 】

マラリアの処置に広く用いられているにもかかわらず、アルテミシニンの分子の作用機序は不明である。ヒト赤血球における鉄の酸化及びマラリア原虫小胞体Ca<sup>2+</sup> ATPase SERCAの阻害(O'Neillら、2010)を含めて、様々な分子標的が提案されている。加えて、哺乳動物細胞に対するこれらの化合物の強力な効果が観察され、アルテミシニンは抗炎症及び抗癌剤として記載されている。単離されたアルテミシニンの膵臓における効果はまだ評価されていないが、ヒト患者における及び1型糖尿病の動物モデルにおけるヨモギ属抽出物の陽性効果については限られた証拠が存在する(Ahmadら、2014)。膵 細胞におけるアルテミシニンの分子の作用機序を同定するために、本発明者らはケミカルプロテオミクスアプローチを用いた。本発明者らは、細胞及びArx過剰発現 細胞において活性なアルテミシニンであるアルテスネートを固体支持体に結合させ、競合遊離アルテメテルの存在及び不在下でブルダウン実験を行った(図4a)。質量分析は、ゲフィリンを最上位の特異的相互作用因子として同定し、CUL3及びその推定的基質アダプターBtd9を含むE3ユビキチン化リガーゼの強い濃縮を示した(図5b)。次いで、本発明者らは、細胞のサーマルシフトアッセイ(Martinez Molinaら、Science 2013)を用いて、これらの因子をアルテミシニンの相互作用因子として確証した。通常、小分子との相互作用は、タンパク質を熱変性に対して安定させるものであり、本発明者らは、アルテメテル処置後にBTBD9についてそのような安定化を観察した(図4c)。対照的に、ゲフィリン化は不安定化された(図4d)。ゲフィリンは、モリブデン補因子MoCoの合成における酵素活性、RAFT1との相互作用によるmTORシグナル伝達の調節、並びにゲフィリン及びGABA受容体の膜への輸送における構造的役割をはじめとする多様な機能を発揮する。細胞株において、本発明者らは、ウェスタンブロット及び免疫蛍光によりアルテミシニンの処置後にゲフィリンタンパク質レベルの用量依存性増加を観察している(図5a及び図5e)。この観察は、ゲフィリン安定性のアルテミシニン媒介増加を示唆している。相応じて、本発明者らは、化合物処置溶解物においてMoCo合成能増大を観察した(図5f)。ゲフィリンレベル及びクラスター形成増加と一致して、本発明者らは、より高い細胞内塩化物イオン濃度(図5g)及びGABA受容体の膜占有率(図5b)も観察した。Cul3-Btd9ユビキチン化系の変化がゲフィリン安定性増加の原因であるかどうかを検討するために、本発明者らは免疫共沈降実験を行った。本発明者らは、アルテメテルの添加によって完全にブロックされたCUL3とBTBD9の強い相互作用を観察した(図5c)。

#### 【 0 1 4 3 】

細胞のRNAシーケンシング実験は、GABA受容体シグナル伝達に対するアルテメテルの効果を更に強調した。遺伝子セット濃縮分析によって、有意に改変された経路の中から

10

20

30

40

50

シナプス伝達プロセスを特定し、本発明者らは、その経路でのNrxn3、Sv2b及びShc3の有意なアップレギュレーションを観察した(図5d)。興味深いことに、GABAは、細胞増殖の誘導によって糖尿病を改善することができる因子として提案されている(Soltaniら、2011)。GABA受容体シグナル伝達が膵細胞におけるアルテミシニンの作用機序に關与することを証明するために、本発明者らは、アルテメテルと、ビククリン(図5h)又はガバジン(図5i)、2種のGABA受容体アンタゴニスト、とを併用した。GABA受容体アンタゴニストの存在は、TC1細胞におけるアルテメテルの効果を阻害した。重要なこととして、GABARアゴニストであるチアガピンの処置も、細胞におけるインスリン発現を増加させた(図5j)。ヒト生物学への本発明者らの発見の関連性の特徴を明らかにするために、本発明者らは、ヒト一次膵島におけるアルテメテルの効果を調査した。マウス細胞株における発見と一致して、本発明者らは、ゲフィリンタンパク質レベル増加、及びGABA受容体についての膜染色増加を観察した(図6b)。アルテメテルでの3日の処置は、インスリンの分泌を増加させ(図6b)、インスリンとグルカゴンの両方を発現する二重陽性細胞の数を増加させた(図6a、図6d)。遺伝子発現レベルに関しては、アルテメテル処置膵島培養物は、細胞因子ARX及びPPYの発現を相対的に劇的に低減させたが、PAX6及びPAX4を含む細胞因子の発現増加はわずかであった。

10

## 【0144】

アルテミシニン併用療法は、マラリアに対して選択される処置であり、1年に3億より多くの処置剤が調剤されている。この大きな患者コホートにもかかわらず、ヒト膵臓内分泌機能に対するアルテミシニンの効果に関する臨床データは発表されておらず、幾つかの理由のため今まで注目されずにきた。マラリア原虫感染患者の急性の命に関わる状態と共に、マラリア原虫感染の公知の低血糖を引き起こす傾向のため、血糖値は短期間に大きく変動しうることになる。更に、健常個体の場合、グルコースによって調節された様式でしかインスリンを分泌しないので、細胞数の劇的な増加であっても表現型の原因になるとは予想されない。残念なことに、現在、ヒト細胞量を直接評定するために使用できるイメージング法はない。膵臓機能に対するアルテミシニンの効果を研究するために理想的な対象は、検出可能なインスリンC-ペプチドの完全欠如(T1D患者の60%又は小児1500名に1名がかかる状態)を伴う1型糖尿病患者であるであろう。本発明者らは、更にマラリアに感染しており、アルテミシニン併用療法で処置を受けているそのような患者から、血液試料を得ることを現在試みている。アルテミシニンが分化転換も誘導する場合、本発明者らは、診断時に採取した試料ではなく処置後の血液試料においてC-ペプチドを検出できると予想している。

20

30

## 【0145】

短い処置サイクル、併用処置でのマラリア原虫若しくは他の薬物の負の作用、又は膵臓における達成可能なアルテミシニンレベルが、この状況ではまだ臨床的有用性を制限しうる。しかし、その場合でも、本発明者らの発見は、細胞の細胞への分化転換による1型糖尿病の処置に向けての創薬の全く新しい道を開く。これらの道としては、構造的に異なるゲフィリン安定剤を挙げることができるであろうが、GABA受容体シグナル伝達経路の他のプレーヤーを標的にする化合物も挙げることもできるであろう。

## 【0146】

40

## 【表 1 A】

参考文献

Ahmad, W., Khan, I., Khan, M.A., Ahmad, M., Subhan, F., and Karim, N. (2014). Evaluation of antidiabetic and antihyperlipidemic activity of *Artemisia indica* linn (aerial parts) in Streptozotocin induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 151: 618-623.

Al-Hasani, K., Pfeifer, A., Courtney, M., Ben-Othman, N., Gjernes, E., Vieira, A., Druelle, N., Avolio, F., Ravassard, P., Leuckx, G., et al. (2013). Adult Duct-Lining Cells Can Reprogram into beta-like Cells Able to Counter Repeated Cycles of Toxin-Induced Diabetes. *Dev Cell* 26, 86-100. 10

Arancibia-Cárcamo, I.L., Yuen, E.Y., Muir, J., Lumb, M.J., Michels, G., Saliba, R.S., Smart, T.G., Yan, Z., Kittler, J.T., Moss, S.J..(2009). Ubiquitin-dependent lysosomal targeting of GABA(A) receptors regulates neuronal inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:17552-17557. Collombat, P., Xu, X., Ravassard, P., Sosa-Pineda, B., Dussaud, S., Billestrup, N., Madsen, O.D., Serup, P., Heimberg, H., and Mansouri, A. (2009). The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into alpha and subsequently beta cells. *Cell* 138, 449-462. 20

Courtney, M., Gjernes, E., Druelle, N., Ravaud, C., Vieira, A., Ben-Othman, N., Pfeifer, A., Avolio, F., Leuckx, G., Lacas-Gervais, S., et al. (2013). The Inactivation of Arx in Pancreatic alpha-Cells Triggers Their Neogenesis and Conversion into Functional beta-Like Cells. *PLoS Genet* 9, e1003934.

Forstera, B., Belaidi, A.A., Juttner, R., Bernert, C., Tsokos, M., Lehmann, T.N., Horn, P., Dehnicke, C., Schwarz, G., and Meier, J.C. (2010). Irregular RNA splicing curtails postsynaptic gephyrin in the cornu ammonis of patients with epilepsy. *Brain* 133, 3778-3794. 30

Genau, H.M., Huber, J., Baschieri, F., Akutsu, M., Dötsch, V., Farhan, H., Rogov, V., Behrends, C. (2015). CUL3-KBTBD6/KBTBD7 Ubiquitin Ligase Cooperates with GABARAP Proteins to Spatially Restrict TIAM1-RAC1 Signaling. *Mol Cell* 57:995-1010.

Huber, K et al. (2014) Stereospecific targeting of MTH1 by (S)-crizotinib as anticancer strategy. *Nature*, 508, 222-227.

## 【表 1 B】

Martinez Molina, D., Jafari, R., Ignatushchenko, M., Seki, T., Larsson, E.A., Dan, C., Sreekumar, L., Cao, Y, Nordlund, P. (2013) Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay. *Science*. 341, 84-7.

O'Neill, P.M., Barton, V.E., and Ward, S.A. (2010). The molecular mechanism of action of artemisinin--the debate continues. *Molecules* 15, 1705-1721.

Pagliuca, F.W., and Melton, D.A. (2013). How to make a functional beta-cell. *Development* 140, 2472-2483.

Reiss, J., and Johnson, J.L. (2003). Mutations in the molybdenum cofactor biosynthetic genes MOCS1, MOCS2, and GEPH. *Hum Mutat* 21, 569-576.

Soltani, N., Qiu, H., Aleksic, M., Glinka, Y., Zhao, F., Liu, R., Li, Y., Zhang, N., Chakrabarti, R., Ng, T., et al. (2011). GABA exerts protective and regenerative effects on islet beta cells and reverses diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 11692-11697.

Stogios, P.J., Downs, G.S., Jauhal, J.J., Nandra, S.K., Privé, G.G. (2005). Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biol.* 6:R82.

Tyagarajan, S.K., and Fritschy, J.M. (2010). GABA(A) receptors, gephyrin and homeostatic synaptic plasticity. *J Physiol.* 588, 101-106.

Walpita, D., Hasaka, T., Spoonamore, J., Vetere, A., Takane, K.K., Fomina-Yadlin, D., Fiaschi-Taesch, N., Shamji, A., Clemons, P.A., Stewart, A.F., et al. (2012). A human islet cell culture system for high-throughput screening. *J Biomol Screen* 17, 509-518.

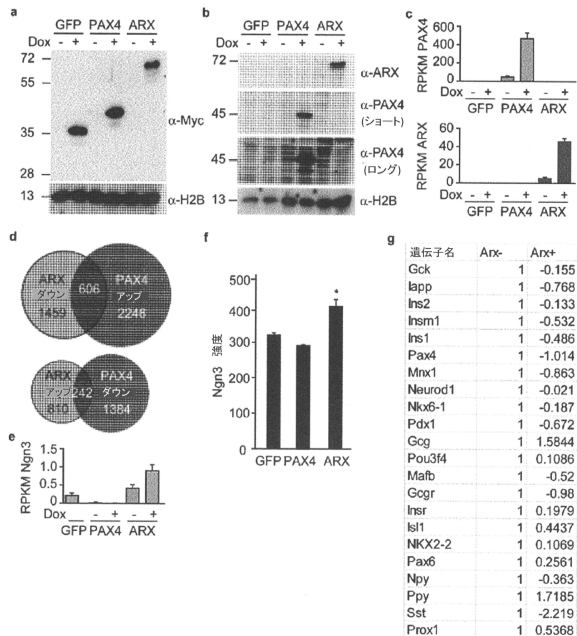
Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J., and Melton, D.A. (2008). In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 455, 627-632.

10

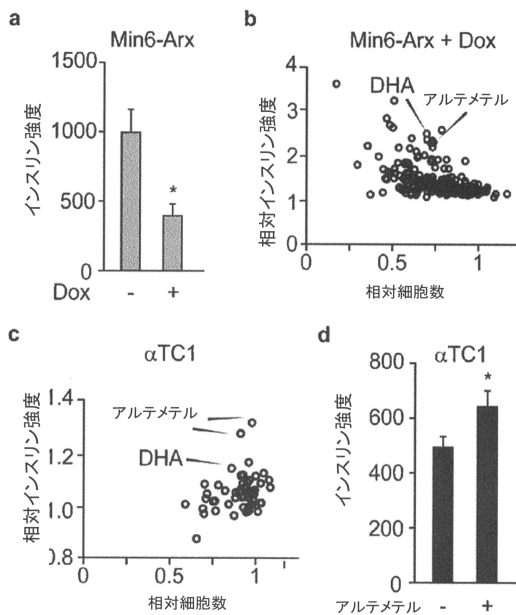
20

30

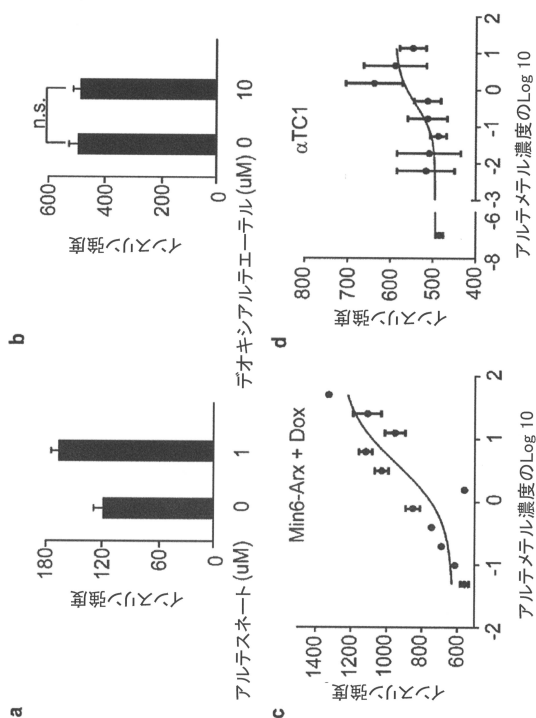
【 図 1 】



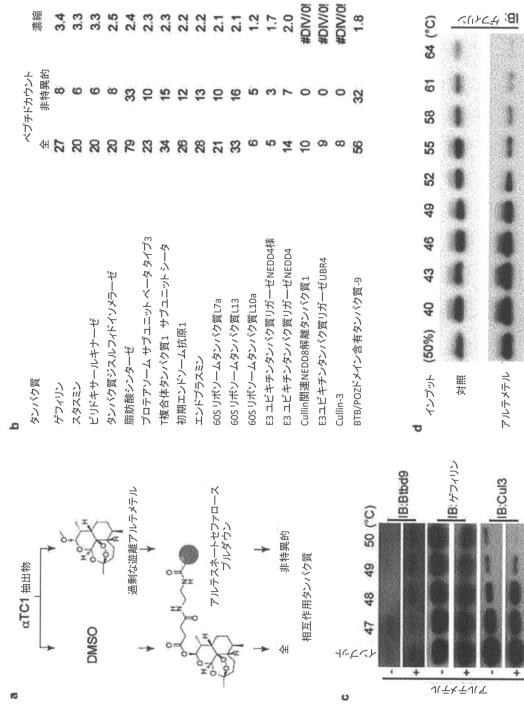
【 図 2 】



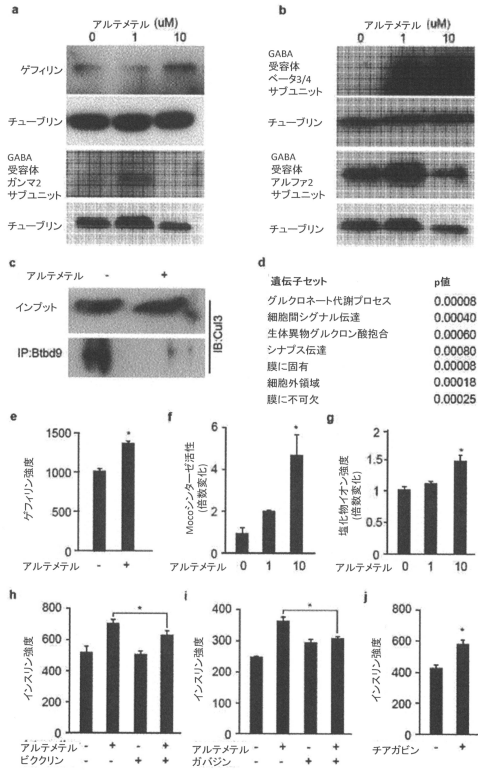
【 図 3 】



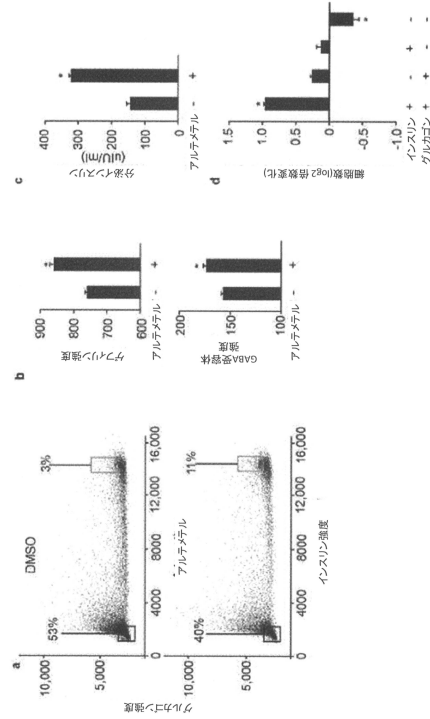
【 図 4 】



【図5】



【図6】



【図7】

プライマー配列

種	遺伝子	方向	配列	配列番号
mm	Ins2	fw	GTCAGCAGCACCTTGTGGTTCC	1
mm	Ins2	re	ACAATGCCACGCTTCGTG	2
mm	Pdx1	fw	TCCACCACCACTTCCAGCTCA	3
mm	Pdx1	re	AATTCTTCCAGCTCCAG	4
mm	Rsk1	fw	GCCGCTGGACCCGGAGAATG	5
mm	Rsk1	re	GCCGGGTGACCTTGCCTACC	6
mm	Rsk2	fw	TAACCCGAGAGGTCACACTCAG	7
mm	Rsk2	re	CTCGAACCTGTGCATCCCGA	8
mm	Rsk3	fw	TCCTGTGTTGATGACGTGGAG	9
mm	Rsk3	re	GGTCAAAGTGGAGGTGCCTC	10
mm	Actb	fw	GGTGGGAATGGGTGAGAAGGAC	11
mm	Actb	re	GGCCACACCGAGCTCATTGT	12
mm	Pax4	fw	AGGTATCTAATGGCTGTGAGC	13
mm	Pax4	re	GACACACTGGGAGCCCTTGT	14
mm	Npy	fw	TGGACTGACCCCTGCTCTAT	15
mm	Npy	re	TGCTCAGGGCTGGATCTCT	16
mm	Inspp	fw	CTCTCTGTGGCACTGAACCA	17
mm	Inspp	re	GGACTGGACCAAGTGTGTTG	18
hs	GAPDH	fw	AGAAGGCTGGGGCTCATTG	19
hs	GAPDH	re	AGGGCCATCCACAGCTTC	20
hs	TUBB3	fw	CTCAGGGCCCTTGGACATC	21
hs	TUBB3	re	CAGGCAGTCCGACTTTTAC	22
hs	ACTB	fw	CTGTCTGGCGGCCACCACAT	23
hs	ACTB	re	GCAACTAAGTCATAGTCCGC	24
hs	HMB5	fw	GGCAATGGGCTGCAA	25
hs	HMB5	re	GGTACCACCGGGAATCAC	26
hs	SDHA	fw	TGGGAACAAGGGCATCTG	27
hs	SDHA	re	CCACCATGCATCAAATTCATG	28
hs	AOF2	fw	AATGCCAAGCAGAGAAGGA	29
hs	AOF2	re	CTGCAGTGTGGGTTTCTAA	30
hs	INS	fw	CAGATCACTGCTCTGCCATGG	31
hs	INS	re	GTTCCACAATGCCACGCTTC	32
hs	GCG	fw	TCCAGATATTCAGCTTCCCAG	33
hs	GCG	re	CTTCTCGGCTTTCACCA	34
hs	SST	fw	GCTGTCTGCGGCTCCAGT	35
hs	SST	re	CGTTCTCGGGGTGCCATAGC	36
hs	PPY	fw	TGTCCACTGCTGGCTCTGTT	37
hs	PPY	re	TATAAGTCCAGCGGCTGAG	38
hs	PDX1	fw	CCTTCCATGGATGAAGTC	39
hs	PDX1	re	ITCAACATGACAGCCAGCTC	40
hs	MAFA	fw	AGTTGGCACTTCTGCTCTC	41
hs	MAFA	re	TTCAAGAGGAGAGCTCAT	42
hs	ARX	fw	ATGAGCTGGACTTGACCAGG	43
hs	ARX	re	ACACTGCCGCTCCGAGGAAA	44
hs	PAX6	fw	TCCATCAGCCACGGGCAATC	45
hs	PAX6	re	TAGGTTGCCCTGGCACCGAA	46
hs	AMY2A	fw	CTGGGTGGTGGCCAAATTAAGC	47
hs	AMY2A	re	TGTTGGCCCAACCAATCAT	48
hs	PAX4	fw	GTGASGTTCTGGTTTTCAA	49
hs	PAX4	re	AGGTGGGTTCTACTCAGAC	50



【配列表】

0006680759000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 31/155 (2006.01)		A 6 1 K 31/155
A 6 1 K 9/06 (2006.01)		A 6 1 K 9/06
A 6 1 K 9/08 (2006.01)		A 6 1 K 9/08
A 6 1 K 9/10 (2006.01)		A 6 1 K 9/10
A 6 1 K 9/107 (2006.01)		A 6 1 K 9/107
A 6 1 K 9/16 (2006.01)		A 6 1 K 9/16
A 6 1 K 9/20 (2006.01)		A 6 1 K 9/20

(72)発明者 ジン・リ

オーストリア・A - 1 0 9 0 ・ウィーン・ヌスドルファー・シュトラッセ・8 6 / トプ・8

(72)発明者 シュテファン・クピセク

オーストリア・A - 1 2 1 0 ・ウィーン・シェンケンドルフガッセ・4 2 / 1 2

審査官 磯部 洋一郎

(56)参考文献 特開平02 - 1 5 7 2 2 3 ( J P , A )

Int J Pharm, 2009, Vol.370(1-2), p.87-82

Malaria Journal, 2010, Vol.9:310, URL, <http://www.malariajournal.com/content/9/1/310>

Industrial Crops and Products, 2011, Vol.34, p.1084-1088

Cell, 2017, Vol.168, p.86-100

Cell, 2017, Vol.168, p.73-85

Cell Metabolism, 2018, Vol.27, p.218-225

Cell Metabolism, 2018, Vol.28, p.787-792

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K 3 1 / 3 5 7

A 6 1 K 9 / 0 6

A 6 1 K 9 / 0 8

A 6 1 K 9 / 1 0

A 6 1 K 9 / 1 0 7

A 6 1 K 9 / 1 6

A 6 1 K 9 / 2 0

A 6 1 K 3 1 / 1 5 5

A 6 1 K 3 8 / 2 2

A 6 1 K 4 5 / 0 0

A 6 1 P 3 / 1 0

A 6 1 P 5 / 5 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )