(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2017-524680
(P2017-524680A)
(43)公表日　平成29年8月31日(2017.8.31)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 38/26	(2006.01)	A61K	38/26	ZNA	4C076
A61K 9/08	(2006.01)	A61K	9/08		4C084
A61K 47/10	(2006.01)	A61K	47/10		4H045
A61K 47/26	(2006.01)	A61K	47/26		
A61K 47/12	(2006.01)	A61K	47/12		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 106 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-575120 (P2016-575120)
(86)(22)出願日　平成27年6月23日 (2015.6.23)
(85)翻訳文提出日　平成29年2月22日 (2017.2.22)
(86)国際出願番号　PCT/US2015/037183
(87)国際公開番号　WO2015/200324
(87)国際公開日　平成27年12月30日 (2015.12.30)
(31)優先権主張番号　62/016,806
(32)優先日　平成26年6月25日 (2014.6.25)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　591002957
グラクソスミスクライン・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー
ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ　ＬＬＣ
アメリカ合衆国デラウェア州、ウィルミングトン、コーポレーション、サービス、カンパニー、センタービル、ロード、２７１１、スウィート、４００
(74)代理人　100091982
弁理士　永井　浩之
(74)代理人　100091487
弁理士　中村　行孝
(74)代理人　100082991
弁理士　佐藤　泰和

最終頁に続く

(54)【発明の名称】医薬組成物

(57)【要約】
本発明は、アルビグルチドまたはその変異体と、緩衝剤と、少なくとも１種の糖および／もしくは少なくとも１種のポリオールと、少なくとも１種の安定化剤と、場合により界面活性剤とを含んでなる液体組成物を提供し、前記アルビグルチドは、前記液体組成物中で安定を保つ。アルビグルチドまたはその変異体は、前記アルビグルチドまたはその変異体の少なくとも約≧９６％が、液体組成物中で少なくとも１週間の期間にわたって単量体として残存すれば、液体中で安定を保つと見なされ得る。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号１で示されるポリペプチドと少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％の配列同一性を有するポリペプチド、または、Ｃ末端および／もしくはＮ末端で末端切断された、配列番号１で示されるポリペプチドと少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％の配列同一性を有するポリペプチドと、少なくとも１種の緩衝剤と、少なくとも１種の糖および／もしくは少なくとも１種のポリオールと、少なくとも１種の安定化剤と、場合により少なくとも１種の界面活性剤とを含んでなる液体組成物であって、前記ポリペプチドが前記液体組成物中で安定を保つ、液体組成物。
【請求項２】
前記ポリペプチドは、配列番号１または配列番号１と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％の配列同一性を有するポリペプチドと全配列にわたって比較した場合に、Ｎ末端で１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０個のアミノ酸が末端切断されている、請求項１に記載の液体組成物。
【請求項３】
前記ポリペプチドは、配列番号１または配列番号１と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％の配列同一性を有するポリペプチドと全配列にわたって比較した場合に、Ｃ末端で１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のアミノ酸が末端切断されている、請求項１または２に記載の液体組成物。
【請求項４】
前記緩衝剤が、前記液体組成物中に約５ｍＭ～約１５ｍＭの濃度でクエン酸ナトリウムを含んでなる、請求項１～３のいずれか一項に記載の液体組成物。
【請求項５】
前記緩衝剤が、前記液体組成物中に約５ｍＭ～約１０ｍＭの濃度でコハク酸塩を含んでなる、請求項１～４のいずれか一項に記載の液体組成物。
【請求項６】
前記液体組成物が、前記液体組成物中に約７２ｍＭ～約２０７ｍＭの濃度で少なくとも１種の糖を含んでなる、請求項１～５のいずれか一項に記載の液体組成物。
【請求項７】
前記安定化剤が、前記液体組成物中に約５０ｍＭ～約１２５ｍＭの濃度でアルギニンを含んでなる、請求項１～６のいずれか一項に記載の液体組成物。
【請求項８】
前記安定化剤または前記緩衝剤が、前記液体組成物中に約５０ｍＭ～約１２５ｍＭの濃度でヒスチジンを含んでなる、請求項１～７のいずれか一項に記載の液体組成物。
【請求項９】
前記安定化剤がスクロースを含んでなる、請求項１～８のいずれか一項に記載の液体組成物。
【請求項１０】
前記液体組成物が界面活性剤を含んでなる、請求項１～９のいずれか一項に記載の液体組成物。
【請求項１１】
前記界面活性剤がポリソルベート８０およびポリソルベート２０から選択される、請求項１０に記載の液体組成物。
【請求項１２】
クエン酸ナトリウム、トレハロース、アルギニン、ポリソルベート８０および水を含んでなり、前記液体組成物が約５．５～約６．０のｐＨを有する、請求項１～１１のいずれ

か一項に記載の液体組成物。
【請求項１３】
約３０ｍｇ／ｍＬ～約１００ｍｇ／ｍＬの、配列番号１で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、約１１０ｍＭ～約１４０ｍＭのトレハロース、９０ｍＭ～約１１０ｍＭのアルギニン、約５ｍＭ～約１５ｍＭのクエン酸ナトリウム、および０．０１％ｗ／ｗのポリソルベート８０を含んでなり、前記液体組成物が約５．５～約６．０のｐＨを有する、請求項１～１２のいずれか一項に記載の液体組成物。
【請求項１４】
約５０ｍｇ／ｍＬの、配列番号１で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含んでなる、請求項１～１３のいずれか一項に記載の液体組成物。
【請求項１５】
５０ｍｇ／ｍＬの、配列番号１で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、１１７ｍＭのトレハロース、１００ｍＭのアルギニン、１０ｍＭのクエン酸ナトリウム、０．０１％ｗ／ｗのポリソルベート８０および注射水からなり、前記液体組成物が約５．９のｐＨを有する、請求項１～１４のいずれか一項に記載の液体組成物。
【請求項１６】
前記ポリペプチドが、少なくとも１つのＧＬＰ－１活性を有し、かつ、前記ＧＬＰ－１活性を前記液体組成物中で少なくとも１週間維持する、請求項１～１５のいずれか一項に記載の液体組成物。
【請求項１７】
前記ポリペプチドの少なくとも９６％が、前記液体組成物中で少なくとも１週間単量体として残存する、請求項１～１６のいずれか一項に記載の液体組成物。
【請求項１８】
前記ポリペプチドが、少なくとも１つのＧＬＰ－１活性を有し、かつ、前記少なくとも１つのＧＬＰ－１活性を、光から保護される場合に、少なくとも１２か月、少なくとも９０％の効力で維持する、請求項１～１７のいずれか一項に記載の液体組成物。
【請求項１９】
前記液体組成物が光から保護されて約２℃～約８℃で維持される場合に、前記ポリペプチドが、前記液体組成物中で少なくとも１２か月間、安定を保つ、請求項１～１８のいずれか一項に記載の液体組成物。
【請求項２０】
血糖管理を必要とするヒトに血糖管理を提供する方法であって、前記ヒトに請求項１～１９のいずれか一項に記載の液体組成物を投与することを含んでなる、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、アルビグルチドを含むＧＬＰ－１アゴニストを含んでなる液体組成物に関する。
【背景技術】
【０００２】
血糖降下薬は、血中のグルコース濃度を低下させるために１型および２型糖尿病の処置において使用され得る。エキセンディン－４およびＧＬＰ－１誘導体などのインスリン分泌刺激ペプチドが、糖尿病の処置のための治療薬として現在販売されている。製品には、ＢＹＥＴＴＡ（登録商標）およびＢＹＤＵＲＥＯＮ（登録商標）（エキセンディン－４またはエクセナチド）；ＶＩＣＴＯＺＡ（登録商標）（リラグルチド；ＧＬＰ－１断片とパルミトイルの融合体）；ＴＲＵＬＩＣＩＴＹ（商標）（デュラグルチド；　ＧＬＰ－１類似体とＩｇＧ４　Ｆｃ領域の融合体）およびＴＡＮＺＥＵＭ（商標）／ＥＰＥＲＺＡＮ（商標）が含まれる。インスリン分泌刺激ペプチドには、限定されるものではないが、インクレチンホルモン、例えば、胃機能抑制ペプチド(gastric inhibitory peptide)（ＧＩＰ）およびグルカゴン様ペプチド－１(glucagon like peptide-1)（ＧＬＰ－１）、ならび

にその断片、変異体、および／またはコンジュゲートが含まれる。インスリン分泌刺激ペプチドにはまた、例えば、エキセンディン－３およびエキセンディン－４が含まれる。ＧＬＰ－１は、食物の摂取に応答して腸のＬ細胞により分泌される３６アミノ酸長のインクレチンホルモンである。ＧＬＰ－１は、生理学的な、グルコース依存的様式でインスリン分泌を刺激し、グルカゴン分泌を低下させ、胃内容排出を阻害し、食欲を低下させ、β細胞の増殖を刺激することが示されている。非臨床試験では、ＧＬＰ－１は、グルコース依存性インスリン分泌に重要な遺伝子の転写を刺激することにより、また、β細胞新生を促進することにより、β細胞の能力の継続を促進する(Meier, et al. Biodrugs. 2003; 17 (2): 93-102)。

【０００３】

健常な個体では、ＧＬＰ－１は、膵臓によるグルコース依存性インスリン分泌を刺激し、その結果、末梢におけるグルコース吸収を増加させることによって食後血糖値を調節する重要な役割を果たす。ＧＬＰ－１はまた、グルカゴン分泌を抑制して、肝臓のグルコース生産の低下をもたらす。加えて、ＧＬＰ－１は、胃内容排出を遅らせ、小腸の運動を緩慢にして食物吸収を遅らせる。２型糖尿病（Ｔ２ＤＭ）患者では、正常な食後のＧＬＰ－１上昇が存在しないか、または低下している(Vilsboll T, et al., Diabetes. 2001. 50; 609-613)。従って、外因性ＧＬＰ－１であるインクレチンホルモン、またはインクレチン模倣剤を投与することの１つの根拠は、食事関連のインスリン分泌を増加させ、グルカゴン分泌を低下させ、かつ／または胃腸運動を緩慢にするために、内因性ＧＬＰ－１を増強、置換または補充することである。天然ＧＬＰ－１の血清半減期は極めて短い（＜５分）。

【０００４】

アルビグルチドは、米国ではＴＡＮＺＥＵＭ（商標）、欧州ではＥＰＥＲＺＡＮ（商標）として市販されている。ＴＡＮＺＥＵＭ（商標）／ＥＰＥＲＺＡＮ（商標）の有効成分はアルビグルチドである。アルビグルチドは、組換え融合タンパク質は、２コピーの３０アミノ酸の配列の改変型ヒトグルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ－１、断片７～３６（Ａ８Ｇ））が組換えヒト血清アルブミンと直列に遺伝的に融合されたものからなる。各ＧＬＰ－１配列は、ジペプチジルペプチダーゼＩＶ（ＤＰＰ－ＩＶ）を介するタンパク質分解に対して耐性を付与するために、８位の天然アラニンをグリシンで置換して改変されている。ＴＡＮＺＥＵＭ（商標）／ＥＰＥＲＺＡＮ（商標）は、皮下注射用の３０ｍｇアルビグルチドペンとして提供され、再構成後に０．５ｍＬの容量で３０ｍｇの用量を送達するように設計された４０．３ｍｇの凍結乾燥アルビグルチドと０．６５ｍＬの注射水希釈剤を含有する。ＴＡＮＺＥＵＭ（商標）／ＥＰＥＲＺＡＮ（商標）はまた、再構成後に０．５ｍＬの容量で５０ｍｇの用量を送達するように設計された６７ｍｇの凍結乾燥アルビグルチドと０．６５ｍＬの注射水希釈剤を含有する５０ｍｇペンとして提供される。不活性成分としては、１５３ｍＭのマンニトール、０．０１％（ｗ／ｗ）のポリソルベート８０、１０ｍＭのリン酸ナトリウム、１１７ｍＭのトレハロース二水和物が含まれる。ＴＡＮＺＥＵＭ（商標）／ＥＰＥＲＺＡＮ（商標）は保存剤を含有しない。

【０００５】

アルビグルチドなどの治療用タンパク質の凍結乾燥またはフリーズドライ製剤には、無菌注射水を別に供給する必要があることから、複雑なパッケージングを必要とするという欠点がある。さらに、凍結乾燥製剤は一般に、二室注射カートリッジを使用して投与される。二室カートリッジは高価であると言え、注射水が凍結乾燥した薬物と混合された後、凍結乾燥した有効薬が再構成され注射の準備ができるまで３０分～１時間を要する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００６】

よって、まだ対処されていない、血糖降下薬、特に、アルビグルチドまたはその変異体の液体組成物の必要がある。

【課題を解決するための手段】

【０００７】
一実施形態において、本発明は、アルビグルチドと、緩衝剤と、少なくとも１種の糖および／または少なくとも１種のポリオールと、少なくとも１種の安定化剤と、場合により界面活性剤とを含んでなる液体組成物を提供し、前記アルビグルチドは前記液体組成物中で安定を保つ。アルビグルチドは、前記アルビグルチドの少なくとも≧９６％が、光から保護される場合に液体組成物中で少なくとも１週間の期間にわたって単量体として残存すれば、液体中で安定を保つと見なされ得る。
【０００８】
別の実施形態において、本発明は、配列番号１で示されるポリペプチドと少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド、または、Ｃ末端および／もしくはＮ末端で末端切断された、配列番号１で示されるポリペプチドと少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％の配列同一性を有するポリペプチドと、少なくとも１種の緩衝剤と、少なくとも１種の糖および／または少なくとも１種のポリオールと、少なくとも１種の安定化剤とを含んでなる液体組成物を提供し、前記ポリペプチドは、前記液体組成物中で安定を保ち、少なくとも１つのＧＬＰ－１活性を有する。一実施形態において、前記液体組成物は、界面活性剤をさらに含んでなる。
【０００９】
別の実施形態において、本発明は、ＧＬＰ－１アゴニストを含んでなる液体組成物を提供し、前記ＧＬＰ－１アゴニストは、前記液体組成物中で少なくとも１年間、安定を保ち、少なくとも１つのＧＬＰ－１活性を有する。好適には、ＧＬＰ－１アゴニストはアルビグルチドである。
【００１０】
本発明は、２型糖尿病の含む代謝障害を処置する方法であって、ヒトに本発明の液体組成物のいずれか１つを投与することを含んでなる方法を提供する。
【図面の簡単な説明】
【００１１】
【図１】ｔ０における試験１．０処方物Ｆ０７～Ｆ１２の非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル。
【図２】ｔ０における試験１．０処方物Ｆ０７～Ｆ１２の還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル。
【図３】試験１．０からのｔ２サンプルの非還元および還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル。
【図４】ｔ０における試験１．１からの処方物Ｆ０１－Ｆ０７の非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル。
【図５】ｔ０における試験１．１からの処方物Ｆ０８－Ｆ１４の非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル。
【図６】ｔ１における試験１．１からの処方物Ｆ０１－Ｆ０７の非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル。
【図７】ｔ１における試験１．１からの処方物Ｆ０８－Ｆ１４の非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル。
【図８】ｔ２における試験１．１からの処方物Ｆ０１－Ｆ０７の非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル。
【図９】ｔ２における試験１．１からの処方物Ｆ０１－Ｆ０７の非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル。
【図１０】ｔ０における試験１．２からの処方物Ｆ０１～Ｆ０８の非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル。
【図１１】ｔ０における試験１．２からの処方物Ｆ０９～Ｆ１６の非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル。
【図１２】ｔ１における試験１．２からの処方物Ｆ０１～Ｆ１８の非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル。
【図１３】ｔ１における試験１．２からの処方物Ｆ０９～Ｆ１６の非還元ＳＤＳ－ＰＡＧ

Ｅゲル。
【図１４】ｔ２における試験１．２からの処方物Ｆ０９～Ｆ１６の非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル。
【図１５】ｔ２における試験１．２からの処方物Ｆ０９～Ｆ１６の非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル。
【図１６】２５℃でｔ２２におけるＲＰ　ＨＰＬＣによる純度をエンドポイントとして用いた場合のＰＬＳ１モデルに従うｐＨおよびクエン酸塩の効果。タンパク質濃度は５０ｍｇ／ｍＬに、アルギニンは１００ｍＭに、およびトレハロースは１１７ｍＭに固定した。
【図１７】２５℃でｔ２２におけるＲＰ　ＨＰＬＣによる純度をエンドポイントとして用いた場合のＰＬＳ１モデルに従うＰＳ　８０およびタンパク質濃度の効果。クエン酸塩は１０ｍＭ、ｐＨは６．０に、アルギニンは１００ｍＭに、およびトレハロースは１１７ｍＭに固定した。
【図１８】２５℃でｔ２２におけるＲＰ　ＨＰＬＣによる純度をエンドポイントとして用いた場合のＰＬＳ１モデルに従うアルギニンおよびトレハロースの効果。クエン酸塩は１０ｍＭに、ｐＨは６．０に、およびタンパク質濃度は５０ｍｇ／ｍＬに固定した。
【図１９】５℃および２５℃でｔ２２における二量体含量をエンドポイントとして用いた場合のＰＬＳ２モデルに従うｐＨおよびクエン酸塩の効果。タンパク質濃度は５０ｍｇ／ｍＬに、Ａｒｇは１００ｍＭに、およびトレハロースは１１７ｍＭに固定した。
【図２０】５℃および２５℃でｔ２２における二量体含量をエンドポイントとして用いた場合のＰＬＳ２モデルに従うＰＳ　８０およびタンパク質濃度の効果。クエン酸塩は１０ｍＭに、ｐＨは６．０に、Ａｒｇは１００ｍＭに、およびトレハロースは１１７ｍＭに固定した。
【図２１】５℃および２５℃でｔ２２における二量体含量をエンドポイントとして用いた場合のＰＬＳ２モデルに従うアルギニンおよびトレハロースの効果。クエン酸塩は１０ｍＭに、ｐＨは６．０に、タンパク質濃度は５０ｍｇ／ｍＬに固定した。
【図２２】５℃でｔ２２におけるｃＩＥＦによる主要ピーク純度をエンドポイントとして用いた場合のＰＬＳ１モデルに従うｐＨおよびクエン酸塩の効果。タンパク質濃度は５０ｍｇ／ｍＬに、Ａｒｇは１００ｍＭに、およびトレハロースは１１７ｍＭに固定した。
【図２３】５℃でｔ２２におけるｃＩＥＦによる主要ピーク純度をエンドポイントとして用いた場合のＰＬＳ１モデルに従うＰＳ　８０およびタンパク質濃度の効果。クエン酸塩を１０ｍＭに、ｐＨを６．０に、Ａｒｇを１００ｍＭに、およびトレハロースを１１７ｍＭに固定した。
【図２４】５℃でｔ２２におけるｃＩＥＦによる主要ピーク純度をエンドポイントとして用いた場合のＰＬＳ１モデルに従うアルギニンおよびトレハロースの効果。クエン酸塩を１０ｍＭに、ｐＨを６．０に、およびタンパク質濃度を５０ｍｇ／ｍＬに固定した。
【発明を実施するための形態】
【００１２】
発明の詳細な説明
定義
「ＧＬＰ－１アゴニスト組成物」は、本明細書で使用する場合、限定されるものではないが、インクレチンホルモンおよびインクレチン模倣剤を含め、インスリンの分泌の刺激、またはそうでなければインスリンのレベルの上昇が可能ないずれの組成物も意味する。
【００１３】
本明細書で使用する場合、「ＧＬＰ－１アゴニスト」および「ＧＬＰ－１受容体アゴニスト」およびＧＬＰ－１Ｒアゴニスト」は、ＧＬＰ－１受容体と結合することができ、かつ／または少なくとも１つのＧＬＰ－１活性を有するいずれの化合物も意味して、互換的に使用される。好適には、アルビグルチドは、ＧＬＰ－１アゴニストまたはＧＬＰ－１Ｒアゴニストと呼ばれ得る。
【００１４】
「インクレチンホルモン」は、本明細書で使用する場合、哺乳動物においてインスリン

分泌を増強するまたはそうでなければインスリンのレベルを上昇させるいずれのホルモンも意味する。インクレチンホルモンの一例はＧＬＰ－１である。ＧＬＰ－１は、食物の摂取に応答して腸管Ｌ細胞により分泌されるインクレチンホルモンである。健常な個体では、ＧＬＰ－１は、膵臓によるグルコース依存性インスリン分泌を刺激して末梢におけるグルコース吸収の増大をもたらすことによって食後血糖値を調節する重要な役割を果たす。ＧＬＰ－１はまた、グルカゴン分泌を抑制して、肝臓のグルコース生産の低下をもたらす。加えて、ＧＬＰ－１は、胃内容排出時間を遅らせ、小腸の運動を緩慢にして食物の吸収を遅らせる。ＧＬＰ－１は、グルコース依存性インスリン分泌に関与する遺伝子の転写を刺激することにより、また、β細胞新生を促進することにより、β細胞の能力の継続を促進する(Meier, et al. Biodrugs 2003; 17 (2): 93-102)。

【００１５】

「ＧＬＰ－１活性」は、本明細書で使用する場合、ヒトを含む哺乳動物に投与した際に、限定されるものではないが、血液および／または血漿グルコースの低下、グルコース依存性インスリン分泌の刺激またはそうでなければインスリンのレベル(the level or insulin)の上昇、グルカゴン分泌の抑制、フルクトサミンの低下、脳へのグルコース送達および代謝の増加、胃内容排出の遅延、およびβ細胞の能力の促進、および／または新生を含む天然ヒトＧＬＰ－１の活性のうち１以上を意味する。これらの活性およびＧＬＰ－１活性に関連する他の活性はいずれも、ＧＬＰ－１活性を有する組成物またはＧＬＰ－１アゴニストにより直接的または間接的に生じ得る。例として、ＧＬＰ－１活性を有する組成物は、哺乳動物において血漿グルコースレベルの低下を引き起こすインスリン生産を直接的または間接的に刺激し得る。当技術分野で理解されているように、ＧＬＰ－１活性は、様々な標準的手段によって測定することができる。ＧＬＰ－１活性は、ｉｎ　ｖｉｖｏおよび／またはｉｎ　ｖｉｔｒｏで測定することができる。例として、配列番号１で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドまたは配列番号１と９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％の配列同一性を有するポリペプチドのＧＬＰ－１活性は、哺乳動物への投与前後の血中または血漿グルコースレベルを測定するための標準的技術を用いて測定することができる。別の例として、配列番号１で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドまたは配列番号１と９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％の配列同一性を有するポリペプチドのＧＬＰ－１活性をｉｎ　ｖｉｔｒｏで測定することができる。

【００１６】

インスリン分泌の誘導を含む、その既知の細胞効果を媒介するＧＬＰ－１の能力は、その結合および続いてのＧＬＰ－１受容体の活性化に依存する。この活性化は、アデニル酸シクラーゼによる細胞内３’，５’－サイクリックアデノシン一リン酸（ｃＡＭＰ）生産の増加をもたらし、これはＥＬＩＳＡによって測定することができる。アルビグルチドは、ｃＡＭＰ生産の誘導を含め、感受性細胞に対して類似の効果を引き起こす。ヒトＧＬＰ－１受容体を安定発現するように操作されたＨＥＫ２９３Ｆ細胞株を用いたバイオアッセイは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいてＧＬＰ－１アゴニストの生物活性を決定するために使用することができる。このアッセイは、ＨＥＫ２９３Ｆ細胞で発現されるＧＬＰ－１受容体とアルビグルチドの結合が、ＥＬＩＳＡにより検出および定量可能な細胞内ｃＡＭＰレベルの上昇を引き起こすという原理に基づいている。有効濃度を比較することにより、試験サンプルの相対的能力である、試験サンプルに対するアルビグルチド参照標準の５０％（EC_{50}）が決定され得る。

【００１７】

アルビグルチドを含むＧＬＰ－１アゴニストは、天然ＧＬＰ－１または凍結乾燥ペレットから再構成されたアルビグルチドに対して相対的なＧＬＰ－１受容体結合活性を保持する。例えば、本発明の液体組成物中のアルビグルチドは、天然ＧＬＰ－１または凍結乾燥ペレットから再構成されたアルビグルチドの活性の少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、

９７％、９８％、９９％、または１００％活性を保持し得る（例えばｃＡＭＰ生産によって測定されるような再構成アルビグルチドに対するアルビグルチド液体組成物のＥＣ５０の逆比として計算される）。一実施形態において、液体組成物中のアルビグルチドは、再構成アルビグルチドに比べて同じ、１００％、９９％、９８％、９７％、９６％、９５％または９０％の活性（本明細書では「効力」という用語と同義的に使用される）を有する。好適には、本発明の液体組成物中のアルビグルチドは、天然ＧＬＰ－１または凍結乾燥ペレットから再構成されたアルビグルチドの活性の約９０％～１００％活性を保持し得る。

【００１８】

本明細書で使用する場合、限定されるものではないが、アルビグルチドを含むＧＬＰ－１アゴニストの「効力」は、ｉｎ　ｖｉｖｏおよび／またはｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて細胞アッセイでＧＬＰ－１受容体を活性化するための少なくとも１つのＧＬＰ－１活性を示すＧＬＰ－１アゴニストの能力を意味する。本明細書に記載されるように、また、当技術分野で理解されているように、アルビグルチドおよびその変異体を含むＧＬＰ－１アゴニストの効力は、いくつかのｉｎ　ｖｉｖｏおよびｉｎ　ｖｉｔｒｏ法によって測定することができる。本発明のいくつかの態様において、液体組成物のいずれかにおけるＧＬＰ－１アゴニストは、アルビグルチドの効力の約８０％～約１３０％の間を有し得る。いくつかの態様において、ＧＬＰ－１アゴニストは、アルビグルチドの効力の１３０％超を有し得る。いくつかの態様において、本発明の液体製剤中のＧＬＰ－１アゴニストの効力は、時間０とＴ１の間の差異としてそれ自体に対して測定することができる。加えて、またはあるいは、本発明の液体製剤中のＧＬＰ－１アゴニストの効力は、同じ処方物、同じ条件下、同じ時点でのアルビグルチドの効力に対して測定することができる。

【００１９】

「インクレチン模倣剤」は、本明細書で使用する場合、インスリン分泌を増強するまたはそうでなければそのインスリンのレベル(the level or insulin)を上昇させることができる化合物である。インクレチン模倣剤は、インスリン分泌の刺激、β細胞新生の増加、β細胞アポトーシスの阻害、グルカゴン分泌の阻害、胃内容排出の遅延および哺乳動物における安全性の誘導が可能であり得る。インクレチン模倣剤には、限定されるものではないが、限定されるものではないが、エキセンディン３およびエキセンディン４（その任意の断片および／または変異体および／またはコンジュゲートを含む）を含む、ＧＬＰ－１活性を有するいずれのポリペプチドも含まれる。

【００２０】

「血糖降下薬」は、本明細書で使用する場合、血糖を低下させることができる化合物を含んでなるいずれの化合物または組成物も意味する。血糖降下薬としては、限定されるものではないが、インクレチンホルモンまたはインクレチン模倣剤を含む任意のＧＬＰ－１アゴニスト、ＧＬＰ－１ならびに／またはその断片、変異体および／もしくはコンジュゲートを含み得る。他の血糖降下薬は、限定されるものではないが、インスリン分泌を増加させる薬物（例えば、スルホニル尿素（ＳＵ）およびメグリチニド）を含み、ＧＬＰ－１の破壊を阻害し（例えば、ＤＰＰ－ＩＶ阻害剤）、グルコースの利用度を高め（例えば、グリタゾン、チアゾリジンジオン（ＴＺＤ）および／またはｐＰＡＲアゴニスト）、肝臓のグルコース生産を低下させ（例えば、メトホルミン）、かつ、グルコース吸収を遅延させる（例えば、α－グルコシダーゼ阻害剤）。スルホニル尿素の例としては、限定されるものではないが、アセトヘキサミド、クロルプロパミド、トラザミド、グリピジド、グリクラジド、グリベンクラミド（グリブリド）、グリキドン、およびグリメピリドが挙げられる。グリタゾンの例としては、限定されるものではないが、ロシグリタゾンおよびピオグリタゾンが挙げられる。

【００２１】

「ポリヌクレオチド」は一般に、非改変ＲＮＡもしくはＤＮＡまたは改変ＲＮＡもしくはＤＮＡであり得るいずれのポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドも意味する。「ポリヌクレオチド」には、限定されるものではないが、一本鎖および二本

鎖ＤＮＡ、一本鎖領域と二本鎖領域のまたは一本鎖領域と二本鎖領域を三本鎖領域の混合物であるＤＮＡ、一本鎖および二本鎖ＲＮＡ、ならびに一本鎖領域と二本鎖領域の混合物であるＲＮＡ、一本鎖領域もしくは、より一般には、二本鎖領域、もしくは三本鎖領域、または一本鎖領域と二本鎖領域の混合物であり得るＤＮＡとＲＮＡを含んでなるハイブリッド分子が含まれる。加えて、「ポリヌクレオチド」は、本明細書で使用する場合、ＲＮＡもしくはＤＮＡまたはＲＮＡとＤＮＡの両方を含んでなる三本鎖領域を意味する。このような領域の鎖は、同じ分子に由来してもまたは異なる分子に由来してもよい。これらの領域は、これらの分子の１以上の総てを含んでもよいが、より一般には、これらの分子の一部の領域のみを含む。三重らせん領域の分子のうちの１つは、多くの場合、オリゴヌクレオチドである。本明細書で使用する場合、用語「ポリヌクレオチド」はまた、１以上の改変塩基を含んでなる上記のようなＤＮＡまたはＲＮＡも含む。よって、安定性のためにまたはその他の理由で改変された骨格を有するＤＮＡまたはＲＮＡは、その用語が本明細書に含まれる場合、「ポリヌクレオチド」である。さらに、２つだけ例を挙げると、イノシンなどの希少な塩基、またはトリチル化塩基などの改変塩基を含んでなるＤＮＡまたはＲＮＡは、その用語が本明細書で使用される場合、ポリヌクレオチドである。ＤＮＡおよびＲＮＡに対して、当業者に公知の多くの有用な目的を果たす極めて多様な改変が行われてきたことが認識されるであろう。用語「ポリヌクレオチド」は、それが本明細書で使用される場合、ポリヌクレオチドのこのような化学的、酵素的または代謝的改変形態、ならびにウイルスおよび細胞（例えば、単純な細胞および複雑な細胞を含む）に特徴的なＤＮＡおよびＲＮＡの化学形態を包含する。「ポリヌクレオチド」はまた、しばしばオリゴヌクレオチドと呼ばれる短いポリヌクレオチドを包含する。

【００２２】

「ポリペプチド」は、ペプチド結合または改変ペプチド結合により互いに連結された２以上のアミノ酸、すなわち、ペプチド等価体を含んでなるいずれのペプチドまたはタンパク質も意味する。「ポリペプチド」は、一般にペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマーと呼ばれる短鎖と、一般にタンパク質と呼ばれる長鎖の両方を意味する。ポリペプチドは、２０の遺伝子コードアミノ酸以外のアミノ酸も含み得る。「ポリペプチド」は、翻訳後プロセシングなどの天然のプロセスにより、または当技術分野で周知の化学修飾技術により改変されたアミノ酸配列を含む。このような改変は、基礎的教本、およびより詳しい単行書、ならびに多数の研究論文に十分に記載されている。改変は、ペプチドのいずれの場所に生じることもできる。同じタイプの改変が所与のポリペプチドのいくつかの部位において同じ程度でまたは異なる程度で存在してもよい。また、所与のポリペプチドが多くのタイプの改変を含んでもよい。ポリペプチドは、ユビキチン化の結果として分岐してもよく、ポリペプチドは分岐のあるまたは分岐のない環状であってもよい。環状、分岐および分岐環状ポリペプチドは翻訳後の天然プロセスから生じてもよく、または合成法により作製されてもよい。改変には、アセチル化、アシル化、ＡＤＰ－リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスホチジルイノシトール(phosphotidylinositol)の共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合的架橋の形成、システインの形成、ピログルタミン酸塩の形成、ホルミル化、γ－カルボキシル化、グリコシル化、ＧＰＩアンカー形成、水酸化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解性プロセシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニン化、およびユビキチン化などの転移ＲＮＡを介したタンパク質へのアミノ酸付加が含まれる。例えば、PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES,第2版, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993およびWold, F., Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, pgs. 1-12, POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson編, Academic Press, New York, 1983; Seifter, et al., “Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors”, Meth. Enzymol. (1990) 182:626-646およびRattan, et al., “Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging”, Ann NY Ac

ad Sci (1992) 663:48-62参照。

【００２３】

「変異体」は、この用語が本明細書で使用される場合、それぞれ参照ポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは異なるが、参照ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの生物活性を保持するなど本質的な特性を保持するポリヌクレオチドまたはポリペプチドである。ポリヌクレオチドの典型的な変異体は、別の参照ポリヌクレオチドとはヌクレオチド配列が異なる。変異体のヌクレオチド配列の変化は、参照ポリヌクレオチドによりコードされているポリペプチドのアミノ酸配列を変更しても変更しなくてもよい。ヌクレオチド変化は、以下に述べるように、参照配列によりコードされているポリペプチドにアミノ酸の置換、付加、欠失、融合および末端切断をもたらし得る。ポリペプチドの典型的な変異体は、別の参照ポリペプチドとはアミノ酸配列が異なる。一般に、差異は、参照ポリペプチドと変異体の配列が全体的に密接に類似し、多くの領域で同一であるように制限される。変異体と参照ポリペプチドは、任意の組合せの１以上の置換、付加、欠失によりアミノ酸配列が異なり得る。置換または挿入されたアミノ酸残基は、遺伝コードによりコードされているものであってもなくてもよい。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変異体は、対立遺伝子変異体などの天然に存在するものであってよく、それは天然に存在することが知られていない変異体であってもよい。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの天然に存在しない変異体は、突然変異誘発技術により、または直接的合成により作製され得る。変異体にはまた、限定されるものではないが、そのアミノ酸側基の１以上の化学修飾を有するポリペプチドまたはその断片も含み得る。化学修飾には、限定されるものではないが、化学部分の付加、新たな結合の作出、および化学部分の除去が含まれる。アミノ酸側基における修飾には、限定されるものではないが、リシン－ε－アミノ基のアシル化、アルギニン、ヒスチジン、またはリシンのＮ－アルキル化、グルタミン酸またはアスパラギン酸カルボン酸基のアルキル化、およびグルタミンまたはアスパラギンの脱アミド化が含まれる。末端アミノ基の修飾には、限定されるものではないが、デス－アミノ、Ｎ－低級アルキル、Ｎ－ジ－低級アルキル、およびＮ－アシル修飾が含まれる。末端カルボキシ基の修飾には、限定されるものではないが、アミド、低級アルキルアミド、ジアルキルアミド、および低級アルキルエステル修飾が含まれる。さらに、１以上の側基、または末端基は、通常の技能を有するタンパク質化学者に公知の保護基により保護されてもよい。

【００２４】

本明細書で使用する場合、「断片」は、ポリペプチドを参照して使用する際には、天然ポリペプチド全体のアミノ酸配列の総てではなく一部が同じアミノ酸配列を有するポリペプチドである。断片は、「独立型」またはより大きいポリペプチド内に含まれてもよく、その中でそれは単一のより大きいポリペプチドの単一の連続した領域としての一部を形成する。よって、ＧＬＰ－１の断片は、「独立型」であってもよいし、または遺伝的に融合され、より大きいアミノ酸配列の一部であってもよい。例として、天然ＧＬＰ－１の断片は、天然アミノ酸１～３６のうちアミノ酸７～３６を含むであろう。さらに、ポリペプチドの断片はまた、天然の部分配列の変異体であってもよい。例えば、天然ＧＬＰ－１のアミノ酸７～３６を含んでなるＧＬＰ－１の断片は、８番のＡｌａからＧｌｙへなど、その部分配列内にアミノ酸置換を有する変異体であってもよい。

【００２５】

本明細書で使用する場合、「コンジュゲート」または「コンジュゲートされた」とは、互いに結合された２つの分子を意味する。例えば、第１のポリペプチドは第２のポリペプチドに供給結合的にまたは非共有結合的に結合されてよい。第１のポリペプチドは、第２のポリペプチドに化学リンカーによって供給結合的に結合されてもよく、または遺伝的に融合されてもよく、この場合には、第１と第２のポリペプチドは共通のポリペプチド主鎖を有する。本明細書に記載のＧＬＰ－１ポリペプチドはいずれも、アルブミンおよび／もしくはその断片またはヒトＦｃ領域、例えば、改変ＩｇＧ４または改変ＩｇＧ１など、別の安定化ポリペプチドにリンカーにより結合することができる。

【００２６】

本明細書で使用する場合、「直列に配向した」とは、同じ分子の一部として互いに隣接している２以上のポリペプチドを意味する。それらは共有結合的または非共有結合的に連結されてよい。２以上の直列に並んだポリペプチドは、同じポリペプチド主鎖の一部を形成してもよい。直列に配向したポリペプチドは順配向または逆配向を有してよく、かつ／または他のアミノ酸配列により分離されていてもよい。

【００２７】

本明細書で使用する場合、「アルビグルチド」または「ＡＬＢ」は、２コピーの３０アミノ酸の配列の改変型ヒトグルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ－１、断片７～３６（Ａ８Ｇ））が組換えヒト血清アルブミンと直列に遺伝的に融合されたものからなる組換え融合タンパク質を意味する。アルビグルチドのアミノ酸配列は以下に配列番号１として示される。

【００２８】

【化１】

```
HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRHGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR 60
DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAE 120
NCDKSLHTL FGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPE 180
VDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLL 240
PKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT 300
KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMP 360
ADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEK 420
CCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVS 480
TPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTE 540
SLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKA 600
TKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL               674
```

（配列番号１）

【００２９】

本明細書で使用する場合、血中または血漿グルコースを「低下させる("reduce" or "reducing"）」とは、血糖降下薬の投与後の患者の血中または血漿に見られる血糖量の低下を意味する。血中または血漿グルコースの低下は、個体ごとにまたは対象の群の平均変化として測定および評価することができる。加えて、血中または血漿グルコースの平均低下は、処置した対象の群に関して、基準線からの平均変化としておよび／またはプラセボを投与した対象の血中または血漿グルコースにおける平均変化と比較した平均変化として測定および評価することもできる。

【００３０】

本明細書で使用する場合、「ＧＬＰ－１活性を増強する」とは、天然ＧＬＰ－１に関連する活性のいずれかおよび総ての増強を意味する。例として、ＧＬＰ－１活性の増強は、ＧＬＰ－１活性を有する少なくとも１つのポリペプチドを対象に投与した後に測定し、ＧＬＰ－１活性を有するポリペプチドの投与前の同じ対象のＧＬＰ－１活性と比較するか、プラセボを投与した第２の対象と比較することができる。

【００３１】

本明細書で使用する場合、「血糖上昇に関連する疾患」には、限定されるものではないが、１型および２型糖尿病、グルコース不耐症、および高血糖症が含まれる。

【００３２】

本明細書で使用する場合、「併用投与」または「併用投与する」とは、２種以上の化合物または同じ化合物の２以上の用量を同じ患者に投与することを意味する。このような化合物の併用投与は、同時またはほぼ同時点（例えば、同じ時間内）であってよく、または併用投与は互いに数時間内もしくは数日内であってもよい。例えば、第１の化合物が週に１回投与され、一方、第２の化合物は毎日併用投与されてよい。

【００３３】

本明細書で使用する場合、「最大血漿濃度」または「Ｃｍａｘ」は、ある物質（例えば、ＧＬＰ－１活性を有するポリペプチドまたはＧＬＰ－１アゴニスト）を哺乳動物に投与した後の、哺乳動物血漿におけるその物質の最高観測濃度を意味する。

【００３４】

本明細書で使用する場合、「曲線下面積」または「ＡＵＣ」は、時間に対する、ある物質の血漿中の濃度のプロットにおける曲線下面積である。ＡＵＣは、ある時間間隔中の瞬間的濃度の積分の指標であり得、質量×時間／容量の単位を有し、これはまたモル濃度×時間、例えば、ｎＭ×日としても表すことができる。ＡＵＣは一般に、台形法（例えば、線形、線形－対数）によって計算される。ＡＵＣは、通常、０から無限大の時間間隔で示され、他の時間間隔は表示される（例えば、ＡＵＣ（ｔ１，ｔ２）の場合、ｔ１およびｔ２はその間隔の開始時間と終了時間である）。よって、本明細書で使用する場合、「AUC_{0-24h}」は、２４時間の期間のＡＵＣを意味し、「AUC_{0-4h}」は、４時間の期間のＡＵＣを意味する。

【００３５】

本明細書で使用する場合、「加重平均ＡＵＣ」とは、ＡＵＣをＡＵＣが計算される期間で割った商である。例えば、加重平均AUC_{0-24h}は、AUC_{0-24h}を２４時間で割った商を表すと考えられる。

【００３６】

本明細書で使用する場合、「信頼区間」または「ＣＩ」は、ある測定または試験が所与の確率ｐに相当する区間であり、ここで、ｐは、９０％または９５％ＣＩを意味し、算術平均、幾何平均、または最小二乗平均のいずれかで計算される。本明細書で使用する場合、幾何平均は、累乗法により逆変換した自然対数変換値の平均であり、最小二乗平均は、同様に幾何平均であってもなくてもよいが、固定された効果を用いる分散分析（ＡＮＯＶＡ）モデルから導出される。

【００３７】

本明細書で使用する場合、「変動係数（ＣＶ）」は、分散の指標であり、平均に対する標準偏差の比として定義される。変動係数は、上記の計算値に１００をかけることによりパーセンテージ（％）として報告される（％ＣＶ）。

【００３８】

本明細書で使用する場合、「用量」は、ヒトを含む哺乳動物に投与され得る治療化合物のいずれの量も意味する。有効用量は、治療化合物の意図される効果のうち少なくとも１つを誘導するために十分な量である、化合物の用量である。例えば、ＧＬＰ－１アゴニストの有効用量は、ヒトに投与した場合にヒトにおいて少なくとも１つのタイプのＧＬＰ－１活性、例えば、限定されるものではないが、前記ヒトにおけるインスリン生産の増加を誘導する。当技術分野で理解されているように、治療化合物の有効用量は、代用エンドポイントによって測定することができる。よって、別の例として、ＧＬＰ－１アゴニストの有効用量は、ヒトにおいて血清グルコースを低下させるその能力により測定することができる。

【００３９】

本明細書で使用する場合、「緩衝剤」または「バッファー」およびその文法的変形は、液体組成物のｐＨを維持する働きをし得る溶液のいずれの成分も意味する。好適には、緩衝剤またはバッファーは、任意の薬学上許容可能な注射用バッファーであり得る。緩衝剤の例としては、限定されるものではないが、クエン酸バッファー（例えば、クエン酸一ナトリウム－クエン酸二ナトリウム混合物、クエン酸－クエン酸三ナトリウム混合物、クエン酸－クエン酸一ナトリウム混合物など）、コハク酸バッファー（例えば、コハク酸－コハク酸一ナトリウム混合物、コハク酸－水酸化ナトリウム混合物、コハク酸－コハク酸二ナトリウム混合物など）、酒石酸バッファー（例えば、酒石酸－酒石酸ナトリウム混合物、酒石酸－酒石酸カリウム混合物、酒石酸－水酸化ナトリウム混合物など）、フマル酸バッファー（例えば、フマル酸－フマル酸一ナトリウム混合物、フマル酸－フマル酸二ナトリウム混合物、フマル酸一ナトリウム－フマル酸二ナトリウム混合物など）、グルコン酸

バッファー（例えば、グルコン酸－グルコン酸ナトリウム混合物、グルコン酸－水酸化ナトリウム混合物、グルコン酸－グルコン酸カリウム混合物など）、シュウ酸バッファー（例えば、シュウ酸－シュウ酸ナトリウム混合物、シュウ酸－水酸化ナトリウム混合物、シュウ酸－シュウ酸カリウム混合物など）、乳酸バッファー（例えば、乳酸－乳酸ナトリウム混合物、乳酸－水酸化ナトリウム混合物、乳酸－乳酸カリウム混合物など）、リン酸バッファー（リン酸第一ナトリウム／リン酸第二ナトリウム）および酢酸バッファー（例えば、酢酸－酢酸ナトリウム混合物、酢酸－水酸化ナトリウム混合物など）が挙げられる。加えて、ヒスチジンまたはヒスチジンＨＣｌおよびグリセリンも緩衝剤として使用可能である。好適には、バッファーは、液体組成物を約５．７～約６．２、または約５．８～約６．１、または約５．９～約６．０の所望のｐＨ範囲内に維持する。好適には、バッファーは、本発明の水性液体組成物を約５．９のｐＨに維持する。緩衝剤の濃度は、本発明の液体組成物のｐＨを維持するために調整する必要がある。好適には、バッファーは、リン酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、コハク酸ナトリウム、炭酸ナトリウムおよび酢酸ナトリウムから選択される。

【００４０】

本明細書で使用する場合。「糖」は、注射用として薬学上許容可能な安定化糖を意味する。好適には、二糖類としては、スクロース、ラクツロース、ラクトース、マルトース、トレハロース、ラフィノース、またはセロビオース、および／またはそれらの混合物が含まれる。他の企図される二糖類としては、コージビオース、ニゲロース、イソマルトース、ββ－トレハロース、αβ－トレハロース、ソホロース、ラミナリビオース、ゲンチオビオース、ツラノース、マルツロース、パラチノース、ゲンチオビウロース(gentiobiulose)、マンノビオース、メリビオース、メリビウロース(melibiulose)、ルチノース、ルチヌロース(rutinulose)、およびキシロビオースが含まれる。糖には、限定されるものではないが、二糖、単糖または多糖が含まれる。用語「糖」は、総ての糖を意味して使用され得る。二糖は、例えば、スクロースまたはトレハロース、またはそれらの混合物であり得る。好適には、糖(saccharide or a sugar)は、本発明の液体組成物中で安定化剤としても働き得る。本発明のいくつかの態様において、トレハロースは、トレハロース二水和物である。他の態様において、トレハロースはトレハロース一水和物である。

【００４１】

本明細書で使用する場合、用語「ポリオール」は、いずれの糖アルコールも意味する。ポリオールの例としては、限定されるものではないが、マンニトール、マルチトール、ソルビトール、キシリトール、エリトリトール、およびイソマルトが挙げられる。糖アルコールは、それらの類似糖から温和な還元条件下で生成され得る。好適には、ポリオールはまた、本発明の液体組成物中で安定化剤としても働き得る。

【００４２】

用語「賦形剤」は、加工および／または保存中に、バルク特性の変更、安定性の改善および／またはモル浸透圧濃度の調整の目的で液体組成物に添加されるいずれの化合物も意味する。

【００４３】

用語「安定化剤」または「安定剤」は、限定されるものではないがアルビグルチドなどの有効成分の安定性を改善する、またはそうでなければ高める賦形剤を意味する。本明細書で使用する場合、「安定化剤」または「安定剤」は、本発明の液体組成物中でアルビグルチドなどのＧＬＰ－１ポリペプチドの凝集を防ぐことができるいずれの薬剤も意味する。安定化剤には、限定されるものではないが、アルギニンＨＣｌおよびヒスチジンＨＣｌが含まれる。好適には、オクタン酸ナトリウムは安定剤としても働き得る。用語「安定化剤」は、ポリペプチドを含んでなる組成物の保存または生産中にポリペプチドを安定化させることができる物質、または物質の混合物を包含することが意図される。加えて、糖(saccharides and sugars)、一般に、ポリオール、一般に、トレハロース、マンニトール、オクタン酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、コハク酸ナトリウム、および限定されるものではないがポリソルベート８０を含む界面活性剤も安定剤として働き得る。例えば、ア

ルギニンおよびトレハロースは双方とも同じ液体組成物中で安定剤として働くことができ、協調安定剤とも呼ばれる。

【００４４】

用語「安定性」または「安定」およびその文法的変形は、アルビグルチドまたはその変異体の少なくとも１つのＧＬＰ－１活性の相対的時間的不変性を意味する。用語「安定化」は、組成物の保存または生産中に、生物活性およびポリペプチド安定性の実質的保持が維持されるようにポリペプチドの凝集物（不溶性および／または可溶性）の形成および／または化学的変性および／またはタンパク質の脱フォールディングを最小化することを包含することを意図する。

【００４５】

用語ＧＬＰ－１ポリペプチドの「物理的安定性」は、ＧＬＰ－１ポリペプチドの二量体、オリゴマーおよびポリマー形態での不溶性および／または可溶性凝集物の形成、ならびに分子のいずれの構造的変形および変性にも関連する。

【００４６】

用語「化学的安定性」は、加速化条件において溶解または固体状態で保存した際のＧＬＰ－１ポリペプチドのいずれの化学的変化の形成にも関連するものとする。例として、加水分解、脱アミド化および酸化がある。特に、硫黄含有アミノ酸は、対応するスルホキシドの形成を伴う酸化を受けやすい。用語「化学的安定性」には、ポリペプチド骨格の化学変性、例えば、タンパク質分解に対する耐性も含む。

【００４７】

タンパク質を安定化させるための賦形剤は一般に、Manning et al., "Stability of protein pharmaceuticals," Pharmaceutical Research, 6:903-918 (1989); Wang et al., "Review of excipients and pH's for parenteral products used in the United States," Journal of Parenteral Drug Association, 34:452-462 (1980); Wang et al., "Parenteral formulations of proteins and peptides: stability and stabilizers," Journal of Parenteral Science & Technology, 42:S4-S26 (1988); Cleland et al., "The Development of Stable Protein Formulations: A Close Look at Protein Aggregation, Deamidation, and Oxidation", Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, vol. 10(4), pp. 307-377 (1993)に記載されている。

【００４８】

本明細書で使用する場合、「界面活性剤」は、液体組成物の表面張力を低下させるいずれの成分も意味する。界面活性剤は、イオン性または非イオン性であり得る。好適な注射用界面活性剤には、限定されるものではないが、ポリソルベート８０、ポリソルベート２０、およびプルロニックＦ６８が含まれる。好適には、界面活性剤はまた、本発明の液体組成物中で安定化剤としても働き得る。

【００４９】

本発明は、アルビグルチド、緩衝剤、少なくとも１種の糖および／または少なくとも１種のポリオール、少なくとも１種の安定化剤および場合により界面活性剤を含んでなる液体組成物を提供し、前記アルビグルチドは前記液体組成物中で安定を保つ。一実施形態において、緩衝剤は、任意の本発明の液体組成物中にクエン酸ナトリウムを含んでなる。一実施形態において、緩衝剤は、クエン酸ナトリウムからなる。クエン酸ナトリウムは好適には、任意の本発明の液体組成物中、クエン酸塩約５ｍＭ～約１５ｍＭの濃度である。クエン酸ナトリウムは、任意の本発明の液体組成物中、クエン酸塩約１０ｍＭの濃度である。一態様において、液体組成物のｐＨは、クエン酸塩濃度が１０ｍＭを越える場合には、約５．５～約５．７の間である。別の態様において、クエン酸塩濃度が本発明の液体組成物中クエン酸塩１０ｍＭである場合には、ｐＨは約５．９である。

【００５０】

一態様において、緩衝剤は、任意の本発明の液体組成物中にコハク酸クエン酸塩を含んでなる。一実施形態において、緩衝剤は、コハク酸塩からなる。コハク酸塩は、任意の本発明の液体組成物中、約５ｍＭ～約１０ｍＭの濃度であり得る。

【００５１】
一実施形態において、本発明の液体組成物は、糖を含んでなる。一実施形態において、糖は、トレハロースを含んでなる。一実施形態において、糖は、トレハロースからなる。トレハロースは、任意の本発明の液体組成物中、約７２ｍＭ～約２０７ｍＭの濃度であり得る。いくつかの態様において、トレハロースは、約７５ｍＭ、８０ｍＭ、８５ｍＭ、９０ｍＭ、９５ｍＭ、１００ｍＭ、１０５ｍＭ、１１０ｍＭ、１１５ｍＭ、１２０ｍＭ、または１２５ｍＭの濃度であり得る。好適には、トレハロースは、液体組成物中、約１００ｍＭ～約１４０ｍＭまたは約１００ｍＭ～約１２０ｍＭの範囲の濃度であり得る。一態様において、トレハロースは、前記液体組成物中、約１１７ｍＭの濃度である。一実施形態において、液体組成物は、糖を含んでなるが、ポリオールは含まない。一実施形態において、液体組成物は、ポリオールを含んでなり、糖は含まない。一実施形態において、液体組成物は、糖およびポリオールの両方を含んでなる。

【００５２】
一実施形態において、安定化剤は、任意の本発明の液体組成物中にアルギニンを含んでなる。一態様において、安定化剤はアルギニンである。好適には、アルギニンは、任意の本発明の液体組成物中、約５０ｍＭ～約１２５ｍＭの濃度である。一態様において、アルギニンは、約４５ｍＭ、５０ｍＭ、５５ｍＭ、６０ｍＭ、７０ｍＭ、７５ｍＭ、８０ｍＭ、８５ｍＭ、９０ｍＭ、９５ｍＭ、１００ｍＭ、１０５ｍＭ、１１０ｍＭ、１１５ｍＭ、１２０ｍＭ、１２５ｍＭまたは１３０ｍＭの濃度であり得る。好適には、アルギニンは、液体組成物中、約９０ｍＭ～約１１０ｍＭの範囲の濃度であり得る。好適には、アルギニン濃度は、液体組成物中、約８０ｍＭ～１２０ｍＭの範囲であり得る。アルギニンは、任意の本発明の液体組成物中、約１００ｍＭの濃度であり得る。

【００５３】
別の態様において、安定化剤は、ヒスチジンを含んでなる。一態様において、ヒスチジンは、任意の本発明の液体組成物中、約５０ｍＭ～約１２５ｍＭの濃度である。好適には、ヒスチジンは、液体組成物中、約９０ｍＭ～約１１０ｍＭの範囲の濃度であり得る。好適には、ヒスチジン濃度は、任意の本発明の液体組成物中、約８０ｍＭ～１２０ｍＭの範囲であり得る。一態様において、ヒスチジンは、任意の本発明の液体組成物中、約１００ｍＭの濃度である。

【００５４】
一実施形態において、液体組成物は、界面活性剤を含んでなる。界面活性剤は、ポリソルベート８０である。ポリソルベート８０は、任意の本発明の液体組成物中、約０．００５％ｗ／ｗ～約０．０２％ｗ／ｗである。ポリソルベート８０は、任意の本発明の液体組成物中、０．０１％ｗ／ｗの濃度である。

【００５５】
一実施形態において、本発明の液体組成物は、メチオニンおよび／またはＥＤＴＡをさらに含んでなる。好適には、本発明の液体組成物は、注射水を含んでなる。

【００５６】
一実施形態において、液体組成物は、ポリオールを含んでなる。一実施形態において、ポリオールは、マンニトールを含んでなる。一実施形態において、ポリオールは、マンニトールからなる。一実施形態において、液体組成物は、ポリオールを含んでなるが、糖は含まない。

【００５７】
好適には、アルビグルチドは、任意の本発明の液体組成物中に約３０ｍｇ／ｍＬ～約１００ｍｇ／ｍＬの濃度で存在する。アルビグルチドは、任意の本発明の液体組成物中に約６０ｍｇ／ｍＬの濃度で存在する。アルビグルチドは、任意の本発明の液体組成物中に、約５０ｍｇ／ｍＬの濃度で存在する。好適には、アルビグルチドは、約３０ｍｇ／ｍＬ、３５ｍｇ／ｍＬ、４０ｍｇ／ｍＬ、４５ｍｇ／ｍＬ、５０ｍｇ／ｍＬ、５５ｍｇ／ｍＬ、６０ｍｇ／ｍＬまたは６５ｍｇ／ｍＬで存在し得る。好適には、アルビグルチドは、約４０ｍｇ／ｍＬ～約８０ｍｇ／ｍＬまたは約５０ｍｇ／ｍＬ～約７０ｍｇ／ｍＬで存在し得

る。いくつかの態様において、アルビグルチドは、精製後、処方前に熱処理される。

【００５８】

一態様において、本発明の液体組成物は約５．０～６．５の間のｐＨを有する。好適には、液体組成物のｐＨは、約５．５～約６．２の範囲であり得る。好適には、液体組成物のｐＨは、約５．５～約５．９である。一態様において、ｐＨは約５．５～約５．７である。一態様において、液体組成物は、約５．９のｐＨを有する。

【００５９】

一実施形態において、本発明の液体組成物中のアルビグルチドの少なくとも≧９０％、≧９５％、≧９６％、≧９７％、好適には≧９８％、好適には≧９９％、好適には１００％が任意の本発明の液体組成物中で単量体として残存する。単量体としてのアルビグルチドの安定性は、当技術分野で公知であり、本明細書に示される実施例に記載されている様々な技術によって測定することができる。本明細書に記載されているように、アルビグルチドは、光から保護される場合に、室温で保存すると最大１週間、約２℃～約８℃で保存すると最大１２か月、１８か月および２４か月、本発明の液体組成物中で単量体として残存するであろう。別の態様において、前記液体組成物中のアルビグルチドは、少なくとも１つのＧＬＰ－１活性を有し、前記少なくとも１つのＧＬＰ－１活性を、少なくとも１２か月、少なくとも９０％の効力で維持する。一実施形態において、本発明の液体製剤は、光から保護される。

【００６０】

一実施形態において、本発明は、配列番号１で示されるポリペプチドと少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％の配列同一性を有するポリペプチドまたはＣ末端および／またはＮ末端で末端切断された、配列番号１で示されるポリペプチドと少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％の配列同一性を有するポリペプチド、少なくとも１種の緩衝剤、少なくとも１種の糖および／または少なくとも１種のポリオール、少なくとも１種の安定化剤および場合により少なくとも１種の界面活性剤を含んでなる液体組成物を提供し、前記ポリペプチドは、前記液体組成物中で安定を保つ。一態様において、ポリペプチドは、配列番号１または配列番号１と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％の配列同一性を有するポリペプチドと全配列にわたって比較した場合にＮ末端で１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のアミノ酸が末端切断されている。一態様において、ポリペプチドは、配列番号１または配列番号１と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％の配列同一性を有するポリペプチドと全配列にわたって比較した場合にＣ末端で１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のアミノ酸が末端切断されている。

【００６１】

一態様において、本ポリペプチドは、配列番号１で示されるポリペプチドと１００％の配列同一性を有する。一態様において、液体組成物は、界面活性剤を含んでなる。一態様において、液体組成物は、クエン酸ナトリウム、トレハロース、アルギニン、ポリソルベート８０および水を含んでなり、前記組成物は約５．９のｐＨを有する。一態様において、本ポリペプチドは、前記液体組成物中、約３０ｍｇ／ｍＬ～約１００ｍｇ／ｍＬの濃度であり、好適には前記ポリペプチドの濃度は約６０ｍｇ／ｍＬであり、好適には前記ポリペプチドの濃度は約５０ｍｇ／ｍＬである。

【００６２】

一実施形態において、本発明は、配列番号１で示されるポリペプチドと少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％の配列同一性を有するポリペプチドまたはＣ末端および／またはＮ末端で末端切断された、配列番号１で示されるポリペプチドと少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％の配列同一

性を有するポリペプチド約３０ｍｇ／ｍＬ～約１００ｍｇ／ｍＬ、約１１０ｍＭ～約１４０ｍＭのトレハロース、９０ｍＭ～約１１０ｍＭのアルギニン、５ｍＭ～約１５ｍＭのクエン酸ナトリウム、および０．０１％ｗ／ｗのポリソルベート８０を含んでなる液体組成物を提供し、前記組成物は約５．５～約６．０のｐＨを有する。一実施形態において、液体組成物は、配列番号１で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド約５０ｍｇ／ｍＬを含んでなる。一実施形態において、液体組成物は、配列番号１で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド５０ｍｇ／ｍＬ、１１７ｍＭのトレハロース、１００ｍＭのアルギニン、１０ｍＭのクエン酸ナトリウム、０．０１％ｗ／ｗのポリソルベート８０および注射水からなり、前記組成物は約５．９のｐＨを有する。

【００６３】

本発明はまた、液体組成物を提供し、前記液体組成物は、配列番号１と少なくとも９０％の配列同一性を有するポリペプチドを含んでなり、前記ポリペプチドは、少なくとも１つのＧＬＰ－１活性を有し、前記ＧＬＰ－１活性を前記液体組成物中で少なくとも１週間維持する。一態様において、前記ポリペプチドの少なくとも９６％が、任意の本発明の液体組成物中で少なくとも１週間、単量体として残存する。一態様において、本ポリペプチドは、前記少なくとも１つのＧＬＰ－１活性を、任意の本発明の液体組成物中で少なくとも１２か月、少なくとも９０％の効力で維持する。一実施形態において、本ポリペプチドは、光から保護される場合に、組成物が約２℃～約８℃で維持されると少なくとも１２か月、任意の本発明の液体組成物中で安定を保つ。

【００６４】

本発明はまた、ＧＬＰ－１アゴニストを含んでなる液体組成物を提供し、前記ＧＬＰ－１アゴニストは、任意の本発明の液体組成物中で少なくとも1年間、安定を保ち、少なくとも１つのＧＬＰ－１活性を有する。液体組成物は、クエン酸ナトリウム、トレハロース、アルギニン、ポリソルベート８０および水をさらに含んでなり得る。

【００６５】

また、配列番号１で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド約３０ｍｇ／ｍＬ～約１００ｍｇ／ｍＬ、１１７ｍＭのトレハロース、１００ｍＭのアルギニン、１０ｍＭのクエン酸ナトリウム、および０．０１％ｗ／ｗのポリソルベート８０を含んでなる液体組成物も提供され、前記組成物は約５．９のｐＨを有する。好適には、前記液体組成物は、配列番号１で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド約６０ｍｇ／ｍＬを含んでなる。好適には、本発明の液体組成物は、配列番号１で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド約５０ｍｇ／ｍＬを含んでなる。

【００６６】

一実施形態において、配列番号１で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド５０ｍｇ／ｍＬ、１１７ｍＭのトレハロース、１００ｍＭのアルギニン、１０ｍＭのクエン酸ナトリウム、０．０１％ｗ／ｗのポリソルベート８０および注射水からなる液体組成物が提供され、前記組成物は約５．９のｐＨを有する。

【００６７】

一実施形態において、配列番号１で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド５０～７０ｍｇ／ｍＬ、１００～１４０ｍＭのトレハロース、９０～１１０ｍＭのアルギニン、９～１１ｍＭのクエン酸ナトリウム、０．０１％ｗ／ｗのポリソルベート８０および注射水からなる液体組成物が提供され、前記組成物は約５．５～約６．０のｐＨを有する。

【００６８】

一実施形態において、液体組成物は、糖を含んでなるが、ポリオールは含まない。本発明の一実施形態において、液体組成物の糖はポリオールで置換される。好適な例としては、限定されるものではないが、マンニトール　マルチトール、ソルビトール、キシリトール、エリトリトール、およびイソマルトが挙げられる。一実施形態において、液体組成物はマンニトールを含んでなる。

【００６９】

ある実施形態において、方法は、ヒトにおいて代謝障害を処置するための方法であって

、本発明の液体組成物のヒトへの液体組成物の投与を含んでなる方法が提供される。代謝障害は、２型糖尿病（Ｔ２ＤＭ）である。いくつかの態様において、液体組成物は、ペン型注射デバイスを介してヒトの皮下に投与される。一実施形態において、液体組成物は、充填済みシリンジに含まれ、液体組成物はオートインジェクターデバイスを用いて投与され得る。いくつかの態様において、オートインジェクターデバイスは、２８、２９、３０またはそれより大きいゲージ（より小さい開口を示す）を有する。別の実施形態において、デバイスは、オートインジェクターである。一態様において、デバイスは、２９ゲージ（Ｇ）の針を備える。一態様において、液体組成物は、それを必要とするヒトに血糖管理を提供するために使用される。好適には、前記ヒトに任意の本発明の液体組成物を投与することを含んでなる、Ｔ２ＤＭを有するヒトに血糖管理を提供するための方法が提供される。

【００７０】

本発明はまた、代謝障害の処置において使用するための液体組成物を提供し、例えば、血糖上昇に関連する疾患には、限定されるものではないが、１型および２型糖尿病、グルコース不耐症、および高血糖症が含まれる。

【００７１】

さらなる実施形態において、本発明は、代謝障害、例えば、１型および２型糖尿病、グルコース不耐症、および高血糖症を含む血糖上昇に関連する疾患を処置するための薬剤の製造において使用するための本発明の液体組成物を提供する。

【００７２】

本発明の実施形態は、ポリペプチドを含んでなり、そのポリペプチドは、限定されるものではないが、ＧＬＰ－１またはその断片、変異体、および／もしくはコンジュゲートであり得る。本発明のＧＬＰ－１断片および／または変異体および／またはコンジュゲートは一般に、少なくとも１つのＧＬＰ－１活性を有する。ＧＬＰ－１またはその断片、変異体、および／またはコンジュゲートは、ヒト血清アルブミンを含んでなり得る。ヒト血清アルブミンは、ＧＬＰ－１またはその断片および／もしくは変異体とコンジュゲートされてもよい。ヒト血清アルブミンは、注射前に化学リンカーを介してインクレチンホルモン（例えば、ＧＬＰ－１）およびその変異体とコンジュゲートされてもよいし、またはｉｎｖｉｖｏで天然ヒト血清アルブミンと化学的に連結されてもよい（例えば、引用することによりその全内容が本明細書の一部とされる米国特許第６，５９３，２９５号および米国特許第６，３２９，３３６号参照）。あるいは、ヒト血清アルブミンは、ＧＬＰ－１ならびに／またはその断片および／もしくは変異体、またはエキセンディン－３もしくはエキセンディン－４などの他のＧＬＰ－１アゴニストならびに／またはその断片および／もしくは変異体と遺伝的に融合されてもよい。ヒト血清アルブミンと融合されたＧＬＰ－１ならびにその断片および／または変異体は以下：ＷＯ２００３／０６００７１、ＷＯ２００３／５９９３４、ＷＯ２００５／００３２９６、ＷＯ２００５／０７７０４２および米国特許第７，１４１，５４７号（引用することによりその全内容が本明細書の一部とされる）に示されている。

【００７３】

ＧＬＰ－１活性を有するポリペプチドは、ヒトＧＬＰ－１の少なくとも１つの断片および／または変異体を含んでなり得る。ヒトＧＬＰ－１の２つの天然断片は、配列番号２で表される。

【００７４】

【化２】

```
7   8   9   10  11  12  13  14  15  16  17
His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-
18  19  20  21  22  23  24  25  26  27  28
Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-
29  30  31  32  33  34  35  36  37
Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Xaa
```

（配列番号２）

【００７５】

配列中：３７番のＸａａはＧｌｙ（以下、「ＧＬＰ－１（７－３７）」と呼ぶ”）、または－NH_2（以下、「ＧＬＰ－１（７－３６）」と呼ぶ）である。ＧＬＰ－１断片としては、限定されるものではないが、ヒトＧＬＰ－１のアミノ酸７～３６（ＧＬＰ－１（７－３６））を含んでなる、またはそうでなければからなるＧＬＰ－分子１を含み得る。ＧＬＰ－１の変異体またはその断片としては、限定されるものではないが、野生型ＧＬＰ－１または配列番号２に示されるＧＬＰ－１の天然断片に１，２、３、４、５またはそれを越えるアミノ酸置換を含み得る。変異体ＧＬＰ－１またはＧＬＰ－１の断片としては、限定されるものではないが、野生型ＧＬＰ－１のアラニン８に類似するアラニン残基の置換を含み得、このようなアラニンはグリシンに変異される（以下、「Ａ８Ｇ」と呼ぶ）（例えば、引用することによりその全内容が本明細書の一部とされる米国特許第５，５４５，６１８号に開示されている突然変異体を参照）。

【００７６】

いくつかの態様において、ＧＬＰ－１の少なくとも１つの断片および変異体は、ＧＬＰ－１（７－３６（Ａ８Ｇ））を含んでなり、かつ、ヒト血清アルブミンと遺伝的に融合されている。さらなる実施形態において、本発明のポリペプチドは、ヒト血清アルブミンまたはその変異体のＮ末端またはＣ末端に融合されたＧＬＰ－１ならびに／またはその断片および／もしくは変異体の１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、またはそれを越える直列に配向した分子を含んでなる。他の実施形態は、アルブミンまたはその変異体のＮ末端またはＣ末端に融合されたこのようなＡ８Ｇポリペプチドを有する。ヒト血清アルブミンのＮ末端に融合された２つの直列に配向したＧＬＰ－１（７－３６）（Ａ８Ｇ）断片および／または変異体の一例は、配列番号１を含んでなり、図１に示される。別の態様において、ＧＬＰ－１の少なくとも１つの断片および変異体は、ヒト血清アルブミンに直列に遺伝的に融合された少なくとも２つのＧＬＰ－１（７－３６（Ａ８Ｇ））を含んでなる。少なくとも２つのＧＬＰ－１（７－３６（Ａ８Ｇ））は、ヒト血清アルブミンのＮ末端で遺伝的に融合されてよい。ＧＬＰ－１活性を有する少なくとも１つのポリペプチドは、配列番号１を含んでなり得る。

【００７７】

ＧＬＰ－１（７－３７）の変異体は、例えば、Glu^{22}－ＧＬＰ－１（７－３７）ＯＨと表すことができ、これは、ＧＬＰ－１（７－３７）ＯＨの２２番に通常見られるグリシンがグルタミン酸で置換されているＧＬＰ－１変異体を示し；Val^{8}－Glu^{22}－ＧＬＰ－１（７－３７）ＯＨは、ＧＬＰ－１（７－３７）ＯＨの８番に通常見られるアラニンと２２番に通常見られるグリシンがそれぞれバリンおよびグルタミン酸で置換されているＧＬＰ－１化合物を示す。ＧＬＰ－１の変異体の例としては、限定されるものではないが、以下のものが挙げられる。

【００７８】

【表１】

Val^{8}-GLP-1(7-37)OH	Gly^{8}-GLP-1(7-37)OH	Glu^{22}-GLP-1(7-37)O- H
Asp^{22}-GLP-1(7-37)OH	Arg^{22}-GLP-1(7-37)OH	Lys^{22}-GLP-1(7-37)OH
Cys^{22}-GLP-1(7-37)OH	Val^{8}-Glu^{22}-GLP-1(7-37)OH	Val^{8}-Asp^{22}-GLP-1(7-37)OH
Val^{8}-Arg^{22}-GLP-1(7-37)OH	Val^{8}-Lys^{22}-GLP-1(7-37)OH	Val^{8}-Cys^{22}-GLP-1(7-37)OH
Gly^{8}-Glu^{22}-GLP-1(7-37)OH	Gly^{8}-Asp^{22}-GLP-1(7-37)OH	Gly^{8}-Arg^{22}-GLP-1(7-37)OH
Gly^{8}-Lys^{22}-GLP-1(7-37)OH	Gly^{8}-Cys^{22}-GLP-1(7-37)OH	Glu^{22}-GLP-1(7-36)OH
Asp^{22}-GLP-1(7-36)OH	Arg^{22}-GLP-1(7-36)OH	Lys^{22}-GLP-1(7-36)OH
Cys^{22}-GLP-1(7-36)OH	Val^{8}-Glu^{22}-GLP-1(7-36)OH	Val^{8}-Asp^{22}-GLP-1(7-36)OH
Val^{8}-Arg^{22}-GLP-1(7-36)OH	Val^{8}-Lys^{22}-GLP-1(7-36)OH	Val^{8}-Cys^{22}-GLP-1(7-36)OH
Gly^{8}-Glu^{22}-GLP-1(7-36)OH	Gly^{8}-Asp^{22}-GLP-1(7-36)OH	Gly^{8}-Arg^{22}-GLP-1(7-36)OH
Gly^{8}-Lys^{22}-GLP-1(7-36)OH	Gly^{8}-Cys^{22}-GLP-1(7-36)OH	Lys^{23}-GLP-1(7-37)OH
Val^{8}-Lys^{23}-GLP-1(7-37)OH	Gly^{8}-Lys^{23}-GLP-1(7-37)OH	His^{24}-GLP-1(7-37)OH
Val^{8}-His^{24}-GLP-1(7-37)OH	Gly^{8}-His^{24}-GLP-1(7-37)OH	Lys^{24}-GLP-1(7-37)OH
Val^{8}-Lys^{24}-GLP-1(7-37)OH	Gly^{8}-Lys^{23}-GLP-1(7-37)OH	Glu^{30}-GLP-1(7-37)OH
Val^{8}-Glu^{30}-GLP-1(7-37)OH	Gly^{8}-Glu^{30}-GLP-1(7-37)OH	Asp^{30}-GLP-1(7-37)OH
Val^{8}-Asp^{30}-GLP-1(7-37)OH	Gly^{8}-Asp^{30}-GLP-1(7-37)OH	Gln^{30}-GLP-1(7-37)OH
Val^{8}-Gln^{30}-GLP-1(7-37)OH	Gly^{8}-Gln^{30}-GLP-1(7-37)OH	Tyr^{30}-GLP-1(7-37)OH
Val^{8}-Tyr^{30}-GLP-1(7-37)OH	Gly^{8}-Tyr^{30}-GLP-1(7-37)OH	Ser^{30}-GLP-1(7-37)OH
Val^{8}-Ser^{30}-GLP-1(7-37)OH	Gly^{8}-Ser^{30}-GLP-1(7-37)OH	His^{30}-GLP-1(7-37)OH
Val^{8}-His^{30}-GLP-1(7-37)OH	Gly^{8}-His^{30}-GLP-1(7-37)OH	Glu^{34}-GLP-1(7-37)OH
Val^{8}-Glu^{34}-GLP-1(7-37)OH	Gly^{8}-Glu^{34}-GLP-1(7-37)OH	Ala^{34}-GLP-1(7-37)OH
Val^{8}-Ala^{34}-GLP-1(7-37)OH	Gly^{8}-Ala^{34}-GLP-1(7-37)OH	Gly^{34}-GLP-1(7-37)OH
Val^{8}-Gly^{34}-GLP-1(7-37)OH	Gly^{8}-Gly^{34}-GLP-1(7-37)OH	Ala^{35}-GLP-1(7-37)OH
Val^{8}-Ala^{35}-GLP-1(7-37)OH	Gly^{8}-Ala^{35}-GLP-1(7-37)OH	Lys^{35}-GLP-1(7-37)OH
Val^{8}-Lys^{35}-GLP-1(7-37)OH	Gly^{8}-Lys^{35}-GLP-1(7-37)OH	His^{35}-GLP-1(7-37)OH
Val^{8}-His^{35}-GLP-1(7-37)OH	Gly^{8}-His^{35}-GLP-1(7-37)OH	Pro^{35}-GLP-1(7-37)OH
Val^{8}-Pro^{35}-GLP-1(7-37)OH	Gly^{8}-Pro^{35}-GLP-1(7-37)OH	Glu^{35}-GLP-1(7-37)OH
Gly^{8}-Glu^{35}-GLP-1(7-37)OH	Val^{8}-Ala^{27}-GLP-1(7-37)OH	Val^{8}-His^{37}-GLP-1(7-37)OH
Val^{8}-Glu^{22}-Lys^{23}-GLP-1(7-37)OH	Val^{8}-Glu^{22}-Glu^{23}-GLP-1(7-37)OH	Val^{8}-Glu^{22}-Ala^{27}-GLP-1(7-37)OH
Val^{8}-Gly^{34}-Lys^{35}-GLP-1(7-37)OH	Val^{8}-His^{37}-GLP-1- (7-37)OH	Gly^{8}-His^{37}-GLP-1(7-37)OH
Val^{8}-Glu^{22}-Ala^{27}-GLP-1(7-37)OH	Gly^{8}-Glu^{22}-Ala^{27}-GLP-1(7-37)OH	Val^{8}-Lys^{22}-Glu^{23}-GLP-1(7-37)OH
Gly^{8}-Lys^{22}-Glu^{23}-GLP-1(7-37)OH.	Val^{8}-Glu^{35}-GLP-1(7-37)OH	

【００７９】

ＧＬＰ－１の変異体は、限定されるものではないが、そのアミノ酸側基の１以上の化学修飾を有するＧＬＰ－１またはＧＬＰ－１断片も含み得る。化学修飾には、限定されるものではないが、化学部分の付加、新たな結合の作出、および化学部分の除去が含まれる。アミノ酸側基における修飾には、限定されるものではないが、リシン－ε－アミノ基のアシル化、アルギニン、ヒスチジン、またはリシンのＮ－アルキル化、グルタミン酸またはアスパラギン酸カルボン酸基のアルキル化、およびグルタミンまたはアスパラギンの脱アミド化が含まれる。末端アミノ基の修飾には、限定されるものではないが、デス－アミノ、Ｎ－低級アルキル、Ｎ－ジ－低級アルキル、およびＮ－アシル修飾が含まれる。末端カ

ルボキシ基の修飾には、限定されるものではないが、アミド、低級アルキルアミド、ジアルキルアミド、および低級アルキルエステル修飾が含まれる。さらに、１以上の側基、または末端基は、通常の技能を有するタンパク質化学者に公知の保護基により保護されてもよい。

【００８０】

ＧＬＰ－１断片または変異体にはまた、前記断片または変異体のＧＬＰ－１（７－３７）ＯＨのＮ末端および／またはＣ末端に１以上のアミノ酸が付加されたポリペプチドが含まれる。Ｎ末端またはＣ末端にアミノ酸が付加されたＧＬＰ－１のアミノ酸は、ＧＬＰ－１（７－３７）ＯＨの対応するアミノ酸と同じ数字によって表される。例えば、ＧＬＰ－１（７－３７）ＯＨのＮ末端に２個のアミノ酸を付加することより得られたＧＬＰ－１化合物のＮ末端アミノ酸は５番であり、ＧＬＰ－１（７－３７）ＯＨのＣ末端に１個のアミノ酸を付加することより得られたＧＬＰ－１化合物のＣ末端アミノ酸は３８番である。よって、これらの両ＧＬＰ－１化合物では、ＧＬＰ－１（７－３７）ＯＨと同様に、１２番はフェニルアラニンにより占められ、２２番はグリシンにより占められる。Ｎ末端にアミノ酸が付加されたＧＬＰ－１のアミノ酸１～６は、ＧＬＰ－１（１－３７）ＯＨの対応する位置のアミノ酸と同じであるか、またはその保存的置換であり得る。Ｃ末端にアミノ酸が付加されたＧＬＰ－１のアミノ酸３８～４５は、グルカゴンまたはエキセンディン－４の対応する位置のアミノ酸と同じであるか、またはその保存的置換であり得る。

【００８１】

アルビグルチドは、再構成および注射のためのデュアルカートリッジデバイスを用い、凍結乾燥形態で商業的に供給される。本発明は、液体形態で安定なアルビグルチドの液体製剤を提供する。下表で凍結乾燥形態と安定な液体製剤を比較する。

【００８２】

【表２】

市販の凍結製品	液体製剤
30mg 用量強度: 60mg/mL アルビグルチド 50mg 用量強度: 100mg/mL アルビグルチド	30 mg および 50 mg 量量強度のための 50 mg /mL アルビグルチド
10mM リン酸ナトリウム, 117mM トレハロース, 153mM マンニトール, 0.01%(w/w)ポリソルベート 80, pH 7.0	10mM クエン酸ナトリウム, 117mM トレハロース, 100mM アルギニン, 0.01%(w/w)ポリソルベート 80, pH5.9
ペンインジェクター中のデュアルチャンバーカートリッジ(DCC) 29G 薄壁×5mm 針を供給	オートインジェクター中に 29G ステーキド・ニードル(staked needle)を備えた充填済みシリンジ オートインジェクターは注射深度を制御する

【実施例】

【００８３】

以下の実施例は本発明の様々な非限定態様を示す。以下の実施例に関して、特に断りのない限り、アルビグルチド（ＡＬＢ）は、配列番号１および／またはアルビグルチドと呼ばれ得る。

【００８４】

実施例１

本明細書の実施例１では、４つの試験（試験１．０；試験１．１；試験１．２；および試験１．３）の結果を示す。各試験に示される処方物は、処方物番号によって表示される。同じ処方物番号は２つ以上の試験で使用される場合があるが、常に同じ処方物を表すわけではない。各試験の結果を示す表は表題に試験番号を含む。

【００８５】

アルビグルチド（ＡＬＢ）の安定性を、６０のユニークな処方物を包含する４つの試験

中、様々な温度で評価した。アルビグルチドの安定性に対するバッファー、ポリオール、糖、ポリソルベート８０、およびオクタン酸ナトリウムの効果を検討した。加えて、ｐＨおよびタンパク質濃度を変更した。クエン酸塩、アルギニン、トレハロース、およびポリソルベート８０を含有する処方物は、水溶液中のアルビグルチドにさらなる開発を正当化するのに十分な安定性を付与することが判明した。妥当性の目標仕様は、２～８℃で１８か月の保存の後、ＳＥＣにより＞９６％単量体である。妥当性の他の許容可能な目標仕様には、限定されるものではないが、１８か月後、ＳＥＣにより１００％、≧９９％、≧９８％、≧９７％、≧９６％、≧９５％、≧９４％、≧９３％、≧９２％、≧９１％、≧９０％単量体である。加えて、他の許容可能な目標仕様には、１２か月後、ＳＥＣにより同じ単量体パーセンテージが含まれる。

【００８６】

材料および方法

材料

本試験に使用した化学物質を表１にまとめる。本プロジェクトに使用した材料および器具をそれぞれ表２および３にまとめる。

【００８７】

【表３】

表１：試験１に使用した化学物質

化学物質	供給者	純度
クエン酸ナトリウム二水和物	Mallinckrodt	USP
塩酸アルギニン	Spectrum	USP
トレハロース二水和物	Spectrum	未知
ポリソルベート 80	Spectrum	NF
オクタン酸ナトリウム	Alfa Aesar	96%
リン酸第一ナトリウム一水和物	Fisher	ACS
トレハロース二水和物	Spectrum	未知
マンニトール	BDH	USP
ヒスチジン	Spectrum	USP
コハク酸ナトリウム	Spectrum	未知

【００８８】

【表４】

表２：試験１に使用した材料

材料	供給者	材料	供給者
Millex 0.22 ミクロンフィルターユニット	Millipore	リン酸(85%)	Mallinckrodt Baker
バイアル 1mL Fiolax Clear	Schott	水酸化ナトリウム	Mallinckrodt Baker
13mm アルミニウムシール	Wheaton	氷酢酸	Mallinckrodt Baker
13mm ブチル栓	Kimble-Chase	L-アルギニン(≧98%)	Sigma Aldrich
HPLC オートサンプラー12x32mm バイア	National Scientific	イミノ二酢酸	Sigma Aldrich
HPLC バイアル 黒ねじ式キャップ	Fisherbrand	Acquity UPLC BEH 300 C4 1.7 um 2.1x 150 mm	Waters
HPLC バイアルポリスプリングインサート	National Scientific	Pellicon XL Biomax 10 メンブランフィルター	Millipore
TSK ゲル G3000SWxl	Tosoh	cIEF キット	Beckman
cIEF ゲルポリマー溶液	Beckman Coulter	pI 5.5 cIEF マーカー	PtoteinSimple
ファルマライト 3-10 両性電解質	GE Healthcare	pI 6.6 cIEF マーカー	American Peptide
尿素	Mallinckrodt Baker		

【００８９】

【表５】

表３：試験で使用した装置および器具

製造者	装置	モデル
Denver Instrument	pH meter	Model 250
Cary	UV-VIS 分光計	Bio 100
Dionex	HPLC	Ultimate 3000
Dionex	HPLC	Ultimate 3000
Dionex	HPLC	Ultimate 3000
Eppendorf	遠心機	MiniSpin Plus
BioRad	電源	Power Pac 300
Binder	オーブン	Binder
Binder	オーブン	Binder
Sartorius	天秤	CPA124S
VWR	加熱ブロック	12621-104
Labnet	振盪機	Orbit P4
HP	CE	3D-CE

【００９０】

方法

以下の節では、これらの試験の実施に際して使用した方法および技術を記載する。

【００９１】

サンプル調製　透析のため、調剤バッファーを適当なｐＨで、２容量の１Ｌ保存液として

調製した。各処方物では、必要な質量の１３０％に相当する保存液容量をＳｌｉｄｅ－Ａ－Ｌｙｚｅｒカセット（１０ｋＤａカットオフ）に入れた。サンプルを、バッファー（２×１Ｌ）中、２～８℃で一晩、２回透析した。次に、サンプルを取り出し、濃度をA_{280}により測定した。サンプルを透析バッファーで適当な濃度に希釈し、任意の他の賦形剤（ポリソルベート、二糖類、アミノ酸、オクタン酸塩など）を固体として溶液に加えた。その後、終濃度をA_{280}により測定した。サンプルをバイオセーフティーキャビネット内で除菌濾過し、ラベルを付けたオートクレーブ済みバイアルに入れ、栓をした。次に、バイアルを示された温度の安定性チャンバーに入れた。

【００９２】

ＵＶ分光法　本実施例のＵＶ分光法は総て、そうではないことが記載されない限り、Ｖａｒｉａｎ　Ｃａｒｙ　１００　Ｂｉｏ分光計を用いて実施した。総ての読み取りに較正済みの０．１ｍｍセル（０．００９６ｃｍ）を用いた。装置は、２８０ｎｍでの分析前にバッファーで再びゼロ点補正した。取り外し可能なセルをバッファー、水、およびエタノールですすぎ、次いで、乾燥させ、その後、各サンプルを分析した。アルビグルチドに割り当てた濃度を用い、０．７５５ｍＬ／ｍｇ　ｃｍの吸光係数を測定した。

【００９３】

サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）法　簡単に述べれば、総ての分離にＴｏｓｏｈ　ＴＳＫゲルＧ３０００ＳＷｘｌ　７．８ｍｍ×３０ｃｍカラムを用いた。移動相は、１５ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ７．５からなった。１ｍＬ／分の流速を用い、検出波長を２１４ｎｍに設定した。サンプルを水で１．７ｍｇ／ｍＬに希釈し、各分離に５μＬ（８．５μｇ）の溶液を注入した。各実施は２０分であり、総てのサンプル成分がこの時間内に分離された。分析後、カラムを脱イオン水ですすぎ、２０％メタノール中で保存した。

【００９４】

逆相クロマトグラフィー（ＲＰ　ＨＰＬＣ）法　分離は総て、Ａｃｑｕｉｔｙ　ＵＰＬＣ　ＢＥＨ３００Ｃ４　１．７μｍ　２．１×１５０ｍｍカラムを用いて実施した。カラムを２５℃に保持し、１ｍｇ／ｍＬに希釈したサンプルから各実施につき２μｇのタンパク質をカラムに注入した（２０μＬ注入）。０．１ｍＬ／分の一定流速を用いた。溶媒Ａは脱イオン水中０．１５％ＴＦＡからなり、溶媒Ｂはアセトニトリル中０．１５％ＴＦＡからなった。検出は２１４ｎｍで行った。バッファークロマトグラムは積分前にサンプルクロマトグラムから差し引いた。

【００９５】

勾配計画は次のとおりである。

時間	％Ｂ
０	３７．４
２０	４０．４
２０．１	９５
２５	９５
２５．１	３７．４
６０	３７．４

【００９６】

キャピラリー等電点電気泳動（ｃＩＥＦ）法　キャピラリー等電点電気泳動は、Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒから刊行されているＰＡ　８００　ｐｌｕｓ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ　Ｇｕｉｄｅおよび内部ガイダンスの文書「ｃＩＥＦ．ＰＤＦ」からの洞察を用いて行った。サンプルは下記を含有するように調製した。

１００μＬの１０Ｍ尿素
５０ｍＭ　ＤＴＴ
６μＬファルマライトｐＨ５～８
６μＬ　５００ｍＭアルギニン
０．５μＬ　ｐＩ　５．１２マーカー（ＰｒｏｔｅｉｎＳｉｍｐｌｅ）
０．５μＬ　ｐＩ　６．６０マーカー（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｐｅｐｔｉｄｅ、５ｍｇ／

ｍＬ）
０．５μＬ　１００ｍｇ／ｍＬアルビグルチドサンプル（または同等質量）
【００９７】
中性コーティングキャピラリーは、Gao, et al. (Gao, L.; Liu, S. R., Cross-linked polyacrylamide coating for capillary isoelectric focusing. Anal Chem 2004, 76 (24), 7179-7186)に記載されているように作製した。コーティングしたキャピラリーを３２ｃｍの長さに切断し、２２ｃｍの部分に窓を設けた。キャピラリーを各泳動前に４Ｍ尿素（３分）、脱オイン水(dionized water)（２分）ですすいだ。サンプルの全キャピラリー注入を行った（２５ｐｓｉで１００秒）。サンプルは、２５ｋＶの一定電圧、正磁極で、入口の陽極液（０．５％メチルセルロース中、１００ｍＭリン酸）と出口の陰極液（０．５％メチルセルロース中、１００ｍＭ水酸化ナトリウム）の間を１５分間泳動させた。化学物質の動員は、陽極液とモビライザー溶液（３５０ｍＭ酢酸）の間に、３０ｋＶの一定電圧で４０分間行った。検出は２８０ｎｍで行った。各泳動は、脱イオン水による２分のフラッシュで終了した。試験１．３からはｃＩＥＦ　を省いた。
【００９８】
データはＣｈｒｏｍｅｌｅｏｎソフトウエアを用いて分析した。サンプルの総ての積分ピークに関して相対的面積および最初のピークモーメントを記録した。等電点は、２つのｃＩＥＦマーカーの最初のピークモーメントを用いて決定した。
【００９９】
ＳＤＳ－ＰＡＧＥ法　以下に記載するように、試験１の様々な段階で、この方法の種々の変形形態を用いた。
【０１００】
試験１．０、１．１：　０．５μＬのサンプル、２．５μＬのＮｕＰＡＧＥ　ＬＤＳサンプルバッファー、および７μＬの水を用い、サンプルをＳＤＳ－ＰＡＧＥ向けに調製した。各調製サンプルを電気泳動前に７０℃で１０分間インキュベートした。ＮｕＰＡＧＥ　１２％Ｂｉｓ－ＴｒｉｓゲルおよびｎｕＰＡＧＥ　ＭＥＳバッファーを各ゲルに用いた。サンプルを各ウェルにロードし（１０μＬ）、２００Ｖで４０分間分離した。次に、ゲルを脱イオン水ですすぎ、脱イオン水中に１５分間浸漬した。次に、ゲルをＳｉｍｐｌｙ　Ｂｌｕｅ　Ｓａｆｅ　Ｓｔａｉｎ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で１時間覆った後、再び脱イオン水中で少なくとも２時間インキュベートした。
【０１０１】
試験１．２：　サンプルのタンパク質濃度に関わらず０．２５μｇのタンパク質を用いて各１０μＬのサンプルを調製したこと以外は上記のとおり。材料は８μＬだけ各ゲルのウェルにロードした。
【０１０２】
試験１．３：　本試験についてはＳＤＳ－ＰＡＧＥは実施しなかった。
【０１０３】
潜在構造射影（ＰＬＳ）法　ＰＬＳモデリングの詳細な説明は刊行されている[Stahle, L.; Wold, K. Multivariate data analysis and experimental design in biomedical research. Prog. Med. Chem. 1988, 25: 291-338; Wold S. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. Chemom. Intell. Lab. Syst. 2001, 58: 109-130]。これは大きく複雑なデータセットの多変量解析のための最も一般的な計量化学的方法である。どんな大きな数値マトリックスでも、妥当なサンプル数があれば、（いわゆるＸ行列をともに形成する）、対象とする従属変数の最大分散量（Ｙ行列）を説明する数学的モデルを構築することができる。Ｘ行列の変動とエンドポイント（Ｙ行列）の間の関係の単一の最良の説明は、第１主成分ＰＣ１と呼ばれる。次いで重要な（Ｙ行列の分散の説明に関して）成分は、第２主成分ＰＣ２と呼ばれるなどである。Ｙ行列の分散の大部分の説明するために必要とされるＰＣは、かなりの頻度で、１つまたは２つだけである。これらのＰＣはそれぞれＸ行列の各変数からの寄与をいくらか含む。Ｘ行列内の変数が所与のＰＣの構築に重く寄与すれば、有意性ありと格付けされる。実際に、所与のモデルで、Ｘ行列の各変数に関して回

帰係数を計算することができ、この場合、モデルは、Ｙ行列の十分な説明を提供するために、特定の数のＰＣのコンポジットである[Katz, M.H. Multivariate Analysis: A Practice Guide for Clinicians. Cambridge University Press, New York, pp. 158-162 (1999)]。要するに、ＰＬＳはＸ行列から情報を取得し、ＰＣの所望の数を計算し、好適なモデルを構築する。ＰＬＳモデルは、相互作用項、適当であれば、ならびに二次項を含むことができ、非線形効果の特徴付けを可能とする。サンプルの総てを含むモデルは較正モデルと呼ばれる[Wold S. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. Chemom. Intell. Lab. Syst. 2001, 58: 109-130]。全体の決定係数（r^2）はモデルの質を示す。ＰＬＳ計算は総て、Ｕｎｓｃｒａｍｂｌｅｒ（登録商標）ソフトウエア（ＣＡＭＯ、コーヴァリス、ＯＲ）を用いて行った。Ｙ行列の単一変数を用いて行うＰＬＳ分析は、ＰＬＳ１分析と呼ばれる。Ｙ行列の多変数に適合するモデルの構築は、ＰＬＳ２分析と呼ばれる。

【０１０４】

総ての較正モデルに対して標準的技術[Martens, H.; Martens, M. Multivariate Analysis of Quality: An Introduction, Wiley and Sons, Chichester, UK (2001)]を用いて完全な公差バリデーションを行った。簡単に述べれば、あるサンプルをある時点で取り出し、データセットを再較正し、新しいモデルを構築する。このプロセスを、較正サンプルの総てが一度取り出され、バリデーションモデルとして定量されるまで繰り返す。従って、総てのサンプルを含有する第１セットは較正セットと呼ばれ、公差バリデーション後のものはバリデーションセットと呼ばれる。上記のＰＬＳモデルの構築に使用した任意の因子の統計的有意性を決定するため、ジャックナイフアルゴリズム[Martens, H.; Martens, M. Multivariate Analysis of Quality: An Introduction, Wiley and Sons, Chichester, UK (2001)]を使用した。

【０１０５】

結果および考察

このプロジェクトは４回の処方物スクリーニングにより進行した。各回からの結果を用いて次回の処方物を最適化した。

【０１０６】

試験１．０．

１回目のスクリーニングは、バッファー種とｐＨの両方を検討するために計画された。１２の処方物を用い、３種類の異なるバッファー（クエン酸、リン酸、ヒスチジン）をｐＨ値５．７～６．８の間で検討した。加えて、２つの処方物は、ＧＳＫで実施した予備処方物研究で潜在的安定剤として特定された１０ｍＭオクタン酸ナトリウムを含有した。本試験の処方物のうちの１つは、マンニトール、トレハロース、アルギニン、およびポリソルベート８０を含有した。本試験では、ガラスバイアル中のサンプルを４０℃で１週間および２週間保存した。総てのサンプがアルビグルチドを６０ｍｇ／ｍＬの濃度で含有した。

【０１０７】

【表６】

表４：試験１．０の処方物の組成

処方物番号	pH	ｸｴﾝ酸塩	リン酸塩	His	mann	tre	PS80	オクタン酸
		mM	mM	mM	mM	mM	%	mM
F01	7.0	0	10	0	153	117	0.01	0
F02	5.7	10	0	0	0	0	0	0
F03	5.7	0	10	0	0	0	0	0
F04	5.7	0	0	10	0	0	0	0
F05	6.3	0	10	0	0	0	0	0
F06	6.3	0	0	10	0	0	0	0
F07	5.3	10	0	0	0	0	0	0
F08	5.3	0	0	10	0	0	0	0
F09	5.7	0	10	0	0	0	0	10
F10	5.7	10	0	0	0	0	0	10
F11	6.8	0	10	0	0	0	0	0
F12	6.8	0	0	10	0	0	0	0

【０１０８】

【表７】

表５：試験１．０の目視検査

LB141 S1 の目視検査			
サンプル	t0	1 週間 40C	2 週間 40C
F01	透明	透明	透明
F02	透明	透明	透明
F03	透明	曇り	曇り
F04	透明	曇り	ゲル化
F05	透明	透明	曇り
F06	透明	曇り	ゲル化
F07	透明	透明	透明
F08	透明	ゲル化	ゲル化
F09	透明	透明	透明
F10	透明	透明	透明
F11	透明	透明	透明
F12	透明	曇り	曇り

【０１０９】

最初は、総てのサンプルが透明であり、調製時には淡褐色であった。示されたインキュベーション時点で、いくつかのサンプルは曇りが出るか、完全にゲル化した（表５）。不良の目視外観を示したサンプルにはさらなる分析を行わなかった。

【０１１０】

【表８】

表６：試験１．０からの処方物のＲＰ　ＨＰＬＣによる純度

LB141 試験 1 RP									
サンプル	t0			t1 (1 週間 40°C)			t2 (2 週間 40°C)		
F01	85.18	±	0.82	77.46	±	1.46	71.29	±	0.56
F02	87.07	±	0.71	83.86	±	0.77	81.08	±	0.14
F03	85.01	±	1.18	n/a	±	n/a	n/a	±	n/a
F04	85.97	±	1.02	n/a	±	n/a	n/a	±	n/a
F05	85.12	±	0.40	74.19	±	0.87	n/a	±	n/a
F06	85.98	±	0.33	n/a	±	n/a	n/a	±	n/a
F07	89.37	±	0.19	85.51	±	0.35	79.93	±	0.75
F08	85.84	±	0.22	n/a	±	n/a	n/a	±	n/a
F09	88.55	±	0.97	86.67	±	0.31	82.76	±	0.48
F10	88.13	±	0.96	85.23	±	0.30	81.32	±	0.31
F11	87.24	±	0.81	75.21	±	0.53	68.79	±	0.35
F12	84.67	±	0.81	n/a	±	n/a	n/a	±	n/a

【０１１１】

【表９】

表７：試験１．０からの処方物のＳＥＣによるモノマー含量

LB141 試験 1 SEC									
サンプル	t0			t1 (1 週間 40°C)			t2 (2 週間 40°C)		
F01	99.05	±	0.09	90.12	±	0.17	83.95	±	0.28
F02	98.70	±	0.00	96.18	±	0.02	93.65	±	0.23
F03	98.93	±	0.04	96.18	±	0.01	n/a	±	n/a
F04	98.42	±	0.16	50.08	±	0.38	n/a	±	n/a
F05	98.91	±	0.02	84.79	±	0.31	n/a	±	n/a
F06	98.85	±	0.04	83.21	±	0.11	n/a	±	n/a
F07	98.51	±	0.04	91.29	±	0.05	85.86	±	0.12
F08	98.67	±	0.13	n/a	±	n/a	n/a	±	n/a
F09	98.83	±	0.01	97.24	±	0.02	96.40	±	0.04
F10	98.54	±	0.00	97.36	±	0.03	96.62	±	0.08
F11	98.91	±	0.03	90.33	±	0.33	82.17	±	0.16
F12	98.80	±	0.03	56.64	±	0.65	n/a	±	n/a

【０１１２】

ＲＰ　ＨＰＬＣによる試験１．０サンプルの純度は、表に示されるように、２つの処方物（Ｆ０９およびＦ１０）が他よりもかなり良好であることを示す（表６）。これらは１０ｍＭオクタン酸塩を含有する２つであった。また、ｐＨを約６．８に上昇させると安定性は低下したことが明らかである。同様の傾向がＳＥＣによっても見られ、保存時の単量体含量はこれら２つの処方物で高かった（表７）。これらの処方物は、対照処方物（表４の凍結乾燥処方物およびＦ０１参照）Ｆ０１以外、バッファーを含むだけで、処方物Ｆ０９およびＦ１０のオクタン酸以外には、他の安定剤を含まなかった。不良の目視外観を示さなかった処方物に関しては、ほとんどがクエン酸に基づくものであった。

【０１１３】

【表１０】

表８：凍結－解凍サイクルを受けた試験１．０からのサンプルのＲＰ　ＨＰＬＣによる純度

LB141 凍結/解凍 RP						
サンプル	3回凍結			5回凍結		
F01	84.40	±	1.84	84.37	±	0.77
F02	87.56	±	1.97	88.21	±	0.17
F03	84.07	±	1.16	85.35	±	1.06
F04	83.13	±	2.15	84.69	±	0.65
F05	86.29	±	1.16	85.53	±	1.04
F06	85.59	±	0.93	87.78	±	0.60
F07	87.11	±	0.79	89.89	±	0.68
F08	85.00	±	0.99	87.56	±	0.60
F09	88.41	±	2.18	89.32	±	0.43
F10	88.10	±	0.36	89.34	±	0.59
F11	85.31	±	0.71	86.49	±	0.37
F12	88.01	±	0.70	87.83	±	0.53

【０１１４】

また、これらの処方物に反復凍結－解凍（Ｆ／Ｔ）サイクルを施した。この場合にも、ＲＰ　ＨＰＬＣ（表８）およびＳＥＣ（表９）を用いて安定性を判定した。アッセイ誤差の範囲内で、凍結－解凍サイクルの際に純度の低下は無かった。ＳＥＣにより単量体含量に若干の見掛けの低下が見られたが（表９）、これらは、それらが有意でないと思われるに十分小さかった。

【０１１５】

【表１１】

表９：凍結－解凍サイクルを受けた試験１．０からのサンプルのＳＥＣによるモノマー含量

LB141 凍結/解凍 SEC						
サンプル	3回凍結			5回凍結		
F01	99.03	±	0.01	99.00	±	0.03
F02	98.62	±	0.01	98.64	±	0.00
F03	98.71	±	0.05	98.60	±	0.05
F04	97.94	±	0.17	97.30	±	0.21
F05	98.83	±	0.01	98.79	±	0.02
F06	98.56	±	0.06	98.58	±	0.05
F07	98.39	±	0.04	98.30	±	0.01
F08	98.11	±	0.21	97.57	±	0.18
F09	98.75	±	0.02	98.70	±	0.01
F10	98.54	±	0.01	98.57	±	0.01
F11	98.81	±	0.01	98.72	±	0.02
F12	98.71	±	0.02	98.34	±	0.05

【０１１６】

最後に、試験１．０サンプルを、ＳＤＳ－ＰＡＧＥを用いて評価した。このアッセイは還元条件または非還元条件下で行うことができる。より高分子量（ＭＷ）のバンドをモニ

タリングするために、ゲルに意図的に過剰ロードした（図１および２）。還元ゲル（図２）は、非還元ゲルで見られた（図１）最高ＭＷのバンドの欠如を示し、これがある種のジスルフィド架橋によるものであることを示唆し、これはｔ０でも存在する。４０℃で２週間の後には、非還元ゲルにかろうじて入る極めて高いＭＷの種が存在する（図３）。この種は還元剤を加えることにより効果的に除去される。加えて、非還元ゲルに見られる凝集物の量にはいくらかの差異があると思われ、従って、これらだけを続いての試験に用いた。

【０１１７】

試験１．１．

第２ラウンドの試験では、他の安定剤がほとんど不在で、やや異なるｐＨ範囲と特定のバッファー組成に焦点を当てた（表１０）。従前の研究ではより低いｐＨが安定性に有益であることが示唆されたことから、ｐＨ範囲を低くし、５．３～６．０にわたった。試験１．０で不良な溶液安定性（ゲル化、曇り）をもたらしたヒスチジンは、さらなる検討から除いた。このｐＨ範囲では、カルボン酸バッファーは、クエン酸バッファーと同様に、十分機能するはずである。いくらかの安定性を付与するとみられることから、その構造的類似性による評価を行うためにバッファーとしてコハク酸を導入した。トレハロース、マンニトール、およびオクタン酸ナトリウムをそれぞれ安定剤として検討した。試験１．０と同様に、最初の処方物は、凍結乾燥対照処方物である（表４のＦ０１参照）。加えて、処方物Ｆ１３およびＦ１４は、何がそれらの個々の寄与であり得るかを決定するために、それぞれマンニトールおよびトレハロースを含む。４０℃で１週間および２５℃で２週間の後にサンプルを評価した。

【０１１８】

【表１２】

表１０：試験１．１処方物の組成

処方物番号	pH	ｸｴﾝ酸塩	ﾘﾝ酸塩	コハク酸塩	ﾏﾝﾆﾄｰﾙ	ﾄﾚﾊﾛｰｽ	PS80	ｵｸﾀﾝ酸塩
F01	7.0	0	10	0	153	117	0.01	0
F02	5.7	10	0	0	0	0	0.01	0
F03	5.7	20	0	0	0	0	0.01	0
F04	5.7	10	0	0	0	0	0.01	10
F05	6.0	10	0	0	0	0	0.01	10
F06	5.3	10	0	0	0	0	0.01	0
F07	5.3	0	0	10	0	0	0.01	0
F08	5.7	0	10	0	0	0	0.01	0
F09	5.7	0	0	10	0	0	0.01	0
F10	5.7	0	0	20	0	0	0.01	10
F11	6.0	0	0	10	0	0	0.01	10
F12	6.0	0	0	10	0	0	0.01	0
F13	5.7	10	0	0	153	0	0.01	0
F14	5.7	10	0	0	0	117	0.01	0

【０１１９】

【表１３】

表１１：試験１．１からのサンプルのＲＰ　ＨＰＬＣによる純度

LB141 S1.1 t0 RP											
サンプル	t0			含量	1 週間 40C			含量	2 週間 25C			含量
F01	82.91	±	0.22	100.00	80.08	±	0.68	94.21	89.39	±	0.09	19.15
F02	87.86	±	1.25	100.00	81.44	±	0.21	89.61	86.25	±	0.22	78.31
F03	87.37	±	0.15	100.00	85.62	±	0.69	100.07	84.40	±	0.47	81.51
F04	87.99	±	0.91	100.00	83.02	±	0.10	97.83	84.24	±	0.87	81.84
F05	86.13	±	1.05	100.00	80.87	±	0.05	100.98	83.12	±	0.43	84.26
F06	86.97	±	0.56	100.00	83.06	±	0.50	96.36	83.92	±	0.43	72.53
F07	87.07	±	0.82	100.00	74.66	±	0.87	102.50	16.77	±	13.51	22.02
F08	85.50	±	0.23	100.00	72.23	±	0.57	99.81	75.41	±	1.23	32.03
F09	85.41	±	0.87	100.00	77.39	±	0.88	100.19	63.73	±	0.50	41.34
F10	86.46	±	0.92	100.00	81.73	±	0.66	99.16	83.09	±	1.47	81.94
F11	85.76	±	0.39	100.00	81.32	±	0.14	99.96	n/a	±	n/a	n/a
F12	83.50	±	0.46	100.00	76.81	±	0.31	101.96	57.49	±	0.91	33.07
F13	86.14	±	0.16	100.00	83.76	±	0.46	96.87	82.50	±	0.44	70.89
F14	87.32	±	1.23	100.00	83.62	±	0.82	97.57	65.00	±	1.56	68.85

【０１２０】
【表１４】

表１２：試験１．１からのサンプルのＳＥＣによるモノマー含量

LB141 S2 t0 SEC								
サンプル	t0			1 週間 40C			2 週間 25C		
F01	98.46	±	0.06	89.10	±	0.44	94.60	±	0.34
F02	98.36	±	0.01	94.46	±	0.03	97.54	±	0.02
F03	98.62	±	0.01	96.29	±	0.02	97.76	±	0.01
F04	98.54	±	0.02	97.40	±	0.01	98.01	±	0.01
F05	98.60	±	0.02	97.59	±	0.01	98.06	±	0.02
F06	98.31	±	0.01	89.66	±	0.03	97.26	±	0.01
F07	98.10	±	0.02	78.76	±	0.79	97.80	±	0.02
F08	98.57	±	0.01	76.86	±	0.05	97.64	±	0.00
F09	98.40	±	0.00	90.06	±	0.01	97.62	±	0.03
F10	98.57	±	0.01	96.71	±	0.01	97.77	±	0.04
F11	98.73	±	0.04	97.40	±	0.01	93.62	±	0.11
F12	98.75	±	0.04	89.17	±	0.04	97.53	±	0.04
F13	98.73	±	0.00	96.06	±	0.02	97.89	±	0.03
F14	98.75	±	0.02	95.81	±	0.03	97.65	±	0.01

【０１２１】
これらの処方物に関し、ＲＰによるアルビグルチドの純度は、最初は８５～８７％付近であり、対照処方物はｔ０ではやや低かった（表１１）。サンプルを高温下で保存すると、ＲＰ　ＨＰＬＣによる純度は低下し、クエン酸塩を含有する処方物が最も安定であった（表１１）。また、単量体含量値も、低ｐＨサンプル（ｐＨ５．３）で、保存時に低下し、処方物Ｆ０７およびＦ０８は、４０℃で１週間後に（ｔ１）最大の低下を示す（表１２

）。２５℃で２週間後（ｔ２）、単量体含量は、処方物Ｆ０１およびＦ１１を除く総てが９７％以上であった。Ｆ１１の結果は、他の値のラインから外れていると思われ、正しくない可能性がある。保存時にやや曇りを示した処方物があり、表１１および１２ではこれらに灰色で網掛けをしている。

【０１２２】

これらの処方物はまた、非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルを用いてアッセイした。ｔ０データのゲルを図４および５に示す。あたかも二量体であるかのうように泳動する単量体の上の強いバンドと、処方物の総てに存在するより高いＭＷの弱いバンドが存在した。このバンドは処方物Ｆ１４で極めて顕著である（図５）。ｔ１では、処方物Ｆ０６およびＦ０７で、Ｆ０１～Ｆ０７の他の処方物のいずれよりも、はるかに大きな高ＭＷ種の増加が見られる（図６）。これらは低ｐＨ処方物である。同様に、処方物Ｆ０８、Ｆ０９、およびＦ１２でも、高ＭＷ種の量の増加が見られる。後ろ２つの製剤は、コハク酸バッファーを含有する。加えて、これらの種の最低量はオクタン酸処方物の場合であると見られる（図６および７）。ｔ２（２週間、２５℃では、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより見られた変性は極めて少なく（図８および９）、これらの条件下でＲＰ　ＨＰＬＣおよびＳＥＣにより見られた少量の変性に見合っていた。

【０１２３】

ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＳＥＣはともに、断片化ではなく凝集が変性の主要経路であることを示す。全体的に見れば、試験１．１は、クエン酸塩が最良のバッファーと思われ、コハク酸塩は可能性のある代替であることを示す。ｐＨ応答は比較的平坦であると見られるが、最適値はｐＨ５．７付近であると思われる。

【０１２４】

試験１．２．

このラウンドにおける第３の試験を、主として、最初の２ラウンドで安定剤であると判明した処方物成分のレベルを最適化するために計画した。具体的には、この試験で、クエン酸塩、コハク酸塩、オクタン酸塩、トレハロース、およびマンニトールのレベルを検討した。加えて、１００ｍｇ／ｍＬまでのタンパク質濃度を評価した。各処方物はこの場合、１００ｍＭのアルギニンＨＣｌを含有し、試験２と呼ばれたアルビグルチドに対する追加試験で用いたものと一致するようにしたことに留意されたい。最後に、２つの処方物は、ポリソルベート－８０（ＰＳ－８０）不含材料から作製された（これまでの保存溶液は総て、処理中に添加される０．０１％ＰＳ－８０を含有していた）。４０℃で１週間（ｔ１）、２５℃で２週間（ｔ２）、および２５℃で４週間（ｔ４）のインキュベーションの後にサンプルを調べた。

【０１２５】

【表１５】

表１３：試験１．２の処方物の組成

処方物	pH	アルギニン	タンパク質	クエン酸塩	コハク酸塩	オクタン酸塩	マンニトール	トレハロース	PS 80
		mM	mg/mL	mM	mM	mM	mM	Mm	wt%
F01	5.5	100	60	10	0	10	240	0	0.01
F02	5.5	100	60	0	10	10	0	240	0.01
F03	5.5	100	100	0	10	10	240	0	0.01
F04	5.5	100	100	10	0	20	0	240	0.01
F05	5.5	100	60	5	0	0	120	0	0.01
F06	5.5	100	60	15	0	0	120	0	0.01
F07	5.9	100	60	10	0	10	240	0	0.01
F08	5.9	100	60	0	10	10	0	240	0.01
F09	5.9	100	60	0	10	0	240	0	0.01
F10	5.9	100	60	10	0	10	0	240	0.01
F11	5.9	100	100	5	0	0	240	0	0.01
F12	5.9	100	100	20	0	20	240	0	0.01
F13	5.7	100	60	10	0	10	120	0	0
F14	5.7	100	60	10	0	0	120	0	0
F15	5.7	100	60	0	20	0	0	120	0.01
F16	5.7	100	100	0	20	0	0	120	0.01

【０１２６】

【表１６】

表１４：試験１．２からの処方物のｐＨ値およびＵＶによるタンパク質濃度

LB141 S1.2 pH および UV								
	t0		t1 1 週間 40 C		t2 2 週間 25 C		t4 4 週間 25 C	
サンプル	pH	濃度(mg/mL)	pH	濃度 (mg/mL)	pH	濃度 (mg/mL)	pH	濃度 (mg/mL)
F01	5.56	60.42	5.41	61.82	5.55	60.13	5.46	58.84
F02	5.57	63.31	5.60	62.87	5.62	61.52	5.55	58.06
F03	5.46	100.00	5.47	103.30	5.57	102.59	5.46	101.90
F04	5.54	79.30	5.55	83.25	5.66	80.71	5.60	80.53
F05	5.44	60.83	5.44	58.95	5.57	59.84	5.47	59.64
F06	5.41	58.65	5.42	59.71	5.52	59.42	5.46	59.75
F07	5.84	60.67	5.87	62.44	5.95	62.50	5.79	60.65
F08	6.03	60.90	6.05	62.72	6.11	62.27	6.00	61.35
F09	5.87	61.31	6.01	63.76	5.95	62.67	5.94	61.69
F10	5.89	61.82	5.98	63.67	5.99	63.80	5.94	60.69
F11	5.80	102.25	5.73	102.50	5.93	103.31	5.75	101.17
F12	5.93	97.89	5.92	99.99	6.00	99.71	6.01	98.61
F13	5.78	57.23	5.73	57.13	5.92	57.99	5.78	56.91
F14	5.63	56.42	5.57	58.76	5.72	56.88	5.65	57.17
F15	5.71	58.35	5.57	58.64	5.72	58.94	5.62	58.31
F16	5.61	102.69	5.56	99.81	5.71	101.50	5.65	98.84

【０１２７】

試験１．２で評価したいずれの処方物にもｐＨまたはタンパク質濃度の変化はほとんど無かった（表１４）。これらの処方物で、ＳＥＣによる最初の単量体含量は９８％～９９％の間であった（表１５）。残部はオリゴマー、おそらくは二量体であり、相対的保持時間（ＲＲＴ）０．８９に溶出する。

【０１２８】
【表１７】

表１５：ｔ０における試験１．２の処方物の
ＳＥＣによるピーク面積のパーセンテージ

LB141 S1.2 t0 SEC						
サンプル	HMW1			単量体		
	RRT 0.89			RRT 1.00		
F01	1.56	±	0.06	98.44	±	0.06
F02	1.66	±	0.01	98.34	±	0.01
F03	1.66	±	0.01	98.34	±	0.01
F04	1.55	±	0.01	98.45	±	0.01
F05	1.35	±	0.06	98.65	±	0.06
F06	1.53	±	0.02	98.47	±	0.02
F07	1.53	±	0.01	98.47	±	0.01
F08	1.55	±	0.07	98.45	±	0.07
F09	1.52	±	0.05	98.48	±	0.05
F10	1.45	±	0.01	98.55	±	0.01
F11	1.49	±	0.01	98.51	±	0.01
F12	1.69	±	0.02	98.31	±	0.02
F13	1.13	±	0.01	98.87	±	0.01
F14	1.16	±	0.01	98.84	±	0.01
F15	1.76	±	0.00	98.24	±	0.00
F16	1.72	±	0.04	98.28	±	0.04

【０１２９】
４０℃で１週間保存した際、ほとんどの処方物の単量体含量は、約９７％にまたはそれを越えて低下する（表１６）。ＲＲＴ０．７８および０．８５を有する２つの新たな種が見られ、これらはおそらくより高分子量（ＭＷ）の凝集物である。少数の処方物が他より多い単量体を保持するとみられる。これらにはＦ１３、Ｆ１４、Ｆ１０、およびＦ０７が含まれる。総てがバッファーとしてクエン酸塩を含有し、４つのうち３つがポリオール安定剤としてトレハロースの代わりにマンニトールを使用している。単量体含量の範囲はｔ１では比較的小さいが（表１６）、これらの差異は、特に、どの処方物がＨＭＷ３種（ＲＲＴ０．７８）を含有しないと思われるかを考慮する場合に、おそらく有意義である。
【０１３０】

【表１８】

表１６：ｔ１（４０℃で１週間）における試験１．２の処方物の
ＳＥＣによるピーク面積のパーセンテージ

LB141 S1.2 t1 1 週間 40C SEC												
サンプル	HMW3			HMW2			HMW1			単量体		
	RRT 0.78			RRT 0.85			RRT 0.89			RRT 1.00		
F01	0.12	±	0.01	0.27	±	0.02	2.06	±	0.01	97.56	±	0.03
F02	0.13	±	0.00	0.31	±	0.00	2.89	±	0.02	96.67	±	0.02
F03	0.23	±	0.00	0.37	±	0.02	2.86	±	0.02	96.54	±	0.04
F04	0.14	±	0.00	0.29	±	0.00	2.38	±	0.01	97.20	±	0.01
F05	0.80	±	0.00	0.27	±	0.01	1.86	±	0.02	97.08	±	0.02
F06	0.44	±	0.00	0.32	±	0.02	2.06	±	0.01	97.17	±	0.03
F07	n/a	±	n/a	0.21	±	0.05	1.86	±	0.03	97.93	±	0.08
F08	n/a	±	n/a	0.16	±	0.01	2.33	±	0.02	97.50	±	0.02
F09	0.04	±	0.00	0.27	±	0.01	2.34	±	0.03	97.35	±	0.02
F10	0.00	±	0.00	0.14	±	0.01	1.86	±	0.01	98.00	±	0.02
F11	0.08	±	0.00	0.29	±	0.02	2.07	±	0.02	97.56	±	0.02
F12	n/a	±	n/a	0.24	±	0.00	2.16	±	0.01	97.60	±	0.01
F13	n/a	±	n/a	0.10	±	0.01	1.69	±	0.01	98.21	±	0.00
F14	0.05	±	0.00	0.24	±	0.02	1.77	±	0.00	97.94	±	0.01
F15	0.04	±	0.00	0.35	±	0.02	2.42	±	0.01	97.19	±	0.01
F16	0.07	±	0.00	0.41	±	0.02	2.57	±	0.02	96.95	±	0.01

【０１３１】

【表１９】

表１７：ｔ２（２５℃で２週間）における試験１．２の処方物の
ＳＥＣによるピーク面積のパーセンテージ

LB141 S1.2 t2 SEC									
サンプル	HMW2			HMW1			単量体		
	RRT 0.85			RRT 0.89			RRT 1.00		
F01	0.22	±	0.02	1.71	±	0.01	98.07	±	0.01
F02	0.29	±	0.01	2.28	±	0.01	97.43	±	0.01
F03	0.30	±	0.02	2.16	±	0.02	97.54	±	0.00
F04	0.24	±	0.01	1.98	±	0.01	97.78	±	0.01
F05	0.24	±	0.03	1.63	±	0.03	98.13	±	0.00
F06	0.31	±	0.02	1.91	±	0.05	97.77	±	0.07
F07	0.27	±	0.00	1.69	±	0.01	98.04	±	0.01
F08	0.24	±	0.01	1.90	±	0.01	97.86	±	0.00
F09	0.23	±	0.01	1.97	±	0.00	97.81	±	0.01
F10	0.13	±	0.02	1.65	±	0.03	98.23	±	0.01
F11	0.16	±	0.01	1.74	±	0.01	98.10	±	0.01
F12	0.37	±	0.00	1.99	±	0.00	97.64	±	0.00
F13	0.18	±	0.01	1.51	±	0.02	98.31	±	0.01
F14	0.19	±	0.01	1.51	±	0.01	98.30	±	0.01
F15	0.32	±	0.03	2.06	±	0.04	97.63	±	0.01
F16	0.30	±	0.02	2.22	±	0.01	97.48	±	0.03

【０１３２】

ｔ２で最も安定な処方物（処方物Ｆ０１、Ｆ０５、Ｆ１１、Ｆ１３、およびＦ１４）は、総てがバッファーとしてクエン酸塩を、安定剤としてマンニトールを含有する（表１７）。ＳＥＣにより検出された唯一の変性産物が０．８５のＲＲＴを有するより高ＭＷの種であり、２５℃で高ＭＷ種に凝集は課せられなかったことを示す。２５℃で４週間後（ｔ４）、単量体含量はなお極めて高く、多くの処方物が９８％以上を保持している（表１８）。ＲＲＴ　０．８５における凝集ピークの量の小さな変動を含め、表１８に見られるやや高い単量体レベルをもたらす可能性のある新たな列を設けた。単量体含量の最低値はコハク酸塩を含有するｐＨ５．５の処方物に対するものであり、これは最適ｐＨが５．５より高いことを示唆する。

【０１３３】

【表２０】

表１８：ｔ４（５℃で４週間）における試験１．２の処方物の
ＳＥＣによるピーク面積のパーセンテージ

LB141 S1.2 t4 SEC									
サンプル	HMW2			HMW1			単量体		
	RRT 0.85			RRT 0.89			RRT 1.00		
F01	0.13	±	0.01	2.15	±	0.02	97.71	±	0.05
F02	0.12	±	0.00	2.93	±	0.03	96.95	±	0.03
F03	0.19	±	0.00	2.72	±	0.00	97.09	±	0.01
F04	0.15	±	0.01	2.62	±	0.01	97.24	±	0.01
F05	0.54	±	0.00	1.04	±	0.01	98.37	±	0.04
F06	0.32	±	0.01	1.42	±	0.03	98.25	±	0.05
F07	0.01	±	0.00	1.50	±	0.00	98.50	±	0.00
F08	n/a	±	n/a	0.72	±	0.01	99.28	±	0.01
F09	n/a	±	n/a	0.58	±	0.01	99.42	±	0.01
F10	0.00	±	0.00	1.54	±	0.02	98.46	±	0.02
F11	n/a	±	n/a	0.22	±	0.04	99.78	±	0.04
F12	n/a	±	n/a	0.71	±	0.01	99.29	±	0.01
F13	0.00	±	0.00	1.28	±	0.02	98.72	±	0.02
F14	n/a	±	n/a	0.33	±	0.02	99.67	±	0.02
F15	0.02	±	0.00	0.70	±	0.04	99.28	±	0.03
F16	0.05	±	0.01	0.73	±	0.01	99.22	±	0.01

【０１３４】
【表２１】

表１９：ｔ０における試験１．２の処方物のＲＰ　ＨＰＬＣによる純度

LB141 S1.2 t0 RP					LB141 S1.2 t0 RP			
サンプル	単量体				サンプル	単量体		
F01	88.07	±	0.87		F09	87.39	±	0.25
F02	87.08	±	0.53		F10	88.28	±	0.22
F03	87.25	±	0.26		F11	88.82	±	0.11
F04	86.95	±	0.40		F12	86.59	±	0.33
F05	87.24	±	0.47		F13	89.27	±	0.34
F06	87.75	±	0.20		F14	89.61	±	0.05
F07	87.04	±	0.10		F15	88.45	±	0.16
F08	87.16	±	0.14		F16	87.34	±	0.30

【０１３５】
ｔ０におけるＲＰ　ＨＰＬＣによる純度を表１９に示す。総ての処方物が８７～８９％の範囲の純度を示す。４０℃で１週間の保存の後、純度は、多くの処方物で低下し、８０％未満となるものもある（表２０）。少数のものは（処方物Ｆ０５、Ｆ１４、Ｆ１５、およびＦ１６）は、８５％近い純度を示し続けている。一般的傾向は、タンパク質濃度が低いほど、また、マンニトール量が多いほど、より良好な安定性であると思われる。
【０１３６】

【表２２】

表２０：ｔ１（４０℃で１週間）における試験１．２の処方物の
ＲＰ　ＨＰＬＣによる純度

LB141 S1.2 t1 1週間 40 C RP					LB141 S1.2 t1 1週間 40 C RP			
サンプル	単量体				サンプル	単量体		
F01	81.32	±	0.58		F09	82.51	±	0.71
F02	80.61	±	0.54		F10	79.34	±	0.62
F03	81.95	±	0.18		F11	84.37	±	0.77
F04	79.06	±	0.24		F12	75.09	±	0.52
F05	85.17	±	0.64		F13	80.36	±	0.29
F06	82.92	±	0.20		F14	86.44	±	0.26
F07	80.26	±	0.12		F15	85.11	±	0.62
F08	80.73	±	0.39		F16	84.32	±	0.57

【０１３７】
【表２３】

表２１：ｔ２（２５℃で２週間）における試験１．２の処方物の
ＲＰ　ＨＰＬＣによる純度

LB141 S1.2 t2 2週間 25C RP					LB141 S1.2 t2 2週間 25C RP			
サンプル	単量体				サンプル	単量体		
F01	83.84	±	0.61		F09	84.90	±	0.31
F02	83.16	±	0.57		F10	85.91	±	0.18
F03	84.86	±	0.46		F11	87.00	±	0.34
F04	84.90	±	0.25		F12	84.96	±	0.25
F05	86.88	±	0.16		F13	86.15	±	0.15
F06	86.51	±	0.26		F14	87.93	±	0.16
F07	85.91	±	0.49		F15	86.92	±	0.24
F08	85.71	±	0.36		F16	86.84	±	0.79

【０１３８】
ｔ２では、ほとんどの処方物で、純度はほとんど変化せず、この方法の誤差を考えればおそらく全く変化しなった（表２１）。２５℃で４週間後（ｔ４）、観測された純度の範囲がやや広くなっている（表２２）。安定性の最も低い処方物は低ｐＨ（５．５）かまたは最大のクエン酸塩濃度を持つものである。最も安定な処方物は、安定剤としてマンニトールを含有するか、またはコハク酸塩を高濃度で使用する。一般に、主要な傾向は、タンパク質濃度が低いほど安定性は高いというものである。
【０１３９】

【表２４】

表２２：ｔ４（２５℃で４週間）における試験１．２の処方物のＲＰ　ＨＰＬＣによる純度

LB141 S1.2 t4 4週間 25C RP					LB141 S1.2 t4 4週間 25C RP			
サンプル	単量体				サンプル	単量体		
F01	80.13	±	1.49		F09	87.54	±	0.53
F02	79.73	±	2.64		F10	82.49	±	0.15
F03	84.19	±	0.37		F11	84.54	±	0.26
F04	81.17	±	0.11		F12	77.29	±	0.30
F05	87.97	±	0.33		F13	81.07	±	0.71
F06	88.21	±	0.16		F14	87.67	±	0.14
F07	86.35	±	0.46		F15	86.35	±	0.31
F08	84.16	±	0.39		F16	86.47	±	0.34

【０１４０】

【表２５】

表２３：試験１．２の処方物Ｆ０１－Ｆ０４に関するｃＩＥＦピークの相対的強度

		t0		t1 1週間 40C		t2 2週間 25C		t4 4週間 25C	
処方物	ピーク	pI	相対面積	pI	相対面積	pI	相対面積	pI	相対面積
F01	1	5.81	1.30	5.89	0.56	5.88	0.95	5.87	1.27
	2	5.76	52.48	5.85	45.29	5.82	45.57	5.80	48.45
	3	5.73	16.30	5.81	19.63	5.79	22.26	5.78	22.05
	4,5	5.69	19.28	5.77	24.87	5.74	21.77	5.73	20.29
	6	5.64	7.65	5.71	7.66	5.69	7.72	5.69	6.82
	7	5.61	2.99	5.67	1.98	5.65	1.72	5.65	1.12
	8								
F02	1	5.81	1.51	5.88	0.68	5.85	1.64	5.86	1.52
	2	5.76	49.87	5.84	42.77	5.79	46.60	5.80	47.88
	3	5.73	21.19	5.81	20.99	5.76	25.42	5.78	26.30
	4,5	5.68	18.96	5.77	27.64	5.70	16.71	5.72	17.87
	6	5.64	6.73	5.71	6.76	5.66	8.12	5.68	5.84
	7	5.60	1.74	5.68	1.16	5.62	1.50	5.64	0.58
	8								
F03	1	5.83	1.66	5.89	0.59	5.82	1.49	5.88	0.90
	2	5.77	58.93	5.84	46.19	5.76	51.08	5.82	52.86
	3	5.74	16.39	5.81	16.03	5.72	21.60	5.79	19.42
	4,5	5.70	15.84	5.77	26.72	5.67	17.64	5.74	19.93
	6	5.66	5.77	5.71	8.61	5.62	7.20	5.69	5.94
	7	5.62	1.41	5.68	1.86	5.58	0.99	5.65	0.95
	8								
F04	1	5.82	1.76	5.88	2.43	5.86	1.31	5.87	1.31
	2	5.76	53.50	5.84	44.17	5.79	47.19	5.81	50.44
	3	5.74	19.12	5.80	25.77	5.77	23.37	5.78	19.06
	4,5	5.69	19.26	5.74	18.67	5.72	19.40	5.73	20.67
	6	5.65	4.85	5.70	7.50	5.67	7.17	5.68	6.90
	7	5.60	1.51	5.65	1.45	5.63	1.57	5.64	1.62
	8								

【０１４１】

【表２６】

表２３（続き）：試験１．２の処方物Ｆ０５－Ｆ０８に関するｃＩＥＦピークの相対強度

		t0		t1 1週間 40C		t2 2週間 25C		t3 4週間 25C	
処方物	ピーク	pI	相対面積	pI	相対面積	pI	相対面積	pI	相対面積
F05	1	5.81	1.46	5.88	2.98	5.86	1.47	5.87	1.49
	2	5.75	57.36	5.83	41.56	5.80	49.21	5.81	53.38
	3	5.73	19.00	5.80	32.18	5.77	24.92	5.78	22.57
	4,5	5.68	15.23	5.75	18.42	5.73	17.86	5.73	16.70
	6	5.64	5.85	5.70	4.45	5.68	6.00	5.69	5.10
	7	5.60	1.11	5.67	0.43	5.64	0.54	5.65	0.75
	8								
F06	1	5.87	1.01	5.87	1.41	5.88	1.07	5.86	1.39
	2	5.82	44.28	5.83	41.42	5.82	54.42	5.81	51.10
	3	5.79	20.35	5.80	30.70	5.79	20.06	5.77	24.61
	4,5	5.75	24.16	5.75	18.40	5.75	18.29	5.72	16.23
	6	5.70	8.40	5.70	6.16	5.70	5.66	5.67	5.57
	7	5.66	1.79	5.66	1.91	5.66	0.49	5.63	1.10
	8								
F07	1	5.83	1.28	5.86	1.07	5.88	1.21	5.87	1.25
	2	5.76	53.15	5.81	45.54	5.82	51.93	5.82	55.24
	3	5.74	19.78	5.78	26.26	5.79	19.13	5.79	17.92
	4,5	5.69	18.34	5.73	20.31	5.74	19.19	5.74	19.77
	6	5.65	6.23	5.69	6.81	5.69	7.44	5.70	5.12
	7	5.61	1.21	5.65	1.13	5.65	1.11	5.66	0.71
	8								
F08	1	5.82	1.82	5.90	0.64	5.89	0.98	5.88	1.11
	2	5.76	50.43	5.85	44.58	5.85	36.24	5.82	55.94
	3	5.73	18.50	5.82	15.97	5.81	31.91	5.79	19.31
	4,5	5.69	18.82	5.78	27.87	5.75	22.18	5.75	18.00
	6	5.64	7.46	5.72	8.63	5.70	6.61	5.70	5.27
	7	5.61	2.97	5.69	2.31	5.66	2.08	5.66	0.38
	8								

【０１４２】

【表２７】

表２３（続き）：試験１．２の処方物Ｆ０９－Ｆ１２に関するｃＩＥＦピークの相対強度

		t0		t1 1週間 40C		t2 2週間 25C		t3 4週間 25C	
処方物	ピーク	pI	相対面積	pI	相対面積	pI	相対面積	pI	相対面積
F09	1	5.82	1.44	5.89	0.93	5.84	1.88	5.90	1.34
	2	5.76	49.53	5.85	48.76	5.78	50.99	5.85	51.78
	3	5.73	23.28	5.81	22.91	5.75	24.45	5.82	24.61
	4,5	5.68	17.73	5.77	19.07	5.70	15.62	5.76	17.64
	6	5.64	6.58	5.72	7.54	5.65	5.00	5.71	4.28
	7	5.60	1.44	5.68	0.79	5.61	2.08	5.67	0.36
	8								
F10	1	5.81	1.40	5.90	1.10	5.86	1.68	5.88	0.82
	2	5.76	50.54	5.85	47.64	5.80	47.05	5.83	51.54
	3	5.73	20.27	5.81	21.21	5.77	24.93	5.80	18.82
	4,5	5.68	19.32	5.77	21.64	5.72	18.72	5.75	20.56
	6	5.64	6.93	5.71	6.98	5.67	7.01	5.71	6.89
	7	5.60	1.54	5.67	1.44	5.63	0.62	5.67	1.37
	8								
F11	1	5.84	2.37	5.89	0.99	5.86	1.37	5.91	0.76
	2	5.78	51.88	5.85	49.39	5.80	49.13	5.85	53.52
	3	5.75	18.80	5.81	20.70	5.77	25.37	5.82	17.09
	4,5	5.70	18.84	5.77	20.99	5.72	18.36	5.77	21.27
	6	5.66	7.24	5.72	6.40	5.68	5.01	5.72	6.25
	7	5.61	0.88	5.68	1.53	5.64	0.75	5.68	1.11
	8								
F12	1	5.88	1.39	5.89	0.80	5.87	1.21	5.89	0.72
	2	5.82	43.40	5.85	49.65	5.81	47.83	5.84	48.09
	3	5.80	22.44	5.82	19.51	5.78	22.35	5.81	18.78
	4,5	5.75	24.14	5.77	22.45	5.73	20.82	5.76	22.81
	6	5.70	8.21	5.72	6.93	5.68	6.56	5.72	7.87
	7	5.66	0.42	5.68	0.67	5.64	1.23	5.68	1.73
	8								

【０１４３】

【表２８】

表２３（続き）：試験１．２の処方物Ｆ１３－Ｆ１６に関するｃＩＥＦピークの相対強度

		t0		t1 1週間 40C		t2 2週間 25C		t3 4週間 25C	
処方物	ピーク	pI	相対面積	pI	相対面積	pI	相対面積	pI	相対面積
F13	1	5.84	1.46	5.86	1.44	5.84	1.77	5.89	0.73
	2	5.77	51.26	5.81	54.06	5.78	45.89	5.85	30.54
	3	5.75	20.04	5.78	15.96	5.75	27.27	5.81	35.06
	4,5	5.70	19.86	5.74	20.99	5.70	16.92	5.76	23.90
	6	5.66	6.41	5.69	6.94	5.65	7.07	5.71	8.08
	7	5.62	0.98	5.65	0.60	5.61	1.08	5.67	1.68
	8								
F14	1	5.85	1.16	5.87	1.22	5.84	1.95	5.89	0.99
	2	5.78	49.23	5.82	49.91	5.78	48.22	5.83	51.40
	3	5.76	17.44	5.79	23.66	5.76	26.77	5.80	16.47
	4,5	5.72	21.47	5.75	18.95	5.70	15.61	5.76	22.78
	6	5.67	7.74	5.70	4.73	5.66	6.12	5.71	6.90
	7	5.63	2.96	5.67	1.54	5.62	1.33	5.67	1.45
	8								
F15	1	5.86	1.01	5.89	0.77	5.86	1.34	5.88	0.51
	2	5.79	45.27	5.85	45.84	5.80	50.91	5.84	51.38
	3	5.77	20.51	5.81	22.94	5.77	24.33	5.80	16.84
	4,5	5.73	21.61	5.77	21.53	5.72	18.71	5.76	23.89
	6	5.68	9.86	5.72	7.57	5.67	4.38	5.72	5.70
	7	5.64	1.74	5.69	1.35	5.63	0.34	5.68	1.68
	8								
F16	1	5.83	1.61	5.91	1.07	5.87	1.26	5.88	0.86
	2	5.77	52.78	5.86	47.89	5.82	41.42	5.84	47.18
	3	5.75	23.24	5.83	19.38	5.79	32.26	5.80	15.97
	4,5	5.70	15.76	5.79	19.69	5.72	18.09	5.76	24.04
	6	5.65	5.48	5.74	9.56	5.67	5.89	5.72	9.29
	7	5.61	1.13	5.70	2.41	5.63	1.07	5.68	2.67
	8								

【０１４４】

ＰＬＳモデリングは、最も有効な賦形剤について何らかの指針を提供することができる。このモデリングは限定数のデータポイントにグローバルなフィットを与えるが、特に、データセットが総体として考慮される場合に、データのノイズにより隠されている可能性のある傾向を特定するという点で有用な指針を与えることができる。

【０１４５】

試験１．２に関するＰＬＳ１モデルは、ｔ１における単量体含量の差異をエンドポイントとして用いて構築された。ＰＬＳは、ｐＨ－バッファー相互作用項も含んだ二次モデルである。このモデルは８つの主成分（ＰＣ）を用い、較正セットでは０．９９８およびバリデーションセットでは０．９４６の相関係数を有し、それは極めて正確かつロバストなモデルであったことを示す。様々な因子の相関係数を表２４にまとめる。差を最小化しようとしているので、安定剤は負の相関係数を持つことになる。

【０１４６】

【表２９】

表２４：ｔ１における単量体含量の差異をエンドポイントとして用い、ＰＬＳ１モデル１の構築に使用した因子の相関係数。統計的に有意であると判定された因子（ｐ＜０．０５）を太字で示す。

因子	r値
pH	-0.704
タンパク質	+0.160
クエン酸塩	-0.602
コハク酸塩	+0.296
オクタン酸塩	-0.095
マンニトール	+0.037
トレハロース	+0.004

【０１４７】

ｐＨとクエン酸塩の効果を示す応答曲面は、最適ｐＨが約６であることを示す。クエン酸塩は有益であることが判明し、最適濃度は１０ｍＭ付近であったが、これは極めて浅い最小値である。ｐＨとコハク酸塩の効果に関する応答曲面はより複雑である。ｐＨ６では、コハク酸塩は少なくとも２０ｍＭで安定剤であるが、その効果はコハク酸塩が存在しなかった場合と同じである。提示される最後の曲面は、オクタン酸塩は、ｐＨ６で、１０ｍＭ付近に浅い最小値を有する弱い安定剤であると見られることを示す。オクタン酸塩は、安定性に対して有意な効果を持つと判定されず、応答曲面は比較的浅いプロファイルを呈することに留意されたい。

【０１４８】

ＰＬＳ２モデルは、ｔ２およびｔ４での単量体含量の、２つの異なるエンドポイントを用いて構築された。このモデルは１つのＰＣのみを使用し、較正セットでは０．８６１およびバリデーションセットでは０．６９８の相関係数を有し、それは従前のモデルと同等の精度に近いものではなかったことを示す。様々な因子の相関係数を表２５に挙げる。クエン酸塩は弱い安定剤であることが示されるが、コハク酸塩は不安定剤として挙げられている。表２５の値は二次項または相互作用項を反映せず、従って、実際の応答曲面の検討が役立つ。

【０１４９】

【表３０】

表２５：ｔ２およびｔ４（２５℃で２週間および４週間）における単量体含量をエンドポイントとして用い、ＰＬＳ２モデルの構築に使用した因子の相関係数。統計的に有意であると判定された因子（ｐ＜０．０５）を太字で示す。

因子	r値
pH	+0.024
タンパク質	-0.093
クエン酸塩	+0.087
コハク酸塩	-0.149
オクタン酸塩	-0.070
マンニトール	+0.065
トレハロース	-0.126
PS 80	-0.165

【０１５０】

ｐＨとクエン酸塩の効果に関する応答曲面は、最適ｐＨが５．５～５．７であることを示す。このモデルによれば、最適クエン酸塩濃度は１０ｍＭ付近であるが、全曲面にわたる範囲が極めて小さく（＜０．２％）、従って、いずれの変動も有意でない可能性がある。オクタン酸塩は、このモデルによれば、特に１０ｍＭを越える濃度で不安定剤である。同様に、ＰＳ　８０は、このモデルによれば、２５℃でアルビグルチドの安定性を低下させる。加えて、両モデルから、タンパク質濃度が上昇すると安定性の低下をもたらすが、その効果は大きくないことが見出される。このモデルは質が低いものであり、試験１で行われた他の研究からの知見と一致しないかもしれないことに留意されたい。

【０１５１】

ｔ４における単量体含量だけをエンドポイントとして用いるＰＬＳ１モデルを構築した。このモデルは８つのＰＣを用い、較正セットでは０．９９９およびバリデーションセットでは０．８５６の相関係数を有し、それを上記の最初のＰＬＳ１モデルに匹敵する高品質モデルとした。相関係数は多くの因子では相当大きかったが、ｐＨ、タンパク質、およびコハク酸塩の３つだけが有意であると思われた（表２６）。

【０１５２】

【表３１】

表２６：ｔ４（２５℃で４週間）における単量体含量をエンドポイントとして用い、ＰＬＳ１モデルの構築に使用した因子の相関係数。統計的に有意であると判定された因子（ｐ＜０．０５）を太字で示す。

因子	r値
pH	+0.585
タンパク質	-0.137
クエン酸塩	+0.295
コハク酸塩	-0.497
オクタン酸塩	-0.261
マンニトール	-0.025
トレハロース	-0.154
PS 80	-0.007

【０１５３】
ｐＨとクエン酸塩の効果に関する応答曲面は、ｐＨ最適値がｐＨ６．０付近であることを示し、ｔ２データが、より低いｐＨが優れているといういずれの指摘にも影響を及ぼしていたということを示唆する。このモデルは、最適クエン酸塩濃度が１０ｍＭであったことを示す。
【０１５４】
顕著な濃度効果が存在する場合、製品の保存寿命を効果的に延長するので、タンパク質濃度の効果は注目される。このモデルは、タンパク質濃度の上昇とともに、特に、濃度が６０ｍｇ／ｍＬを越えれば、安定性が低下することを示す。このモデルは、タンパク質濃度がｔ４における単量体含量に対して有意な効果を有することを示す。
【０１５５】
コハク酸塩は、ｐＨ６で非線形効果を有すると予測されるが、そのｐＨでの効果は極めて小さい。それと同時に、それはｐＨで５．５明らかに不安定化する。コハク酸塩の影響が小さいことを考えれば、試験１．２データの総てを基に、クエン酸塩をバッファーとしての最良の選択と考えることがおそらく最良である。最後に、オクタン酸塩も、しかしながら、コハク酸塩よりもはるかにｐＨ依存的な様式で(but in a more much pH-independent fashion that succinate)不安定化する。最適ｐＨは６．０付近であると予測される。
【０１５６】
第４のＰＬＳ（ＰＬＳ１）モデルを、ｔ１におけるＲＰ　ＨＰＬＣによる純度の差異をエンドポイントとして用いて構築した。このモデルは３つのＰＣを用い、較正セットでは０．９４９およびバリデーションセットでは０．７４８の相関係数を有していた。このモデルにおける因子の相関係数を表２７にまとめる。ｐＨ、クエン酸塩およびオクタン酸塩の３つの因子が有意であると計算された。
【０１５７】

【表３２】

表２７：ｔ１（４０℃で１週間）におけるＲＰ　ＨＰＬＣによる純度の差異をエンドポイントとして用い、ＰＬＳ１モデルの構築に使用した因子の相関係数。統計的に有意であると判定された因子（ｐ＜０．０５）を太字で示す。

因子	r値
pH	+0.252
タンパク質	-0.052
クエン酸塩	+0.217
コハク酸塩	-0.080
オクタン酸塩	+0.372
マンニトール	+0.029
トレハロース	+0.071
PS 80	-0.059

【０１５８】
このＰＬＳモデルは、クエン酸塩濃度が１０ｍＭを越えた場合に、最適ｐＨは５．５～５．７付近であることを示す。従前に見られたように、ｐＨとコハク酸塩に関する応答曲面は、極めて複雑である。それは、コハク酸塩が存在しない場合、最適ｐＨは５．５であることを示す。しかしながら、コハク酸塩が存在する場合、その傾向は逆転し、ｐＨ６がより有利であり、コハク酸塩は、２０ｍＭで安定性のいくらかの増大を与える。このモデルによれば、オクタン酸塩は、総てのｐＨ値で不安定化する。このモデルはまた、ＰＳ８０は、５．５～５．７付近の最適ｐＨで、純度を維持するのに有益であることを示す。

【０１５９】
全体的に見れば、試験１．２は、アルビグルチドの安定化に何らかの重要な情報を提供する。最適ｐＨは６．０付近であるが、若干低いｐＨ値でも、安定性プロファイルを感知できるほどに変化させない。バッファー効果に対するデータは変動するが、一般的意味は、適度な量のクエン酸塩、約１０～１５ｍＭが有益であるということである。コハク酸塩の効果は解読がより難しいが、それがクエン酸塩と同程度良好な安定剤であることを示唆するデータはない。

【０１６０】
特に、ＳＥＣにより測定される物理的安定性に関して、タンパク質濃度が上昇すると安定性は低下する。７０ｍｇ／ｍＬほどを越える濃度は、安定性をある程度低下させる。オクタン酸塩は安定性に有害であることが示されたものの、いくらかのＰＳ　８０はいくらかの、しかしながら、いずれの数学的モデルでも有意であると見なされるほど十分なことは稀である、利益を提供するとみられる。

【０１６１】
試験１．２で考慮された２つの構造的安定剤マンニトールおよびトレハロースでは、２つの間に有意な差があるとは思われない。このデータの中にはマンニトールがより良好な安定剤であることを示唆するものがあるが、これらの差異は極めてわずかなものであるので、これを決定的にいうことはできない。ｐＨ、バッファーおよびタンパク質濃度の影響はより重要であると思われる。

【０１６２】

最後に、これらのサンプルを、非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥを用いて調べた。ｔ０において、５０ｋＤ付近に主要な単量体バンドと、１１０ｋＤ付近に、おそらく二量体である第２のより弱いバンドが存在する（図１０および１１）。ｔ１において、２００ｋＤ付近のかすかなバンドがいくつかの処方物に見られる（図１２および１３）。このバンドは、ｔ２サンプルには見られない（図１４および１５）。これらの結果はＳＥＣ所見に反映され、２５℃ではＲＲＴ　０．７８の種を生じないが、４０℃処理では生じる。

【０１６３】

試験１．３．

最後の試験は、トレハロースおよびアルギニンＨＣｌ両方の濃度効果を検討するように計画した（表２８）。クエン酸塩は検討した唯一のバッファー系であり、５～１５ｍＭの間で変動した。従前のデータはより低濃度の使用が保存寿命を延長させ得ることを示唆したことから、３０ｍｇ／ｍＬという低いタンパク質濃度を採用した。２サンプル以外の総てでｐＨは６．０に固定した。オクタン酸塩は、従前のデータ（試験１．２および試験２．０）に基づき、潜在的安定剤としては打ち切った。サンプルは５か月の期間維持した。

【０１６４】

【表３３】

表２８：試験１．３の処方物の組成

処方物番号	pH	ｸｴﾝ酸塩	ﾀﾝﾊﾟｸ質	ｱﾙｷﾞﾆﾝ HCl	ﾄﾚﾊﾛｰｽ	PS 80
		mM	mg/mL	mM	mM	wt%
1	5.7	5	50	100	117	0.01
2	5.7	10	50	100	117	0.01
3	6	5	30	100	117	0.01
4	6	5	50	100	117	0.01
5	6	10	50	100	117	0.01
6	6	15	50	100	117	0.01
7	6	5	30	50	207	0.01
8	6	5	50	75	162	0.01
9	6	5	80	125	72	0.01
10	6	10	30	50	207	0.01
11	6	10	50	75	162	0.01
12	6	10	80	125	72	0.01
13	6	15	50	100	117	0.01
14	6	5	50	50	207	0.01
15	6	5	50	125	72	0.01
16	6	5	100	100	117	0
17	6	5	100	100	117	0.01
18	6	5	50	100	117	0

【０１６５】

サンプルを複数の時点および保存温度でアッセイした。安定性データは、４０℃で１週間および２週間後、３０℃で１週間、２週間、または３週間後、２５℃で４週間、１３週間および２２週間（およそ１か月、３か月、および５か月）後、ならびに５℃で３か月および５か月後に収集した。安定性試験は、以下にまとめるように、ＳＥＣおよびＲＰ　ＨＰＬＣを用いて実施した。逆に、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびｃＩＥＦは、それらが安定性を示す方法とは思われないのでこの時点で打ち切った。加えて、サンプルをＧＳＫにおいて、ＳＥＣおよびＲＰも用い、ｃＩＥＦおよびＣａｌｉｐｅｒ分析により行われる試験を加えてアッセイした。

【０１６６】

【表３４】

表２９：試験１．３からのサンプルのｐＨ値

処方物	t0	t1 25C	t1 40C	t2 25C	t2 40C	t3 25C	t4 25C	t13 5C	t13 25C	t22 5C	t22 25C
F01	5.68	5.76	5.70	5.70	5.73	5.79	5.84	5.75	5.75	5.70	5.67
F02	5.65	5.60	5.62	5.70	5.64	5.71	5.73	5.67	5.68	5.66	5.62
F03	6.01	5.97	6.03	6.01	6.03	6.07	6.07	6.08	6.05	5.98	6.01
F04	6.11	6.13	6.12	6.21	6.14	6.18	6.19	6.19	6.16	6.17	6.14
F05	5.94	5.93	5.95	6.00	5.96	6.02	6.02	5.99	5.97	5.99	5.95
F06	5.93	5.92	6.01	5.95	5.92	5.99	5.96	5.95	5.94	5.90	5.91
F07	6.01	6.03	6.00	6.11	6.10	6.13	6.06	6.12	6.09	6.08	6.02
F08	6.10	6.12	6.13	6.13	6.12	6.16	6.16	6.10	6.13	6.12	6.15
F09	6.22	6.17	6.14	6.21	6.21	6.26	6.26	6.24	6.22	6.18	6.19
F10	5.96	5.89	5.96	5.96	5.96	5.95	5.95	5.96	5.96	5.92	5.94
F11	5.96	5.95	5.93	5.92	5.94	6.01	5.97	5.99	5.97	5.93	5.97
F12	6.04	6.05	6.01	6.06	6.04	6.07	6.07	6.06	6.02	6.03	6.01
F13	6.05	5.90	5.93	5.94	5.93	5.94	5.94	5.93	5.94	5.90	5.90
F14	6.05	5.97	6.04	6.07	6.02	6.07	5.99	6.09	6.05	6.03	6.01
F15	6.04	6.04	6.08	6.09	6.07	6.09	6.10	6.06	6.06	6.04	6.04
F16	6.04	5.97	5.98	6.13	6.05	6.05	6.09	6.07	6.00	6.01	6.00
F17	6.14	6.19	6.17	6.16	6.15	6.14	6.19	6.17	6.11	6.12	6.09
F18	5.92	5.93	5.80	5.94	5.95	5.96	5.96	5.95	6.03	5.89	5.86

【０１６７】

【表３５】

表３０：試験１．３からのサンプルのＵＶによる濃度

処方物	t0	t1 25C	t1 40C	t2 25C	t2 40C	t3 25C	t4 25C	t13 5C	t13 25C	t22 5C	t22 25C
F01	57.8	52.5	51.3	51.3	51.0	50.8	51.2	51.1	53.2	51.8	50.2
F02	48.3	48.76	49.0	49.8	49.9	49.0	48.8	49.4	49.8	55.0	48.8
F03	30.6	30.46	31.3	31.7	31.3	30.9	30.3	31.1	31.0	30.6	31.5
F04	50.1	48.7	48.9	49.6	49.7	49.1	48.8	48.5	50.3	49.1	50.6
F05	50.77	49.7	50.4	49.6	49.3	48.7	49.5	49.0	44.1	52.9	51.5
F06	51.5	50.2	49.4	50.4	51.0	52.1	50.1	48.5	49.1	49.7	50.0
F07	29.4	29.0	30.2	30.6	30.6	28.2	29.6	30.6	29.1	29.5	29.1
F08	47.9	47.2	49.5	47.5	48.1	47.2	47.9	47.5	50.0	46.9	48.8
F09	79.3	78.6	79.4	77.0	79.6	78.9	77.5	75.8	78.5	79.0	78.3
F10	31.3	29.4	33.3	29.3	29.4	29.9	29.0	29.2	28.8	29.9	28.9
F11	50.7	50.1	51.4	49.6	49.7	48.7	50.2	50.2	50.8	50.8	51.1
F12	77.2	74.9	78.3	76.7	76.3	74.5	75.6	75.3	75.4	75.0	78.5
F13	45.9	45.4	47.6	46.7	46.2	47.1	45.3	46.0	46.0	45.7	46.5
F14	48.9	47.2	50.3	48.2	48.2	47.6	47.5	47.3	48.1	47.7	47.7
F15	48.3	48.4	30.2	48.4	49.3	48.5	48.6	46.7	47.1	51.1	47.9
F16	97.0	95.8	96.9	99.6	100.2	96.5	97.5	96.3	93.6	99.0	98.6
F17	98.9	102.7	101.0	99.4	101.3	98.0	98.6	99.7	98.6	99.6	98.2
F18	57.8	48.76	49.5	50.8	48.5	41.2	48.9	54.0	48.7	48.4	49.0

【０１６８】

ｐＨ値（表２９）およびタンパク質濃度（表３０）は両方とも、試験１．３の過程で極めて安定であると思われる。ＳＥＣによる単量体含量はｔ０において約９８％～９８．５％の範囲であり、二量体（ＲＲＴ　０．８９）およびオリゴマー（ＲＲＴ　０．８５）のみが観察された（表３１）。これらの試験で、ＳＥＣにより断片が見られた時点は無かった。

【０１６９】

【表３６】

表３１：ｔ０での試験１．３における処方物のＳＥＣによる
ピーク面積のパーセンテージ

LB141 S1.3 t0 SEC												
サンプル	HMW3			HMW2			HMW1			単量体		
	RRT 0.79			RRT 0.85			RRT 0.89			RRT 1.00		
F01	n/a	±	n/a	0.10	±	0.00	1.38	±	0.01	98.52	±	0.01
F02	n/a	±	n/a	0.10	±	0.00	1.36	±	0.00	98.54	±	0.00
F03	n/a	±	n/a	0.08	±	0.00	1.47	±	0.02	98.45	±	0.02
F04	n/a	±	n/a	0.08	±	0.00	1.54	±	0.01	98.38	±	0.01
F05	n/a	±	n/a	0.08	±	0.00	1.42	±	0.00	98.49	±	0.00
F06	n/a	±	n/a	0.09	±	0.00	1.35	±	0.00	98.56	±	0.00
F07	n/a	±	n/a	0.09	±	0.00	1.48	±	0.00	98.44	±	0.01
F08	n/a	±	n/a	0.09	±	0.00	1.58	±	0.00	98.33	±	0.01
F09	n/a	±	n/a	0.09	±	0.00	1.81	±	0.01	98.10	±	0.01
F10	n/a	±	n/a	0.10	±	0.00	1.50	±	0.00	98.40	±	0.00
F11	n/a	±	n/a	0.11	±	0.00	1.47	±	0.01	98.42	±	0.01
F12	n/a	±	n/a	0.10	±	0.00	1.66	±	0.01	98.25	±	0.01
F13	n/a	±	n/a	0.11	±	0.00	1.53	±	0.00	98.36	±	0.00
F14	n/a	±	n/a	0.10	±	0.00	1.55	±	0.01	98.35	±	0.01
F15	n/a	±	n/a	0.09	±	0.00	1.67	±	0.00	98.24	±	0.01
F16	n/a	±	n/a	0.11	±	0.00	1.73	±	0.01	98.16	±	0.01
F17	n/a	±	n/a	0.10	±	0.00	1.89	±	0.01	98.01	±	0.01
F18	n/a	±	n/a	0.12	±	0.00	1.72	±	0.00	98.16	±	0.00

【０１７０】

【表３７】

表３２：３０℃で１週間保存した試験１．３の処方物のＳＥＣによるピーク面積のパーセンテージ

LB141 S1.3 t1 30C SEC												
サンプル	HMW3			HMW2			HMW1			単量体		
	RRT 0.79			RRT 0.85			RRT 0.89			RRT 1.00		
F01	n/a	±	n/a	0.22	±	0.00	1.81	±	0.00	97.98	±	0.00
F02	n/a	±	n/a	0.21	±	0.00	1.73	±	0.00	98.06	±	0.00
F03	n/a	±	n/a	0.15	±	0.00	1.81	±	0.01	98.04	±	0.00
F04	n/a	±	n/a	0.15	±	0.00	1.95	±	0.00	97.90	±	0.01
F05	n/a	±	n/a	0.17	±	0.00	1.77	±	0.00	98.06	±	0.00
F06	n/a	±	n/a	0.17	±	0.00	1.76	±	0.00	98.07	±	0.00
F07	n/a	±	n/a	0.16	±	0.00	1.85	±	0.01	97.99	±	0.01
F08	n/a	±	n/a	0.16	±	0.00	1.98	±	0.00	97.86	±	0.00
F09	n/a	±	n/a	0.17	±	0.12	2.24	±	0.12	97.58	±	0.01
F10	n/a	±	n/a	0.16	±	0.00	1.92	±	0.01	97.92	±	0.01
F11	n/a	±	n/a	0.18	±	0.00	1.89	±	0.00	97.93	±	0.00
F12	n/a	±	n/a	0.18	±	0.00	1.92	±	0.00	97.90	±	0.00
F13	n/a	±	n/a	0.18	±	0.00	1.89	±	0.00	97.93	±	0.00
F14	n/a	±	n/a	0.19	±	0.00	2.00	±	0.01	97.81	±	0.00
F15	n/a	±	n/a	0.18	±	0.00	1.96	±	0.01	97.86	±	0.00
F16	n/a	±	n/a	0.09	±	0.11	2.31	±	0.11	97.60	±	0.01
F17	n/a	±	n/a	0.02	±	0.00	2.42	±	0.01	97.55	±	0.01
F18	n/a	±	n/a	0.02	±	0.00	2.36	±	0.01	97.61	±	0.01

【０１７１】

３０℃で、より高ＭＷの種は見られず、単量体の損失はわずかである（表３２）。最も低い単量体含量は１００ｍｇ／ｍＬ処方物（処方物Ｆ１６およびＦ１７）で見られた。他方、４０℃では、わずか１週間後でも、より高ＭＷの種が見られた（表３３）。ｔ０との差異は小さいが、より高いトレハロースレベルおよびより低いアルギニン濃度が安定性に有益であり得ると思われる。１週間のサンプルに対する若干のさらなる単量体含量の低下が３０℃２週間で見られる（表３４）。この場合にも、より高ＭＷの種（ＲＲＴ　０．７９）が見られない。同様に、４０℃で２週間の保存の後でさえ損失はほとんどなく（表３５）、単量体含量は多くの処方物でなお９７％以上である。最大の低下は、ＰＳ　８０を含まない、または高タンパク質濃度の処方物で見られる。

【０１７２】

【表３８】

表３３：４０℃で１週間保存した試験１．３の処方物のＳＥＣによるピーク面積のパーセンテージ

LB141 S1.3 t1 40C SEC												
サンプル	HMW3			HMW2			HMW1			単量体		
	RRT 0.79			RRT 0.85			RRT 0.89			RRT 1.00		
F01	0.24	±	0.00	0.21	±	0.01	2.12	±	0.03	97.42	±	0.03
F02	0.26	±	0.00	0.24	±	0.00	2.11	±	0.01	97.39	±	0.01
F03	0.19	±	0.00	0.19	±	0.00	1.95	±	0.02	97.82	±	0.02
F04	0.21	±	0.01	0.21	±	0.01	2.16	±	0.01	97.57	±	0.01
F05	0.21	±	0.01	0.21	±	0.01	1.94	±	0.00	97.80	±	0.00
F06	0.19	±	0.00	0.19	±	0.00	1.84	±	0.01	97.92	±	0.01
F07	0.18	±	0.00	0.18	±	0.00	1.92	±	0.01	97.87	±	0.01
F08	0.23	±	0.00	0.23	±	0.00	2.16	±	0.01	97.55	±	0.01
F09	0.14	±	0.11	0.26	±	0.01	2.35	±	0.02	97.31	±	0.01
F10	0.17	±	0.01	0.17	±	0.01	1.97	±	0.01	97.82	±	0.01
F11	0.16	±	0.10	0.22	±	0.01	1.99	±	0.01	97.75	±	0.01
F12	0.23	±	0.01	0.23	±	0.01	2.08	±	0.02	97.63	±	0.01
F13	0.18	±	0.01	0.18	±	0.01	1.93	±	0.01	97.85	±	0.01
F14	0.22	±	0.01	0.22	±	0.01	2.13	±	0.01	97.57	±	0.00
F15	0.22	±	0.01	0.22	±	0.01	2.17	±	0.01	97.50	±	0.01
F16	0.24	±	0.01	0.28	±	0.01	2.41	±	0.00	97.07	±	0.00
F17	0.29	±	0.01	0.29	±	0.01	2.66	±	0.02	96.89	±	0.01
F18	0.16	±	0.03	0.16	±	0.03	2.20	±	0.03	97.50	±	0.01

【０１７３】

【表３９】

表３４：３０℃で２週間保存した試験１．３の処方物のＳＥＣによる
ピーク面積のパーセンテージ

LB141 S1.3 t2 30C SEC												
サンプル	HMW3			HMW2			HMW1			単量体		
	RRT 0.79			RRT 0.85			RRT 0.89			RRT 1.00		
F01	n/a	±	n/a	0.24	±	0.01	1.85	±	0.01	97.91	±	0.01
F02	n/a	±	n/a	0.24	±	0.01	1.83	±	0.01	97.93	±	0.01
F03	n/a	±	n/a	0.18	±	0.00	1.82	±	0.00	98.00	±	0.00
F04	n/a	±	n/a	0.19	±	0.00	1.91	±	0.00	97.90	±	0.00
F05	n/a	±	n/a	0.20	±	0.00	1.83	±	0.00	97.96	±	0.01
F06	n/a	±	n/a	0.20	±	0.01	1.80	±	0.00	98.00	±	0.01
F07	n/a	±	n/a	0.18	±	0.00	1.91	±	0.00	97.91	±	0.00
F08	n/a	±	n/a	0.20	±	0.00	1.97	±	0.00	97.83	±	0.00
F09	n/a	±	n/a	0.17	±	0.01	2.03	±	0.01	97.80	±	0.03
F10	n/a	±	n/a	0.16	±	0.01	1.88	±	0.01	97.96	±	0.01
F11	n/a	±	n/a	0.19	±	0.00	1.89	±	0.02	97.92	±	0.02
F12	n/a	±	n/a	0.18	±	0.01	1.88	±	0.02	97.94	±	0.02
F13	n/a	±	n/a	0.18	±	0.01	1.83	±	0.01	98.00	±	0.02
F14	n/a	±	n/a	0.17	±	0.00	1.93	±	0.01	97.90	±	0.00
F15	n/a	±	n/a	0.16	±	0.01	1.78	±	0.02	98.05	±	0.02
F16	n/a	±	n/a	0.19	±	0.01	2.05	±	0.01	97.76	±	0.02
F17	n/a	±	n/a	0.18	±	0.00	2.14	±	0.01	97.68	±	0.01
F18	n/a	±	n/a	0.17	±	0.00	2.04	±	0.01	97.79	±	0.02

【０１７４】

【表４０】

表３５：４０℃で２週間保存した試験１．３の処方物のＳＥＣによるピーク面積のパーセンテージ

LB141 S1.3 t2 40C SEC												
サンプル	HMW3			HMW2			HMW1			単量体		
	RRT 0.79			RRT 0.85			RRT 0.89			RRT 1.00		
F01	0.61	±	0.01	0.24	±	0.01	2.24	±	0.01	96.92	±	0.01
F02	0.64	±	0.01	0.21	±	0.02	2.16	±	0.02	96.98	±	0.00
F03	0.10	±	0.01	0.21	±	0.02	2.19	±	0.03	97.50	±	0.05
F04	0.13	±	0.00	0.25	±	0.01	2.23	±	0.01	97.38	±	0.01
F05	0.09	±	0.00	0.23	±	0.01	2.05	±	0.02	97.64	±	0.02
F06	0.06	±	0.00	0.20	±	0.01	1.97	±	0.03	97.78	±	0.01
F07	0.04	±	0.00	0.17	±	0.00	1.94	±	0.01	97.85	±	0.01
F08	0.34	±	0.01	0.26	±	0.01	2.14	±	0.01	97.26	±	0.03
F09	0.65	±	0.03	0.31	±	0.00	2.33	±	0.03	96.72	±	0.05
F10	0.15	±	0.00	0.21	±	0.01	2.01	±	0.04	97.63	±	0.04
F11	0.42	±	0.00	0.24	±	0.01	2.10	±	0.01	97.24	±	0.02
F12	0.35	±	0.01	0.27	±	0.01	2.16	±	0.02	97.22	±	0.02
F13	0.08	±	0.00	0.20	±	0.01	2.35	±	0.01	97.37	±	0.01
F14	0.17	±	0.02	0.25	±	0.00	2.45	±	0.02	97.13	±	0.01
F15	0.32	±	0.01	0.35	±	0.00	2.56	±	0.02	96.77	±	0.02
F16	1.01	±	0.03	0.49	±	0.02	2.73	±	0.04	95.77	±	0.06
F17	1.50	±	0.03	0.46	±	0.02	2.54	±	0.01	95.50	±	0.02
F18	0.89	±	0.00	0.45	±	0.01	2.76	±	0.01	95.90	±	0.01

【０１７５】

【表４１】

表３６：３０℃で３週間保存した試験１．３の処方物のＳＥＣによるピーク面積のパーセンテージ

LB141 S1.3 t3 30C SEC												
サンプル	HMW3			HMW2			HMW1			単量体		
	RRT 0.79			RRT 0.85			RRT 0.89			RRT 1.00		
F01	n/a	±	n/a	0.14	±	0.02	1.85	±	0.01	98.06	±	0.01
F02	n/a	±	n/a	0.13	±	0.01	1.83	±	0.01	98.11	±	0.01
F03	n/a	±	n/a	0.10	±	0.03	1.82	±	0.00	98.21	±	0.01
F04	n/a	±	n/a	0.11	±	0.02	1.91	±	0.00	98.10	±	0.01
F05	n/a	±	n/a	0.10	±	0.00	1.83	±	0.00	98.12	±	0.01
F06	n/a	±	n/a	0.11	±	0.03	1.80	±	0.00	98.13	±	0.01
F07	n/a	±	n/a	0.11	±	0.00	1.91	±	0.00	98.05	±	0.04
F08	n/a	±	n/a	0.11	±	0.01	1.97	±	0.00	97.97	±	0.01
F09	n/a	±	n/a	0.15	±	0.02	2.03	±	0.01	97.82	±	0.02
F10	n/a	±	n/a	0.10	±	0.01	1.88	±	0.01	98.03	±	0.01
F11	n/a	±	n/a	0.13	±	0.00	1.89	±	0.02	97.95	±	0.00
F12	n/a	±	n/a	0.12	±	0.01	1.88	±	0.02	97.95	±	0.03
F13	n/a	±	n/a	0.14	±	0.03	1.83	±	0.01	98.00	±	0.00
F14	n/a	±	n/a	0.15	±	0.05	1.93	±	0.01	97.85	±	0.01
F15	n/a	±	n/a	0.12	±	0.01	1.78	±	0.02	97.99	±	0.02
F16	n/a	±	n/a	0.13	±	0.02	2.05	±	0.01	97.81	±	0.03
F17	n/a	±	n/a	0.12	±	0.02	2.14	±	0.01	97.72	±	0.02
F18	n/a	±	n/a	0.12	±	0.01	2.04	±	0.01	97.79	±	0.02

【０１７６】

３０℃で３週間後でさえ、ほとんどの処方物で単量体含量の損失はほとんどなく（表３６）、これらが安定性に関してはほぼ最適であることが示唆される。２５℃で４週間保持されたサンプルでは、単量体含量は９８％付近でなお代わらず、これはｔ０のレベルに近い（表３７）。これらの短期試験は総て、ここで考慮される処方物がほぼ最適であることを示す。言い換えれば、ＳＥＣにより測定される物理的安定性は、クエン酸バッファー中、ｐＨ６．０付近で最大であり、アルギニンおよびトレハロースは安定剤として協調して働いている。ＰＳ　８０は長期安定性には必要でないか、または有害でさえある可能性がある。試験１．２については、より高いタンパク質濃度はアルビグルチドの保存安定性を低下させると思われる。

【０１７７】

【表４２】

表３７：２５℃で４週間保存した試験１．３の処方物のＳＥＣによるピーク面積のパーセンテージ

LB141 S1.3 t4 25C SEC												
サンプル	HMW3			HMW2			HMW1			単量体		
	RRT 0.79			RRT 0.85			RRT 0.89			RRT 1.00		
F01	n/a	±	n/a	0.19	±	0.00	1.68	±	0.00	98.12	±	0.00
F02	n/a	±	n/a	0.18	±	0.01	1.63	±	0.01	98.18	±	0.02
F03	n/a	±	n/a	0.12	±	0.01	1.72	±	0.01	98.16	±	0.02
F04	n/a	±	n/a	0.14	±	0.00	1.84	±	0.00	98.03	±	0.01
F05	n/a	±	n/a	0.17	±	0.00	1.75	±	0.01	98.09	±	0.00
F06	n/a	±	n/a	0.17	±	0.00	1.72	±	0.00	98.12	±	0.01
F07	n/a	±	n/a	0.14	±	0.00	1.84	±	0.01	98.02	±	0.01
F08	n/a	±	n/a	0.15	±	0.01	1.91	±	0.01	97.94	±	0.02
F09	n/a	±	n/a	0.19	±	0.01	2.02	±	0.01	97.78	±	0.01
F10	n/a	±	n/a	0.15	±	0.01	1.88	±	0.01	97.97	±	0.01
F11	n/a	±	n/a	0.18	±	0.01	1.87	±	0.00	97.95	±	0.00
F12	n/a	±	n/a	0.18	±	0.01	1.86	±	0.02	97.96	±	0.01
F13	n/a	±	n/a	0.17	±	0.00	1.80	±	0.00	98.02	±	0.00
F14	n/a	±	n/a	0.16	±	0.01	1.87	±	0.00	97.96	±	0.02
F15	n/a	±	n/a	0.15	±	0.00	1.78	±	0.01	98.07	±	0.01
F16	n/a	±	n/a	0.18	±	0.01	1.97	±	0.01	97.84	±	0.02
F17	n/a	±	n/a	0.21	±	0.00	2.01	±	0.01	97.78	±	0.01
F18	n/a	±	n/a	0.17	±	0.01	1.96	±	0.01	97.88	±	0.00

【０１７８】

【表４３】

表３８：５℃で１３週間（３か月）保存した試験１．３の処方物のＳＥＣによるピーク面積のパーセンテージ

LB141 S1.3 t13 5C SEC												
サンプル	HMW3			HMW2			HMW1			単量体		
	RRT 0.79			RRT 0.85			RRT 0.89			RRT 1.00		
F01	n/a	±	n/a	0.22	±	0.01	1.85	±	0.01	97.93	±	0.01
F02	n/a	±	n/a	0.21	±	0.00	1.75	±	0.00	98.04	±	0.00
F03	n/a	±	n/a	0.16	±	0.01	1.83	±	0.01	98.01	±	0.00
F04	n/a	±	n/a	0.15	±	0.01	1.92	±	0.01	97.92	±	0.00
F05	n/a	±	n/a	0.17	±	0.01	1.81	±	0.01	98.02	±	0.01
F06	n/a	±	n/a	0.17	±	0.00	1.76	±	0.00	98.07	±	0.00
F07	n/a	±	n/a	0.16	±	0.00	1.82	±	0.00	98.02	±	0.01
F08	n/a	±	n/a	0.16	±	0.00	1.91	±	0.01	97.94	±	0.01
F09	n/a	±	n/a	0.16	±	0.00	2.06	±	0.01	97.78	±	0.01
F10	n/a	±	n/a	0.16	±	0.00	1.79	±	0.00	98.05	±	0.00
F11	n/a	±	n/a	0.17	±	0.01	1.82	±	0.01	98.01	±	0.01
F12	n/a	±	n/a	0.16	±	0.00	1.89	±	0.01	97.95	±	0.00
F13	n/a	±	n/a	0.17	±	0.00	1.81	±	0.00	98.02	±	0.00
F14	n/a	±	n/a	0.17	±	0.01	1.88	±	0.01	97.95	±	0.00
F15	n/a	±	n/a	0.15	±	0.01	1.94	±	0.01	97.91	±	0.00
F16	n/a	±	n/a	0.16	±	0.00	1.96	±	0.01	97.87	±	0.00
F17	n/a	±	n/a	0.15	±	0.00	2.04	±	0.00	97.80	±	0.00
F18	n/a	±	n/a	0.18	±	0.00	2.06	±	0.01	97.76	±	0.01

【０１７９】

５℃および２５℃で３か月および５か月（それぞれｔ１３およびｔ２２）保持する長期保存試験を行った。５℃で３か月後、Ｓｅｃによる単量体含量は、総てではないが多くの処方物で９８％近く維持された（表３８）。比較として、２５℃で同じ期間保持したものは約９７％の単量体を含有しており（表３９）、これらの処方物は総て極めて安定であったことを示す。

【０１８０】

【表４４】

表３９：２５℃で１３週間（３か月）保存した試験１．３の処方物のＳＥＣによるピーク面積のパーセンテージ

LB141 S1.3 t13 25C SEC												
サンプル	HMW3			HMW2			HMW1			単量体		
	RRT 0.79			RRT 0.85			RRT 0.89			RRT 1.00		
F01	n/a	±	n/a	0.37	±	0.01	2.55	±	0.02	97.08	±	0.01
F02	n/a	±	n/a	0.35	±	0.02	2.46	±	0.02	97.19	±	0.00
F03	n/a	±	n/a	0.23	±	0.01	2.44	±	0.01	97.33	±	0.00
F04	n/a	±	n/a	0.24	±	0.01	2.58	±	0.01	97.18	±	0.00
F05	n/a	±	n/a	0.25	±	0.01	2.46	±	0.01	97.29	±	0.00
F06	n/a	±	n/a	0.26	±	0.01	2.44	±	0.01	97.31	±	0.00
F07	n/a	±	n/a	0.24	±	0.01	2.56	±	0.01	97.20	±	0.00
F08	n/a	±	n/a	0.24	±	0.01	2.63	±	0.01	97.13	±	0.00
F09	n/a	±	n/a	0.25	±	0.04	2.76	±	0.02	96.98	±	0.04
F10	n/a	±	n/a	0.26	±	0.00	2.51	±	0.02	97.24	±	0.02
F11	n/a	±	n/a	0.27	±	0.00	2.59	±	0.00	97.14	±	0.00
F12	n/a	±	n/a	0.25	±	0.01	2.57	±	0.00	97.18	±	0.00
F13	n/a	±	n/a	0.25	±	0.00	2.45	±	0.01	97.30	±	0.01
F14	n/a	±	n/a	0.27	±	0.01	2.63	±	0.02	97.10	±	0.01
F15	n/a	±	n/a	0.23	±	0.00	2.57	±	0.00	97.20	±	0.00
F16	n/a	±	n/a	0.31	±	0.00	2.80	±	0.01	96.89	±	0.00
F17	n/a	±	n/a	0.30	±	0.00	2.85	±	0.00	96.86	±	0.00
F18	n/a	±	n/a	0.31	±	0.01	2.74	±	0.01	96.95	±	0.01

【０１８１】

【表４５】

表４０：５℃で２２週間（５か月）保存した試験１．３の処方物のＳＥＣによるピーク面積のパーセンテージ

LB141 S1.3 5MO 5C SEC												
サンプル	HMW3			HMW2			HMW1			単量体		
	RRT 0.79			RRT 0.85			RRT 0.89			RRT 1.00		
F01	n/a	±	n/a	0.22	±	0.01	1.85	±	0.00	97.93	±	0.01
F02	n/a	±	n/a	0.22	±	0.00	1.78	±	0.01	98.00	±	0.00
F03	n/a	±	n/a	0.17	±	0.01	1.91	±	0.01	97.92	±	0.00
F04	n/a	±	n/a	0.18	±	0.00	2.00	±	0.01	97.82	±	0.00
F05	n/a	±	n/a	0.19	±	0.00	1.95	±	0.01	97.86	±	0.00
F06	n/a	±	n/a	0.18	±	0.00	1.85	±	0.01	97.96	±	0.01
F07	n/a	±	n/a	0.17	±	0.00	1.91	±	0.01	97.92	±	0.01
F08	n/a	±	n/a	0.18	±	0.01	2.02	±	0.00	97.80	±	0.00
F09	n/a	±	n/a	0.21	±	0.01	2.13	±	0.01	97.67	±	0.01
F10	n/a	±	n/a	0.17	±	0.01	1.87	±	0.01	97.97	±	0.00
F11	n/a	±	n/a	0.19	±	0.01	1.91	±	0.01	97.90	±	0.00
F12	n/a	±	n/a	0.20	±	0.01	1.92	±	0.01	97.88	±	0.00
F13	n/a	±	n/a	0.18	±	0.01	1.87	±	0.01	97.95	±	0.00
F14	n/a	±	n/a	0.19	±	0.00	1.90	±	0.01	97.91	±	0.00
F15	n/a	±	n/a	0.18	±	0.01	1.93	±	0.01	97.89	±	0.00
F16	n/a	±	n/a	0.21	±	0.00	1.98	±	0.00	97.81	±	0.00
F17	n/a	±	n/a	0.21	±	0.01	2.08	±	0.01	97.71	±	0.01
F18	n/a	±	n/a	0.20	±	0.00	2.06	±	0.00	97.74	±	0.00

【０１８２】

５℃で５か月間保持したサンプルを調べると、ＳＥＣによる単量体含量は、平均９８％に届かないものである（表４０）。これは保存１か月につき約０．１％の（またはそれより少ない）単量体の損失に当たる。このような変性速度は、２４か月経過すると２～３％の損失と予測され、期間終了時の単量体含量は９６％近い。一方、２５℃で５か月間の処方物の保存は、ほとんどが約９７％の単量体をなお保持することを示し（表４１）、室温で週間単位への拡張が適合可能であったことを示唆する。

【０１８３】

【表４６】

表４１：２５℃で２２週間（５か月）保存した試験１．３の処方物のＳＥＣによるピーク面積のパーセンテージ

LB141 S1.3 5MO 25C SEC												
サンプル	HMW3			HMW2			HMW1			単量体		
	RRT 0.79			RRT 0.85			RRT 0.89			RRT 1.00		
F01	n/a	±	n/a	0.31	±	0.00	2.77	±	0.01	96.92	±	0.01
F02	n/a	±	n/a	0.30	±	0.01	2.69	±	0.00	97.01	±	0.01
F03	n/a	±	n/a	0.20	±	0.00	2.62	±	0.00	97.18	±	0.00
F04	n/a	±	n/a	0.22	±	0.00	2.85	±	0.01	96.94	±	0.01
F05	n/a	±	n/a	0.23	±	0.01	2.69	±	0.01	97.08	±	0.01
F06	n/a	±	n/a	0.23	±	0.00	2.62	±	0.01	97.15	±	0.01
F07	n/a	±	n/a	0.20	±	0.01	2.83	±	0.00	96.97	±	0.00
F08	n/a	±	n/a	0.22	±	0.00	2.82	±	0.01	96.95	±	0.00
F09	n/a	±	n/a	0.26	±	0.01	2.99	±	0.01	96.76	±	0.00
F10	n/a	±	n/a	0.19	±	0.00	2.70	±	0.01	97.11	±	0.01
F11	n/a	±	n/a	0.24	±	0.01	2.78	±	0.01	96.98	±	0.01
F12	n/a	±	n/a	0.25	±	0.01	2.80	±	0.01	96.95	±	0.01
F13	n/a	±	n/a	0.23	±	0.01	2.64	±	0.00	97.14	±	0.00
F14	n/a	±	n/a	0.24	±	0.00	2.81	±	0.01	96.96	±	0.00
F15	n/a	±	n/a	0.22	±	0.00	2.68	±	0.00	97.10	±	0.00
F16	n/a	±	n/a	0.28	±	0.01	2.93	±	0.01	96.79	±	0.00
F17	n/a	±	n/a	0.28	±	0.01	3.05	±	0.01	96.67	±	0.00
F18	n/a	±	n/a	0.27	±	0.01	2.92	±	0.01	96.81	±	0.00

【０１８４】

安定性はまた、これらのアルビグルチド処方物の化学的安定性の何らかのエビデンスを提供するＲＰ　ＨＰＬＣにより純度を測定することによってもモニタリングした。初期純度は総ての処方物で８９％付近であった（表４２）。サンプルを３０℃（表４３）または２５℃（表４４）で保持すると、純度は、あったとしても極めて小さい変化である（下記参照）。４０℃では、純度にいくらかの低下が見られ、これは実質的なものであると思われるが、純度は８６％付近のレベルに低下するに過ぎない（表４２）。最低純度は８０～１００ｍｇ／ｍＬのタンパク質濃度を有するサンプルで見られる。ＰＳ　８０を含有する１００ｍｇ／ｍＬ（Ｆ１７）が、４０℃でのＲＰ　ＨＰＬＣにより、界面活性剤を含まない対応する処方物（Ｆ１６）よりも大きな安定性を示すことに注目すべきである。これらの差異は、より低い保存温度では小さくなる、または有意でなくなる。

【０１８５】

【表４７】

表４２：４０℃で０、１週間、および２週間保存した試験１．３の処方物のＲＰ　ＨＰＬＣにより測定した純度

サンプル	t0	t1	t2
F01	**88.15 ± 0.50**	88.90 ± 0.41	87.04 ± 1.07
F02	**88.64 ± 0.18**	88.85 ± 0.75	87.12 ± 0.36
F03	**88.43 ± 0.45**	88.55 ± 0.70	88.30 ± 0.06
F04	**86.94 ± 0.10**	88.42 ± 0.28	86.64 ± 0.35
F05	**88.56 ± 0.20**	89.57 ± 0.21	88.54 ± 0.12
F06	**87.67 ± 0.41**	89.70 ± 0.55	87.73 ± 0.04
F07	**88.55 ± 0.30**	88.71 ± 0.10	88.23 ± 0.48
F08	**87.90 ± 0.35**	87.85 ± 0.21	87.57 ± 0.55
F09	**84.97 ± 0.32**	88.09 ± 1.06	86.15 ± 0.20
F10	**88.76 ± 0.04**	88.67 ± 0.53	87.93 ± 0.25
F11	**88.76 ± 0.21**	89.53 ± 0.23	87.22 ± 0.33
F12	**86.25 ± 0.54**	89.60 ± 0.28	86.69 ± 0.38
F13	**88.02 ± 0.27**	90.04 ± 0.25	87.69 ± 0.22
F14	**87.42 ± 0.36**	89.70 ± 0.32	88.10 ± 0.21
F15	**86.45 ± 0.06**	89.44 ± 0.21	87.20 ± 0.51
F16	**86.48 ± 0.18**	89.82 ± 0.45	86.45 ± 0.41
F17	**87.29 ± 0.24**	89.19 ± 0.32	89.46 ± 0.38
F18	**87.75 ± 0.30**	90.47 ± 0.06	86.84 ± 0.24

【０１８６】

【表４８】

表４３：３０℃で０、１週間、および２週間保存した試験１．３の処方物のＲＰ　ＨＰＬＣにより測定した純度

サンプル	t0	t1 30	t2 30	t3 30
F01	88.15 ± 0.50	89.46 ± 0.10	89.24 ± 0.16	90.47 ± 0.37
F02	88.64 ± 0.18	89.65 ± 0.43	89.51 ± 0.27	90.08 ± 0.41
F03	88.43 ± 0.45	89.67 ± 0.29	89.07 ± 0.16	90.66 ± 0.27
F04	86.94 ± 0.10	88.09 ± 0.63	88.27 ± 0.07	90.40 ± 0.60
F05	88.56 ± 0.20	89.39 ± 0.14	89.36 ± 0.40	89.40 ± 0.19
F06	87.67 ± 0.41	90.07 ± 0.10	88.70 ± 0.30	89.18 ± 0.09
F07	88.55 ± 0.30	89.96 ± 0.30	88.49 ± 0.34	89.05 ± 0.19
F08	87.90 ± 0.35	89.14 ± 0.65	87.69 ± 0.37	88.75 ± 0.31
F09	84.97 ± 0.32	88.77 ± 0.23	88.18 ± 0.31	88.38 ± 0.66
F10	88.76 ± 0.04	89.35 ± 0.34	89.37 ± 0.71	88.46 ± 0.46
F11	88.76 ± 0.21	88.97 ± 0.15	89.17 ± 0.17	89.11 ± 0.49
F12	86.25 ± 0.54	88.96 ± 0.54	88.83 ± 0.32	89.21 ± 0.40
F13	88.02 ± 0.27	88.80 ± 0.44	88.90 ± 0.34	89.68 ± 0.55
F14	87.42 ± 0.36	89.32 ± 0.32	89.35 ± 0.13	89.32 ± 0.70
F15	86.45 ± 0.06	89.30 ± 0.32	89.68 ± 0.34	89.11 ± 0.40
F16	86.48 ± 0.18	88.12 ± 0.55	86.78 ± 0.14	88.50 ± 0.80
F17	87.29 ± 0.24	88.40 ± 0.68	87.50 ± 0.41	88.42 ± 0.64
F18	87.75 ± 0.30	89.45 ± 0.28	88.72 ± 0.02	87.74 ± 0.41

【０１８７】

【表４９】

表４４：２５℃で保存した試験１．３の処方物のＲＰ　ＨＰＬＣにより測定した純度

サンプル	t0	t4	t13	t22
F01	88.15 ± 0.50	88.08 ± 0.30	85.83 ± 1.41	87.96 ± 0.44
F02	88.64 ± 0.18	87.07 ± 0.77	86.16 ± 0.55	87.78 ± 0.51
F03	88.43 ± 0.45	86.57 ± 0.69	85.43 ± 0.91	86.80 ± 1.61
F04	86.94 ± 0.10	86.50 ±0.34	86.63 ± 0.86	87.08 ± 0.83
F05	88.56 ± 0.20	86.34 ± 0.60	86.45 ± 1.06	86.78 ± 0.63
F06	87.67 ± 0.41	86.41 ± 0.75	85.66 ± 0.88	87.74 ± 1.06
F07	88.55 ± 0.30	86.90 ± 0.45	86.10 ± 0.58	85.94 ± 0.17
F08	87.90 ± 0.35	86.79 ± 0.17	86.43 ± 0.11	85.17 ± 0.22
F09	84.97 ± 0.32	87.06 ± 0.49	84.61 ± 0.42	84.64 ± 0.42
F10	88.76 ± 0.04	87.33 ± 0.51	85.60 ± 0.49	85.27 ± 0.39
F11	88.76 ± 0.21	86.88 ± 0.41	86.76 ± 0.51	84.95 ± 0.12
F12	86.25 ± 0.54	86.76 ± 0.46	85.25 ± 0.38	84.40 ± 0.40
F13	88.02 ± 0.27	87.35 ± 0.35	84.89 ± 0.97	83.95 ± 0.50
F14	87.42 ± 0.36	87.62 ± 1.32	84.33 ± 0.91	83.98 ± 0.42
F15	86.45 ± 0.06	87.11 ± 0.08	88.02 ± 0.15	84.18 ± 0.65
F16	86.48 ± 0.18	87.60 ± 0.25	87.63 ± 0.44	83.96 ± 0.37
F17	87.29 ± 0.24	88.09 ± 0.19	87.18 ± 1.30	84.14 ± 0.78
F18	87.75 ± 0.30	88.19 ± 0.64	87.84 ± 0.48	85.27 ± 0.45

【０１８８】

【表５０】

表４５：５℃で保存した試験１．３の処方物のＲＰ　ＨＰＬＣにより測定した純度

サンプル	t0	t13	t22
F01	88.15 ± 0.50	88.94 ± 0.56	88.72 ± 0.27
F02	88.64 ± 0.18	87.30 ± 0.49	88.89 ± 0.57
F03	88.43 ± 0.45	89.43 ± 0.58	89.44 ± 0.38
F04	86.94 ± 0.10	85.64 ± 0.64	89.51 ± 0.10
F05	88.56 ± 0.20	86.82 ± 0.34	89.03 ± 0.42
F06	87.67 ± 0.41	87.54 ± 0.77	89.36 ± 0.26
F07	88.55 ± 0.30	85.98 ± 0.68	89.26 ± 0.21
F08	87.90 ± 0.35	88.40 ± 0.74	88.20 ± 0.77
F09	84.97 ± 0.32	86.69 ± 0.25	88.43 ± 0.73
F10	88.76 ± 0.04	88.29 ± 0.63	89.83 ± 0.37
F11	88.76 ± 0.21	86.87 ± 0.61	89.68 ± 0.41
F12	86.25 ± 0.54	87.52 ± 0.34	89.29 ± 0.28
F13	88.02 ± 0.27	88.70 ± 0.10	89.99 ± 0.30
F14	87.42 ± 0.36	87.63 ± 0.64	90.22 ± 0.51
F15	86.45 ± 0.06	86.60 ± 0.28	90.37 ± 0.40
F16	86.48 ± 0.18	85.24 ± 0.14	89.95 ± 0.56
F17	87.29 ± 0.24	86.30 ± 0.67	90.09 ± 0.29
F18	87.75 ± 0.30	87.78 ± 0.24	90.07 ± 0.44

【０１８９】

５℃で保存したサンプルでは、測定可能な純度損失はなく（表４５）、本方法の誤差の範囲内で、総ての値が初期値から実質的に変化していない。２５℃で保存したサンプルでは、ｔ１３およびｔ２２においてＲＰ　ＨＰＬＣによりいくらかの小さな損失が見られた（表４４）。それでもなお、本ＲＰ法の誤差からは、これらの損失が実際にどれだけの大きさに相当するかを判定することは困難となる。一般に、損失は５か月で２～４％の範囲であったが、これはこれらの処方物中でアルビグルチドの化学的安定性が極めて良好であることを示す。

【０１９０】

ＳＥＣおよびＲＰデータのＰＬＳモデリング

これらのデータをエンドポイントとして用い、いくつかのＰＬＳモデルを構築した。それらを本節の末尾に３か月および５か月時点のモデルとともに、使用した時点の順に列挙する。

【０１９１】

ＰＬＳ１モデルは、ｔ２／４０℃での単量体含量の差異をエンドポイントとして用いて構築した。このモデルは１つのＰＣを使用し、較正セットでは０．８６５およびバリデーションセットでは０．７５１の相関係数を有していた。これは、このモデルが試験１．２データのＰＬＳモデルのいくつかほどロバストではないことを示す。クエン酸塩、タンパク質、アルギニン、トレハロース、およびＰＳ　８０の５因子は、有意であると計算された。ｐＨおよびクエン酸塩に関する応答曲面は、単量体含量の損失は、ｐＨ６および最高濃度のクエン酸塩で最低であることを示す。タンパク質濃度が作用する限り、応答曲面は、約７０ｍｇ／ｍＬまでの濃度に関しては比較的平坦であり、閾値を越えるやや高い損失を伴う。１００ｍｇ／ｍＬでの損失の増加は、低濃度サンプルよりも高い、２週間後で約０．４％と予測される（下記考察を参照）。

【０１９２】

ある処方物は１００ｍＭアルギニンと１１７ｍＭトレハロースを含有する。試験１．３の１つの主要な目標は、これらの量を変化させることの効果を検討することであった。アルギニンおよびトレハロースに関する応答曲面はドーム型を示し、その一般傾向は、ｐＨ６でアルギニンは不安定化し、トレハロースは安定化するというものである。サンプルがより低温で保存される場合、おそらくは疎水性効果が高温下で強められる傾向があるという事実のために、あまり急激でない差異が見られる。最後に、ＰＳ　８０は、このＰＬＳモデルでは安定剤であるものと思われる。

【０１９３】

試験１．３データの第２のＰＬＳ１モデルは、２５℃で４週間後（ｔ４／２５℃）の単量体含量をエンドポイントとして用いて構築した。このモデルは１つのＰＣを使用し、較正セットでは０．８１１およびバリデーションセットでは０．６３６の相関係数を有していた。このモデルはより低い保存温度でのデータを反映し、従って、長期保存安定性に関してより適切であり得る。

【０１９４】

ｐＨおよびクエン酸塩に関する応答曲面は、最適ｐＨは５．７～５．８付近であり、クエン酸塩が良好な安定剤であると思われることを示す。

【０１９５】

タンパク質濃度の効果の大きさを判断するために、ＰＳ　８０を用いた場合の予測単量体含量パーセンテージを曲面に挙げる。それは３０ｍｇ／ｍＬから１００ｍｇ／ｍＬへ動くことにより単量体含量に約０．１５％の低下を示す。この傾向は、これまでに実施した残りの分析の総てと完全に一致する。より高いタンパク質濃度は安定性の低下をもたらす。同時に、ＰＳ　８０は、このモデルでそうであるように、少量の安定化を提供すると思われる。

【０１９６】

第３のＰＬＳモデルは、ｔ２／３０　Ｃ、ｔ３／３０　Ｃ、およびｔ４／２５　Ｃにおける二量体含量の差異を用いて構築した。これらの温度は総て加速化ストレス条件を表すが、それらは温度の逸脱に対して残存するアルビグルチドの能力に関する情報を提供する。加えて、複数の時点および温度を考慮することにより、安定性プロファイルのより良いバランスの観点が浮かび上がり得る。本報告に記載するＰＬＳモデルの総てにおいて、データは中央に集められ、標準偏差の逆数に対して正規化される。従って、いずれの応答も、他のいずれのものとも等加重でエンドポイントとして使用可能である。よって、２つの異なる温度からの安定性データは、互いに併用可能であり、各個は等しい考慮を与える。

【０１９７】

このＰＬＳ２モデルは２つの外れ値を有する（処方物１４および１５）が、３つのＰＣを用いる、較正ｒ値０．９５８およびバリデーションセットでは０．９０５を有する高品

質モデルをもたらした。トレハロース濃度およびアルギニン濃度において極値を表すことを除き、それらがなぜ他と整合しないデータを示すのかは明らかでない。

【０１９８】

このモデルによる最適ｐＨは５．９～６．０であり、クエン酸塩は１５ｍＭで若干不安定化している。これらの結果は、ｐＨ６．０がほぼ理想的であり、適度な量のクエン酸塩（１０～１５ｍＭ）が存在する必要があるという初期の結果と一致する。

【０１９９】

このモデルによれば、タンパク質濃度は安定性に影響を及ぼすが、７０～８０ｍｇ／ｍＬ超またはそれより高い濃度でのみである。この場合にも、この知見は、試験１．２および試験１．３に関して収集されたデータと一致する。各データセットは、約６０ｍｇ／ｍＬの濃度がアルビグルチドの保存安定性を低下させる可能性があることを指し示す。

【０２００】

これらのデータおよびこれらのモデルは、アルギニンまたはトレハロースのいずれかに関する２０ｍＭ内の変動は、ＳＥＣにより測定される安定性に最小限の影響しか及ぼさないことを示唆する。言い換えれば、アルギニン濃度は、８０～１２０ｍＭの範囲であり得、トレハロースは１００から１４０ｍＭまで変動可能である。ここでもまた、応答曲面は、ＰＳ　８０は、少なくともこのモデルによれば、あまり強くない安定剤であることを示すが、これは一般的傾向であるようである。

【０２０１】

データが５か月（２２週間）から保存されたサンプルに関して収集された場合、ＰＬＳ２モデルは、２５℃で保存したサンプルのｔ１３およびｔ２２における単量体含量をエンドポイントとして用いて構築した。このモデルは、較正セットでの相関係数０．８５６およびバリデーションセットでのｒ値０．７７５を有していた。３つの因子が統計的に有意であると思われ、これらはタンパク質濃度、クエン酸塩、およびＰＳ　８０であった。

【０２０２】

ｐＨおよびクエン酸塩に関する応答曲面は、単量体含量は最高エン酸塩レベルで最大となり、より高いｐＨ値では、ｐＨ５．７が若干好ましいことを示す。タンパク質濃度は、このモデルの安定性に対して有意な効果を有し、単量体含量は約６０ｍｇ／ｍＬまで一定である。このモデルによれば、この値を越えれば、安定性は低下する。比較として、アルギニンは、評価した濃度範囲では、安定性に対する効果が比較的低い。トレハロースおよびアルギニンは、ｐＨおよびクエン酸塩レベルが固定されれば、ほとんど効果がない（応答曲面全体にわたる範囲を参照）。最後に、ＰＳ　８０の効果は、２５℃で単量体含量を維持するために有益であることが判明した。

【０２０３】

ＰＬＳ２モデルは、５℃で保存したサンプルのｔ１３およびｔ２２における単量体含量をエンドポイントとして用いて構築した。このモデルは、較正セットでの相関係数０．９３８のおよびバリデーションセットでのｒ値０．６０４を有していた。２つの因子が統計的に有意であると思われ、これらはタンパク質濃度およびクエン酸塩であった。

【０２０４】

より低温度で保存したサンプルに関するこのモデルでは、従前のモデルと同様に、クエン酸塩は安定剤であること、およびより高いｐＨ値ではｐＨ５．７が好ましいことが見出せる。続いての応答曲面は、単量体含量は、より低いタンパク質濃度（＜６０ｍｇ／ｍＬ）では維持されるが、濃度が１００ｍｇ／ｍＬに上昇すると失われることを示す。加えて、ＰＳ　８０は単量体含量の維持に有益であり得ると思われる。このモデルは、従前のモデルに酷似して、ａｒｇおよびトレハロースがこれらの範囲内で安定性にほとんど効果がないことを示す。好適には、本発明の液体組成物は、アルギニンに関しては１００ｍＭおよびトレハロースに関しては１１７ｍＭの濃度を含有してよい。

【０２０５】

ＰＬＳ１モデルは、２５℃で保存したサンプルのｔ２２におけるＲＰ　ＨＰＬＣによる純度をエンドポイントとして用いて構築した。５℃での損失は、比較モデルを構築するの

は小さすぎた。このＰＬＳモデルは、較正セットでの相関係数０．８５９およびバリデーションセットでのｒ値０．７００を有していた。２つの因子が有意であることが見出され、これらはｐＨおよびタンパク質濃度であった。

【０２０６】

ｐＨおよびクエン酸塩の効果は、ＳＥＣエンドポイントで見られたものと同じパターンを示し、より高いクエン酸塩が有益であり、２５℃でタンパク質の純度を維持するためにはｐＨ５．７が好ましいことを示す（図１６）。加えて、このモデルによれば、６０ｍｇ／ｍＬ付近の閾値を越える、より高いタンパク質濃度は純度の損失をもたらす（図１７）。ＰＳ　８０の添加は、保存時に純度のより大きな保持をもたらすと思われる。第３の応答曲面は、アルギニンおよびトレハロースの効果を示す。左上４分の１の濃い灰色の領域は、最大安定性の領域を示す。１００ｍＭアルギニンおよび１１７ｍＭトレハロースの本組成物は、この領域の中央にそのまま入る（図１８）。このデータはまた、いずれかの安定剤のレベルの２０％またはそれを越える変化は安定性に適用可能な影響を持たないことを示唆する。

【０２０７】

捕捉データ

この試験１．３からのサンプルを用いて、捕捉データを作成した。ＳＥＣおよびＲＰに加えて、ＣａｌｉｐｅｒおよびｃＩＥＦを用いてデータを収集した。本報告のこの節は、特に、データが３か月および５か月（ｔ１３およびｔ２２）間保存されたサンプルに属する場合に、データの簡単な要約を提供する。

【０２０８】

【表５１】

表４６：２２週間（５か月）保存した試験１．３からのアルビグルチドサンプルのＣａｌｉｐｅｒデータ，還元サンプルを太字テキストで表し、非還元サンプルを太字でない黒で挙げる

処方物番号	t22 5 C	t22 25 C	t0	t22 5 C	t22 25 C
1	**99.9**	**99.7**	97.6	98.3	96.9
2	**99.9**	**99.7**	97.6	98.3	96.8
3	**99.9**	**99.7**	97.6	98.1	96.8
4	**99.9**	**99.7**	97.8	98.0	97.0
5	**99.9**	**99.7**	97.6	98.2	97.1
6	**99.9**	**99.7**	97.8	98.2	97.1
7	**99.9**	**99.7**	97.6	97.9	97.4
8	**99.9**	**99.7**	97.3	98.0	97.3
9	**99.9**	**99.7**	97.2	98.1	97.2
10	**99.9**	**99.7**	97.3	97.9	97.0
11	**99.9**	**99.7**	97.5	98.2	97.2
12	**99.9**	**99.7**	97.6	98.5	97.2
13	**99.9**	**99.7**	97.4	98.4	97.1
14	**99.9**	**99.7**	97.3	98.3	97.1
15	**99.9**	**99.7**	97.4	98.4	97.2
16	**NT**				
17	**99.9**	**99.7**	97.5	98.4	97.2
18					
NT=試験せず					

【０２０９】

ＰＳ　８０を含有するサンプルは、Ｃａｌｉｐｅｒ法を用いて分析しなかったが、１６の処方物の維持に関する結果を表４６に挙げる。太字で挙げられている還元サンプルは、

５か月後にいずれの処方物にも事実上損失はないことを示す。非還元法はより高い安定性を示すと思われ、処方物の値にいくらかの変動が見られる。それでもなお、これらの損失は非常に小さく、この技術から安定性のさらなる分析を導出することはできない。

【０２１０】

【表５２】

表４７：５℃および２５℃で２２週間（５か月）保存した試験１．３の処方物のＳＥＣによる単量体含量のパーセンテージ

処方物番号	t0	t22 5 C	t22 25 C
1	98.3	98.0	96.8
2	98.4	98.1	96.8
3	98.3	98.0	97.2
4	98.2	97.9	97.0
5	98.3	98.0	97.2
6	98.4	98.0	97.1
7	98.3	97.9	96.9
8	98.2	97.8	96.8
9	98.1	97.7	96.7
10	98.3	98.0	97.1
11	98.3	97.9	96.9
12	98.2	97.9	96.9
13	98.3	98.0	97.0
14	98.2	97.9	96.7
15	98.2	97.9	97.0
16	98.2	97.8	96.6
17	98.1	97.7	96.5
18	98.1	97.8	96.7

【０２１１】

ＳＥＣによるｔ２における単量体含量を表４７にまとめる。初期値は９８．３％付近であった。５℃で５か月後、それらの値はなおほとんど９８％付近であり、１月当たり０．１％未満が失われることを意味する。比較として、２５℃でのレベルは９７％付近であり、やはり、単量体の損失は１月当たり約０．２％に過ぎない。＞９６％の単量体という現行の仕様を考えると、これらのサンプルは総てこの試験を通過すると思われる。

【０２１２】

ＰＬＳ１モデルは、５℃で５か月間保存したサンプルのこれらのデータをエンドポイントとして用いて構築した。このモデルは、較正セットでの相関係数０．９２９およびバリデーションセットでのｒ値０．７００を有していた。３つの因子が統計的に有意であると判定され、これらはｐＨ、クエン酸塩、およびタンパク質濃度であった。

【０２１３】

このモデルは、クエン酸塩が安定剤であること、および単量体含量は、より高いｐＨ値ではなくｐＨ５．７に向かうことにより最大化されることを示す。一方、単量体含量は５０ｍｇ／ｍＬ未満のタンパク質濃度で最高に留まる。ＰＳ　８０の添加は、あまり大きくないいくらかの量の安定化をもたらすと予測される。アルギニンおよびトレハロースの効果は、現行の目標の１００ｍＭアルギニンおよび１１７ｍＭトレハロース付近に最大があると思われる。このモデルは、これらの濃度にある程度の有意域があることを示し、安定性に影響を及ぼすことなく各方向に２０ｍＭを越える変動を容易に適合させることができる。

【０２１４】

【表５３】

表４８：５℃および２５℃で２２週間（５か月）保存した試験１．３の処方物のＳＥＣによる二量体含量のパーセンテージ

処方物番号	t0	t22 5 C	t22 25 C
1	1.7	2.0	3.2
2	1.6	1.9	3.2
3	1.7	2.0	2.8
4	1.8	2.1	3.0
5	1.7	2.0	2.8
6	1.6	2.0	2.9
7	1.7	2.1	3.1
8	1.8	2.2	3.2
9	1.9	2.3	3.3
10	1.7	2.0	2.9
11	1.7	2.1	3.1
12	1.8	2.1	3.1
13	1.7	2.0	3.0
14	1.8	2.1	3.3
15	1.8	2.1	3.0
16	1.8	2.2	3.4
17	1.9	2.3	3.5
18	1.9	2.2	3.3

【０２１５】

２２週間（ｔ２２、５か月）保存したサンプルの二量体含量を表４８にまとめる。５℃では、それらのレベルは１．９％～２．３％の間であり、１．７％付近の初期値から若干上昇したに過ぎなかった。２５℃では、二量体含量は３％以上に上昇していたが、なお＜４％という現行の仕様を下回っていた。

【０２１６】

ＰＬＳ２モデルは、５℃および２５℃で５か月間保存したサンプルの二量体レベルをエンドポイントとして用いて構築した。このモデルは、較正セットでの相関係数０．９６１およびバリデーションセットでのｒ値０．７７８を有していた。３つの因子が統計的に有意であると判定され、これらはｐＨ、クエン酸塩、およびタンパク質濃度であった。

【０２１７】

このＰＬＳ２モデルは、クエン酸塩が安定剤であり、最小二量体レベルはｐＨ５．７で生じることを示す（図１９）。これらの知見は、上記の多くのＰＬＳモデルと、特に、少なくとも3か月間保存したサンプルのデータに焦点を当てたものについては、一致する。ＰＳ　８０は安定剤であると予測されるが、タンパク質濃度の増加はより高い二量体レベルをもたらすことが示されている（図２０）。このモデルは、９０ｍＭを越えるアルギニン濃度および８０～１４０ｍＭの間のトレハロースレベルが二量体形成を最小化することを示す（図２１）。

【０２１８】

【表５４】

表４９：５℃および２５℃で２２週間保存した試験１．３のサンプルに関して
ＧＳＫにより行われたＲＰ　ＨＰＬＣによる純度。
比較のためｔ０に関するデータを示す。

処方物番号	t0	t22 5 C	t22 25 C
1	96.5	96.5	93.3
2	96.5	96.3	93.4
3	96.7	96.4	93.2
4	96.5	96.5	93.1
5	96.4	96.5	93.4
6	96.6	96.4	93.4
7	96.9	96.4	93.2
8	96.4	96.5	93.3
9	96.7	96.5	93.3
10	96.5	96.5	93.6
11	96.4	96.6	93.6
12	96.6	96.5	93.0
13	96.6	96.4	93.4
14	96.5	96.5	93.2
15	96.4	96.5	93.1
16			
17	96.5	96.5	93.4
18	NT	NT	NT
NT=試験せず			

【０２１９】

ｔ２２におけるサンプルの純度を、ＲＰ　ＨＰＬＣを用いて測定した（表４９（Tale 49））。これらの初期純度は９６．５％付近であった。５℃で５か月後、これらの値は本質的に変化しなかった。２５℃で２２週間後であっても、これらのレベルは約３％低下したに過ぎなかった（表４９）。

【０２２０】

これら１８の処方物に対してＧＳＫで行った最後の分析試験は、ｃＩＥＦを用いて変化プロファイルを測定することであった。主要ピーク強度により判断される純度を各処方物に関して表５０にまとめる。ｔ２２において、５℃サンプルでは小さな低下が、２５℃で保存したサンプルでは７～１１％の範囲の損失が見られた。

【０２２１】

【表５５】

表５０：５℃および２５℃で２２週間保存した試験１．３のサンプルに関して
ＧＳＫにより行われたｃＩＥＦによる主要ピーク純度

処方物番号	t0	t22 5C	t22 25C
1	76.8	74.4	67.7
2	77.0	73.8	66.6
3	75.9	73.6	68.7
4	75.5	72.4	67.2
5	76.3	74.2	68.3
6	75.6	74.8	67.9
7	75.1	73.7	69.5
8	74.9	74.1	66.5
9	75.0	73.1	68.2
10	76.4	72.0	66.9
11	75.3	73.0	67.3
12	75.4	73.2	67.1
13	75.5	73.3	66.0
14	76.4	73.8	66.2
15	75.9	74.3	67.1
16	73.0	72.1	64.7
17	75.8	73.6	66.2
18	73.7	71.7	63.8

【０２２２】
ＰＬＳ１モデルは、５℃で５か月保存したサンプルのｃＩＥＦによる主要ピーク純度をエンドポイントとして用いて構築した。このモデルは、較正セットでの相関係数０．８９１およびバリデーションセットでのｒ値０．６６３を有していた。３つの因子が統計的に有意であると判定され、これらはｐＨ、クエン酸塩、およびＰＳ　８０であった。
【０２２３】
このＰＬＳモデルは、これらのｔ２２サンプルに関する主要ピーク純度の維持にクエン酸塩が効果的であり、一方、ｐＨ５．７もより高いｐＨ値に比べて有益であることを示す（図２２）。同時に、ＰＳ　８０の添加が有益であると予測される（図２３）。タンパク質濃度依存は、従前のモデルとは若干異なり、若干高い濃度が役立つと予測されるが、応答曲面はこの領域ではかなり浅い。最後に、アルギニンおよびトレハロースの効果を図２４に示す。応答曲面の全範囲は約０．４％に過ぎず、このことは、現在用いられている量が理想に近いことを示す。このモデルによれば、いっそう大きな変化も安定性に最小の影響しか及ぼさないことが予測される。
【０２２４】
要約
水溶液中のアルビグルチドの安定性を検討するために、４セットの試験が行われた。主要安定性指標アッセイはＳＥＣおよびＲＰ　ＨＰＬＣである。ｃＩＥＦおよびＳＤＳ－ＰＡＧＥから情報が得られるものの、少なくとも比較的安定な処方物に関して安定性を評価するにはＨＰＬＣの感度は不足していると思われる。ｃＩＥＦだけが、サンプルが５か月間保存された後にのみ、安定性に関する有用な情報を提供することが判明した。
【０２２５】
初期の試験としての試験１．０は、ヒスチジン（Ｈｉｓ）処方物が、程度はより低いがリン酸処方物と同様に、安定性が低いことを示した。加えて、より高いｐＨ（＞６．３）も同様にいくらかの不安定性を生じた。同時に、これらの処方物は総て、凍結－解凍損傷に極めて耐性があった。試験１．１では、Ｈｉｓの代わりにコハク酸塩を加えて、バッフ

ァー効果をより詳細に調べた。それはクエン酸塩の潜在的代替であることが分かったが、総てを考慮した場合、クエン酸塩が引き続き、アルビグルチドの最良のバッファーであることが示されている。

【０２２６】

試験１．２では、マンニトール、トレハロース、およびＰＳ　８０などの他の成分の効果を検討した。これらのデータは、コハク酸塩は安定化がクエン酸塩に近いものではないこと、およびｐＨ最適値が５．５から最大６．０であることを再び示した。試験１．３からの情報とともに、バッファー濃度の選択には注意を要することが判明した。繰り返して、これらのデータは、適度なレベルのクエン酸塩、約１０～１５ｍＭを最良の範囲であると指し示した。他のタンパク質については、アルビグルチドは過剰なクエン酸塩により、おそらくコロイド安定性の低下のために不安定化されると思われる。オクタン酸塩は不安定化することが判明し、一方、マンニトールおよびトレハロースの効果は同等であり、大部分は比較的弱かった。

【０２２７】

処方物の最適化は、アルギニンおよびＰＳ　８０レベルの変更とともに再びトレハロースおよびマンニトールを検討する試験１．３に続いた。ＰＳ　８０が安定剤であることは試験１．３（これまで）から明らかである。これらの効果があまり大きくない傾向があるとしても、一貫した所見は、ＰＳ　８０を存在させることは有益であるということである。

【０２２８】

ｐＨおよびバッファーの選択は試験１．３で決定付けた。最適ｐＨは、特に３か月および５か月の時点からのデータを考慮する場合には、５．７であると思われる。さらに一般に、これらの試験の全体的な傾向は、ｐＨに対する応答は、５．７～６．２というこの限られたｐＨ範囲では、比較的平坦であることを示している。それでもなお、最新のデータは、ＳＥＣにより決定されるのであれＲＰ　ＨＰＬＣにより決定されるのであれまたはｃＩＥＦにより決定されるのであれ、これはタンパク質を安定化すると思われるので、ｐＨ５．７の選択に関して説得力のある議論をなす。先の試験に関して上述したように、適度な量のクエン酸塩（１０～１５ｍＭ）が理想的であると思われる。

【０２２９】

試験１．３からの結果は、１００ｍＭのアルギニンおよび１１７ｍＭのトレハロースを使用する処方物が良い選択となることを示す。ＳＥＣ、ＲＰおよびさらにはｃＩＥＦにより測定されるように、いずれの化合物でも約２０ｍＭ（またはそれを越える）変動は安定性に最小限の影響しか示さないと思われる。言い換えれば、アルギニン濃度は８０～１２０ｍＭの範囲であり得、トレハロースは１００から１４０ｍＭまで変動可能であった。

【０２３０】

タンパク質濃度の効果は、試験１．２からの知見の上に成り立つ試験１．３でより詳細に調べられた。約６０ｍｇ／ｍＬ未満の安定性プロファイルは比較的平坦であったが、より高いタンパク質濃度は単量体の損失をもたらしたことが判明した。より高いタンパク質濃度での安定性のいくらかの低下はＲＰ　ＨＰＬＣによっても見られた。従って、長期保存を考える場合、５０ｍｇ／ｍＬ～６０ｍｇ／ｍＬの濃度が、安定性を損なうことなく使用でき、かつ、なおより良い投与の容易性を可能とする最高の濃度であろう。

【０２３１】

様々な試験を通していくつかの違いが見られるものの、最適な液体組成物の組成が浮かび上がってきた。処方物は約ｐＨ５．７であるべきであり、おそらく０．３単位のｐＨ変動は合理的に十分忍容され得る。１０～１５ｍＭのクエン酸塩濃度、ならびに１００ｍＭのアルギニンおよび１１７ｍＭのトレハロースを含有する処方物が最良である。全体的に見れば、これらのデータは、これらのレベルが最適値から遠くないことを示す。ほとんどの場合、０．０１％程度のＰＳ　８０が高温下で保存されるサンプルに有益であると思われる。

【０２３２】

４０℃での保存は、２５℃またはさらには３０℃での保存時には見られないより高いＭＷの凝集物が生じる。しいかしながらなお、ＳＥＣによる単量体の損失は異なる保存温度間でおおよそ相関すると思われる。断片化が見られる場合は無く、二量体、オリゴマーおよびより高いＭＷの凝集物が形成するだけであった。これらの処方物の純度をＲＰ　ＨＰＬＣにより調べると、５℃では、あるとしても極めてわずかな純度低下が見られるに過ぎない。２５℃であっても、純度の変化は５か月後に５％未満である。同様に、ｃＩＥＦデータも、２５℃で５か月後に主要ピーク純度の多くて１０％未満が失われ、５℃保存では５％未満の損失であることを示す。これらの知見は、保存時にアルビグルチドに生じる化学的変性は極めて少なく、主要な分解経路は可溶性の凝集物の形成であることを示唆する。これも、適正な処方および２～８℃での保存によって大幅に抑えることができる。

【０２３３】

実施例２

アルビグルチド原薬(Bulk Drug Substance)（ＢＤＳ）は、合成Ｂ３の経路からプロセス３（Ｐ３）を経て製造された。加熱処理はＰ３における潜在的工程として探究され、Ｄｏｗｎｓｔｒｅａｍ　Ｐｒｏｃｅｓｓｉｎｇ　Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ（ＤＰＤ）により、プロテアーゼ活性およびさらにアルビグルチドの酵素分解を低下させ、バイオアッセイおよびＲＰＨＰＬＣにより決定される有効性の高いペプチドをもたらすことが示されている。アルビグルチドのタンパク質分解的変性の低下は、潜在的に溶液処方物を実現可能とし得る。タンパク質分解的変性に加えて、凝集および酸化が溶液中のアルビグルチドの変性の２つの主要な機構である。試験は、ｃＩＥＦにおける主としてピーク９７の酸性変異体は、Ｎ末端およびリシンカルバミル化、システインおよびトリプトファン酸化であることを示した。試験により、アルビグルチドは、５ｍＭクエン酸塩、１００ｍＭ塩酸アルギニン、および１１７ｍＭトレハロースを含んでなるｐＨ５．７の処方物中で、溶液凝集に対してより安定であることが示された。この処方物は、本実施例で「最適化」処方物と呼ばれる。従前の試験もまた、現行の現凍結乾燥処方物（ｐＨ　７．２、１０ｍＭリン酸塩、１５３ｍＭマンニトール、１１７ｍＭトレハロース、および０．０１％（ｗ／ｗ）ＰＳ８０）へのオクタン酸ナトリウムの添加が、別の製造プロセスとしてのプロセス２（Ｐ２）からのアルビグルチドを凝集に対して安定化させ得ることを示した。

【０２３４】

この試験では、種々の処方物中でのＰ３および熱処理Ｐ３材料の溶液安定性を検討した。加えて、アルビグルチドｐＩ前後のダイアフィルトレーションバッファーｐＨの凝集に及ぼす効果を検討した。

【０２３５】

本試験の目的は、

１．Ｐ３材料と熱処理Ｐ３材料の安定性を比較すること
２．現行の凍結乾燥処方物と最適化溶液処方物を比較すること
３．Ｐ２とＰ３を非熱処理アルビグルチドに対して比較すること
４．最適化溶液処方物に対するｐＨ（５．７および６．５）の効果を評価すること
５．アルビグルチドの酸化を防ぐ助けとなり得るかどうかを判定すること
６．オクタン酸塩が、それが溶液中のＰ２材料に対するものと同じ安定化効果をＰ３材料に対して有するかどうかを判定すること
７．ｐＨ６．５の最適化溶液処方物中でアルビグルチドを安定化できるかどうかを判定すること
８．ダイアフィルトレーション中のアルビグルチドの凝集に対するｐＨの効果を評価すること

であった。

【０２３６】

実験の設定およびアッセイ

材料：

アルビグルチド：　最適化溶液処方物および現行の凍結乾燥処方物中のＰ３およびＰ３

熱処理材料はＤＰＤから入手した。ＰＤ３大スケールの実施からのＢｌｕｅ　ＳＡＨＬプール１５ＬはＤＰＤによりさらに精製された。別の１５Ｌ（３×５Ｌサイクル）を熱処理し、精製した。この材料はＤＰＤにより小スケールで処理されたものであるので、フルスケールで製造された材料を代表するものとはいえない。

【０２３７】

アルビグルチドダイアフィルトレーションサンプルは、バッファーを５ｍＭクエン酸塩、１００ｍＭ塩酸アルギニン、１１７ｍＭトレハロース　ｐＨ５．０、５．７および６．５に交換するためのＵＦＤＦ工程により調製した。ｐＨ５．０、５．７および６．５のサンプルを最初のダイアフィルトレーションで調製したが、ｐＨ５．７のサンプルをまず水でダイアフィルトレーションを行い、次に、ｐＨ５．７バッファーを用い、ダイアフィルトレーションサンプルにおいて高次の凝集物（約０．８％）を観察した。ｐＨ５．７でのダイアフィルトレーションを繰り返した。

【０２３８】

バイアル：　３ｍＬガラスバイアル、ガラスタイプＩ、非処理、ＧＳＫ　Ｃｏｍｅｔ　Ｆｌｕｒｏｔｅｃ血清用栓：１３ｍｍ、インジェクション１３５８、Ｗｅｓｔ　４０２３／５０、灰色、ＧＳＫ　Ｃｏｍｅｔ

【０２３９】

処方物：

処方物情報については表５１を参照。

【０２４０】

【表５６】

表５１：処方物情報

処方物	タンパク質濃度 (mg/mL)	処方物	材料および製法
1	~80	pH 7.2, 10mM リン酸塩, 153mM マンニトール, 117mM トレハロース, および約 0.01% (w/w) PS80	DPD からの P3
2	~80	pH 7.2, 10mM リン酸塩, 153mM マンニトール, 117mM トレハロース, および約 0.01% (w/w) PS80	DPD からの P3 熱処理物
3	~80	pH 5.7, 5mM クエン酸塩, 100mM 塩酸アルギニン, 117mM トレハロース, および約 0.01% (w/w) PS80	P3 熱処理物からの透析
4	~80	pH 6.5, 10mM リン酸塩, 100mM 塩酸アルギニン, 117mM トレハロース, および約 0.01% (w/w) PS80	P3 熱処理物からの透析
5	~80	pH 6.5, 10mM リン酸塩, 100mM 塩酸アルギニン, 117mM トレハロース, 10 mM メチオニン(Met), および約 0.01% (w/w) PS80	P3 熱処理物からの透析
6	~80	pH 7.2, 10mM リン酸塩, 153mM マンニトール, 117mM トレハロース, 10mM オクタン酸ナトリウム, および約 0.01% (w/w) PS80	DPD からの P3 + オクタン酸塩
7	~80	pH 6.5, 10mM リン酸塩, 100mM 塩酸アルギニン, 117mM トレハロース, 10 mM オクタン酸ナトリウム, および約 0.01% (w/w) PS80	P3 + オクタン酸塩からの透析
10	~120	pH 7.2, 10mM リン酸塩, 153mM マンニトール, 117mM トレハロース, および約 0.01% (w/w) PS80	DPD からの P3
11	~120	pH 7.2, 10mM リン酸塩, 153mM マンニトール, 117mM トレハロース, および約 0.01% (w/w) PS80	P2

【０２４１】

サンプル調製および記録

サンプルを目的処方物中で２～８℃で３回透析した。透析後、ＤＰＤからの最適化処方物中のサンプルの濃度と合わせるために、サンプルを目的処方物で８０ｍｇ／ｍＬに希釈した（最適化処方物中Ｐ３熱処理物）。サンプルを調製し、表５２に示されるように以下の温度で記録した。

【０２４２】

【表５７】

表５２：安定性試験計画

温度	0時点	1か月	2か月	3か月	6か月	12か月
2-8℃	√	√		√	√	√
25℃/60% RH	√	√		√	√	
40℃/75% RH	√	√	SEC, cIEF			

充填容量: 0.5mL

【０２４３】

アッセイ方法および合格基準

０時点のサンプルをキャピラリーＤＳＣにより分析した。サンプルを各サンプルと同じ調剤バッファーで１ｍｇ／ｍＬに希釈した。スキャン速度を１℃／分とした。スキャン開始温度は２５℃であり、終了温度は９５℃であった。バイオアッセイでは、処方物１および２を０時点にて３反復で分析した。他の総ての時点では、一回の測定を行った。

【０２４４】

【表５８】

表５３：試験方法および合格基準

試験	試験方法	STD_135403 _2.0 に基づく 50 mg/Pen (AAY)に関する安定性合格基準
外観および説明	INS_8930[1]	透明～乳光, 本質的に粒子不含の溶液。色およびカラーグレードを報告。
pH	Ph.Eur. 2.2.3 and USP <791>	pH 7.2 の処方物では 6.6-7.5, 他の pH 目標 j のための情報として
サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)	INS_8898	単量体≧95.0% 凝集率%: 結果を報告(1dp)
逆相 HPLC	INS_10015	≧84.0%主要ピーク
キャピラリー等電点電気泳動(cIEF)	INS_8922	≧59.0%メイン pI メイン: 結果を報告(2dp)
タンパク質濃度	INS_109290	情報としてのみ
キャピラリーゲル電気泳動(CGE) 還元および非還元	INS_107709	還元:≧95.0% 非還元:≧95.0%
浸透圧	INS_70585	結果を報告, mOsm/kg (0dp)
バイオアッセイ[2]	INS_8838	50.0～150.0%相対効力
キャピラリーDSC	INS_60971	結果を報告
40℃で 8 週間のサンプルは SEC-HPLC および cIEF に関してのみ分析した。 2～8℃で 12 か月の処方物 1 はサンプルの不足のためにアッセイされなかった。		

【０２４５】

結果

種々の処方物中でのアルビグルチドの安定性

表５４は、キャピラリーＤＳＣで測定した場合の０時点での種々の処方物中でのアルビグルチドの転移温度ΔＨおよび熱アンフォールディング曲線を示す。表５５～５７は、２～８℃で１２か月まで、２５℃で６か月までおよび４０℃で８週間まで保存した後の種々

の処方物中でのアルビグルチドの結果を示す。ｐＨにより、またＲＰ－ＨＰＬＣ、ＳＥＣ、ＲＰ－ＨＰＬＣ、ｃＩＥＦ、ＣＧＥおよびモル浸透圧濃度によるタンパク質濃度により測定された２～８、２５および４０℃での種々の処方物中でのアルビグルチドの安定性を表５５に示す。４０℃のサンプルでは、３時点を用いたデータに関してグラフが描かれるが（ＳＥＣ－ＨＰＬＣおよびｃＩＥＦ）、２時点を用いたデータに関してグラフは描かれない。

【０２４６】

ＳＥＣ－ＨＰＬＣ、ＲＰ－ＨＰＬＣ、ｃＩＥＦおよび非還元（ＮＲ）型および還元（Ｒ）型ＣＧＥにより測定された２～８および２５℃における種々の処方物中でのアルビグルチドの結果には、統計的に有意な変性が生じたかどうかを決定するためにＳｉｇｍａＰｌｏｔバージョン１０を用いると、直線的傾向があった。初期時点と最終時点の間に有意な差は見られなかったので、統計分析に他のアッセイは含まれなかった。２～８および２５℃における各アッセイのｐ値および傾きを表５８に示す。線形回帰の傾きは変性率に相当する。傾きは、ｐ値が≦０．１であった場合に統計的に有意と見なされた。ｐ値が≦０．１であった場合のアッセイに関して変性率を報告した。ｐ値が＞０．１であった場合には変性率は０と報告した。アッセイに関する時間に対する生データのプロットは、統計的に有意な傾きとともに付録３に含まれる。

【０２４７】

【表５９】

表５４：キャピラリーＤＳＣにより測定される０時点での種々の処方物中でのアルビグルチドの転移温度

	処方物						
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
Tonset (°C)	44.8	44.5	56.2	53.5	51.5	66.9	71.4
Tm 1 (°C)	58.0	61.3	68.0	64.9	64.3	78.8	79.5
Tm 2 (°C)	71.1	72.2	73.3	73.2	72.2	79.7	81.3
ΔH1 (kCal/モル)	91	93	130	97	100	180	46
ΔH2 (kCal/モル)	100	130	130	110	130	170	280
注: Tonset はタンパク質がアンフォールドし始める温度である。それは Cp が劇的に増加し始める温度を決定するためのアンフォールディングプロファイルの目視検査により決定される。							

【０２４８】

【表６０】

表５５：２～８℃での安定性データ

アッセイ	時間(か月)		処方物								
			1	2	3	4	5	6	7	10	11
一般外観	0		[1]GA	[2]GA	[2]GA	[2]GA	[3]GA	[3]GA	[3]GA	[6]GA	[7]GA
	1		[3]GA	[2]GA	[2]GA	[2]GA	[2]GA	[3]GA	[3]GA	[6]GA	[7]GA
	3		[2]GA	[2]GA	[2]GA	[2]GA	[2]GA	[3]GA	[3]GA	[5]GA	[10]GA
	6		[2]GA	[2]GA	[2]GA	[5]GA	[2]GA	[2]GA	[2]GA	NT	NT
	12		NT	[2]GA	[2]GA	[2]GA	[2]GA	[2]GA	[2]GA	NT	NT
pH	0		7.1	7.1	5.9	6.4	6.4	7.1	6.4	7.2	7.2
	1		7.1	7.1	5.9	6.4	6.4	7.1	6.5	7.1	7.0
	3		7.2	7.1	6.0	6.5	6.5	7.2	6.6	7.1	7.0
	6		7.1	7.1	6.0	6.4	6.5	7.2	6.5	NT	NT
	12		NT	7.0	6.0	6.4	6.4	7.2	6.5	NT	NT
濃度 (RP-HPLC mg/mL)	0		79.2	80.8	79.8	80.0	78.6	79.2	79.5	118.7	123.0
	1		78.4	79.0	78.4	79.0	78.5	78.4	78.6	117.4	121.5
	3		78.3	79.7	79.2	78.9	78.6	77.8	79.0	119.6	121.2
	6		79.5	80.6	80.3	77.0	79.0	80.1	80.9	NT	NT
	12		NT	81.7	79.9	79.9	80.0	79.9	80.7	NT	NT
SEC-HPLC (%)	0	メイン	98.0	97.8	97.9	97.8	97.8	98.0	98.0	97.9	98.7
		[+]Pk91	1.8	2.0	1.9	1.9	1.9	1.8	1.7	1.9	1.6
		[-]Pk87	0.2	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1
	1	メイン	97.7	97.6	97.7	97.6	97.6	97.8	97.8	97.5	98.2
		[+]Pk91	2.0	2.1	2.0	2.1	2.1	1.9	1.9	2.2	1.6
		[-]Pk87	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2
	3	メイン	97.4	97.2	97.6	97.5	97.6	97.8	97.8	97.0	97.9
		[+]Pk91	2.3	2.4	2.2	2.2	2.2	2.1	2.0	2.5	1.9
		[-]Pk87	0.3	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.3	0.4	0.2
	6	メイン	97.1	96.9	97.6	97.9	97.5	97.7	97.7	NT	NT
		[+]Pk91	2.6	2.7	2.2	2.0	2.2	2.1	2.1	NT	NT
		[-]Pk87	0.3	0.3	0.3	0.1	0.3	0.2	0.2	NT	NT
	12	メイン	NT	96.9	97.7	97.6	97.6	97.7	97.8	NT	NT
		[+]Pk91	NT	2.8	2.1	2.2	2.1	2.1	2.0	NT	NT
		[-]Pk87	NT	0.4	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	NT	NT
RP-HPLC (%メイン)	0		92.6	92.3	92.5	92.4	92.5	93.1	93.2	93.1	92.3
	1		94.1	94.0	93.8	94.1	93.8	94.1	94.0	93.8	92.4
	3		95.6	94.9	95.2	95.7	95.7	95.9	94.8	95.4	92.3
	6		94.5	94.1	94.8	94.0	94.6	94.2	93.8	NT	NT
	12		NT	95.0	95.3	94.8	95.5	94.6	93.5	NT	NT
cIEF (%メイン)	0		73.4	72.3	73.9	71.8	73.6	72.0	73.6	74.1	73.2
	1		74.4	71.5	72.3	70.5	73.8	71.1	73.1	75.2	73.3
	3		74.0	72.9	73.2	72.9	74.2	73.4	73.2	73.1	68.0
	6		74.7	70.5	72.6	70.8	73.8	73.6	70.8	NT	NT
	12		NT	73.2	74.4	74.4	74.1	71.9	70.4	NT	NT

[1]GA: 透明, 黄色 (Y1 と Y2 の間、しかし黄色が強い[褐色が弱い]), 本質的に粒子不含の溶液
[2]GA: 透明, 黄色 (Y1 と Y2 の間), 本質的に粒子不含の溶液
[3]GA: 透明, 黄色 (Y2 または Y2、しかし黄色がやや強い) 本質的に粒子不含の溶液
[5]GA: 透明, 黄色 (Y1), 本質的に粒子不含の溶液
[6]GA: 透明, 黄色 (Y1 よりやや濃い), 本質的に粒子不含の溶液
[7]GA: 透明, 黄色 (Y1 より濃い), 本質的に粒子不含の溶液
[10]GA: 透明, 黄色 (CY2 と CY3 の間), 本質的に粒子不含の溶液
NT: 試験せず
[Δ] サンプルを 2～8℃で 7 日間保存した後にサンプルの汚染が見られた。CGE 分析でフラグメントピークの存在が見られた。

【０２４９】

【表６１】

表５５：２～８℃での安定性データ（続き）

アッセイ	時間 (か月)	処方物								
		1	2	3	4	5	6	7	10	11
CGE (非還元 %メイン)	0	96.7	96.3	96.6	96.3	96.5	96.7	96.6	96.4	97.8
	1	97.4	97.1	97.1	97.2	97.2	97.5	97.3	96.8	98.2
	3	96.8	96.7	97.0	96.9	97.0	97.1	97.0	96.3	96.3
	6	96.0	95.6	96.2	92.7[Δ]	96.3	96.6	96.6	NT	NT
	12	NT	96.8	97.3	97.3	97.1	97.3	97.4	NT	NT
CGE (還元 %メイン)	0	99.0	98.9	98.9	98.9	98.9	99.0	99.0	99.1	99.3
	1	99.6	99.5	99.5	99.5	99.5	99.6	99.6	99.5	99.6
	3	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.3	99.3	99.3	99.2
	6	98.6	98.4	98.9	96.3	98.6	98.9	98.8	NT	NT
	12	NT	99.4	99.6	99.5	99.6	99.6	99.6	NT	NT
浸透圧 (mOsm/kg)	0	355	339	332	342	356	365	357	378	369
	1	351	345	334	345	350	369	359	380	369
	3	353	341	335	345	357	360	351	381	369
	6	365	340	326	351	355	359	353	NT	NT
	12	NT	347	335	344	353	366	356	NT	NT
*Bio アッセイ (%相対効力)	0	115.7	104.6	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	1	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	3	107.1	80.3	93.5	84.3	99.1	98.3	84.2	NT	NT
	6	112.3	116.0	83.3	240.4[Δ]	106.0	141.4	116.7	NT	NT
	12	NT	82.5	109.4	97.8	109.7	125.4	99.0	NT	NT

[1]GA: 透明, 黄色 (Y1 と Y2 の間、しかし黄色が強い[褐色が弱い]), 本質的に粒子不含の溶液
[2]GA: 透明, 黄色 (Y1 と Y2 の間), 本質的に粒子不含の溶液
[3]GA: 透明, 黄色 (Y2 または Y2、しかし黄色がやや強い) 本質的に粒子不含の溶液
[5]GA: 透明, 黄色 (Y1), 本質的に粒子不含の溶液
[6]GA: 透明, 黄色 (Y1 よりやや濃い), 本質的に粒子不含の溶液
[7]GA: 透明, 黄色 (Y1 より濃い), 本質的に粒子不含の溶液
[10]GA: 透明, 黄色 (CY2 と CY3 の間), 本質的に粒子不含の溶液
NT: 試験せず
[Δ]: サンプルを 2～8℃で 7 日間保存した後にサンプルの汚染が見られた。CGE 分析でフラグメントピークの存在が見られた。

【０２５０】

【表６２】

表５６：２５℃での安定性データ

アッセイ	時間(か月)		処方物								
			1	2	3	4	5	6	7	10	11
一般外観	0		[1]GA	[2]GA	[2]GA	[2]GA	[3]GA	[3]GA	[3]GA	[6]GA	[7]GA
	1		[3]GA	[3]GA	[2]GA	[3]GA	[3]GA	[3]GA	[3]GA	[8]GA	[9]GA
	3		[3]GA	[3]GA	[2]GA	[3]GA	[3]GA	[3]GA	[3]GA	[5]GA	[10]GA
	6		[3]GA	[2]GA	[2]GA	[2]GA	[2]GA	[2]GA	[2]GA	NT	NT
pH	0		7.1	7.1	5.9	6.4	6.4	7.1	6.4	7.2	7.2
	1		7.1	7.1	5.9	6.5	6.4	7.1	6.5	7.1	6.9
	3		7.1	7.1	6.0	6.5	6.5	7.2	6.6	7.1	7.0
	6		7.1	7.1	6.0	6.5	6.5	7.1	6.5	NT	NT
濃度 (RP-HPLC mg/mL)	0		79.2	80.8	79.8	80.0	78.6	79.2	79.5	118.7	123.0
	1		78.2	79.1	78.8	78.4	78.3	79.2	78.9	117.1	121.1
	3		78.6	79.8	78.9	78.8	79.1	78.4	78.8	118.5	119.2
	6		80.1	80.7	80.8	79.9	79.7	80.3	80.5	NT	NT
SEC-HPLC (%)	0	メイン	98.0	97.8	97.9	97.8	97.8	98.0	98.0	97.9	98.7
		[+]Pk91	1.8	2.0	1.9	1.9	1.9	1.8	1.7	1.9	1.6
		[+]Pk87	0.2	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1
	1	メイン	96.4	96.2	97.4	97.1	97.0	97.4	97.4	95.8	96.5
		[+]Pk91	3.1	3.4	2.3	2.5	2.6	2.4	2.3	3.5	2.8
		[+]Pk87	0.4	0.4	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3	0.6	0.4
	3	メイン	95.1	94.8	96.9	96.4	96.6	96.8	96.8	94.3	95.5
		[+]Pk91	4.4	4.6	2.7	3.2	3.1	3.0	2.9	4.8	3.2
		[+]Pk87	0.6	0.6	0.4	0.4	0.3	0.2	0.3	0.8	0.4
	6	メイン	93.7	93.6	96.4	95.5	95.8	96.2	96.0	NT	NT
		[+]Pk91	5.6	5.7	3.2	4.1	3.9	3.6	3.7	NT	NT
		[+]Pk87	0.6	0.7	0.4	0.4	0.4	0.2	0.3	NT	NT
RP-HPLC (%メイン)	0		92.6	92.3	92.5	92.4	92.5	93.1	93.2	93.1	92.3
	1		93.0	93.5	93.5	93.4	93.2	92.8	91.7	92.4	88.5
	3		93.0	93.1	93.5	93.6	94.5	91.6	89.8	94.1	81.8
	6		89.6	89.8	91.5	89.0	90.3	88.9	84.5	NT	NT
cIEF (%メイン)	0		73.4	72.3	73.9	71.8	73.6	72.0	73.6	74.1	73.2
	1		72.3	71.5	72.7	70.8	71.1	72.5	71.4	73.5	71.1
	3		67.6	68.4	69.9	69.5	69.9	65.7	52.8	68.1	56.1
	6		64.1	63.9	67.2	65.4	63.8	56.3	45.2	NT	NT

[1]GA: 透明, 黄色 (Y1 と Y2 の間、しかし 黄色が強い [褐色が弱い]), 本質的に粒子不含の溶液
[2]GA: 透明, 黄色 (Y1 と Y2 の間), 本質的に粒子不含の溶液
[3]GA: 透明, 黄色 (Y2 または Y2、しかし黄色がやや強い) 本質的に粒子不含の溶液
[5]GA: 透明, 黄色 (Y1), 本質的に粒子不含の溶液
[6]GA: 透明, 黄色 (Y1 よりやや濃い), 本質的に粒子不含の溶液
[7]GA: 透明, 黄色 (Y1 より濃い), 本質的に粒子不含の溶液
[8]GA: 透明, 黄色 (Y1、しかし黄色がやや強い, 褐色が弱い) 本質的に粒子不含の溶液
[9]GA: 透明, 黄色 (Y1 より濃く、黄色が強い [褐色が弱い]) 本質的に粒子不含の溶液
[10]GA: 透明, 黄色 (CY2 と CY3 の間), 本質的に粒子不含の溶液
NT: 試験せず

【０２５１】

【表６３】

表５６：２５℃での安定性データ（続き）

アッセイ	時間(か月)	処方物								
		1	2	3	4	5	6	7	10	11
CGE (非還元 %メイン)	0	96.7	96.3	96.6	96.3	96.5	96.7	96.6	96.4	97.8
	1	96.0	95.7	96.7	96.7	96.8	96.7	96.9	95.6	94.3
	3	94.5	94.2	95.8	95.5	95.3	95.7	95.4	93.6	90.8
	6	91.7	90.9	93.7	93.1	93.6	94.1	94.1	NT	NT
CGE (還元 %メイン)	0	99.0	98.9	98.9	98.9	98.9	99.0	99.0	99.1	99.3
	1	99.3	99.2	99.4	99.4	99.4	99.5	99.5	99.2	99.2
	3	98.8	98.5	98.9	98.8	98.8	99.0	98.9	98.5	95.9
	6	97.2	97.3	98.2	97.3	97.7	97.6	97.7	NT	NT
Osmolality 浸透圧	0	355	339	332	342	356	365	357	378	369
	1	361	347	335	341	353	363	354	377	367
	3	347	346	336	350	350	361	362	380	373
	6	356	352	332	346	362	361	356	NT	NT
*バイオアッセイ (%相対効力)	0	115.7	104.6	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	1	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	3	119.6	97.2	112.0	115.2	113.9	137.7	154.8	NT	NT
	6	182.4	165.5	160.3	173.5	196.3	199.8	181.4	NT	NT

[1]GA: 透明, 黄色 (Y1 と Y2 の間、しかし黄色が強い [褐色が弱い]), 本質的に粒子不含の溶液
[2]GA: 透明, 黄色 (Y1 と Y2 の間), 本質的に粒子不含の溶液
[3]GA: 透明, 黄色 (Y2 または Y2、しかし黄色がやや強い) 本質的に粒子不含の溶液
[5]GA: 透明, 黄色 (Y1), 本質的に粒子不含の溶液
[6]GA: 透明, 黄色 (Y1 よりやや濃い), 本質的に粒子不含の溶液
[7]GA: 透明, 黄色 (Y1 より濃い), 本質的に粒子不含の溶液
[8]GA: 透明, 黄色 (Y1、しかし 黄色がやや強い, 褐色が弱い) 本質的に粒子不含の溶液
[9]GA: 透明, 黄色 (Y1 より濃く、 黄色が強い [褐色が弱い]than) 本質的に粒子不含の溶液
[10]GA: 透明, 黄色 (CY2 と CY3 の間), 本質的に粒子不含の溶液
NT: 試験せず

【０２５２】

【表６４】

表５７：４０℃での安定性データ

アッセイ	時間(か月)		処方物								
			1	2	3	4	5	6	7	10	11
一般外観	0		[1]GA	[2]GA	[2]GA	[2]GA	[3]GA	[3]GA	[3]GA	[6]GA	[7]GA
	1		[3]GA	[4]GA	[2]GA	[2]GA	[2]GA	[2]GA	[3]GA	[8]GA	[9]GA
pH	0		7.1	7.1	5.9	6.4	6.4	7.1	6.4	7.2	7.2
	1		7.0	7.0	5.9	6.4	6.4	7.1	6.5	7.0	6.9
濃度 (RP-HPLC mg/mL)	0		79.2	80.8	79.8	80.0	78.6	79.2	79.5	118.7	123.0
	1		79.0	79.9	78.7	78.7	77.9	78.6	79.1	118.3	122.2
SEC-HPLC (%)	0	メイン	98.0	97.8	97.9	97.8	97.8	98.0	98.0	97.9	98.7
		[+]Pk91	1.8	2.0	1.9	1.9	1.9	1.8	1.7	1.9	1.6
		[+]Pk87	0.2	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1
	1	メイン	82.2	82.4	95.7	94.7	94.9	96.3	96.2	80.2	77.7
		[+]Pk91	11.9	11.5	3.3	4.4	4.2	3.4	3.3	10.7	5.5
		[+]Pk87	2.9	2.9	0.7	0.7	0.6	0.3	0.5	3.2	1.8
		[+]大きい	3.0	3.2	0.3	0.2	0.2	0	0	6.0	14.6
		Frag1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.4
		Frag2	0	0	0	0	0	0	0	0	0.1
	2	メイン	NT	NT	94.7	93.2	93.2	95.4	94.9	NT	NT
		[+]Pk91	NT	NT	3.7	5.2	5.5	4.3	4.5	NT	NT
		[+]Pk87	NT	NT	0.7	1.0	0.7	0.3	0.6	NT	NT
		[+]大きい	NT	NT	0.9	0.6	0.6	0	0	NT	NT
RP-HPLC (%メイン)	0		92.6	92.3	92.5	92.4	92.5	93.1	93.2	93.1	92.3
	1		86.8	87.6	91.0	89.8	90.9	89.9	86.1	86.9	81.0
cIEF (%メイン)	0		73.4	72.3	73.9	71.8	73.6	72.0	73.6	74.1	73.2
	1		61.5	62.0	65.6	62.6	63.5	61.7	58.5	61.5	54.8
	2		56.4	51.3	58.8	58.0	64.0	50.6	44.2	NT	NT
CGE (非還元 %メイン)	0		96.7	96.3	96.6	96.3	96.5	96.7	96.6	96.4	97.8
	1		78.2	78.1	94.7	94.5	94.8	95.8	95.1	81.5	85.3
CGE (還元 %メイン)	0		99.0	98.9	98.9	98.9	98.9	99.0	99.0	99.1	99.3
	1		98.0	97.9	98.8	98.6	98.6	98.9	98.9	97.7	95.8
浸透圧 (mOsm/kg)	0		355	339	332	342	356	365	357	378	369
	1		356	345	336	346	358	367	362	386	380
*バイオアッセイ (%相対効力)	0		115.7	104.6	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	1		NT	NT	167.1	153.8	170.9	194.1	183.9	NT	NT

[1]GA: 透明, 黄色 (Y1 と Y2 の間、しかし黄色が強い [褐色が弱い]), 本質的に粒子不含の溶液
[2]GA: 透明, 黄色 (Y1 と Y2 の間), 本質的に粒子不含の溶液
[3]GA: 透明, 黄色 (Y2 または Y2、しかし黄色がやや強い) 本質的に粒子不含の溶液
[4]GA: 透明, 黄色 (Y2、しかし 黄色がやや強い) かき回した際にすぐに沈降する、１つの大きな灰色の細片様の粒子を伴う溶液
[6]GA: 透明, 黄色 (Y1 よりやや濃い), 本質的に粒子不含の溶液
[7]GA: 透明, 黄色 (Y1 より濃い), 本質的に粒子不含の溶液
[8]GA: 透明, 黄色 (Y1 より濃く、黄色が強い [褐色が弱い]than) 本質的に粒子不含の溶液
[9]GA: 透明, 黄色 (CY2), 本質的に粒子不含の溶液
NT: 試験せず

【０２５３】

【表６５】

表５８：処方物の各アッセイの変性率および傾きＰ値

アッセイ	温度	処方物													
		1		2		3		4		5		6		7	
		傾き (%/wk)	p値	傾き (%/wk)	p値	傾き (%/wk)	p値	傾き (%/wk)	p値	傾き (%/wk)	p値	傾き (%/wk)	p値	傾き (%/wk)	p値
SEC-HPLC	2-8℃	-0.033	0.03	-0.017	0.07	0	0.54	0	0.92	0	0.41	0	0.14	0	0.41
	25℃	-0.15	0.04	-0.15	0.05	-0.05	0.03	-0.08	0.02	-0.07	0.04	-0.07	0.03	-0.07	0.02
RP-HPLC	2-8℃	0	0.65	0	0.23	0	0.17	0	0.47	0	0.22	0	0.65	0	0.79
	25℃	0	0.14	0	0.21	0	0.38	0	0.22	0	0.41	-0.17	0.007	-0.33	0.004
cIEF	2-8℃	0	0.25	0	0.66	0	0.41	0	0.21	0	0.36	0	0.83	-0.066	0.03
	25℃	-0.37	0.03	-0.33	0.002	-0.26	0.01	-0.24	0.007	-0.36	0.02	-0.65	0.01	-1.16	0.05
CGE NR	2-8℃	0	0.23	0	0.92	0	0.65	0	0.92	0	0.82	0	0.82	0	0.48
	25℃	-0.19	<0.001	-0.21	0.003	-0.12	0.02	-0.14	0.04	-0.12	0.03	-0.11	0.01	-0.11	0.03
CGE R	2-8℃	0	0.32	0	0.93	0	0.45	0	0.89	0	0.64	0	0.62	0	0.68
	25℃	-0.076	0.07	-0.069	0.05	0	0.17	-0.071	0.10	0	0.11	0	0.11	-0.060	0.10

【０２５４】

ダイアフィルトレーション中のアルビグルチドの凝集に対するｐＨの効果

ダイアフィルトレーション中のアルビグルチドの凝集に対するｐＨの効果もまた検討した。サンプルをＤＰＤにおいてＵＦＤＦによりｐＨ５．０、５．７、および６．５で調製した。ＵＦＤＦの後、サンプルをｐＨおよびＳＥＣ－ＨＰＬＣにより調べた。結果を表５９に示す。

【０２５５】

【表６６】

表５９：種々のｐＨでのアルビグルチド　ダイアフィルトレーションのＳＥＣ－ＨＰＬＣおよびｐＨ結果

ダイアフィルトレーション目標 pH	測定 pH	SEC-HPLC 結果	
		%単量体	Pk91%
5.0	4.92	99.1	0.9
5.7	6.10	98.9	1.1
6.5	6.41	99.2	0.8

【０２５６】

考察

種々の処方物中でのアルビグルチドＰ３材料の安定性

最初に４種類のサンプルをＤＰＤから得た。それらは１０ｍＭリン酸塩、１５３ｍＭマンニトール、１１７ｍＭトレハロース、０．０１％ＰＳ８０　ｐＨ７．２（現行の凍結乾燥処方物）および５ｍＭクエン酸塩、１００ｍＭアルギニン、１１７ｍＭトレハロース、約０．０１％ＰＳ８０（最適化処方物）中のＰ３およびＰ３熱処理材料であった。最適化処方物中のＰ３およびＰ３熱処理材料は、より多い凝集物およびより低いモル浸透圧濃度（１２３および７４ｍＯｓｍ／ｋｇ）を有しており、ＳＥＣ－ＨＰＬＣでのクエン酸塩、アルギニンピークは見られなかった。

【０２５７】

種々の処方物（Ｆ１～Ｆ７）中でのＰ３およびＰ３熱処理材料の安定性を本節で考察した。表５４からのＤＳＣ結果は、ＴｏｎｓｅｔによってはそうでもなかったがＴｍ１により示されるように、熱処理アルビグルチドの温度安定性は非熱処理材料よりもやや安定であることを示す（Ｆ１対Ｆ２）。ｐＨ５．７、５ｍＭクエン酸塩、１００ｍＭ塩酸アルギニン、および１１７ｍＭトレハロース（最適化溶液処方物）であるＦ３のＴｏｎｓｅｔおよびＴｍ１は、処方物Ｆ１、Ｆ２、Ｆ４およびＦ５の場合よりもはるかに高く、アルビグルチドは最適化溶液処方物中でより熱的に安定であることを示す。処方物Ｆ１、Ｆ２、Ｆ４およびＦ５よりも高いＦ３のΔＨ１も、Ｆ３がより安定であることを示す。ｐＨ６．５、１０ｍＭリン酸塩、１００ｍＭ塩酸アルギニン、および１１７ｍＭトレハロース中にＭｅｔを含む（Ｆ５）および含まない（Ｆ４）アルビグルチドのＴｍ１およびＴｍ２は同等であり、Ｍｅｔがアルビグルチドの温度安定性に影響しないことを示す。アルビグルチドの溶液処方物へのオクタン酸ナトリウムの添加（Ｆ６およびＦ７）は、Ｔｏｎｓｅｔ、Ｔｍ１およびＴｍ２をはるかに高くし、第１の転移を第２の転移ピークに極めて近くし、オクタン酸塩は溶液中のアルビグルチドを熱的に安定化させ得ることを示す。転移ピークのシフトはおそらくオクタン酸塩とｒＨＳＡの結合によるものと思われる。Ｆ６およびＦ７のΔＨ１の増加もまた、オクタン酸塩の添加がアルビグルチドの温度安定性を高めたことを示す。

【０２５８】

２～８℃でのＦ１～Ｆ７の安定性

２～８℃でのＦ１およびＦ２の安定性データ（表５５）は、総てのアッセイにより測定されるように、熱処理アルビグルチドと非熱処理アルビグルチドの間に差は無いことを示す。アルビグルチドは現行の凍結乾燥処方物（Ｆ１およびＦ２）では最適化溶液処方物およびオクタン酸ナトリウムを含む処方物よりも溶液中での安定性が低い。２～８℃での０

から６か月または１２か月までのＳＥＣ－ＨＰＬＣの％単量体の減少は、Ｆ１およびＦ２では約０．９％であり、他の処方物ではわずか０．２～０．３％である。この％単量体の減少は、二量体ピークであるピーク９１の増加と一致する。

【０２５９】

２～８℃で１２か月間の保存の後、一般外観、ｐＨ、濃度、ＲＰ－ＨＰＬＣ、ｃＩＥＦ、ＣＧＥ（非還元および還元）、モル浸透圧濃度およびバイオアッセイにより測定した場合、２～８℃で６か月の処方物４のＣＧＥ結果（ＲおよびＮＲ）が低く、２～８℃で６か月の処方物４のバイオアッセイが高いことを除き、総ての処方物間に差は無い。２～８℃で６か月の処方物４のサンプルは汚染されていた。このサンプルを２～８℃で７日間保存した後に数種の微生物が観察された。この汚染がアルビグルチドの切り取り(clipping)を生じ、ＣＧＥ％主要の低下、断片ピークの存在（ＥＥ５６０６２１）およびバイオアッセイの増加をもたらした可能性が最も高い。

【０２６０】

ＳＥＣ－ＨＰＬＣにより測定したＦ１およびＦ２（現行の凍結乾燥処方物）ならびにｃＩＥＦにより測定したＦ７（ｐＨ６．５でオクタン酸ナトリウム含有）を除き、２～８℃での総ての処方物の変性率は統計的に有意でなかった（表５４参照）。最適化溶液処方物中、メチオニン含有および不含のｐＨ６．５、１０ｍＭリン酸塩、１００ｍＭ塩酸アルギニン、および１１７ｍＭトレハロースの処方物中、ならびに１０ｍＭオクタン酸ナトリウムを含有する現行の凍結乾燥処方物中でのアルビグルチドは、２～８℃で少なくとも１２か月間安定である。

【０２６１】

２５℃／６０％ＲＨでのＦ１～Ｆ７の安定性

２５℃でのアルビグルチドの安定性データ（表５６）は、総てのアッセイにより測定されるように、熱処理アルビグルチドと非熱処理アルビグルチドの間に差は無いことを示す（Ｆ１対Ｆ２）。総ての処方物の結果は、一般外観、ｐＨ、濃度およびモル浸透圧濃度により測定されたものと同等である。表５６に示されるように、ＳＥＣ－ＨＰＬＣ結果は、最適化溶液処方物（Ｆ３）中でのアルビグルチドが最も安定であることを示す。Ｆ３は、６か月後に最高の％単量体ピークおよび最低の％凝集物を有する。オクタン酸ナトリウム含有処方物（Ｆ６およびＦ７）は、Ｍｅｔ含有および不含のｐＨ６．５、１０ｍＭリン酸塩中の処方物（Ｆ５およびＦ４）よりもやや安定である。現行の凍結乾燥処方物（Ｆ１およびＦ２）の溶液中でのアルビグルチドは最高の凝集を示した。

【０２６２】

表５６に示されるように、非還元型ＣＧＥの結果は、％メインがより低いＦ１およびＦ２を除く総ての処方物が同等の安定性を有することを示す。表５６に示されるように還元型ＣＧＥの結果は、Ｆ３が最も安定であることを示す。Ｆ５、Ｆ６、およびＦ７（Ｍｅｔ含有（Ｆ５）、オクタン酸ナトリウム含有（Ｆ６およびＦ７））は、Ｆ１、Ｆ２およびＦ４よりもやや安定である。

【０２６３】

表５６に示されるように、ＲＰ－ＨＰＬＣおよびｃＩＥＦの結果もまた、アルビグルチドが最適化溶液処方物中でより安定であることを示す。オクタン酸ナトリウム含有処方物は、最低量の％メインを有し、他の処方物よりも安定性が低い。オクタン酸塩含有処方物（Ｆ６およびＦ７）のｃＩＥＦ結果は、ピーク９１の出現およびピーク９７の増加（処方物３の１４．２％に比べて処方物６では２３．１％および処方物７では２６．３％）を示した。この結果はおそらくメチオニン、システイン、およびトリプトファンの酸化によるものである。この結果はまた、ピーク９７の増加がＮ末端およびリシンカルバミル化、システインおよびトリプトファン酸化によるものであることを示したアルビグルチド製品関連変異体特性評価レポート(Product-Related Variant Characterization Report)によっても裏づけられる。現行の凍結乾燥処方物における溶液中のアルビグルチドは、ｐＨ６．５、１０ｍＭリン酸塩処方物中にある場合と同等である。Ｍｅｔ含有および不含処方物は同等のＲＰ－ＨＰＬＣ結果およびｃＩＥＦ結果を有し、メチオニンは、２５℃で６か月間

、アルビグルチドの化学変性を阻害しなかったことを示す。２５℃で３か月間の総てのサンプルがバイオアッセイの合格基準を通過するが、２５℃で６か月間の総てのサンプルがバイオアッセイ合格基準を満たすわけではなかった。

【０２６４】

２５℃での安定性データ（表５８）の統計分析は、アルビグルチドが総ての供試処方物で、ＳＥＣ、ＣＧＥ　ＮＲ、およびｃＩＥＦにより測定される統計的に有意な変性を有したことを示す。２５℃で最適化溶液処方物（Ｆ３）中のアルビグルチドは、ＳＥＣ－ＨＰＬＣにより測定した場合、最低の変性率を有する。処方物Ｆ３、Ｆ４、Ｆ５、Ｆ６、およびＦ７は総て、ＣＧＥ　ＮＲにより測定した場合、匹敵した変性率を有していた。アルビグルチドは、Ｆ３およびＦ４中ではＩＥＦ％メインの最低の変性率を有する（それぞれ０．２６および０．２４％／週）。Ｆ６およびＦ７（オクタン酸塩含有）は、最高のｃＩＥＦ％メイン変性率を有していた（それぞれ０．６５および１．１７％／週）。Ｆ６およびＦ７（オクタン酸ナトリウム含有）は、ＲＰ－ＨＰＬＣにより統計的に有意な変性を示した唯一の処方物であった。

【０２６５】

Ｆ４（Ｍｅｔ不含）およびＦ５（Ｍｅｔ含有）の変性率を比較すると、ｐＨ６．５の処方物へのメチオニンの添加は、ｃＩＥＦ％メインにより測定される変性率を２５℃で０．２４％／週から０．３６％／週へ増加させるが、他のいずれのアッセイの変性率にも影響を及ぼさないことが示される。全体的に見れば、２５℃での安定性データは、Ｆ３（最適化処方物）がアルビグルチドに対して最も安定な処方物であることを示す。

【０２６６】

４０℃／７５％ＲＨでのＦ１～Ｆ７の安定性

表５７に示されるように、４０℃での結果は、非熱処理材料の安定性は熱処理材料の安定性と同等であることを示す（Ｆ１対Ｆ２）。表５７に示されるように、ＳＥＣ－ＨＰＬＣからの結果は、Ｆ６（ｐＨ７．２でオクタン酸ナトリウム含有）中でのアルビグルチドが最も安定であり、最高パーセントの単量体および最低パーセントの凝集を有することを示す。Ｆ３（最適化溶液処方物）中でのアルビグルチドは、２番目に安定であり、Ｆ７（ｐＨ６．５、１０ｍＭリン酸塩、１００ｍＭ塩酸アルギニン、および１１７ｍＭトレハロース中、オクタン酸ナトリウム含有）と同等である。メチオニンの添加は、凝集に影響を及ぼさなかった（Ｆ４対Ｆ５）。アルビグルチドは、現行の凍結乾燥処方物（Ｆ１およびＦ２）中で最高の凝集率を有していた。

【０２６７】

非還元ＣＧＥの結果は、ＳＥＣ－ＨＰＬＣの結果と同等である。Ｆ６中でのアルビグルチドが最も安定であり、４０℃で１か月後の％メインは９５．８％である。Ｆ２、Ｆ３、Ｆ４、およびＦ７は、４０℃で１か月後に９４．５～９５．１％の範囲の同等の％メインを有していた。現行の凍結乾燥処方物における溶液中のアルビグルチドは安定が最も低く、４０℃で１か月後のＦ１およびＦ２でそれぞれ７８．２および７８．１％メインである。

【０２６８】

表５７に示されるように、ＲＰ－ＨＰＬＣの結果は、Ｆ３（最適化溶液処方物）はＦ５（Ｍｅｔ含有）と同等であり、これらは最も安定な処方物であり、最高の％メインを有し、０から６か月までの変化が最小であることを示す。オクタン酸ナトリウムを含有するＦ７は、最低の％メインを有していた。Ｆ４（Ｍｅｔ含有）とＦ５（Ｍｅｔ不含）を比較すると、０から１か月までの％メインの低下がＦ４では２．６％であり、Ｆ５ではわずか１．６％であることで明らかなように、アルビグルチドはＭｅｔの存在下でより安定である。

【０２６９】

表５７に示されるように、ｃＩＥＦ結果は、Ｆ５（Ｍｅｔ含有）が最も安定な処方物であることを示す。Ｆ３はＦ４およびＦ１と同等であり、２番目に安定な処方物である。Ｆ７（オクタン酸塩、ｐＨ６．５）は、ＲＰ－ＨＰＬＣ結果と一致して最も安定性の低い処

方物である。ｃＩＥＦの結果はまた、アルビグルチドがＭｅｔ含有処方物中でより安定であることを示す。０から６か月までのｃＩＥＦの％メインの低下は、Ｆ４（Ｍｅｔ不含）では１３．８％であり、Ｆ５（Ｍｅｔ含有）ではわずか９．６％である。

【０２７０】

プロセス３およびプロセス２の材料の安定性の比較（Ｆ１０対Ｆ１１）

２～８℃で３か月保存後のｃＩＥＦおよびＣＧＥ　ＮＲ結果により示されるように、プロセス３材料（Ｆ１０）はプロセス２の材料（Ｆ１１）よりも安定である（表５５）。ｃＩＥＦの％メインは、Ｆ１０では７４．１から７３．２に、Ｆ１１では７３．２から６８．０に低下した。非還元ＣＧＥの％メインは、Ｆ１０では低下せず、Ｆ１１では１．５％低下した。

【０２７１】

２５℃で３か月保存後のＲＰ－ＨＰＬＣ、ｃＩＥＦ、およびＣＧＥ（還元および非還元）結果により示されるように、プロセス３の材料（Ｆ１０）は、プロセス２の材料（Ｆ１１）よりも安定である（表５６）。ＲＰ－ＨＰＬＣの％メインは、Ｆ１０では低下せず、Ｆ１１では１０．５％低下した。ｃＩでは７３．２から５６．１に低下した。非還元型ＣＧＥの％メインは、Ｆ１０では２．８％低下し、Ｆ１１では７％低下した。還元型ＣＧＥの％メインは、Ｆ１０では９９．１から９８．５に低下し、Ｆ１１では９９．３から９５．９に低下した。

【０２７２】

４０℃で１か月保存後、ＳＥＣ－ＨＰＬＣ、ＲＰ－ＨＰＬＣ、ｃＩＥＦ、およびＣＧＥ（還元）結果により示されるように、プロセス３の材料（Ｆ１０）は、プロセス２の材料（Ｆ１１）より安定である（表５７）。ＳＥＣ－ＨＰＬＣの％単量体は、Ｆ１０では１７．７％低下し、Ｆ１１では２１．０％低下した。％単量体の低下は、より高次の凝集物（ｐＫ８７より大きいピーク）の増加に相当する。Ｆ１１では、断片も見られた。ＲＰ－ＨＰＬＣの％メインは、Ｆ１０では６．２％低下し、Ｆ１１では１１．３％低下した。ｃＩＥＦの％メインは、Ｆ１０では１２．６％、Ｆ１１では１８．４％低下した。還元型ＣＧＥの％メインは、Ｆ１０では１．４％低下し、Ｆ１１では３．５％低下した。

【０２７３】

ダイアフィルトレーション中のアルビグルチドの凝集に対するｐＨの効果

最適化溶液処方物中、ｐＨ５．０、５．７および６．５でのアルビグルチドのダイアフィルトレーションはＤＰＤにて実施された。総てのサンプルの％単量体は同等である（表５９）。最適化溶液処方物中、種々のｐＨでのダイアフィルトレーションにサンプル間の差は無い。

【０２７４】

結論

全体的に見れば、結果は、熱処理材料と非熱処理材料の間に差は無いことを示す。現行の処方物（Ｆ１およびＦ２）を除き、供試した総ての処方物は、２～８℃で１２か月間、同等の安定性を有していた。従って、ｐＨ５．７での最適化溶液処方物、ｐＨ６．５で１０ｍＭメチオニンおよび１０ｍＭオクタン酸ナトリウム含有および不含の最適化処方物、ならびに１０ｍＭオクタン酸ナトリウムを含有する現行の処方物中でのアルビグルチドは、２～８℃で少なくとも１２か月間安定である。２５℃および４０℃での安定性データは、アルビグルチドは最適化処方物（ｐＨ５．７、５ｍＭクエン酸塩、１００ｍＭ塩酸アルギニン、および１１７ｍＭトレハロース）中で最も安定であることを示す。Ｍｅｔの添加は４０℃でアルビグルチドを安定化することができるが、２～８℃および２５℃では有意な効果は無い。プロセスＩＩの材料と同様に、アルビグルチドプロセスＩＩＩ材料へのオクタン酸ナトリウムの添加は凝集を少なくするが、ＲＰ－ＨＰＬＣおよびｃＩＥＦにより測定した場合、特に、ｐＨ６．５で変性を増大させた。ｃＩＥＦ、ＲＰ－ＨＰＬＣ、ＳＥＣ－ＨＰＬＣおよびＣＧＥ結果により示されるように、プロセス３の材料は、プロセス２の材料より安定である。最適化溶液処方物中、ｐＨ５．０、５．７および６．５でのアルビグルチドのダイアフィルトレーションは凝集を生じない。

【０２７５】
実施例３
２℃～８℃で１２か月間安定であり、５ｍＭクエン酸塩、１１７ｍＭトレハロース、１００ｍＭアルギニン、約０．０１％ポリソルベート８０、ｐＨ５．９を含有するリード処方物を特定した。充填済みシリンジ（ＰＦＳ）内で２～８℃で保存した際にリード処方物に、アルビグルチドに対する安定性の改善を提供する液体製剤を求めて、２つのさらなる処方物の開発研究を行った。
【０２７６】
試験計画
充填済みシリンジ（ＰＦＳ）試験
ＰＦＳ試験に供試した処方物を表６０に挙げる。総ての処方物が１１７ｍＭトレハロース、１００ｍＭアルギニン、約０．０１％（ｗ／ｗ）ＰＳ８０、ｐＨ６．０を含有した。総ての処方物中、アルビグルチド濃度はおよそ１００ｍｇ／ｍＬであった。
【０２７７】
【表６７】

表６０：処方物（総て１１７ｍＭトレハロース、１００ｍＭアルギニン、０．０１％（ｗ／ｗ）ＰＳ８０、ｐＨ６．０を含有）

処方物	バッファー	オクタン酸塩	メチオニン	トリプトファン	システイン	NaCl	調製法
1	5 mM クエン酸塩						透析
2	10 mM クエン酸塩						#1 からスパイク
3	5 mM クエン酸塩					50 mM	#1 からスパイク
4	5 mM クエン酸塩	10 mM					#1 からスパイク
5	5 mM クエン酸塩		10 mM				#1 からスパイク
7	5 mM クエン酸塩		10 mM	1 mM			#1 からスパイク
8	5 mM クエン酸塩				10 mM		#1 からスパイク

【０２７８】
総ての処方物を高シリコーン充填済みシリンジ（ＰＦＳ）に０．７５ｍｌの容量で充填した。処方物１はさらにバイアル（対照）にも充填した。各処方物と容器の組合せを表６１にバリエーションとして挙げる。各バリエーションで評価したストレス（温度、光、剪断）も表６１に示す。
【０２７９】

【表６８】

表６１：評価したバリエーションおよびストレス

バリエーション	処方物	容器	温度安定性試験	光ストレス 試験	剪断応力試験
A	1	バイアル	x		x
B	1	PFS 高シリコーン	x	x	x
E	2	PFS 高シリコーン	x	x	
F	3	PFS 高シリコーン	x	x	
G	4	PFS 高シリコーン	x	x	x
H	5	PFS 高シリコーン	x	x	
J	7	PFS 高シリコーン	x	x	
K	8	PFS 高シリコーン	x	x	

【０２８０】

凝集試験

凝集試験のための処方物計画は、動的光散乱（ＤＬＳ）、ライトサイクラー（外因性蛍光）およびＤＳＣ試験の結果に基づいた。ＤＳＣ、ＤＬＳによる熱的アンフォールディング、および外因性蛍光の結果は、ＮａＣｌの増加、トレハロースの増加、およびアルギニン濃度の低下およびシステインの添加に伴うアルビグルチドの温度安定性の上昇を示した。オクタン酸ナトリウムは、従前の試験で凝集からの保護を示した。しかしながら、オクタン酸塩含有処方物は、従前の試験で、より高い化学変性率を有することが認められていた。オクタン酸含有処方物における化学変性率の増加および凝集率の低下がｐＨに依存するかどうかを判定するために、種々のｐＨ値でオクタン酸ナトリウムを含む処方物を評価した。メチオニンおよびオクタン酸塩の両方を含む処方物もまた、メチオニンがオクタン酸塩による引き起こされる化学変性を防ぐことができるかどうかをみるために評価した。本試験における供試処方物を表６２に挙げる。

【０２８１】

【表６９】

表６２：処方物（総ておよそ１００ｍｇ／ｍＬ、０．０１％（ｗ／ｗ）ＰＳ８０含有）

処方物	バッファー	オクタン酸塩	Met	Arg	Cys	NaCl	トレハロース	pH
NaCl 含有高トレハロース	10 mM クエン酸塩					50 mM	200 mM	6.0
高 NaCl	10 mM クエン酸塩					140 mM		6.0
NaCl 含有アルギニン	10 mM クエン酸塩			100 mM		140 mM		6.0
NaCl 含有トレハロース	10 mM クエン酸塩					140 mM	100 mM	6.0
オクタン酸塩 Met および NaCl	10 mM クエン酸塩	10 mM	20 mM			140 mM		6.0
NaCl およびオクタン酸塩	10 mM クエン酸塩	10 mM				140 mM		6.0
NaCl およびオクタン酸塩	10 mM リン酸塩	10 mM				140 mM		7.0
NaCl + システイン	10 mM クエン酸塩				1.36 mM	140 mM		6.0
NaCl, オクタン酸塩およびシステイン	10 mM リン酸塩	10 mM			1.36 mM	140 mM		7.0

【０２８２】

サンプル調製：

ＰＦＳ試験

１０ｍＭリン酸ナトリウム、１１７ｍＭトレハロース、１５３ｍＭマンニトール、約０．０１％ＰＳ８０、ｐＨ７．０中、４００ｍＬの１０３ｍｇ／ｍＬアルビグルチドを、約１４０ｍｇ／ｍＬに濃縮し、ＰＦＳ処方物１（表１）中で透析した。透析は、光から保護して２～８℃で、２Ｌバッファーに対して１２０ｍＬのアルビグルチド、４回のバッファー交換で合計８Ｌとして行った。処方物２～８は、賦形剤原液を添加することにより処方物１から調製した。各処方物は１Ｍ　ＨＣｌを用いｐＨ６．０に調整し、０．２２ミクロンのＰＥＳフィルターで濾過した。得られた処方物のタンパク質濃度をＲＰＨＰＬＣ濃度により測定した。総ての処方物を、適合する希釈剤を加えることにより１００ｍｇ／ｍＬに希釈した。濃度は、処方物１では約１０５ｍｇ／ｍＬ、他の処方物では９７．６～９９．１であった。タンパク質濃度におけるこの約７％の違いは、本試験の結果に影響を及ぼすとは思われない。シリンジに０．７５ｍＬの原薬溶液を充填し、栓をした。光ストレスサンプルでは、１０００ルクス、２５℃／６５％ＲＨの光安定性チャンバー内に様々な強度で１週間、シリンジを水平に置いた。処方物の光から保護する能力を比較するため、高シリコーンシリンジでのバリエーションのみを光ストレスに関して試験した（バリエーションＢＥＦＧＨＪＫ）。暗所対照は、アルミホイルで包むことにより光から保護した。剪断応力は、シリンジを２５℃で、光から保護して、３００ｒｐｍで４８時間オービタルシェーカー上の水平に置くことにより生じさせた。剪断により引き起こされる変性に対するシリコーン含量およびオクタン酸ナトリウムの影響を評価するために、対照処方物およびオクタン酸ナトリウム処方物（バリエーションＡ、Ｂ、およびＧ）のみを振盪により評価した。

【０２８３】

凝集試験

５ｍＭクエン酸塩、１１７ｍＭトレハロース、１００ｍＭアルギニン、および約０．０１％ＰＳ８０、ｐＨ６．０中のアルビグルチドを、１０ｍＭクエン酸塩、ｐＨ６．０バッファー（凝集処方物１～６および８を調製するため）および１０ｍＭリン酸ナトリウム、１４０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ７．０バッファー（処方物７および９を調製するため）中で透析した。透析は、２～８℃で、光から保護し、約３．５Ｌのバッファーに対して９０ｍＬのアルビグルチド、３回のバッファー交換で、合計１０Ｌとして行った。サンプルのタンパク質濃度をＳｏｌｏ　ＶＰＥにより測定し、透析が完了したことを確認するためにモル浸透圧濃度を測定した。次に、表３の目的処方物を、１０ｍＭクエン酸塩、０．０１％ＰＳ８０　ｐＨ６．０中、または１０ｍＭリン酸ナトリウム、１４０ｍＭＮａＣｌ、０．０１％ＰＳ８０　ｐＨ７．０中に、ＮａＣｌ、トレハロース、アルギニンまたはシステインの保存溶液を添加することにより調製した。各処方物のｐＨを確認し、１Ｍ　ＮａＯＨを用いて、処方物１～４、および８ではｐＨを６．０に調整し、処方物７および９では７．０に調整した。各サンプルを０．２μｍフィルターで濾過した。各処方物は、各シリンジに０．２５ｍＬを充填したバイオアッセイを除く総てのアッセイで０．７５ｍＬをシリンジに充填した。シリンジの頭隙は２～３ｍｍであった。これらのサンプルを表６４の通り、２～８℃または３０℃のいずれかで保存した。

試験

【０２８４】

【表７０】

表６３：ＰＦＳ試験のための温度ストレスの試験計画

温度	時間0	2W	1M	2M	3M	6M
2-8°C	√				√	√
30 °C/65% RH	√		√	√	√	
40 °C/75% RH	√	√	√	√		

【０２８５】

【表７１】

表６４：凝集試験の試験計画

温度	時間０	2W	1M	2M	3M	6M	9M	12M	追加
2-8°C	√ MFI バイオアッセイ FcRn*		√	√ MFI バイオアッセイ FcRn*	√	√	√	√ MFI バイオアッセイ FcRn*	3
30 °C/65% RH	√	√	√	√ MFI バイオアッセイ FcRn*	√				2

*アルビグルチド中の遊離 Cys-94 は FcRn 結合に関与する可能性がある。処方物への Cys の添加は Cys-94 とのジスルフィド結合を形成し、FcRn 結合に影響を及ぼす可能性がある。処方物 8 および 9(Cys 含有処方物)は BDS 対照とともに FcRn 結合により分析した。

【０２８６】

考察

ＰＦＳ試験

バリエーションＫは、ＲＰ－ＨＰＬＣにより測定した場合のピーク９３の有意な形成のために１か月後に打ち切った。以下の考察はバリエーションＡ～Ｊの安定性に着目する。バリエーションＧは４０℃でＲＰＨＰＬＣおよびｃＩＥＦにより加速化された化学変性を示し、バリエーションＪ（トリプトファン／メチオニン）はバリエーションＨ（メチオニン単独）に比べて何の利益も示していなかったので、バリエーションＧとＪに１か月後還元型試験を行った。試験は６か月で終了したが、バリエーションＥは、第ＩＩＩ相／市販アルビグルチド液体製剤として選択された処方物に対する１２か月データ点を得るために１２か月で試験した。

【０２８７】

２～８℃での安定性

安定性データは、ＧＡ（一般外観）、ｐＨ、濃度、ＲＰ－ＨＰＬＣ、ｃＩＥＦ、還元型および非還元型ＣＧＥ、モル浸透圧濃度およびバイオアッセイにより測定した場合に、２～８℃で最大６か月保存後のバリエーションＡ、Ｂ、およびＦ～Ｊ、ならびに最大１２か月保存後のバリエーションＥに差は無いことを示す。ｃＩＥＦピーク１０２は、総ての処方物で６か月の時点で２つのピークに分かれるが、この分割ピークはＤＬより小さい。

【０２８８】

ＳＥＣ－ＨＰＬＣの結果は、２～８℃で最大６か月および１２か月保存後のバリエーションＡ～Ｊでは、９９．０％から９８．２％まで主要ピークの若干の低下を示し、これは二量体ピークの１．０％から約１．６％の増加と一致する。６か月の時点で、総ての処方物の単量体の変動は０．１％以内であった。ピーク８７は０から３か月までは０．１％から０．２％までやや増加したが、３か月～６か月の間ではさらに増加することはなかった。バリエーションＧがＲＰ－ＨＰＬＣにより測定した場合に０時点データ（９７．０％）に比べてやや低い％メイン（６か月時点で９６．３％）を有していたことを除き、他のアッセイで測定した場合に、種々の処方物および容器間で、２～８℃でのアルビグルチドの安定に有意な差は無い。

【０２８９】

ＭＦＩデータは、ガラスバイアル中の粒子数がシリンジ中の粒子数よりも少ないことを示し、これはケイ素粒子の不在によるものであると考えられる。総粒子の大多数は１０μｍ未満の粒子で、約３０，０００である。存在する１０μｍより大きい粒子は約３００に

過ぎない。総粒子数は、２～８℃では保存時間とともに増加しない。バリエーションＧでは、総粒子数は保存時間とともにやや増加した。

【０２９０】

３０℃での安定性

安定性データは、ＧＡ、ｐＨ、濃度、還元型ＣＧＥ、およびモル浸透圧濃度により測定した場合、３０℃で最大３か月保存後のバリエーションＡ～Ｊで有意な変化は無いことを示す。

【０２９１】

総ての処方物でアルビグルチドの純度は時間とともに低下したが、これはＳＥＣ－ＨＰＬＣにより測定した場合の、３０℃で最大３か月保存後の二量体およびピーク８７の増加と一致する。３０℃で３か月保存後に、主要ピークは約９９．０％から約９７．０％に低下し、二量体ピークは約１．０％から２．４～２．６％に増加し、ピーク８７は０．１％から０．３～０．４％に増加した。バリエーションＨ（Ｍｅｔ）は、他のバリエーションよりも０．１～０．３％高い主要ピークを有していた。

【０２９２】

データは、総てのリエーションのＲＰ－ＨＰＬＣの主要ピークが３０℃で３か月保存後に約９７％から約９４％に低下したことを示す。６ＡＡ不純物および６ＡＡ不純物と共溶出されるタンパク質分解断片であるピーク９６は２．２～２．３％から３．１～３．６％に増加し、グリコシル化／糖化アルビグルチドであるピーク９３は０．６～０．７％から１．０～１．３％に増加した。これもまたグリコシル化／糖化アルビグルチドであるピーク９０は＜ＤＬから０．４～０．６％（＜ＱＬ）に増加した。種々のバリエーション間で有意な差は無い。

【０２９３】

ｃＩＥＦ結果は、バリエーションＡ～ＦおよびＨでは、３０℃で３か月保存後に、主要ピークのパーセンテージが約１０％低下し、酸性ピークは約２１％から約２７％に増加し、塩基性ピークは４．０～４．９％から５．７～６．４％に若干増加したことを示す。バリエーションＧ（オクタン酸塩）は、他のバリエーション（７４～７６％）に比べて有意に低い主要ピーク（６９．０％）を有しており、分析は打ち切った。バリエーションＪも、バリエーションＨに比べて利益が無く、トリプトファンの低い溶解度が製造を複雑にするために分析を打ち切った。

【０２９４】

非還元型ＣＧＥ結果は、アルビグルチドの主要ピークは、総ての処方物について３０℃で３か月保存後におよそ同量（約３％）低下したことを示す。バイオアッセイ結果は、３０℃で３か月保存後に、有効ペプチドの遊離のために約１００％から約１３０％へ増加した効力を示す。総てのバリエーション間で有意な差は無い。

【０２９５】

全体的に見れば、結果は、ＳＥＣ－ＨＰＬＣ、ＲＰ－ＨＰＬＣ、ｃＩＥＦ、非還元型ＣＧＥおよびＭＦＩにより測定した場合、３０℃で最大３か月保存後アルビグルチドの安定性は低下し、総粒子数が増加したことを示す。ｃＩＥＦにより測定した場合に安定性がより低かったオクタン酸ナトリウムを含有するバリエーションＧを除く総てのバリエーションが同等の安定性を示した。

【０２９６】

４０℃での安定性

バリエーションＡ～Ｊの安定性は、ＧＡ、ｐＨ、濃度、還元型ＣＧＥ、およびモル浸透圧濃度により測定した場合、４０℃で最大２か月保存後では有意に変化しない。

【０２９７】

ＳＥＣ－ＨＰＬＣ結果は、単量体ピークが約９９％から９４～９５％に低下したことを示し、これは１％から約３．５％への二量体の増加、０．１％から０．４～０．７％へのピーク８７の増加、および最大１．９％のピーク７９の増加と一致する。高次凝集物であるピーク７９は凍結処方物では観察されておらず、凍結薬品の仕様には無い。４０℃で２

か月の時点で、バリエーションＦ（ＮａＣｌ）およびＥ（１０ｍＭクエン酸塩）は、Ｆでは９５．１％およびＥでは９４．９％というより高い単量体パーセンテージを有し、バリエーションＦおよびＥが他のバリエーションよりも安定であることを示す。バリエーションＨ（Ｍｅｔ）は、バリエーションＡおよびＢよりもやや高い単量体ピークパーセンテージを有し（９４．５％）、バリエーションＨはバリエーションＡおよびＢよりも安定であるが、バリエーションＥおよびＦほど安定でないことを示す。

【０２９８】

ＲＰ－ＨＰＬＣ結果は、主要ピークは、より高い主要ピーク（８８．３％）を有したバリエーションＨを除く総てのバリエーションで、約９７％から約８６％に低下したことを示す。バリエーションＨを除く総ての小ピークが同程度で増加し、６ＡＡ不純物および６ＡＡ不純物と共溶出されるタンパク質分解断片であるピーク９６は約２．２％から５．８％に増加した。グリコシル化／糖化アルビグルチドであるピーク９３は、０．６％から約１．４％に増加した。これもグリコシル化／糖化アルビグルチドであるピーク９０およびＮ末端切断アルビグルチドタンパク質分解断片であるピーク８７はそれぞれ＜ＤＬから約１．４％および０．４％（＜ＱＬ）に増加し、バリエーションＨ（Ｍｅｔ）は、総ての小ピークに関してより低いレベルの増加を示す。ＲＰ－ＨＰＬＣ結果は、バリエーションＨがより安定であることを示す。バリエーションＧは、他のバリエーションに比べて０．５か月（９４．０％）および１．０か月（９０．４％）の時点で有意に低い主要ピークを有し、１か月後に分析を打ち切った。バリエーションＪもまた、バリエーションＨに比べて利益が無いために分析を打ち切った。

【０２９９】

ｃＩＥＦ結果は、主要ピークが７４～７６％から５７～５８％に低下し、酸性ピークが約２０％から３３～３４％に増加し、塩基性ピークが４～５％から７～９％に増加したことを示す。バリエーションＧはより低い安定性を有し、１か月後に分析を打ち切った。

【０３００】

結果は、非還元型ＣＧＥにより測定した場合、４０℃で最大２か月保存後の総ての処方物で主要ピークパーセンテージを約２～３％低下させたことを示す。バイオアッセイデータは、バリエーションＡおよびＢに関して４０℃で１か月保存後に、有効ペプチドの遊離のために約１００％から約１８０％へ低下した効力を示す。ＭＦＩデータは、４０℃で２か月保存後に総粒子数が約１～２倍若干増加したことを示す。バリエーションＧでは、４０℃で１か月保存後に１０μｍより大きい粒子数が増加した。

【０３０１】

全体的に見れば、結果は、ＳＥＣ－ＨＰＬＣ、ＲＰ－ＨＰＬＣ、ｃＩＥＦ、非還元型ＣＧＥおよびＭＦＩにより測定した場合、４０℃で最大２か月保存後にアルビグルチドの安定性は低下し、総粒子数は増加したことを示す。ＳＥＣ－ＨＰＬＣにより測定した場合、バリエーションＥ（１０ｍＭクエン酸塩）およびＦ（ＮａＣｌ）がより安定である。安定ＲＰ－ＨＰＬＣにより測定した場合にはバリエーションＨ（Ｍｅｔ）がより安定であるが、ＳＥＣ－ＨＰＬＣにより測定した場合にはＥおよびＦよりも安定性が低い。バリエーションＧ（オクタン酸塩）は、ＲＰ－ＨＰＬＣおよびｃＩＥＦにより測定した場合には、より低い安定性を有する。

【０３０２】

光の影響

バリエーションＡ～Ｋの外観、ｐＨおよびバイオアッセイは、１０００ルクス光、２５℃／６５％ＲＨに７日間曝した後に有意に変化しない。バリエーションＡ～Ｋの安定性は、ＳＥＣ－ＨＰＬＣ、ＲＰ－ＨＰＬＣ、ｃＩＥＦ、ＣＧＥ（ＮＲおよびＲ）により測定した場合、露光後に低下した。ＲＰ－ＨＰＬＣでは、露光サンプルに新たなピーク１０８およびピーク１１２が示された。

【０３０３】

システインを含有するバリエーションＫは、ＳＥＣ－ＨＰＬＣ、ＲＰ－ＨＰＬＣ、ｃＩＥＦおよびＣＧＥ（ＮＲおよびＲ）により測定した場合、露光後に最高の安定性を有して

いた。それぞれＭｅｔおよびＭｅｔ／Ｔｒｙを含有するバリエーションＨおよびＪは、ＳＥＣ－ＨＰＬＣおよび非還元型ＣＧＥにより測定した場合、バリエーションＢ（５ｍＭクエン酸塩）よりもやや安定であり、ＳＥＣ－ＨＰＬＣ、ｃＩＥＦおよびＣＧＥ（ＮＲおよびＲ）により測定した場合、バリエーションＥ（１０ｍＭクエン酸塩）およびＦ（５０ｍＭＮａＣｌ）よりも安定であった。バリエーションＢは、バリエーションＥおよびＦよりもやや安定である。オクタン酸塩を含有する処方物であるバリエーションＧは、ＳＥＣ－ＨＰＬＣおよびＲＰ－ＨＰＬＣにより測定した場合、光ストレス下で最も安定性が低い。

【０３０４】

ＳＥＣ－ＨＰＬＣデータは、単量体ピークがバリエーションＫでは４．５％低下し、バリエーションＨおよびＪでは約６％低下し、バリエーションＢでは７．４％低下し、バリエーションＥおよびＦでは８．５％低下し、バリエーションＧでは８．９％低下したことを示す。ＲＰ－ＨＰＬＣ結果は、主要ピークがバリエーションＫでは約０．６％低下し、バリエーションＨおよびＪでは約６％低下し、バリエーションＢでは４．９％低下し、バリエーションＥおよびＦでは５．７％低下し、バリエーションＧでは１１．４％低下したことを示す。ｃＩＥＦデータは、主要ピークがバリエーションＫでは１７．３％低下し、約バリエーションＢ、ＨおよびＪでは３０％低下し、バリエーションＥおよびＦ、およびＧでは３６～３８％低下したことを示す。非還元型ＣＧＥデータは、主要ピークがバリエーションＫでは１．０％低下し、バリエーションＨおよびＪでは約７％低下し、バリエーションＢでは８．４％低下し、バリエーションＥ、ＦおよびＧでは９．３～９．９％低下したことを示す。還元型ＣＧＥデータは、主要ピークがバリエーションＫでは０．２％低下し、バリエーションＨおよびＪでは約２．３％低下し、バリエーションＢでは２．８％低下し、バリエーションＥ、ＦおよびＧでは３．２～３．４％低下したことを示す。

【０３０５】

振盪ストレス下の影響

バリエーションＢおよびＧの安定性は、ＧＡ、ｐＨ、ＳＥＣ－ＨＰＬＣ、ＲＰ－ＨＰＬＣ、ｃＩＥＦ、ＣＧＥ（ＮＲおよびＲ）およびバイオアッセイにより測定した場合、光から保護して室温にて４８時間、３００ｒｐｍで振盪した後に有意に変化しない。ガラスバイアル中のリード処方物であるバリエーションＡは、ＳＥＣ－ＨＰＬＣにより測定した場合、振盪後にやや低いメインパーセンテージと高い二量体ピークパーセンテージを有し、ＣＧＥ　ＮＲにより測定した場合、より低い主要ピークを有していた。これはおそらくはガラスバイアルの頭隙（約２ｃｍ）がシリンジ（約２～３ｍｍ）よりも大きいことによる。粒子数は、総てのバリエーションで振盪後に粒子数が有意に変化しなかったことを示す。

【０３０６】

凝集試験

この試験は、２～８℃で最大２か月の時点のサンプルおよび３０℃で最大３か月の時点での処方物１～６について行った。リード処方物（対照）よりも安定性の増大を示す処方物が無かったため、３か月後に試験を打ち切った。

【０３０７】

２～８℃での安定性

データは、ＧＡ（一般外観）、ｐＨ、濃度、非還元型および還元型ＣＧＥ、モル浸透圧濃度およびバイオアッセイにより測定した場合、２～８℃にて最大２か月時点で、総ての処方物について安定性の有意な変化は無く、総ての処方物間で有意な差は無いことを示す。

【０３０８】

ＳＥＣ－ＨＰＬＣにより測定された結果は、アルビグルチドの安定性が総ての処方物で２～８℃で２か月保存後にやや低下したことを示す。処方物１およびリード処方物（対照）が最も安定な処方物であり、処方物２（高ＮａＣｌ）、６（ＮａＣｌおよびオクタン酸塩ｐＨ６．０）、および７（ＮａＣｌおよびオクタン酸塩ｐＨ７．０）は他の処方物よりも安定性が低い。ＳＥＣ－ＨＰＬＣ単量体ピークは、処方物１およびリード処方物では０

．２％低下し、処方物２、６および７では０．４～０．５％低下し、他の処方物では約０．３～０．４％低下した。

【０３０９】

ＲＰ－ＨＰＬＣにより測定された結果は、リード処方物が他総ての処方物より安定であり、主要ピークの低下もなく小ピークの増加もないことを示す。システインを含有する処方物８および９は２～８℃で安定でない。主要ピークは０時点および２～８℃で１か月の時点で有意に低下し（処方物９では０時点で３５％低下、処方物８では１か月で１４％低下）、これはピーク９６の有意な増加（処方物９では０時点で３５％増加、処方物８では１か月で１４％増加）と一致する。ピーク９６は、特性評価レポート[7]によれば、６ＡＡ不純物および６ＡＡ不純物と共溶出されるタンパク質分解断片である。処方物１～７では、主要ピークは約９７．２％から約９６．７％に低下した。

【０３１０】

ｃＩＥＦの結果は、リード処方物および処方物４は他の総ての処方物よりもやや安定であり、主要ピークの低下はないことを示す。ｐＨ６．０でオクタン酸ナトリウムを含有する処方物７および９、ならびに処方物８（Ｃｙｓ）は、他の処方物よりも安定性が低い。主要ピークは、処方物７では３．０％低下し、処方物９では１．９％低下し、処方物８では１．１％低下し、他の処方物では０．１～０．８％低下した。ピーク１０２の分割は総てのサンプルで見られなかった。

【０３１１】

ＦｃＲｎ結合の結果は、システインを含有する処方物はアルビグルチドのＦｃ受容体への結合に影響を及ぼし、アルビグルチドの半減期に影響を及ぼすであろうことを示す。ＦｃＲｎ結合は、処方物８では６％低下し、処方物９では１６％低下し、リード処方物では変化がないことを示す。蛍光データは、サンプルを２～８℃で２か月保存した後にリード処方物に比べて、処方物８（Ｃｙｓ）では蛍光強度が低下し、処方物９（Ｃｙｓおよびオクタン酸塩）では蛍光強度が低下し、かつ、青色へシフトしたことを示す。処方物６（オクタン酸塩）もまた、リード処方物に比べて低い蛍光強度を有し、青色へシフトし、他の総ての処方物は、サンプルを２～８℃で２か月保存した後に変化しなかった。ＭＦＩデータは、処方物７および９の総粒子数は２～８℃で２か月保存後に２倍になっていたことを示す。他の総ての処方物は変化していない。

【０３１２】

全体的に見れば、２～８℃でのデータの結果は、ＲＰ－ＨＰＬＣおよびｃＩＥＦにより測定した場合、リード処方物は他の処方物より安定であることを示す。リード処方物および処方物１（高トレハロース）は、ＳＥＣ－ＨＰＬＣにより測定した場合、より安定である。

【０３１３】

３０℃での安定性

ＧＡ（一般外観）、ｐＨ、濃度、還元型ＣＧＥ、およびモル浸透圧濃度により測定した場合、３０℃で３か月の時点で、総ての処方物に有意な安定性の変化は無く、総ての処方物で有意な差は無い。

【０３１４】

ＳＥＣ－ＨＰＬＣ結果は、主要ピークは、総ての処方物で３０℃にて保存した後、経時的に低下したことを示す。オクタン酸塩を含有する処方物６、７および９は安定の最も低い処方物であり、単量体ピークは９９％から９６．２～９６．７％に低下し、二量体ピークは１．０％から３．０～３．５％に低下している。他の処方物では、３０℃で２か月保存後に、単量体ピークは９９％から９７．０～９７．６％に低下し、二量体ピークは１．０％から２．１～２．７％に増加した。処方物７、８および９は、ＲＰ－ＨＰＬＣおよびｃＩＥＦのより測定した場合、Ｃｙｓおよびオクタン酸塩により引き起こされる化学変性のために２か月後に分析を打ち切った。３０℃で３か月のデータは、処方物３（ＮａＣｌ＋Ａｒｇ）およびリード処方物が処方物１、２、４および５より安定であることを示す。処方物３およびリード処方物では、単量体ピークは９８．９％から９７．３％に低下し、

二量体ピークは１．０％から２．２％に増加し、処方物１、２、４および５では、単量体ピークは９８．９％から９６．５～９６．９％に低下し、二量体ピークは１．０％から２．４～２．７％に増加していた。

【０３１５】

ＲＰ－ＨＰＬＣは、主要ピークは、３０℃で経時的に低下し、総ての小ピークは増加していたことを示す。ＲＰ－ＨＰＬＣ主要ピークは、約９７％から８９．９～９４．０％に低下した。６ＡＡ不純物および６ＡＡ不純物と共溶出されるタンパク質分解断片であるピーク９６は、約２％から３．８～７．５％に増加した。グリコシル化／糖化アルビグルチドであるピーク９３は、０．６～０．８％から１．２～１．５％に増加した。これもグリコシル化／糖化アルビグルチドであるピーク９０は、＜ＤＬから０．６～０．９％に増加し、Ｎ末端切断アルビグルチドタンパク質分解断片であるピーク８７は、３０℃で３か月保存後に＜ＤＬから０．４～０．６％（＜ＱＬ）に増加した。システインを含有する処方物８および９は安定でない。３０℃で０．５か月保存後に、主要ピークはそれぞれ５９．７％および２０．３％に増加し、６ＡＡ不純物および６ＡＡ不純物と共溶出されるタンパク質分解断片であるピーク９６はそれぞれ３９．０％および７７．４％に増加した。処方物７、８および９は、２か月後に分析を打ち切った。３０℃で３か月のデータは、リード処方物、処方物２（高ＮａＣｌ）および４（ＮａＣｌ＋トレハロース）は処方物１、３、５および６より安定であることを示す。リード処方物、処方物２および４では、主要ピークは２．９～３．１％低下し、ピーク９６は１．１～１．６％増加し、一方、処方物１、３、５および６では、主要ピークは３．５～７．５％低下し、ピーク９６は１．９～５．５％増加した。他の小ピークは有意な差を示さなかった。

【０３１６】

ｃＩＥＦにより測定された変性は、評価した処方物についてはＲＰ－ＨＰＬＣの結果と同等であった。総ての処方物について主要ピークは低下した。ｃＩＥＦ主要ピークは７５．３～７８．９％から５９．４～６８．９％に低下し、総酸性ピークは１６．９～１９．９％から２５．５～３４．９％に増加し、総塩基性ピークは３．９～４．５％から４．８～６．５％に増加した。３０℃で２か月のデータは、オクタン酸塩を含む処方物５、６、および７、ならびにＣｙｓを含む処方物８および９は他の処方物より安定性が低いことを示す。ｃＩＥＦ主要ピークは、処方物７では約２１％低下し、処方物５、６および９では約１２％から約１４％に低下し、処方物８では９．３％低下し、処方物１～４では約８．５％低下した。処方物７、８および９は、２か月後に分析を打ち切った。３０℃で３か月のデータは、リード処方物が最も安定であり、処方物１～４は処方物５（オクタン酸塩＋Ｍｅｔ）および６（オクタン酸塩）より安定であることを示す。ｃＩＥＦ主要ピークは、リード処方物では３．４％低下し、処方物１～４では７．０～８．０％低下し、処方物５および６では１２．５％および１３．６％低下した。

【０３１７】

ＣＧＥ　ＮＲデータは、アルビグルチドの安定性は経時的に低下したが、主要ピークは３か月の時点で増加していたことを示す。これはおそらくはチップおよび試薬のバッチが異なることによる（異なる時点では異なるバッチのチップが使用された）。この結果はこの場合にも、処方物５、６、７、８および９は処方物１～４およびリード処方物より安定性が低いことを示す。３０℃で２か月保存後では、リード処方物が最も安定である。３０℃で３か月の時点のリード処方物の主要ピークは低下し、他の総ての処方物では増加していた。リード処方物および他の総てのサンプルは異なる時点で、異なるＣＧＥチップで測定された。主要ピークのパーセンテージは、３０℃で３か月保存後に増加すべきではなく、従って、リード処方物の３０℃で３か月のデータを他の処方物と比較することはできない。

【０３１８】

バイオアッセイデータは、効力は、総ての処方物について３０℃で２か月保存後に約１００％から約１３０～１６０％に増加し、種々の処方物間で有意な差は無いことを示す。ＦｃＲｎ結合は、３０℃で２か月保存後に、処方物８および処方物９の両方では２３％低

下し、リード処方物では変化は無かった。ＭＦＩは、総粒子数は、３０℃で２か月保存後に、オクタン酸塩を含有する処方物６および７で増加したことを示す。他の総ての処方物は変化しなかった。

【０３１９】

全体的に見れば、結果は、Ｃｙｓを含有する処方物８および９は、ＲＰ－ＨＰＬＣにより測定した場合、いくつかの新たな種を含むことを示す。オクタン酸塩、Ｃｙｓまたはその両方を含有する処方物５～９は、ＲＰ－ＨＰＬＣ、ｃＩＥＦおよび非還元型ＣＧＥにより測定した場合、安定性は低い。リード処方物および処方物３は、ＳＥＣ－ＨＰＬＣにより測定した場合、他の処方物より安定である。リード処方物、処方物２および４は、ＲＰ－ＨＰＬＣにより測定した場合、他の処方物より安定である。リード処方物は、ｃＩＥＦにより測定した場合、最も安定な処方物である。

【０３２０】

結論

全体的に見れば、結果は、ＰＦＳ試験および凝集試験の両方において示されるように、ＰＦＳ試験においてオクタン酸塩を含有する処方物（バリエーションＧ）は凝集率を低減するが、化学変性に関して他の処方物よりも安定性が低いことを示す。

【０３２１】

システインを含有する処方物（ＰＦＳ試験のけるバリエーションＫ、凝集試験における処方物８および９）は、システインが光誘導変性からアルビグルチドを有意に保護するとしても、ＲＰ－ＨＰＬＣにより測定した場合、新たな種を含む可能性が極めて高い。処方物８（Ｃｙｓ）および処方物９（Ｃｙｓおよびオクタン酸塩）は２～８℃および３０℃で２か月保存後により低いＦｃＲｎ結合を示す。ＨＳＡとＦｃＲｎの結合はｐＨ依存性である。３つの保存されたヒスチジン残基、すなわち、ＨＳＡサブドメインＤＩＩＩａ内のＨｉｓ－４６４、ＤＩＩＩｂ内のＨｉｓ－５３５、およびその２つを接続するループ内のＨｉｓ－５１０は、ＨＳＡとＦｃＲｎのｐＨ依存的結合に重要である。遊離Ｃｙｓ９４の酸化は、アルビグルチドにより課せられるＦｃＲｎ結合の崩壊の評価に関する報告でＦｃＲｎ結合に影響を及ぼさないことが判明した。本試験では、蛍光により測定した場合、処方物８（Ｃｙｓ）および処方物９（Ｃｙｓおよびオクタン酸塩）に三次構造の変化が見出された。Ｃｙｓおよびオクタン酸塩とＨＳＡの結合がおそらく三次構造の変化を生じ、アルビグルチドとＦｃＲｎの結合を低下させる。

【０３２２】

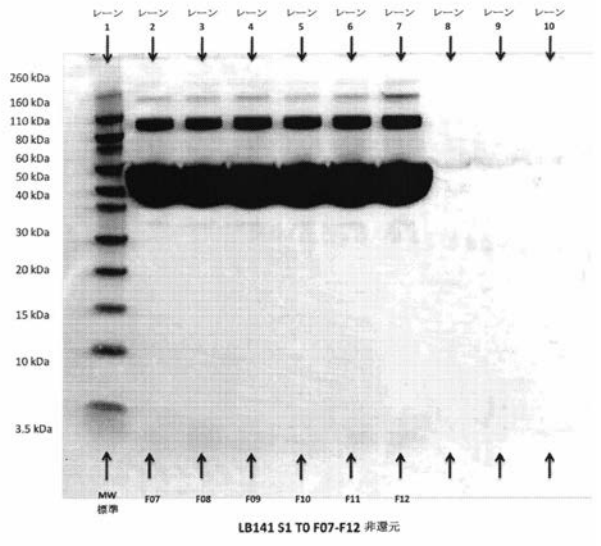
ＭｅｔおよびＴｒｐは、１０ｍＭクエン酸塩処方物に比べて、光誘導変性の部分的低下および４０℃でのＲＰ－ＨＰＬＣにより若干の利益を示すが、両試験において２～８℃という推奨される保存条件で安定性に影響はない。

【０３２３】

５ｍＭクエン酸塩、１１７ｍＭトレハロース、１００ｍＭアルギニンおよび０．０１％ＰＳ８０、ｐＨ６．０であるリード処方物は、ＮａＣｌ、またはＮａＣｌとトレハロースとアルギニンの組合せを含有する他の処方物より良好な安定性を示す。５～１０ｍＭクエン酸塩、１１７ｍＭトレハロース、１００ｍＭアルギニン、約０．０１％ＰＳ８０、ｐＨ５．９～６．０を含有する処方物が推奨される。

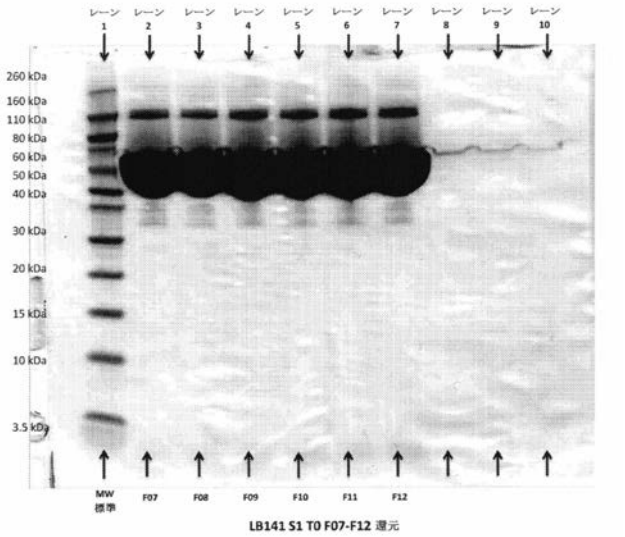
【図１】

図１：t0 における試験 1.0 処方物 F07～F12 の非還元 SDS-PAGE ゲル



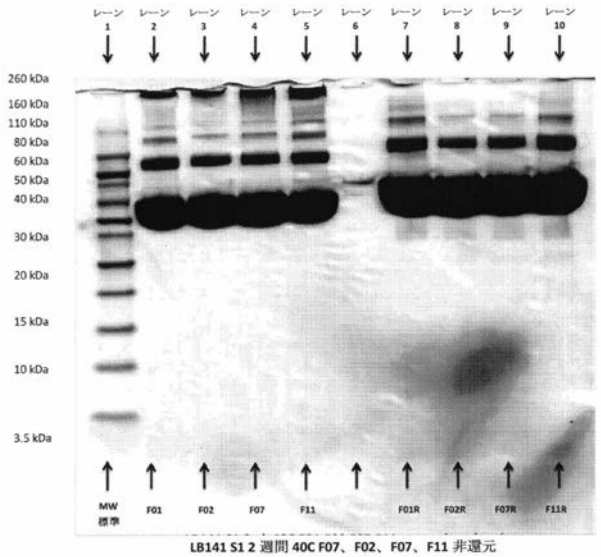
【図２】

図２：t0 における試験 1.0 処方物 F07～F12 の還元 SDS-PAGE ゲル



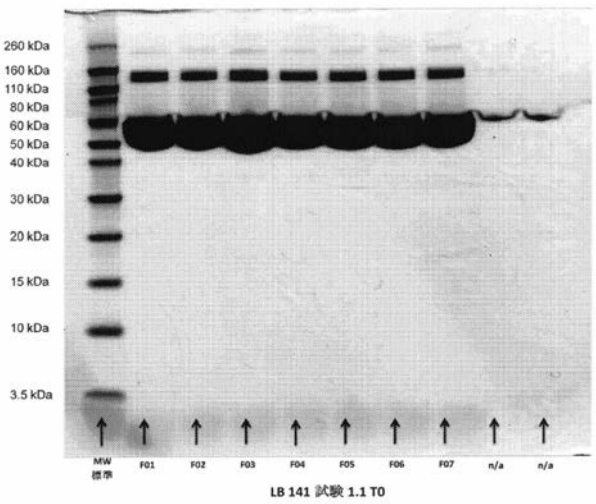
【図３】

図３：試験 1.0 からの t2 サンプルの非還元および還元 SDS-PAGE ゲル



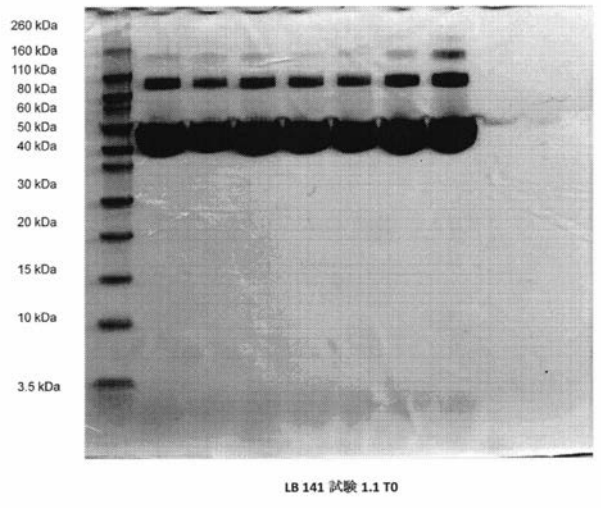
【図４】

図４：t0 における試験 1.1 からの処方物 F01-F07 の非還元 SDS-PAGE ゲル



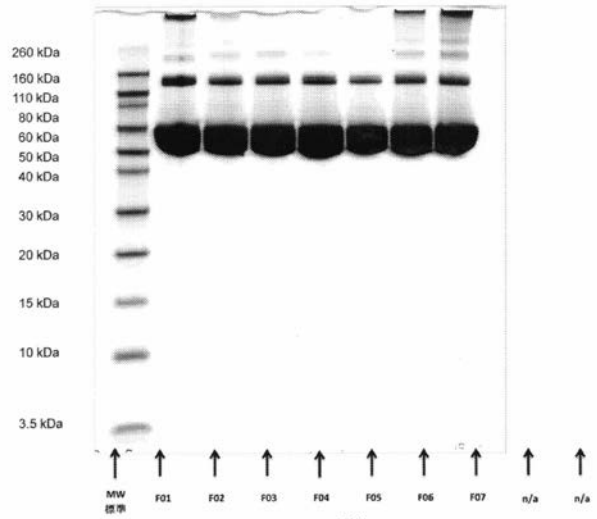
【図５】

図５：t0における試験1.1からの処方物F08-F14の非還元SDS-PAGEゲル



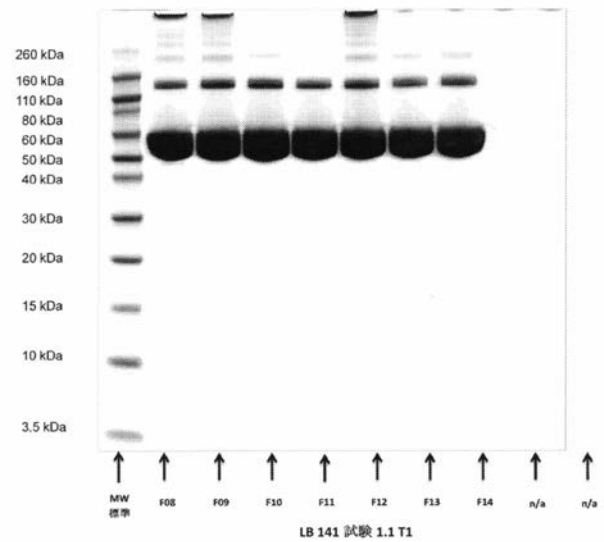
【図６】

図６：t1における試験1.1からの処方物F01-F07の非還元SDS-PAGEゲル



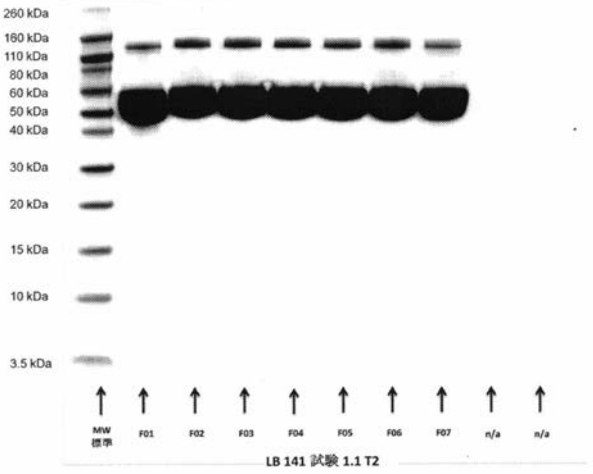
【図７】

図７：t1における試験1.1からの処方物F08-F14の非還元SDS-PAGEゲル



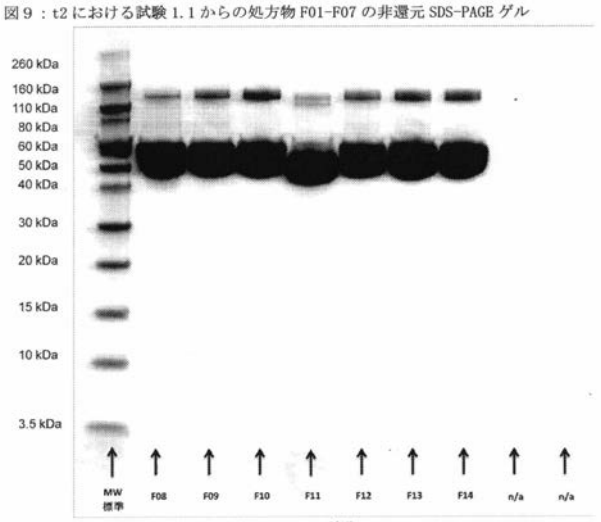
【図８】

図８：t2における試験1.1からの処方物F01-F07の非還元SDS-PAGEゲル



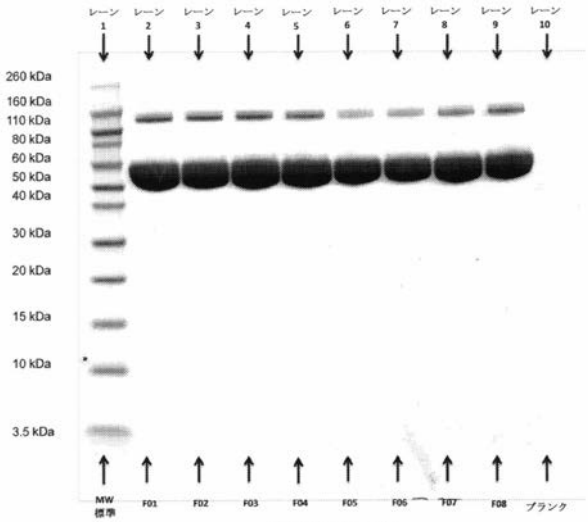
【図９】

図９：t2における試験1.1からの処方物F01-F07の非還元SDS-PAGEゲル



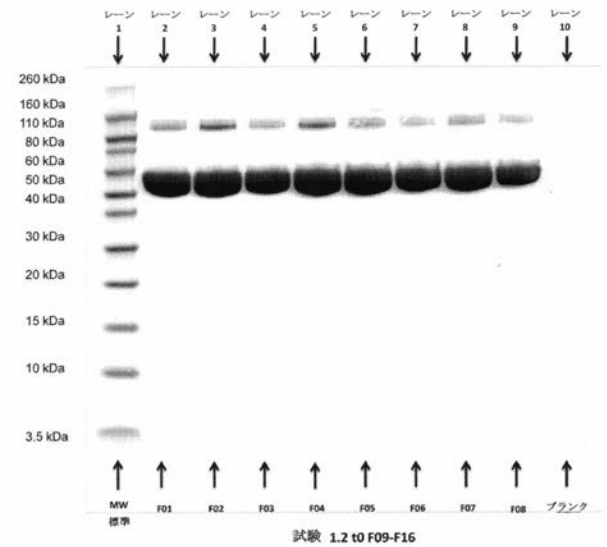
【図１０】

図１０：t0における試験1.2からの処方物F01～F08の非還元SDS-PAGEゲル



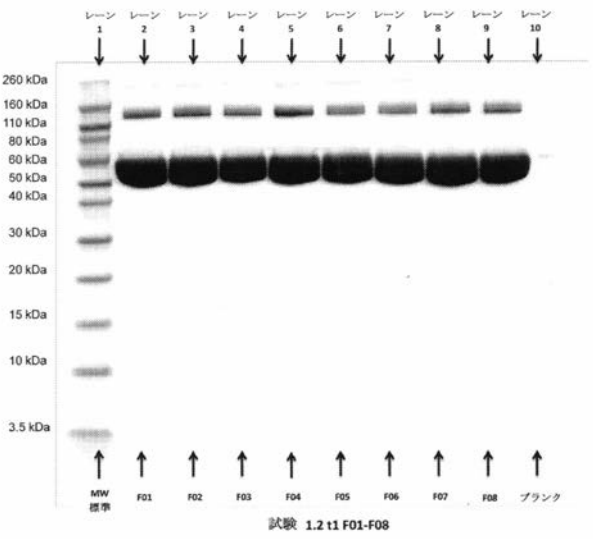
【図１１】

図１１：t0における試験1.2からの処方物F09～F16の非還元SDS-PAGEゲル



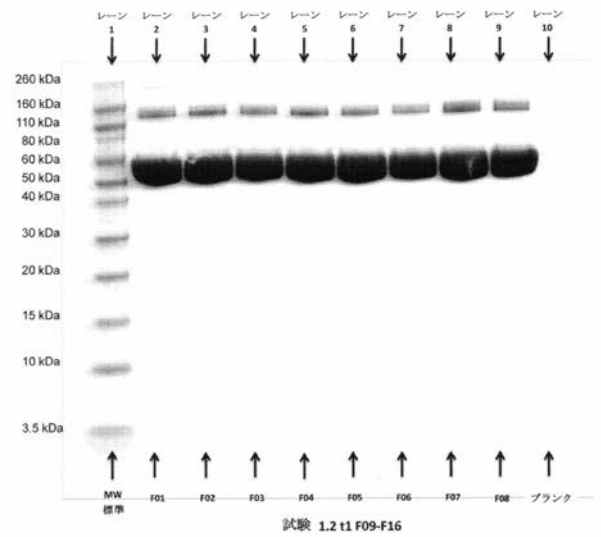
【図１２】

図１２：t1における試験1.2からの処方物F01～F18の非還元SDS-PAGEゲル



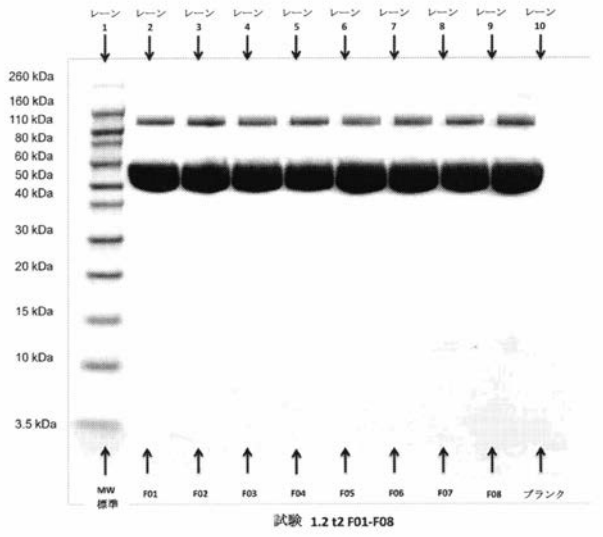
【図１３】

図１３：t1における試験1.2からの処方物F09～F16の非還元SDS-PAGEゲル



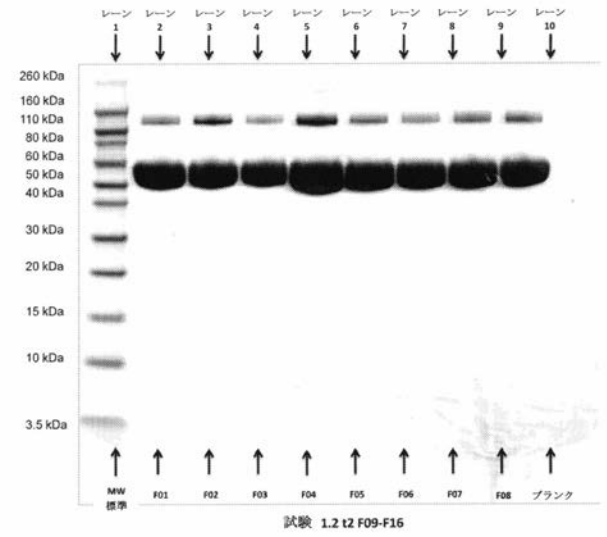
【図１４】

図１４：t2における試験1.2からの処方物F09～F16の非還元SDS-PAGEゲル



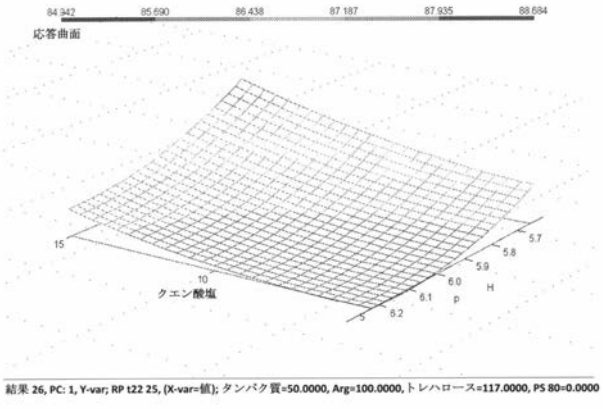
【図１５】

図１５：t2における試験1.2からの処方物F09～F16の非還元SDS-PAGEゲル



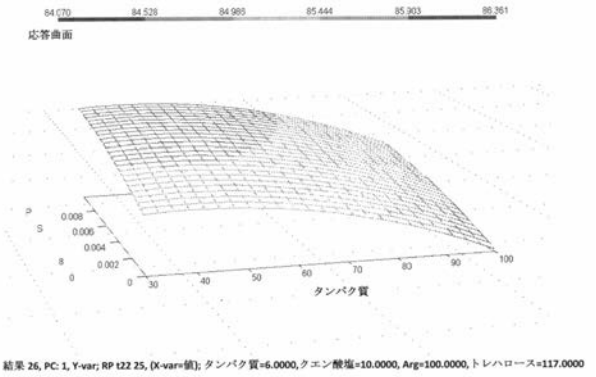
【図１６】

図１６：25℃でt22におけるRP HPLCによる純度をエンドポイントとして用いた場合のPLS1モデルに従うpHおよびクエン酸塩の効果。タンパク質濃度は50mg/mLに、アルギニンは100mMに、およびトレハロースは117mMに固定した。



【図１７】

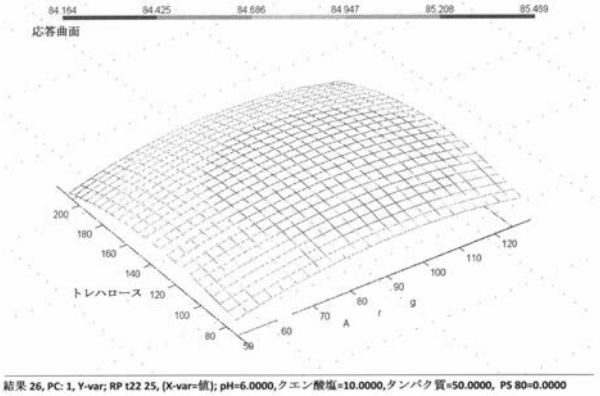
図１７：25℃でt22におけるRP HPLCによる純度をエンドポイントとして用いた場合のPLS1モデルに従うPS 80およびタンパク質濃度の効果。クエン酸塩は10mM、pHは6.0に、アルギニンは100mMに、およびトレハロースは117mMに固定した。



結果 26, PC: 1, Y-var; RP t22 25, (X-var=値); タンパク質=6.0000,クエン酸塩=10.0000, Arg=100.0000,トレハロース=117.0000

【図１８】

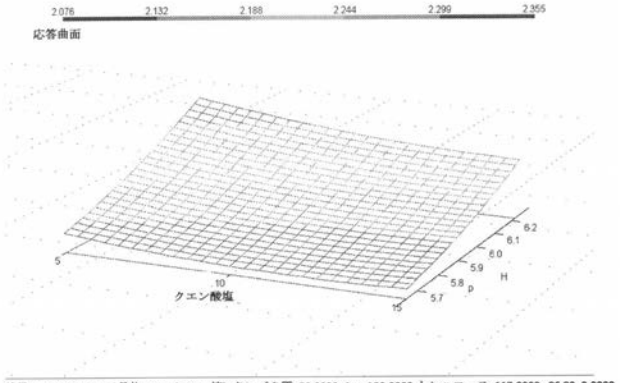
図１８：25℃でt22におけるRP HPLCによる純度をエンドポイントとして用いた場合のPLS1モデルに従うアルギニンおよびトレハロースの効果。クエン酸塩は10mMに、pHは6.0に、およびタンパク質濃度は50mg/mLに固定した。



結果 26, PC: 1, Y-var; RP t22 25, (X-var=値); pH=6.0000,クエン酸塩=10.0000,タンパク質=50.0000, PS 80=0.0000

【図１９】

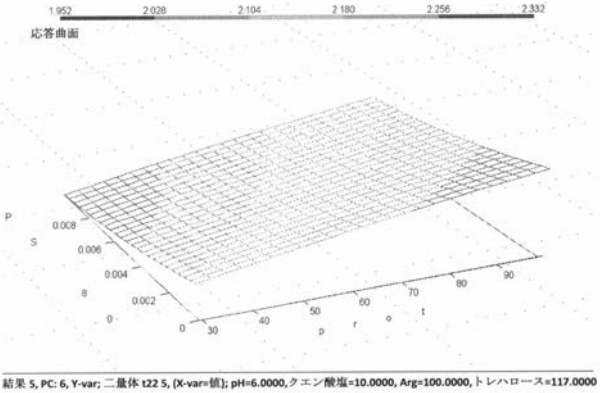
図１９：5℃および25℃でt22における二量体含量をエンドポイントとして用いた場合のPLS2モデルに従うpHおよびクエン酸塩の効果。タンパク質濃度は50mg/mLに、Argは100mMに、およびトレハロースは117mMに固定した。



結果 5, PC: 6, Y-var; 二量体 t22 5, (X-var=値); タンパク質=50.0000, Arg=100.0000,トレハロース=117.0000, PS 80=0.0000

【図２０】

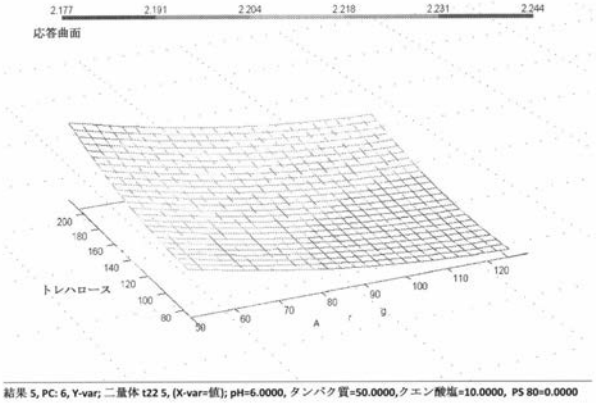
図２０：5℃および25℃でt22における二量体含量をエンドポイントとして用いた場合のPLS2モデルに従うPS 80およびタンパク質濃度の効果。クエン酸塩は10mMに、pHは6.0に、Argは100mMに、およびトレハロースは117mMに固定した。



結果 5, PC: 6, Y-var; 二量体 t22 5, (X-var=値); pH=6.0000,クエン酸塩=10.0000, Arg=100.0000,トレハロース=117.0000

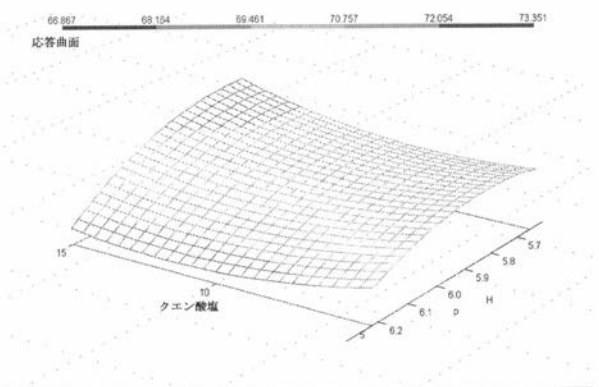
【図２１】

図２１：5℃および25℃でt22における二量体含量をエンドポイントとして用いた場合のPLS2モデルに従うアルギニンおよびトレハロースの効果。クエン酸塩は10mMに、pHは6.0に、タンパク質濃度は50mg/mLに固定した。



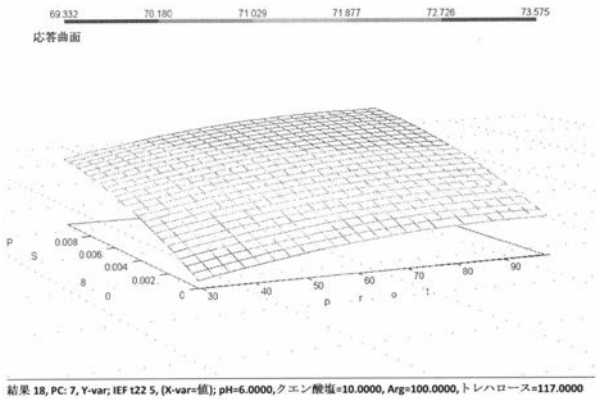
【図２２】

図２２：5℃でt22におけるcIEFによる主要ピーク純度をエンドポイントとして用いた場合のPLS1モデルに従うpHおよびクエン酸塩の効果。タンパク質濃度は50mg/mLに、Argは100mMに、およびトレハロースは117mMに固定した。



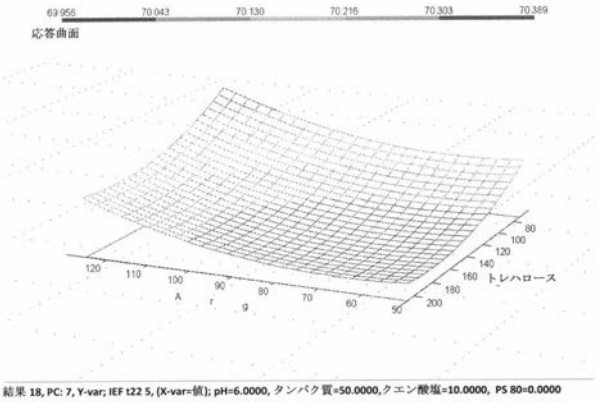
【図２３】

図２３：5℃でt22におけるcIEFによる主要ピーク純度をエンドポイントとして用いた場合のPLS1モデルに従うPS 80およびタンパク質濃度の効果。クエン酸塩を10mMに、pHを6.0に、Argを100mMに、およびトレハロースを117mMに固定した。



【図２４】

図２４：5℃でt22におけるcIEFによる主要ピーク純度をエンドポイントとして用いた場合のPLS1モデルに従うアルギニンおよびトレハロースの効果。クエン酸塩を10mMに、pHを6.0に、およびタンパク質濃度を50mg/mLに固定した。



【配列表】
2017524680000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 15/37183

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 38/26; A61K 38/00; A61K 38/16; C07K 14/00 (2015.01)
CPC - A61K 38/26; A 61K 38/00; C07K 14/47
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 38/26; A61K 38/00; A61K 38/16; C07K 14/00 (2015.01)
CPC - A61K 38/26; A 61K 38/00; C07K 14/47; USPC - 514/7.2; 514/6.7; 514/21.2; 530/350

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
IPC(8) - A61K 38/26; A61K 38/00; A61K 38/16; C07K 14/00 (2015.01) - see keyword below
CPC - A61K 38/26; A 61K 38/00; C07K 14/47; USPC - 514/7.2; 514/6.7; 514/21.2; 530/350 - 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); PatBase; Medline, Google: hypoglycemic, glucagon like peptide-1, GLP-1, albiglutide, pharmaceutical, composition, liquid or solution or buffer or polyol or surfactant or stabilizing, truncated, fragment, deletion, carboxyl, amino, N-terminal, C-terminal, terminus, mg/ml, phosphate, trehalose, mannitol, tween 80, glyce

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2011/0301080 A1 (BUSH et al.) 08 December 2011 (08.12.2011), para [0001], [0002], [0016], [0019], [0020], [0048], [0049], [0056], [0057], and SEQ ID NO: 1	1-3
A	US 2006/0205037 A1 (SADEGHI et al.) 14 September 2006 (14.09.2006), Abstract, para [0051], [0084], [0171], [0185]-[0187], [0276], [0291], and [0307]	1-3
A	SCHJOLDAGER et al., GLP-1 (glucagon-like peptide 1) and truncated GLP-1, fragments of human proglucagon, inhibit gastric acid secretion in humans. Dig Dis Sci. 1989, Vol. 34(5), p. 703-8. Entire documentation, especially Abstract	1-3

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* 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
20 August 2015 (20.08.2015)	30 SEP 2015
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. 571-273-8300	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 15/37183

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.: 4-20
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:

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.:

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.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*47/18*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/18	
Ａ６１Ｋ	*47/22*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/22	
Ａ６１Ｋ	*47/14*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/14	
Ａ６１Ｐ	*3/10*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/10	
Ｃ０７Ｋ	*14/605*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/605	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,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,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,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,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100105153
弁理士 朝倉 悟
(74)代理人 100143971
弁理士 藤井 宏行
(74)代理人 100172557
弁理士 鈴木 啓靖
(72)発明者 リウクアン、チャン
アメリカ合衆国ニュージャージー州、オールド、タッパン、エッカーソン、コート、５
(72)発明者 ダニー、ドゥーセ
アメリカ合衆国ペンシルベニア州、キング、オブ、プルシア、スウェドランド、ロード、７０９
(72)発明者 ダグラス、ピー．ネスタ
アメリカ合衆国ペンシルベニア州、キング、オブ、プルシア、スウェドランド、ロード、７０９

Ｆターム(参考) 4C076 AA11 CC21 DD37 DD42Z DD43Z DD51Q DD60Q DD60Z DD67 EE23F FF36
4C084 AA02 AA03 BA01 BA02 BA08 BA22 BA23 CA18 DB35 MA05 MA16 NA03 ZC351 ZC352
4H045 AA10 AA30 CA40 DA30 EA20