

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-6841

(P2010-6841A)

(43) 公開日 平成22年1月14日(2010.1.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/26 (2006.01)	A 6 1 K 37/28	4 C 0 7 6
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	4 C 0 8 4
A 6 1 K 47/34 (2006.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 47/36 (2006.01)	A 6 1 K 47/36	
A 6 1 K 47/44 (2006.01)	A 6 1 K 47/44	

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 59 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-236733 (P2009-236733)	(71) 出願人	593215117
(22) 出願日	平成21年10月13日 (2009.10.13)		サイオス インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2006-75734 (P2006-75734) の分割		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 43, マウンテン ビュー, チャール ストン ロード 1900, エム10ー 4014エー
原出願日	平成6年3月7日 (1994.3.7)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	044133		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成5年4月7日 (1993.4.7)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペプチドの持続放出

(57) 【要約】

【課題】持続的に血糖を制御するための組成物、および哺乳動物のインシュリン非依存性糖尿病の治療法を提供すること。

【解決手段】グルカゴン様ペプチド1 (GLP-1) およびその関連ペプチドを持続的に投与することよくなる、哺乳動物のインシュリン非依存性糖尿病 (NIDDM) の治療法、ならびにそれらのペプチドの投与を持続させるための組成物 (ここで、GLP-1 は、膵臓および腸管内で処理される間に、GLP-1 のアミノ酸 7-37 を含む 31 アミノ酸のペプチドに変換され、このペプチドは向インシュリン活性 (insulinotropic activity) をもち、すなわちホルモンであるインシュリンの合成または発現を刺激し、または刺激の原因となりうる)。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

明細書に記載の発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は糖尿病を治療するための組成物および方法に関するものである。より詳細には、本発明はグルカゴン様ペプチド 1 (GLP-1) およびその誘導体の投与を持続させる組成物に関するものである。これらの組成物はインシュリン非依存性糖尿病 (NIDDM) の治療に有用である。

10

【背景技術】

【0002】

GLP-1 のアミノ酸配列は下記のとおりであることが知られている：

【0003】

【化 2】

His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly
(配列番号：1)

20

【0004】

GLP-1 は、ロペツ (Lopez, L. C.) ら, P. N. A. S., U S A 8 0 : 5 4 8 5 - 5 4 8 9 (1 9 8 3) ; ベル (Bell, G. I.) ら, Nature 3 0 2 : 7 1 6 - 7 1 8 (1 9 8 3) ; ハインリッヒ (Heinrich, G.) ら, Endocrinol. 1 1 5 : 2 1 7 6 - 2 1 8 1 (1 9 8 4) およびギグリオン (Ghiglierone, M.) ら, Diabetologia 2 7 : 5 9 9 - 6 0 0 (1 9 8 4) に提示されている。

【0005】

GLP-1 は、膵臓および腸管内で処理される間に、GLP-1 のアミノ酸 7 - 3 7 を含む 3 1 アミノ酸のペプチドに変換される。以下、このペプチドを GLP-1 (7 - 3 7) と呼ぶ。

30

【0006】

このペプチドは向インシュリン活性 (insulintropic activity) をもち、すなわちホルモンであるインシュリンの合成または発現を刺激し、または刺激の原因となりうる。この向インシュリン活性のため、GLP-1 (7 - 3 7) はインシュリノトロピン (insulintropin) とも呼ばれる。

【0007】

GLP-1 (7 - 3 7) は下記のアミノ酸配列をもつ：

【0008】

【化 3】

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly; (配列番号：2)

40

【0009】

GLP-1 (7 - 3 7)、その特定の誘導体、およびそれらを哺乳動物において糖尿病の治療に用いることは、米国特許第 5, 1 1 8, 6 6 6 号 (' 6 6 6 特許) および第 5, 1 2 0, 7 1 2 号 (' 7 1 2 特許) 明細書に示されており、これらの明細書の記載を本明細書に参考として引用する。 ' 6 6 6 および ' 7 1 2 特許明細書に示される GLP-1 (

50

7 - 37) の誘導体には、天然の配列に存在しないアミノ酸を含むか、または 1 もしくは 2 以上のアミノ酸を欠如するポリペプチドが含まれる。' 666 および ' 712 特許明細書に示される他の GLP - 1 (7 - 37) 誘導体には、特定の C - 末端塩、エステルおよびアミドが含まれ、その場合塩類およびエステルは OM と定義され、そこで M は薬剤学的に許容しうるカチオンまたは低級 (C₁ - C₆) の分枝鎖もしくは非分枝鎖アルキル基であり、アミドは - NR²R³ と定義され、そこで R² および R³ は同一であるか、または異なり、水素および低級 (C₁ - C₆) の分枝鎖もしくは非分枝鎖アルキル基よりなる群から選ばれる。

【 0010 】

トランケートした GLP - 1 またはトランケートしたインシュリノトロピンとも呼ばれる、向インシュリン活性をもつ特定の他のポリペプチド、およびそれらの誘導体が、国際特許出願 US 89 / 01121 (WO 90 / 11296) 号明細書に示されている。そこで GLP - 1 (7 - 36) 、 GLP - 1 (7 - 35) および GLP - 1 (7 - 34) と呼ばれているポリペプチドは、それぞれ下記のアミノ酸配列をもつ：

【 0011 】

【 化 4 】

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly; (配列番号：3)

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly; (配列番号：4) および

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys; (配列番号：5)

【 0012 】

国際特許出願 US 89 / 01121 号明細書に示されているポリペプチドの誘導体には、キャリアー蛋白質への結合を高めるための、またはその向インシュリン効果を高めるための、本質的な効果に影響を及ぼさない (*inconsequential*) アミノ酸置換、または追加のアミノ酸を含むポリペプチドが含まれる。国際特許出願 US 89 / 01121 号明細書に示されている他のインシュリノトロピン誘導体には、特定の C - 末端塩、エステルおよびアミドが含まれ、その場合塩類およびエステルは OM と定義され、そこで M は薬剤学的に許容しうるカチオンまたは低級の分枝鎖もしくは非分枝鎖アルキル基であり、アミドは - NR²R³ と定義され、そこで R² および R³ は同一であるか、または異なり、水素および低級の分枝鎖もしくは非分枝鎖アルキル基よりなる群から選ばれる。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0013 】

本発明の目的は、持続的に血糖を制御するための組成物、および哺乳動物のインシュリン非依存性糖尿病の治療法を提供することである。

【 課題を解決するための手段 】

【 0014 】

1 形態においては本発明は、各投与後に持続性作用を伴う化合物を長期間にわたって反復投与することよりなる、インシュリン非依存性糖尿病の治療を必要とする哺乳動物におけるその治療方法において、持続性作用が哺乳動物における持続的な血糖制御を達成するために必要なものであり、化合物が下記よりなる群から選ばれる方法に関するものである：

(a) 下記のアミノ酸配列を有するペプチド：

【 0015 】

10

20

30

40

50

【化5】

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly; (配列番号：2)

【0016】

(b) 下記のアミノ酸配列を有するペプチド：

【0017】

【化6】

10

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-X (配列番号：7)

【0018】

式中のXは下記よりなる群から選ばれる：

(A) Lys、

(B) Lys - Gly、および

(C) Lys - Gly - Arg；

(c) 下記の一次構造よりなるポリペプチドの誘導体：

20

 $H_2N - W - COOH$

式中のWは下記よりなる群から選ばれるアミノ酸配列であり：

【0019】

【化7】

His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly
(配列番号：1) および

30

His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg
(配列番号：6)

【0020】

これらの誘導体は哺乳動物において処理された際に向インシュリン活性を有するポリペプチド誘導体を生じる；

(d) 下記の一次構造よりなるポリペプチドの誘導体：

 $H_2N - R - COOH$

式中のRは下記よりなる群から選ばれるアミノ酸配列である：

40

【0021】

【化 8】

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly; (配列番号：2)

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg; (配列番号：3)

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly; (配列番号：4) および

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys; (配列番号：5)

10

【0022】

ならびに

(e) ペプチド(a) - (d) の誘導体であって、下記よりなる群から選ばれる誘導体

- (1) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうる酸付加塩；
- (2) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるカルボキシレート塩；
- (3) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるアルカリ付加塩；
- (4) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうる低級アルキルエステル；

20

ならびに

- (5) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるアミドであって、アミド、低級アルキルアミドおよび低級ジアルキルアミドよりなる群から選ばれる薬剤学的に許容しうるアミド。

【0023】

投与が皮下になされる方法が好ましい。

【0024】

投与が筋肉内になされる方法も好ましい。

30

【0025】

投与が経皮的になされる方法も好ましい。

【0026】

投与が注入ポンプによりなされる方法も特に好ましい。

【0027】

投与が経口吸入によりなされる方法も好ましい。

【0028】

投与が鼻内吸入によりなされる方法も好ましい。

【0029】

投与が胃腸内になされる方法も好ましい。

40

【0030】

他の形態においては本発明は、下記よりなる組成物に関するものである：

(i) 下記よりなる群から選ばれる化合物：

(a) 下記のアミノ酸配列を有するペプチド：

【0031】

【化 9】

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly; (配列番号：2)

50

【 0 0 3 2 】

(b) 下記のアミノ酸配列を有するペプチド：

【 0 0 3 3 】

【 化 1 0 】

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-X (配列番号：7)

【 0 0 3 4 】

式中の X は下記よりなる群から選ばれる：

10

(A) L y s、

(B) L y s - G l y、および

(C) L y s - G l y - A r g；

(c) 下記の一次構造よりなるポリペプチドの誘導体：

 $H_2N - W - COOH$

式中の W は下記よりなる群から選ばれるアミノ酸配列であり：

【 0 0 3 5 】

【 化 1 1 】

His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly
(配列番号：1) および

20

His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg
(配列番号：6)

【 0 0 3 6 】

これらの誘導体は哺乳動物において処理された際に向インシュリン活性を有するポリペプチド誘導体を生じる；

30

(d) 下記の一次構造よりなるポリペプチドの誘導体：

 $H_2N - R - COOH$

式中の R は下記よりなる群から選ばれるアミノ酸配列である：

【 0 0 3 7 】

【 化 1 2 】

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly; (配列番号：2)

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg; (配列番号：3)

40

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly; (配列番号：4) および

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys; (配列番号：5)

【 0 0 3 8 】

ならびに

50

(e) ペプチド(a) - (d) の誘導体であって、下記よりなる群から選ばれる誘導体

:

- (1) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうる酸付加塩;
- (2) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるカルボキシレート塩;
- (3) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるアルカリ付加塩;
- (4) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうる低級アルキルエステル;
- ならびに
- (5) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるアミドであって、アミド、低級アルキルアミドおよび低級ジアルキルアミドよりなる群から選ばれる薬剤学的に許容しうるアミド;

10

ならびに

(ii) 持続的な血糖制御を達成するために上記化合物の作用を持続させうるポリマー。

【0039】

ポリマーが低分子量ポリマーである組成物が特に好ましい。

【0040】

さらにポリマーが下記よりなる群から選ばれる組成物が特に好ましい: ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリオキシエチレン - ポリオキシプロピレンコポリマー、下記よりなる群から選ばれる多糖類: セルロース、セルロース誘導体、キトサン、アラビアゴム、カラヤゴム、グアーゴム、キサンタンゴム、トラガカント、アルギン酸、カラジナン、アガロースおよびフルセララン (f u r c e l l a r r a n s)、デキストラン、デンプン、デンプン誘導体、ヒアルロン酸、ポリエステル、ポリアミド、ポリアンヒドリドならびにポリオルトエステル。ポリエチレングリコールおよびポリビニルピロリドンよりなる群から選ばれるポリマーが特に好ましい。

20

【0041】

他の形態においては本発明は、下記よりなる組成物に関するものである:

(i) 下記よりなる群から選ばれる化合物:

(a) 下記のアミノ酸配列を有するペプチド:

【0042】

【化13】

30

Hls-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly; (配列番号: 2)

【0043】

(b) 下記のアミノ酸配列を有するペプチド:

【0044】

【化14】

Hls-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-X (配列番号: 7)

40

【0045】

式中のXは下記よりなる群から選ばれる:

- (A) L y s、
 - (B) L y s - G l y、および
 - (C) L y s - G l y - A r g;
 - (c) 下記の一次構造よりなるポリペプチドの誘導体:
- $H_2N - W - COOH$

式中のWは下記よりなる群から選ばれるアミノ酸配列であり:

【0046】

50

【化 1 5】

His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
 Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly
 (配列番号：1) および

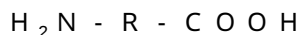
His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
 Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg
 (配列番号：6)

10

【0047】

これらの誘導体は哺乳動物において処理された際に向インシュリン活性を有するポリペプチド誘導体を生じる；

(d) 下記の一次構造よりなるポリペプチドの誘導体：



式中の R は下記よりなる群から選ばれるアミノ酸配列である：

【0048】

【化 1 6】

20

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
 Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly; (配列番号：2)

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
 Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg; (配列番号：3)

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
 Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly; (配列番号：4) および

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
 Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys; (配列番号：5)

30

【0049】

ならびに

(e) ペプチド(a) — (d) の誘導体であって、下記よりなる群から選ばれる誘導体

：

- (1) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうる酸付加塩；
- (2) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるカルボキシレート塩；
- (3) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるアルカリ付加塩；
- (4) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうる低級アルキルエステル；

40

ならびに

- (5) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるアミドであって、アミド、低級アルキルアミドおよび低級ジアルキルアミドよりなる群から選ばれる薬剤学的に許容しうるアミド；

ならびに

(ii) 上記化合物の作用を持続させうる薬剤学的に許容しうる水 - 非混和性の油懸濁液。

【0050】

持続的な血糖制御を達成することができる組成物が好ましい。

50

【 0 0 5 1 】

油がラッカセイ油、ゴマ油、アーモンド油、ヒマシ油、ツバキ油、綿実油、オリーブ油、トウモロコシ油、大豆油、ペニバナ油、ヤシ油、脂肪酸エステルおよび脂肪アルコールエステルよりなる群から選ばれる組成物が特に好ましい。

【 0 0 5 2 】

さらに、湿潤剤、特に非イオン界面活性剤をさらに含む組成物が特に好ましい。

【 0 0 5 3 】

さらにまた、懸濁化剤をさらに含む組成物が特に好ましい。

【 0 0 5 4 】

他の形態においては本発明は、下記よりなる組成物に関するものである：

10

(i) 下記よりなる群から選ばれる化合物：

(a) 下記のアミノ酸配列を有するペプチド：

【 0 0 5 5 】

【 化 1 7 】

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly; (配列番号：2)

【 0 0 5 6 】

20

(b) 下記のアミノ酸配列を有するペプチド：

【 0 0 5 7 】

【 化 1 8 】

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-X (配列番号：7)

【 0 0 5 8 】

式中の X は下記よりなる群から選ばれる：

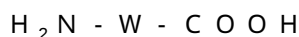
30

(A) L y s、

(B) L y s - G l y、および

(C) L y s - G l y - A r g；

(c) 下記の一次構造よりなるポリペプチドの誘導体：



式中の W は下記よりなる群から選ばれるアミノ酸配列であり：

【 0 0 5 9 】

【 化 1 9 】

His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly (配列番号：1) および

40

His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg (配列番号：6)

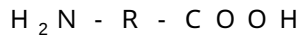
【 0 0 6 0 】

これらの誘導体は哺乳動物において処理された際に向インシュリン活性を有するポリペプ

50

チド誘導体を生じる；

(d) 下記の一次構造よりなるポリペプチドの誘導体：



式中の R は下記よりなる群から選ばれるアミノ酸配列である：

【0061】

【化20】

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly; (配列番号：2)

10

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg; (配列番号：3)

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly; (配列番号：4) および

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys; (配列番号：5)

20

【0062】

ならびに

(e) ペプチド(a) — (d) の誘導体であって、下記よりなる群から選ばれる誘導体

：

- (1) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうる酸付加塩；
 - (2) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるカルボキシレート塩；
 - (3) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるアルカリ付加塩；
 - (4) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうる低級アルキルエステル；
- ならびに

- (5) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるアミドであって、アミド、低級アルキルアミドおよび低級ジアルキルアミドよりなる群から選ばれる薬剤学的に許容しうるアミド；

30

ならびに

(ii) ペプチドとのコンプレックスを形成した亜鉛(II)。

【0063】

持続的な血糖制御作用を達成することができる組成物が好ましい。

【0064】

持続的な血糖制御作用を達成することができる水性懸濁液である組成物が好ましい。

【0065】

亜鉛生成物が非晶質である組成物が特に好ましい。

40

【0066】

亜鉛生成物が結晶質である組成物も特に好ましい。

【0067】

さらに他の形態においては本発明は、下記よりなる組成物：

(i) 下記よりなる群から選ばれる化合物：

(a) 下記のアミノ酸配列を有するペプチド：

【0068】

【化 2 1】

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly; (配列番号：2)

【0069】

(b) 下記のアミノ酸配列を有するペプチド：

【0070】

【化 2 2】

10

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-X (配列番号：7)

【0071】

式中の X は下記よりなる群から選ばれる：

(A) L y s、

(B) L y s - G l y、および

(C) L y s - G l y - A r g；

(c) 下記の一次構造よりなるポリペプチドの誘導体：

 $H_2N - W - COOH$

20

式中の W は下記よりなる群から選ばれるアミノ酸配列であり：

【0072】

【化 2 3】

His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly
(配列番号：1) および

His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg
(配列番号：6)

30

【0073】

これらの誘導体は哺乳動物において処理された際に向インシュリン活性を有するポリペプチド誘導体を生じる；

(d) 下記の一次構造よりなるポリペプチドの誘導体：

 $H_2N - R - COOH$

式中の R は下記よりなる群から選ばれるアミノ酸配列である：

【0074】

40

【化 2 4】

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly; (配列番号：2)

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg; (配列番号：3)

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly; (配列番号：4) および

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys; (配列番号：5)

10

【0075】

ならびに

(e) ペプチド(a) — (d) の誘導体であって、下記よりなる群から選ばれる誘導体

- (1) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうる酸付加塩；
- (2) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるカルボキシレート塩；
- (3) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるアルカリ付加塩；
- (4) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうる低級アルキルエステル；

20

ならびに

- (5) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるアミドであって、アミド、低級アルキルアミドおよび低級ジアルキルアミドよりなる群から選ばれる薬剤学的に許容しうるアミド；

ならびに

(ii) Ni(II)、Co(II)、Mg(II)、Ca(II)、K(I)、Mn(II)、Fe(II) および Cu(II) よりなる群から選ばれる金属。

30

【0076】

持続的な血糖制御を達成することができる組成物が好ましい。

【0077】

さらに他の形態においては本発明は、下記よりなる組成物に関するものである：

(i) 下記よりなる群から選ばれる化合物：

(a) 下記のアミノ酸配列を有するペプチド：

【0078】

【化 2 5】

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly; (配列番号：2)

40

【0079】

(b) 下記のアミノ酸配列を有するペプチド：

【0080】

【化 2 6】

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-X (配列番号：7)

【0081】

式中の X は下記よりなる群から選ばれる：

(A) Lys、

(B) Lys - Gly、および

(C) Lys - Gly - Arg；

(c) 下記の一次構造よりなるポリペプチドの誘導体：

$H_2N - W - COOH$

式中の W は下記よりなる群から選ばれるアミノ酸配列であり：

【0082】

【化 2 7】

His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly
(配列番号：1) および

His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg
(配列番号：6)

【0083】

これらの誘導体は哺乳動物において処理された際に向インシュリン活性を有するポリペプチド誘導体を生じる；

(d) 下記の一次構造よりなるポリペプチドの誘導体：

$H_2N - R - COOH$

式中の R は下記よりなる群から選ばれるアミノ酸配列である：

【0084】

【化 2 8】

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly; (配列番号：2)

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg; (配列番号：3)

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly; (配列番号：4) および

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys; (配列番号：5)

【0085】

ならびに

(e) ペプチド (a) — (d) の誘導体であって、下記よりなる群から選ばれる誘導体

10

20

30

40

50

:

- (1) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうる酸付加塩；
- (2) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるカルボキシレート塩；
- (3) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるアルカリ付加塩；
- (4) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうる低級アルキルエステル；

ならびに

- (5) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるアミドであって、アミド、低級アルキルアミドおよび低級ジアルキルアミドよりなる群から選ばれる薬剤学的に許容しうるアミド；

ならびに

- (ii) 塩基性ポリペプチド；

であって、持続的に血糖を制御することができる水性懸濁液である組成物。

【0086】

塩基性ポリペプチドがプロタミンである組成物が特に好ましい。

【0087】

さらに他の形態においては本発明は、下記よりなる組成物に関するものである：

- (i) 下記よりなる群から選ばれる化合物：

- (a) 下記のアミノ酸配列を有するペプチド：

【0088】

【化29】

10

20

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly; (配列番号：2)

【0089】

- (b) 下記のアミノ酸配列を有するペプチド：

【0090】

【化30】

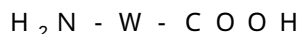
His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-X (配列番号：7)

30

【0091】

式中のXは下記よりなる群から選ばれる：

- (A) Lys、
- (B) Lys - Gly、および
- (C) Lys - Gly - Arg；
- (c) 下記の一次構造よりなるポリペプチドの誘導体：



式中のWは下記よりなる群から選ばれるアミノ酸配列であり：

【0092】

40

【化 3 1】

His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
 Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly
 (配列番号：1) および

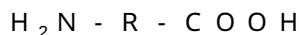
His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
 Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg
 (配列番号：6)

10

【0093】

これらの誘導体は哺乳動物において処理された際に向インシュリン活性を有するポリペプチド誘導体を生じる；

(d) 下記の一次構造よりなるポリペプチドの誘導体：



式中の R は下記よりなる群から選ばれるアミノ酸配列である：

【0094】

【化 3 2】

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
 Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly; (配列番号：2)

20

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
 Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg; (配列番号：3)

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
 Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly; (配列番号：4) および

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
 Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys; (配列番号：5)

30

【0095】

ならびに

(e) ペプチド(a) — (d) の誘導体であって、下記よりなる群から選ばれる誘導体：

- (1) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうる酸付加塩；
- (2) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるカルボキシレート塩；
- (3) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるアルカリ付加塩；
- (4) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうる低級アルキルエステル；

40

ならびに

- (5) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるアミドであって、アミド、低級アルキルアミドおよび低級ジアルキルアミドよりなる群から選ばれる薬剤学的に許容しうるアミド；

ならびに

(ii) フェノール系化合物；

であって、持続的に血糖を制御することができる水性懸濁液である組成物。

【0096】

フェノール系化合物がフェノール、クレゾール、レゾルシンおよびメチルパラベンよりなる群から選ばれる組成物が特に好ましい。

50

【 0 0 9 7 】

さらに他の形態においては本発明は、下記よりなる組成物に関するものである：

(i) 下記よりなる群から選ばれる化合物：

(a) 下記のアミノ酸配列を有するペプチド：

【 0 0 9 8 】

【 化 3 3 】

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly; (配列番号： 2)

10

【 0 0 9 9 】

(b) 下記のアミノ酸配列を有するペプチド：

【 0 1 0 0 】

【 化 3 4 】

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-X (配列番号： 7)

20

【 0 1 0 1 】

式中の X は下記よりなる群から選ばれる：

(A) L y s、

(B) L y s - G l y、および

(C) L y s - G l y - A r g；

(c) 下記の一次構造よりなるポリペプチドの誘導体：

$$H_2N - W - COOH$$

式中の W は下記よりなる群から選ばれるアミノ酸配列であり：

【 0 1 0 2 】

【 化 3 5 】

30

His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly (配列番号： 1) および

His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg (配列番号： 6)

40

【 0 1 0 3 】

これらの誘導体は哺乳動物において処理された際に向インシュリン活性を有するポリペプチド誘導体を生じる；

(d) 下記の一次構造よりなるポリペプチドの誘導体：

$$H_2N - R - COOH$$

式中の R は下記よりなる群から選ばれるアミノ酸配列である：

【 0 1 0 4 】

【化 3 6】

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly; (配列番号：2)

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly; (配列番号：3)

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly; (配列番号：4) および

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys; (配列番号：5)

10

【0 1 0 5】

ならびに

(e) ペプチド(a) — (d) の誘導体であって、下記よりなる群から選ばれる誘導体

- (1) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうる酸付加塩；
- (2) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるカルボキシレート塩；
- (3) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるアルカリ付加塩；
- (4) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうる低級アルキルエステル；

20

ならびに

- (5) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるアミドであって、アミド、低級アルキルアミドおよび低級ジアルキルアミドよりなる群から選ばれる薬剤学的に許容しうるアミド；

ならびに

- (ii) 塩基性ポリペプチドおよびフェノール系化合物；

であって、持続的に血糖を制御することができる水性懸濁液である組成物。

30

【0 1 0 6】

さらに他の形態においては本発明は、下記よりなる組成物に関するものである：

- (i) 下記よりなる群から選ばれる化合物：

(a) 下記のアミノ酸配列を有するペプチド：

【0 1 0 7】

【化 3 7】

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly; (配列番号：2) —

40

【0 1 0 8】

- (b) 下記のアミノ酸配列を有するペプチド：

【0 1 0 9】

【化 3 8】

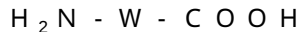
His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-X (配列番号：7)

50

【 0 1 1 0 】

式中の X は下記よりなる群から選ばれる：

- (A) L y s、
- (B) L y s - G l y、および
- (C) L y s - G l y - A r g；
- (c) 下記の一次構造よりなるポリペプチドの誘導体：



式中の W は下記よりなる群から選ばれるアミノ酸配列であり：

【 0 1 1 1 】

【 化 3 9 】

10

His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly
(配列番号：1) および

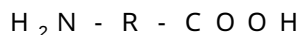
His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg
(配列番号：6)

20

【 0 1 1 2 】

これらの誘導体は哺乳動物において処理された際に向インシュリン活性を有するポリペプチド誘導体を生じる；

- (d) 下記の一次構造よりなるポリペプチドの誘導体：



式中の R は下記よりなる群から選ばれるアミノ酸配列である：

【 0 1 1 3 】

【 化 4 0 】

30

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly; (配列番号：2)

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg; (配列番号：3)

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly; (配列番号：4) および

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys; (配列番号：5)

40

【 0 1 1 4 】

ならびに

- (e) ペプチド (a) — (d) の誘導体であって、下記よりなる群から選ばれる誘導体

：

- (1) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうる酸付加塩；
- (2) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるカルボキシレート塩；
- (3) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるアルカリ付加塩；
- (4) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうる低級アルキルエステル；

ならびに

50

(5) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるアミドであって、アミド、低級アルキルアミドおよび低級ジアルキルアミドよりなる群から選ばれる薬剤学的に許容しうるアミド；

ならびに

(ii) 塩基性ポリペプチド、フェノール系化合物および金属イオン；
であって、持続的に血糖を制御することができる水性懸濁液である組成物。

【0115】

塩基性ポリペプチドがプロタミンである組成物が好ましい。

【0116】

金属イオンが亜鉛である組成物も好ましい。

10

【0117】

さらに他の形態においては本発明は、下記よりなる組成物に関するものである：

(i) 下記よりなる群から選ばれる化合物：

(a) 下記のアミノ酸配列を有するペプチド：

【0118】

【化41】

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly; (配列番号：2)

20

【0119】

(b) 下記のアミノ酸配列を有するペプチド：

【0120】

【化42】

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-X (配列番号：7)

30

【0121】

式中のXは下記よりなる群から選ばれる：

(A) Lys、

(B) Lys - Gly、および

(C) Lys - Gly - Arg；

(c) 下記の一次構造よりなるポリペプチドの誘導体：

$H_2N - W - COOH$

式中のWは下記よりなる群から選ばれるアミノ酸配列であり：

【0122】

【化43】

40

His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly (配列番号：1) および

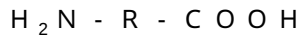
His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg (配列番号：6)

50

【 0 1 2 3 】

これらの誘導体は哺乳動物において処理された際に向インシュリン活性を有するポリペプチド誘導体を生じる；

(d) 下記の一次構造よりなるポリペプチドの誘導体：



式中の R は下記よりなる群から選ばれるアミノ酸配列である：

【 0 1 2 4 】

【 化 4 4 】

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly; (配列番号：2)

10

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg; (配列番号：3)

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly; (配列番号：4) および

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys; (配列番号：5)

20

【 0 1 2 5 】

ならびに

(e) ペプチド (a) — (d) の誘導体であって、下記よりなる群から選ばれる誘導体：

- (1) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうる酸付加塩；
- (2) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるカルボキシレート塩；
- (3) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるアルカリ付加塩；
- (4) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうる低級アルキルエステル；

ならびに

- (5) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるアミドであって、アミド、低級アルキルアミドおよび低級ジアルキルアミドよりなる群から選ばれる薬剤学的に許容しうるアミド；

30

ならびに

(i i) 非晶質または結晶質の物質を生成する条件下で処理された上記ペプチドおよびそれらの誘導体。

【 0 1 2 6 】

その条件が高剪断、塩類への暴露、またはそれらの組み合わせである組成物が好ましい。

【 0 1 2 7 】

塩類が硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウム、硫酸リチウム、塩化リチウム、クエン酸ナトリウム、クエン酸アンモニウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化アンモニウム、酢酸ナトリウム、酢酸アンモニウム、硫酸マグネシウム、塩化カルシウム、硝酸アンモニウムおよび蟻酸ナトリウム、ならびにそれらの組み合わせよりなる群から選ばれる組成物が特に好ましい。

40

【 0 1 2 8 】

さらに他の形態においては本発明は、下記よりなる組成物に関するものである：

(i) 下記よりなる群から選ばれる化合物：

(a) 下記のアミノ酸配列を有するペプチド：

【 0 1 2 9 】

50

【化 4 5】

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly; (配列番号：2)

【0 1 3 0】

(b) 下記のアミノ酸配列を有するペプチド：

【0 1 3 1】

【化 4 6】

10

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-X (配列番号：7)

【0 1 3 2】

式中の X は下記よりなる群から選ばれる：

(A) L y s、

(B) L y s - G l y、および

(C) L y s - G l y - A r g；

20

(c) 下記の一次構造よりなるポリペプチドの誘導体：

 $H_2N - W - COOH$

式中の W は下記よりなる群から選ばれるアミノ酸配列であり：

【0 1 3 3】

【化 4 7】

His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly (配列番号：1) および

30

His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg (配列番号：6)

【0 1 3 4】

これらの誘導体は哺乳動物において処理された際に向インシュリン活性を有するポリペプチド誘導体を生じる；

(d) 下記の一次構造よりなるポリペプチドの誘導体：

 $H_2N - R - COOH$

40

式中の R は下記よりなる群から選ばれるアミノ酸配列である：

【0 1 3 5】

【化 4 8】

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly; (配列番号：2)

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg; (配列番号：3)

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly; (配列番号：4) および

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-
Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys; (配列番号：5)

10

【0 1 3 6】

ならびに

(e) ペプチド(a) — (d) の誘導体であって、下記よりなる群から選ばれる誘導体

- (1) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうる酸付加塩；
- (2) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるカルボキシレート塩；
- (3) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるアルカリ付加塩；
- (4) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうる低級アルキルエステル；

20

ならびに

- (5) 該ペプチドの薬剤学的に許容しうるアミドであって、アミド、低級アルキルアミドおよび低級ジアルキルアミドよりなる群から選ばれる薬剤学的に許容しうるアミド；

ならびに

(ii) リポソームデリバリーシステム。

【0 1 3 7】

持続的な血糖制御を達成することができる組成物が好ましい。

30

【0 1 3 8】

リポソームがリン脂質系のものである組成物が特に好ましい。

【0 1 3 9】

リポソームが非リン脂質系のものである組成物も特に好ましい。

【0 1 4 0】

また本発明は、本発明の組成物を長期間投与することよりなる、インシュリン非依存性糖尿病の治療を必要とする哺乳動物においてそれを治療することに関するものである。

【発明の効果】

【0 1 4 1】

本発明によれば、持続的に血糖を制御するための組成物、および哺乳動物のインシュリン非依存性糖尿病の治療法が提供される。

40

【図面の簡単な説明】

【0 1 4 2】

【図 1】 $4 \text{ ng} / \text{kg} / \text{分}$ のインシュリノトロピンの長期注入（7 時間）がインシュリン非依存性糖尿病（NIDDM）を伴う患者の血漿中グルコース水準に及ぼす作用を示す。

【図 2】 $10 \text{ ng} / \text{kg} / \text{分}$ のインシュリノトロピンの短期注入（60 分間）が NIDDM を伴う患者の血漿中グルコース水準に及ぼす作用を示す。

【図 3】 $2 \text{ ng} / \text{kg} / \text{分}$ および $4 \text{ ng} / \text{kg} / \text{分}$ のインシュリノトロピンの長期注入（7 時間）が NIDDM を伴う患者の血漿中グルコース水準に及ぼす作用を示す。

50

【図 4】ラットに種々の水性懸濁液 (AS) 中における 1 回量 0.5 mg / 0.5 ml を皮下投与したのちのインシュリノトロピンの平均 (n = 3) 血漿中濃度を示す。

【図 5】ラットに種々の水性懸濁液 (AS) 中における 1 回量 0.5 mg / 0.5 ml を皮下投与したのちのインシュリノトロピンの平均 (n = 3) 血漿中濃度を示す。

【図 6】ラットに種々の水性懸濁液 (AS) 中における 1 回量 0.5 mg / 0.5 ml を皮下投与したのちのインシュリノトロピンの平均 (n = 3) 血漿中濃度を示す。

【図 7】ラットに種々の水性懸濁液 (AS) 中における 1 回量 0.5 mg / 0.5 ml を皮下投与したのちのインシュリノトロピンの平均 (n = 3) 血漿中濃度を示す。

【図 8】ラットに種々の水性懸濁液 (AS) 中における 1 回量 0.5 mg / 0.13 ml を皮下投与したのちのインシュリノトロピンの平均 (n = 3) 血漿中濃度を示す。

【図 9】ラットに種々の水性懸濁液 (AS) 中における 1 回量 0.5 mg / 0.13 ml を皮下投与したのちのインシュリノトロピンの平均 (n = 3) 血漿中濃度を示す。

【図 10】インシュリノトロピン垂鉛沈殿の薬物動態研究の結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0143】

持続的に血糖を制御するための組成物、および哺乳動物のインシュリン非依存性糖尿病の治療法を提供する。

GLP-1 (7-37) およびその関連ペプチドを持続的に投与することによりなる、哺乳動物のインシュリン非依存性糖尿病の治療法が開示される。それらのペプチドの投与を持続させるための組成物も開示される。

【0144】

特に指示しない限り、本明細書および特許請求の範囲全体を通して用いられる "誘導体" という語は、提示された一次構造を構成するポリペプチドにおいて、その C-末端に 1 個または 2 個以上の L-アミノ酸が含まれるもの；C-末端カルボキシル基が (C₁-C₆) 直鎖または分枝鎖アルキル基を含むエステルを形成したもの；C-末端カルボキシル基がカルボキシアミドまたは置換カルボキシアミドを形成したもの；酸性アミノ酸残基 (Asp および / または Glu) がエステルまたはカルボキシアミドを形成したもの；およびそれらの組み合わせが含まれるが、それらに限定されない。

【0145】

上記ペプチドに対する相同性をもつポリペプチドであって、その相同性がそれらのポリペプチドに向インシュリン活性を付与するのに十分なものが本発明の範囲に含まれる。上記ポリペプチドの変異体であって、その変異体が発明の本質的な効果に影響を及ぼさないアミノ酸の置換からなり、かつ向インシュリン活性をもつものも本発明の範囲に含まれる。

【0146】

グルカゴン様ペプチド-1 (7-37)、その単離、解明、および糖尿病の治療に使用することは、米国特許第 5,118,666 および 5,120,712 号明細書に示されており、これらの特許明細書の記載全体を本明細書に参考として引用する。

【0147】

本発明においては、インシュリン非依存性糖尿病を伴う患者において、食事その他に際し持続的な血糖制御を達成するために、GLP-1 および関連ポリペプチドを血漿中に持続的に増加させるのが必要であることが見出された。意外にも、GLP-1 および関連ペプチドを食事時間付近で最高 1 時間増加させるだけではグルコース水準が適切に制御されないことが認められた。従って GLP-1 および関連ペプチドの投与には持続的なデリバリーシステムが必要とされる。この持続的なデリバリーシステムによってインシュリンの作用が増強される。

【0148】

本明細書および特許請求の範囲全体を通して用いられる "インシュリンの作用の増強" という句には、インシュリン合成の増加、インシュリン分泌の増加、筋肉および脂肪によるグルコース取り込みの増加、ならびに肝臓によるグルコース産生の減少のうち 1 または 2 以上が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 9 】

本発明のポリペプチドは、当業者に周知の各種方法により製造される。たとえばこれらのポリペプチドは自動ペプチド合成装置、たとえばアプライド・バイオシステムズ (A B I) 4 3 0 A 固相ペプチド合成装置により合成することができる。あるいは本発明のポリペプチドは組換え DNA 技術を用いて製造することができ、この場合そのポリペプチドをコードする DNA 配列が発現ベクターに作動的に結合しており、これを用いて適宜な宿主細胞を形質転換する。この形質転換された細胞を、次いでポリペプチドが発現される条件下で培養する。次いでポリペプチドを培養物から採取する。さらにまた、合成法および組換え DNA 技術を併用して、本発明のアミドおよびエステル誘導体を製造し、および / または目的とするポリペプチドのフラグメントを製造し、次いでこれを当業者に周知の方法で結合させることができる。

10

【 0 1 5 0 】

本発明によるポリペプチドの誘導体は、当業者に周知の方法により製造される。たとえば本発明のポリペプチドの C - 末端アルキルエステル誘導体は、目的とする (C₁ - C₆) アルカノールと目的とするポリペプチドを、触媒酸、たとえば HCl の存在下で反応させることにより製造される。このアルキルエステル形成に適した反応条件には、約 5 0 の反応温度および約 1 - 約 3 時間の反応時間が含まれる。同様にポリペプチド内に A s p および / または G l u 残基の (C₁ - C₆) アルキルエステルを含む本発明のポリペプチドの誘導体を、こうして製造することができる。

【 0 1 5 1 】

本発明のポリペプチドのカルボキシアミド誘導体も当業者に周知の固相ペプチド合成法により製造される。たとえば下記を参照されたい : S o l i d P h a s e P e p t i d e S y n t h e s i s , スチュワート (S t e w a r t , J . M .) ら , パース・ケム出版社 , 1 9 8 4 。

20

【 0 1 5 2 】

上記の代わりに、または上記と組み合わせて、塩基性アミノ酸残基を異なる塩基性アミノ酸残基と、または酸性もしくは中性アミノ酸残基と交換するか、あるいは酸性アミノ酸残基を異なる酸性アミノ酸残基と、または塩基性もしくは中性アミノ酸残基と交換するか、あるいは中性アミノ酸残基を異なる中性アミノ酸残基と、または酸性もしくは塩基性アミノ酸残基と交換することにより、そのポリペプチドに対する DNA コード配列を修飾することによって本発明のポリペプチドの誘導体を製造しうる。このようなポリペプチドの一次配列の変化は、誘導体の直接合成によっても達成しうる。それらの方法は当業者に周知である。もちろん、本発明を実施する際に有用であるためには、これらの誘導体は向インシュリン作用を達成しなければならない。

30

【 0 1 5 3 】

本発明によるポリペプチド誘導体の向インシュリン活性は下記により測定される。

【 0 1 5 4 】

正常なラットの膵臓組織からランゲルハンス島をランシー (L a n c y , P . E) ら , D i a b e t e s , 1 6 : 3 5 - 3 9 (1 9 6 7) の方法の変法により摘出する。この方法においては、膵臓組織のコラーゲナーゼ消化物をフィコール濃度勾配 (ハンクの平衡塩類溶液中 2 7 % , 2 3 % , 2 0 . 5 % および 1 1 % , p H 7 . 4) において分離する。ランゲルハンス島を 2 0 . 5 % / 1 1 % 界面から採取し、洗浄し、立体顕微鏡下に外分泌組織および他の組織を手作業で取り除く。1 0 % ウシ胎仔血清を補充され、かつ 1 1 m M グルコースを含有する R P M I 1 6 4 0 培地中で 3 7 および 9 5 % 空気 / 5 % C O₂ において、ランゲルハンス島を一夜インキュベートする。次いで 1 0 % ウシ胎仔血清を補充され、かつ 5 . 6 m M グルコースを含有する R P M I 1 6 4 0 培地にランゲルハンス島を移す。3 7 および 9 5 % 空気 / 5 % C O₂ において 6 0 分間、ランゲルハンス島をインキュベートする。1 0 % ウシ胎仔血清を補充され、かつ 1 6 . 7 m M グルコースを含有する R P M I 1 6 4 0 培地中において、検査すべきポリペプチド誘導体を 1 n M および 1 0 n M 濃度に調製する。次いで 8 - 1 0 個の摘出されたランゲルハンス島を、9 6 ウェルのミ

40

50

クロタイター皿内の全容量 250 μ l ポリペプチド誘導体含有培地に移す。ランゲルハンス島をポリペプチド誘導体の存在下で 37 および 95 % 空気 / 5 % CO_2 において 90 分間インキュベートする。次いでランゲルハンス島を含まない培地のアリコートを採取し、その 100 μ l をインシュリンの存在量につき、ラジオイムノアッセイ法により、イクエート・インシュリン RIA キット (Equate Insulin RIA Kit) (バイナックス社、メイン州ポートランド) を用いてアッセイする。

【0155】

成人発症糖尿病の治療に有効な用量は、本発明のポリペプチド誘導体をたとえば静脈内、筋肉内または皮下に投与する場合、1 日当たり約 1 $\mu\text{g} / \text{kg} - 1,000 \mu\text{g} / \text{kg}$ であろう。食事中および食間での静脈注入のための好ましい用量範囲は、100 kg の患者を基準として約 4 - 10 $\text{ng} / \text{kg} / \text{分}$ または約 0.6 - 1.4 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ である。ただしこの範囲外の用量も可能であり、本発明の範囲に含まれることを認識すべきである。適切な用量は処方する医師が決定し、治療される症状の程度、および投与される誘導体により達成される反応、ならびに患者の年齢、体重、性別および病歴に応じて決定されるであろう。

【0156】

持続投与は皮下、筋肉内もしくは経皮的手段により、経口吸入、鼻内吸入により、胃腸内に、または注入ポンプを用いて行うことができる。

【0157】

GLP-1 および関連ペプチドの持続投与は、各種の水溶性ポリマー中における溶液としての配合物によっても達成しうる。これらのポリマーは一般に低分子量 ($< 15 \text{kDa}$) のポリマーである。限定ではないこれらの低分子量ポリマーの例には、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコールおよびポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマーが含まれる。これより高い分子量のポリマーも使用しうる。限定ではない、より高い分子量のポリマーの例には、多糖類、たとえばセルロース、セルロース誘導体、キトサン、アラビアゴム、カラヤゴム、グアーゴム、キサンタンゴム、トラガカント、アルギン酸、カラジナン、アガロースおよびフルセラランが含まれる。後者の場合、インビボで酵素により、または加水分解により分解されるポリマー、たとえばデキストラン；デンプンおよびその誘導体、ヒアルロン酸、ポリエステル、ポリアミド、ポリアンヒドリドおよびポリオルトエステルが好ましい。低分子量ポリマーまたは生物分解性ポリマーを用いることにより、高分子量の生物非分解性ポリマーに伴う組織蓄積が避けられる。配合物は一般に約 1 mg / ml の GLP-1 または関連ペプチドを含有し、濃度はポリマーに依存するが、一般に最高で 50 cps の粘度に達する濃度であり、かつ適切な緩衝剤、張性調節剤 (tonicity agent) および防腐剤を含有しうる。ラットおよびヒトにおけるインビボデータは、たとえば測定可能な血中インシュリノトロピン水準を最高で 24 時間達成しうることを証明する。これに対し、たとえばリン酸緩衝食塩液中に配合されたインシュリノトロピンは急激に (約 15 分) ピーク血漿中水準に達し、わずか 4 時間を越えると血漿中水準は検出限界未満にまで低下する。時間に対する血漿中濃度のプロットは、たとえば注射部位からのインシュリノトロピン吸収がポリマーの存在下では著しく減少したことを示唆する。

【0158】

GLP-1 および関連ペプチドは、薬剤学的に許容しうる油に懸濁された粒子として配合されてもよい。好ましい油はトリグリセリドである。これらの油の限定ではない例には、ラッカセイ油、ゴマ油、アーモンド油、ヒマシ油、ツバキ油、綿実油、オリーブ油、トウモロコシ油、大豆油、ベニバナ油およびヤシ油が含まれる。油が水と非混和性であり、かつペプチドに対する貧溶媒である限り、他の群の油、たとえば脂肪酸のエステルおよび脂肪アルコールのエステルも許容される。配合物は適切な防腐剤、湿潤剤および懸濁化剤をも含有しうる。たとえば配合物中のインシュリノトロピンの重量%は、0.01 - 10 % である。ラットにおけるインビボデータは、たとえば測定可能な血中インシュリノトロピン水準を最高で 24 時間達成しうることを証明する。これに対し、たとえばリン酸緩衝

食塩液中に配合されたインシュリノトロピンは急激に（約 15 分）ピーク血漿中水準に達し、わずか 4 時間を越えると血漿中水準は検出限界未満にまで低下する。時間に対する血漿中濃度のプロットは、たとえば注射部位からのインシュリノトロピン吸収が油懸濁液中では著しく減少したことを示唆する。

【0159】

GLP-1 および関連ペプチドは、金属イオン、好ましくは塩の形のものと同様に組み合わせることにより、低溶解性投与形態のものとして配合されてもよい。この組み合わせにより、非晶質または結晶質である組成物が得られる。好ましいイオンは亜鉛（II）である。Ni（II）、Co（II）、Mg（II）、Ca（II）、K（I）、Mn（II）、Fe（II）および Cu（II）を含めた他の金属イオンも使用しうる。

10

【0160】

他の形態の持続投与には、多重ラメラまたは単一ラメラのリボソームが含まれ、その製法は当業者に周知である。リボソームは多重ラメラまたは単一ラメラのいずれも、リン脂質系または非リン脂質系のいずれであってもよい。

【0161】

他の形態の持続投与は、沈殿剤、たとえばフェノール系化合物もしくは塩基性ポリペプチドまたは金属イオンもしくは塩類を用いて、および/または高剪断力を用いて形成された、インシュリノトロピン沈殿または凝集物の水性懸濁液である。2 種以上の沈殿剤を同時に用いることができる。沈殿は結晶質または非晶質のいずれであってもよい。

【0162】

インシュリノトロピン結晶は、水中における薬物溶液から pH 勾配（高から低へ、または低から高へ）および/または温度勾配および/または塩類を用いて溶解度を低下させることにより得られる。塩類には、クエン酸アンモニウム、リン酸ナトリウムまたはカリウム、塩化ナトリウムまたはカリウムまたはアンモニウム、酢酸ナトリウムまたはアンモニウム、硫酸マグネシウム、塩化カルシウム、硝酸アンモニウム、蟻酸ナトリウム、および薬物の溶解度を低下させうる他のいずれかの塩類が含まれる。結晶化のために用いられる塩類が薬剤学的に許容しうるものでない場合、結晶化が完了したのち母液を薬剤学的に許容しうる媒質と交換することができる。目的とする薬物動態プロファイルを達成するためにさらに薬物溶解度を低下させる必要がある場合、結晶を金属イオン、たとえば亜鉛もしくはカルシウム、および/またはフェノール系化合物で処理することができる。この処理は、単にこれらの添加物を結晶懸濁液に添加することにより実施しうる。

20

30

【0163】

インシュリノトロピン沈殿または凝集物の溶解度は生理的条件下で $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下から $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ にまで及びうる。ラットにおけるインビボデータは、これらの配合物が測定可能な血中インシュリノトロピン水準をたとえば少なくとも 30 時間達成しうることを証明する。

【0164】

上記の配合物に用いられる水性媒質は、注射に使用しうるいずれかの種類の緩衝剤系、または純水であってもよい。最終配合物の pH は、配合物が注射可能である限りいかなる値であってもよい。プロタミンをいずれかの塩の形（たとえば硫酸塩、塩化物など）で、またはプロタミン塩基として添加することができる。配合物の調製のために使用しうる成分の濃度範囲の例は下記のとおりである：フェノール（0.5 - 5.0 mg/mL）、m-クレゾール（0.5 - 5.5 mg/mL）、プロタミン（0.02 - 1.0 mg/mL）、亜鉛（0.10 - 6、亜鉛/インシュリノトロピン、モル比）、塩化ナトリウム（最高 100 mg/mL）およびリン酸緩衝液（5 - 500 mM）。

40

【0165】

他のフェノール系または非フェノール系化合物も使用しうる。それらの化合物の限定ではない例には、レゾルシン、メチルパラベン、プロピルパラベン、ベンジルアルコール、クロロクレゾール、クレゾール、ベンズアルデヒド、カテコール、ピロガロール、ハイドロキノン、没食子酸 n-プロピル、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシ

50

トルエンが含まれる。塩基性ポリペプチドの限定ではない例は、ポリリシン、ポリアルギニンなどである。従って、本明細書において「塩基性ポリペプチド」とは、プロタミン、ポリリシンまたはポリアルギニンの塩基性と実質的に同等か、またはそれ以上の塩基性を有するポリペプチドをいう。

【実施例】

【0166】

以上、本発明を一般的に述べたが、以下に個々の例につき述べる。これらの例は本発明を限定するためのものではなく、本発明の範囲は特許請求の範囲の記載によって定められると解すべきである。

【0167】

10

(実施例1)

インシュリノトロピン (1 mg / ml) 懸濁液

溶液 A 1 の調製

10 mg のインシュリノトロピンを 5 ml のメスフラスコ中へ秤量した。約 4 ml のリン酸緩衝食塩液 (PBS) をフラスコに添加して、薬物を分散、溶解した。フラスコを満たすのに十分な PBS (適量) を添加した。20 mg のインシュリノトロピンを 10 ml のメスフラスコ中へ秤量した。約 8 ml の PBS をフラスコに添加して、薬物を分散、溶解した。適量の PBS をフラスコに添加した。両フラスコの内容物を、ガラス注射器により 0.22 μ のフィルター (蛋白質結合が低いもの) を通して 10 ml のガラスバイアル中へ濾過することにより混和した。溶液 A 1 はインシュリノトロピン 2 mg / ml を PBS 中に含有していた。

20

【0168】

溶液 B 1 の調製

8 mg の硫酸プロタミンおよび 44 mg のフェノールを 10 ml のメスフラスコ中へ秤量した。適量の PBS を添加して、硫酸プロタミンおよびフェノールを溶解した。この溶液を 0.22 μ のフィルター (蛋白質結合が低いもの) を通して 10 ml のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 B 1 はプロタミン塩基 0.6 mg / ml およびフェノール 4.4 mg / ml を PBS 中に含有していた。

【0169】

水性懸濁液 1

30

1.5 ml の溶液 A 1 を 3.5 ml のタイプ 1 ガラスバイアル中へピペット注入した。バイアルの内容物を磁気攪拌し、その間に 1.5 ml の溶液 B 1 をバイアル中へピペット注入した。バイアルに栓をし、アルミニウムシェルでシールした。バイアル内容物を 16 時間緩和に攪拌して、懸濁液を形成させた。水性懸濁液 1 はインシュリノトロピン 1 mg / ml、プロタミン塩基 0.3 mg / ml、およびフェノール 2.2 mg / ml を PBS 中に含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

【0170】

(実施例2)

インシュリノトロピン (1 mg / ml) 懸濁液

溶液 A 2 の調製

40

10 mg のインシュリノトロピンを 5 ml のメスフラスコ中へ秤量した。約 4 ml の PBS をフラスコに添加して、薬物を分散、溶解した。適量の PBS をフラスコに添加した。20 mg のインシュリノトロピンを 10 ml のメスフラスコ中へ秤量した。約 8 ml の PBS をフラスコに添加して、薬物を分散、溶解した。適量の PBS をフラスコに添加した。両フラスコの内容物を、ガラス注射器により 0.22 μ のフィルターを通して 10 ml のガラスバイアル中へ濾過することにより混和した。溶液 A 2 はインシュリノトロピン 2 mg / ml を PBS 中に含有していた。

【0171】

溶液 B 2 の調製

2 mg の硫酸プロタミンおよび 44 mg のフェノールを 10 ml のメスフラスコ中へ秤

50

量した。適量の P B S をフラスコに添加して、硫酸プロタミンおよびフェノールを溶解した。この溶液を 0 . 2 2 μ のフィルターを通して 1 0 m l のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 B 2 はプロタミン塩基 0 . 1 5 m g / m l およびフェノール 4 . 4 m g / m l を P B S 中に含有していた。

【 0 1 7 2 】

水性懸濁液 2

1 . 5 m l の溶液 A 2 を 3 . 5 m l のタイプ 1 ガラスバイアル中へピペット注入した。バイアルの内容物を磁気攪拌し、その間に 1 . 5 m l の溶液 B 2 をバイアル中へピペット注入した。バイアルに栓をし、アルミニウムシェルでシールした。バイアル内容物を 1 6 時間攪拌して、懸濁液を形成させた。水性懸濁液 2 はインシュリノトロピン 1 m g / m l 、プロタミン塩基 0 . 0 7 5 m g / m l 、およびフェノール 2 . 2 m g / m l を P B S 中に含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

10

【 0 1 7 3 】

(実施例 3)

インシュリノトロピン (1 m g / m l) 懸濁液

溶液 A 3 の調製

2 0 m g のインシュリノトロピンを 1 0 m l のメスフラスコ中へ秤量した。約 8 m l の P B S をフラスコに添加して、薬物を分散、溶解した。適量の P B S をフラスコに添加した。溶液 A 3 を、注射器により 0 . 2 2 μ のフィルターを通して 1 0 m l のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 A 3 はインシュリノトロピン 2 m g / m l を P B S 中に含有していた。

20

【 0 1 7 4 】

溶液 B 3 の調製

8 m g の硫酸プロタミン、4 4 m g のフェノールおよび 3 2 3 m g のグリセリンを 1 0 m l のメスフラスコ中へ秤量した。適量の P B S をフラスコに添加して、硫酸プロタミン、フェノールおよびグリセリンを溶解した。この溶液を、注射器により 0 . 2 2 μ のフィルターを通して 1 0 m l のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 B 3 はプロタミン塩基 0 . 6 m g / m l 、フェノール 4 . 4 m g / m l 、およびグリセリン 3 2 m g / m l を P B S 中に含有していた。

30

【 0 1 7 5 】

水性懸濁液 3

1 . 5 m l の溶液 A 3 を 3 . 5 m l のタイプ 1 ガラスバイアル中へピペット注入した。バイアルの内容物を磁気攪拌し、その間に 1 . 5 m l の溶液 B 3 をバイアル中へピペット注入した。バイアルに栓をし、アルミニウムシェルでシールした。バイアル内容物を 1 6 時間攪拌して、懸濁液を形成させた。水性懸濁液 3 はインシュリノトロピン 1 m g / m l 、プロタミン塩基 0 . 3 m g / m l 、フェノール 2 . 2 m g / m l 、およびグリセリン 1 6 m g / m l を P B S 中に含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

【 0 1 7 6 】

(実施例 4)

インシュリノトロピン (1 m g / m l) 懸濁液

溶液 A 4 の調製

2 0 m g のインシュリノトロピンを 1 0 m l のメスフラスコ中へ秤量した。約 8 m l の P B S をフラスコに添加して、薬物を分散、溶解した。適量の P B S をフラスコに添加した。溶液 A 4 を、注射器により 0 . 2 2 μ のフィルター (ミリボア、ミレックス (M i l l e x) - G V) を通して 1 0 m l のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 A 4 はインシュリノトロピン 2 m g / m l を P B S 中に含有していた。

40

【 0 1 7 7 】

溶液 B 4 の調製

8 m g の硫酸プロタミンおよび 5 2 m g の m - クレゾールを 1 0 m l のメスフラスコ中

50

へ秤量した。適量の P B S をフラスコに添加して、硫酸プロタミンおよび m - クレゾールを溶解した。この溶液を注射器により 0 . 2 2 μ のフィルターを通して 1 0 m l のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 B 4 はプロタミン塩基 0 . 6 m g / m l および m - クレゾール 5 m g / m l を P B S 中に含有していた。

【 0 1 7 8 】

水性懸濁液 4

1 . 5 m l の溶液 A 4 を 3 . 5 m l のタイプ 1 ガラスバイアル中へピペット注入した。バイアルの内容物を磁気攪拌し、その間に 1 . 5 m l の溶液 B 4 をバイアル中へピペット注入した。バイアルに栓をし、アルミニウムシェルでシールした。バイアル内容物を 1 6 時間攪拌して、結晶を形成させた。水性懸濁液 4 はインシュリノトロピン 1 m g / m l 、プロタミン塩基 0 . 3 m g / m l 、および m - クレゾール 2 . 5 m g / m l を P B S 中に含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

10

【 0 1 7 9 】

(実施例 5)

インシュリノトロピン (1 m g / m l) 懸濁液

溶液 A 5 の調製

5 0 m g のインシュリノトロピンを 2 5 m l のメスフラスコ中へ秤量した。約 2 3 m l の P B S をフラスコに添加して、薬物を分散、溶解した。適量の P B S をフラスコに添加した。溶液 A 5 を、注射器により 0 . 2 2 μ のフィルターを通して 5 0 m l のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 A 5 はインシュリノトロピン 2 m g / m l を P B S 中に含有していた。

20

【 0 1 8 0 】

フェノール原液の調製

0 . 4 4 g のフェノールを 1 0 0 m l のメスフラスコ中へ秤量した。約 9 5 m l の P B S をフラスコに添加してフェノールを溶解した。適量の P B S をフラスコに添加してフェノールを溶解した。得られた溶液 (フェノール 4 . 4 m g / m l) を溶液 B 5 の調製に用いた。

【 0 1 8 1 】

溶液 B 5 の調製

2 5 m l のフェノール原液を 0 . 2 μ のフィルターを通して 5 0 m l のガラスバイアル中へ濾過することにより、溶液 B 5 を調製した。溶液 B 5 はフェノール 4 . 4 m g / m l を P B S 中に含有していた。

30

【 0 1 8 2 】

水性懸濁液 5

1 . 2 5 m l の溶液 A 5 を 3 . 5 m l のタイプ 1 ガラスバイアル中へピペット注入した。バイアルの内容物を磁気攪拌し、その間に 1 . 2 5 m l の溶液 B 5 をバイアル中へピペット注入した。バイアルに栓をし、アルミニウムシェルでシールした。バイアル内容物を 1 6 時間攪拌して、懸濁液を形成させた。水性懸濁液 5 はインシュリノトロピン 1 m g / m l およびフェノール 2 . 2 m g / m l を P B S 中に含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

40

【 0 1 8 3 】

(実施例 6)

インシュリノトロピン (1 m g / m l) 懸濁液

溶液 A 6 の調製

5 0 m g のインシュリノトロピンを 2 5 m l のメスフラスコ中へ秤量した。約 2 3 m l の P B S をフラスコに添加して、薬物を分散、溶解した。適量の P B S をフラスコに添加した。溶液 A 6 を、注射器により 0 . 2 2 μ のフィルターを通して 5 0 m l のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 A 6 はインシュリノトロピン 2 m g / m l を P B S 中に含有していた。

【 0 1 8 4 】

50

フェノール原液の調製

0.44 g のフェノールを 100 ml のメスフラスコ中へ秤量した。約 95 ml の P B S をフラスコに添加してフェノールを溶解した。適量の P B S をフラスコに添加してフェノールを溶解した。得られた溶液 (フェノール 4.4 mg / ml) を溶液 B 6 の調製に用いた。

【0185】

溶液 B 6 の調製

下記により溶液 B 6 を調製した。1.25 mg の硫酸プロタミンを 25 ml のメスフラスコ中へ秤量した。約 20 ml のフェノール原液をフラスコに添加して硫酸プロタミンを溶解した。適量のフェノール原液をフラスコに添加した。溶液 B 6 を 0.22 μ のフィルターを通して 50 ml のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 B 6 はフェノール 4.4 mg / ml およびプロタミン塩基 0.038 mg / ml を P B S 中に含有していた。

10

【0186】

水性懸濁液 6

1.25 ml の溶液 A 6 を 3.5 ml のタイプ 1 ガラスバイアル中へピペット注入した。バイアルの内容物を磁気攪拌し、その間に 1.25 ml の溶液 B 6 をバイアル中へピペット注入した。バイアルに栓をし、アルミニウムシェルでシールした。バイアル内容物を 16 時間攪拌して、懸濁液を形成させた。水性懸濁液 6 はインシュリノトロピン 1 mg / ml、フェノール 2.2 mg / ml、およびプロタミン塩基 0.019 mg / ml を P B S 中に含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

20

【0187】

(実施例 7)

インシュリノトロピン (1 mg / ml) 懸濁液

溶液 A 7 の調製

50 mg のインシュリノトロピンを 25 ml のメスフラスコ中へ秤量した。約 23 ml の P B S をフラスコに添加して、薬物を分散、溶解した。適量の P B S をフラスコに添加した。溶液 A 7 を、注射器により 0.22 μ のフィルターを通して 50 ml のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 A 7 はインシュリノトロピン 2 mg / ml を P B S 中に含有していた。

30

【0188】

フェノール原液の調製

0.44 g のフェノールを 100 ml のメスフラスコ中へ秤量した。約 95 ml の P B S をフラスコに添加してフェノールを溶解した。適量の P B S をフラスコに添加してフェノールを溶解した。得られた溶液 (フェノール 4.4 mg / ml) を溶液 B 7 の調製に用いた。

30

【0189】

溶液 B 7 の調製

溶液 B 7 を下記により調製した。2.5 mg の硫酸プロタミンを 25 ml のメスフラスコ中へ秤量した。約 20 ml のフェノール原液をフラスコに添加して硫酸プロタミンを溶解した。適量のフェノール原液をフラスコに添加した。溶液 B 7 を 0.22 μ のフィルターを通して 50 ml のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 B 7 はフェノール 4.4 mg / ml およびプロタミン塩基 0.075 mg / ml を P B S 中に含有していた。

40

【0190】

水性懸濁液 7

1.25 ml の溶液 A 7 を 3.5 ml のタイプ 1 ガラスバイアル中へピペット注入した。バイアルの内容物を磁気攪拌し、その間に 1.25 ml の溶液 B 7 をバイアル中へピペット注入した。バイアルに栓をし、アルミニウムシェルでシールした。バイアル内容物を 16 時間攪拌して、懸濁液を形成させた。水性懸濁液 7 はインシュリノトロピン 1 mg / ml、フェノール 2.2 mg / ml、およびプロタミン塩基 0.038 mg / ml を P B S 中に含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

50

【 0 1 9 1 】

(実施例 8)

インシュリノトロピン (1 m g / m l) 懸濁液

溶液 A 1 2 の調製

2 0 m g のインシュリノトロピンを 1 0 m l のメスフラスコ中へ秤量した。約 8 m l の P B S をフラスコに添加して、薬物を分散、溶解した。適量の P B S をフラスコに添加した。溶液 A 1 2 を、注射器により 0 . 2 2 μ のフィルターを通して 1 0 m l のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 A 1 2 はインシュリノトロピン 2 m g / m l を P B S 中に含有していた。

【 0 1 9 2 】

溶液 B 1 2

溶液 B 1 2 を下記により調製した。2 0 m g のフェノールを 1 0 m l のメスフラスコ中へ秤量した。約 8 m l の P B S をフラスコに添加してフェノールを溶解した。適量の P B S をフラスコに添加した。溶液 B 1 2 を 0 . 2 2 μ のフィルターを通して 1 0 m l のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 B 1 2 はフェノール 2 m g / m l を P B S 中に含有していた。

【 0 1 9 3 】

水性懸濁液 1 2

4 m l の溶液 A 1 2 を 1 0 m l のタイプ 1 ガラスバイアル中へピペット注入した。バイアルの内容物を磁気攪拌し、その間に 4 m l の溶液 B 1 2 をバイアル中へピペット注入した。バイアルに栓をし、アルミニウムシェルでシールした。バイアル内容物を 1 6 時間攪拌して、懸濁液を形成させた。水性懸濁液 1 2 はインシュリノトロピン 1 m g / m l およびフェノール 1 m g / m l を P B S 中に含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

【 0 1 9 4 】

(実施例 9)

インシュリノトロピン (1 m g / m l) 懸濁液

溶液 A 1 5 の調製

2 0 m g のインシュリノトロピンを 1 0 m l のメスフラスコ中へ秤量した。約 8 m l のリン酸緩衝液 (P B) をフラスコに添加して、薬物を溶解した。適量の P B をフラスコに添加した。溶液 A 1 5 を、注射器により 0 . 2 2 μ のフィルターを通して 1 0 m l のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 A 1 5 はインシュリノトロピン 2 m g / m l を P B 中に含有していた。

【 0 1 9 5 】

溶液 B 1 5 の調製

溶液 B 1 5 を下記により調製した。8 m g の硫酸プロタミンを 1 0 m l のメスフラスコ中へ秤量した。約 8 m l の P B をフラスコに添加して硫酸プロタミンを溶解した。適量の P B をフラスコに添加した。溶液 B 1 5 を 0 . 2 2 μ のフィルターを通して 1 0 m l のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 B 1 5 はプロタミン塩基 0 . 6 m g / m l を P B 中に含有していた。

【 0 1 9 6 】

水性懸濁液 1 5

3 m l の溶液 A 1 5 を 1 0 m l のタイプ 1 ガラスバイアル中へピペット注入した。バイアルの内容物を磁気攪拌し、その間に 3 m l の溶液 B 1 5 をバイアル中へピペット注入した。バイアルに栓をし、アルミニウムシェルでシールした。バイアル内容物を 1 6 時間攪拌して懸濁液を形成させた。水性懸濁液 1 5 はインシュリノトロピン 1 m g / m l およびプロタミン塩基 0 . 3 m g / m l を P B 中に含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

【 0 1 9 7 】

(実施例 1 0)

インシュリノトロピン (1 m g / m l) 懸濁液

溶液 A 1 6 の調製

2 0 m g のインシュリノトロピンを 1 0 m l のメスフラスコ中へ秤量した。約 8 m l の P B をフラスコに添加して、薬物を溶解した。適量の P B をフラスコに添加した。溶液 A 1 6 を、注射器により 0 . 2 2 μ のフィルターを通して 1 0 m l のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 A 1 6 はインシュリノトロピン 2 m g / m l を P B 中に含有していた。

【 0 1 9 8 】

溶液 B 1 6 の調製

溶液 B 1 6 を下記により調製した。4 4 m g のフェノールを 1 0 m l のメスフラスコ中へ秤量した。約 8 m l の P B をフラスコに添加してフェノールを溶解した。適量の P B をフラスコに添加した。溶液 B 1 6 を 0 . 2 2 μ のフィルターを通して 1 0 m l のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 B 1 6 はフェノール 4 . 4 m g / m l を P B 中に含有していた。

10

【 0 1 9 9 】

水性懸濁液 1 6

3 m l の溶液 A 1 6 を 1 0 m l のタイプ 1 ガラスバイアル中へピペット注入した。バイアルの内容物を磁気攪拌し、その間に 3 m l の溶液 B 1 6 をバイアル中へピペット注入した。バイアルに栓をし、アルミニウムシェルでシールした。バイアル内容物を 1 6 時間攪拌して、懸濁液を形成させた。水性懸濁液 1 6 はインシュリノトロピン 1 m g / m l およびフェノール 2 . 2 m g / m l を P B 中に含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

20

【 0 2 0 0 】

(実施例 1 1)

インシュリノトロピン (1 m g / m l) 懸濁液

水性懸濁液 1 7

1 0 m g のインシュリノトロピンを 1 0 m l のメスフラスコ中へ秤量した。約 8 m l の P B をフラスコに添加して、薬物を溶解した。適量の P B をフラスコに添加した。フラスコの内容物を、注射器により 0 . 2 2 μ のフィルターを通して 1 0 m l のタイプ 1 ガラスバイアル中へ濾過した。バイアルに栓をし、アルミニウムシェルでシールした。バイアル内容物を 1 6 時間攪拌して、懸濁液を形成させた。水性懸濁液 1 7 はインシュリノトロピン 1 m g / m l を P B 中に含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

30

【 0 2 0 1 】

(実施例 1 2)

インシュリノトロピン (1 m g / m l) 懸濁液

水性懸濁液 1 8

1 0 m g のインシュリノトロピンを 1 0 m l のメスフラスコ中へ秤量した。約 8 m l の P B S をフラスコに添加して、薬物を溶解した。適量の P B S をフラスコに添加した。フラスコの内容物を、注射器により 0 . 2 2 μ のフィルターを通して 1 0 m l のタイプ 1 ガラスバイアル中へ濾過した。バイアルに栓をし、アルミニウムシェルでシールした。バイアル内容物を 1 6 時間緩和に攪拌して (泡またはバブルが確実に生じないようにする) 、懸濁液を形成させた。水性懸濁液 1 8 はインシュリノトロピン 1 m g / m l を P B S 中に含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

40

【 0 2 0 2 】

(実施例 1 3)

インシュリノトロピン (0 . 2 m g / m l) 懸濁液

溶液 A 2 2 の調製

溶液 A 2 2 を下記により調製した。2 m g のインシュリノトロピンを 5 m l のメスフラスコ中へ秤量した。約 3 m l の P B S をフラスコに添加して、薬物を溶解した。適量の P B S をフラスコに添加した。溶液 A 2 2 を、注射器により 0 . 2 2 μ のフィルターを通し

50

て 10 ml のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 A 2 2 はインシュリノトロピン 0.4 mg/ml を PBS 中に含有していた。

【0203】

溶液 B 2 2 の調製

溶液 B 2 2 を下記により調製した。44 mg のフェノールを 10 ml のメスフラスコ中へ秤量した。約 8 ml の PBS をフラスコに添加してフェノールを溶解した。適量の PBS をフラスコに添加した。溶液 B 2 2 を 0.22 µ のフィルターを通して 10 ml のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 B 2 2 はフェノール 4.4 mg/ml を PBS 中に含有していた。

【0204】

水性懸濁液 2 2

1.5 ml の溶液 A 2 2 を 3.5 ml のタイプ 1 ガラスバイアル中へピペット注入した。バイアルの内容物を磁気攪拌し、その間に 1.5 ml の溶液 B 2 2 をバイアル中へピペット注入した。バイアルに栓をし、アルミニウムシェルでシールした。バイアル内容物を 16 時間攪拌して、懸濁液を形成させた。水性懸濁液 2 2 はインシュリノトロピン 0.2 mg/ml およびフェノール 2.2 mg/ml を PBS 中に含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

【0205】

(実施例 14)

インシュリノトロピン (0.2 mg/ml) 懸濁液

溶液 A 2 3 の調製

溶液 A 2 3 を下記により調製した。2 mg のインシュリノトロピンを 5 ml のメスフラスコ中へ秤量した。約 3 ml の PBS をフラスコに添加して、薬物を溶解した。適量の PBS をフラスコに添加した。溶液 A 2 3 を、注射器により 0.22 µ のフィルターを通して 10 ml のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 A 2 3 はインシュリノトロピン 0.4 mg/ml を PBS 中に含有していた。

【0206】

溶液 B 2 3 の調製

溶液 B 2 3 を下記により調製した。8.8 mg のフェノールを 10 ml のメスフラスコ中へ秤量した。約 8 ml の PBS をフラスコに添加してフェノールを溶解した。適量の PBS をフラスコに添加した。溶液 B 2 3 を 0.22 µ のフィルターを通して 10 ml のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 B 2 3 はフェノール 0.88 mg/ml を PBS 中に含有していた。

【0207】

水性懸濁液 2 3

1.5 ml の溶液 A 2 3 を 3.5 ml のタイプ 1 ガラスバイアル中へピペット注入した。バイアルの内容物を磁気攪拌し、その間に 1.5 ml の溶液 B 2 3 をバイアル中へピペット注入した。バイアルに栓をし、アルミニウムシェルでシールした。バイアル内容物を 16 時間攪拌して、懸濁液を形成させた。水性懸濁液 2 3 はインシュリノトロピン 0.2 mg/ml およびフェノール 0.44 mg/ml を PBS 中に含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

【0208】

(実施例 15)

インシュリノトロピン (1 mg/ml) 懸濁液

溶液 A 2 4 の調製

溶液 A 2 4 を下記により調製した。10 mg のインシュリノトロピンを 5 ml のメスフラスコ中へ秤量した。約 3 ml の PBS をフラスコに添加して、薬物を溶解した。適量の PBS をフラスコに添加した。溶液 A 2 4 を、注射器により 0.22 µ のフィルターを通して 10 ml のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 A 2 4 はインシュリノトロピン 2 mg/ml を PBS 中に含有していた。

10

20

30

40

50

【0209】

溶液B24の調製

溶液B24を下記により調製した。8mgの硫酸プロタミンを10mlのメスフラスコ中へ秤量した。約8mlのPBSをフラスコに添加して硫酸プロタミンを溶解した。適量のPBSをフラスコに添加した。溶液B24を0.22μのフィルターを通して10mlのガラスバイアル中へ濾過した。溶液B24はプロタミン塩基0.6mg/mlをPBS中に含有していた。

【0210】

水性懸濁液24

1.5mlの溶液A24を3.5mlのタイプ1ガラスバイアル中へピペット注入した。バイアルの内容物を磁気攪拌し、その間に1.5mlの溶液B24をバイアル中へピペット注入した。バイアルに栓をし、アルミニウムシェルでシールした。バイアル内容物を16時間攪拌して、懸濁液を形成させた。水性懸濁液24はインシュリノトロピン1mg/mlおよびプロタミン塩基0.3mg/mlをPBS中に含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

10

【0211】

(実施例16)

インシュリノトロピン(1mg/ml)懸濁液

溶液A25の調製

溶液A25を下記により調製した。10mgのインシュリノトロピンを5mlのメスフラスコ中へ秤量した。約3mlのPBSをフラスコに添加して、薬物を溶解した。適量のPBSをフラスコに添加した。溶液A25を、注射器により0.22μのフィルターを通して10mlのガラスバイアル中へ濾過した。溶液A25はインシュリノトロピン2mg/mlをPBS中に含有していた。

20

【0212】

溶液B25の調製

溶液B25を下記により調製した。53mgのm-クレゾールを10mlのメスフラスコ中へ秤量した。約8mlのPBSをフラスコに添加してm-クレゾールを溶解した。適量のPBSをフラスコに添加した。溶液B25を0.22μのフィルターを通して10mlのガラスバイアル中へ濾過した。溶液B25はm-クレゾール5.3mg/mlをPBS中に含有していた。

30

【0213】

水性懸濁液25

1.5mlの溶液A25を3.5mlのタイプ1ガラスバイアル中へピペット注入した。バイアルの内容物を磁気攪拌し、その間に1.5mlの溶液B25をバイアル中へピペット注入した。バイアルに栓をし、アルミニウムシェルでシールした。バイアル内容物を16時間攪拌して、懸濁液を形成させた。水性懸濁液25はインシュリノトロピン1mg/mlおよびm-クレゾール2.5mg/mlをPBS中に含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

40

【0214】

(実施例17)

インシュリノトロピン(0.5mg/ml)懸濁液

溶液A29の調製

溶液A29を下記により調製した。25mgのインシュリノトロピンを25mlのメスフラスコ中へ秤量した。約20mlのPBSをフラスコに添加して、薬物を溶解した。適量のPBSをフラスコに添加した。溶液A29を、注射器により0.22μのフィルターを通して50mlのガラスバイアル中へ濾過した。溶液A29はインシュリノトロピン1mg/mlをPBS中に含有していた。

50

【0215】

溶液B29の調製

溶液 B 2 9 を下記により調製した。5 0 m g のフェノールを 5 0 m l のメスフラスコ中へ秤量した。約 4 0 m l の P B S をフラスコに添加してフェノールを溶解した。適量の P B S をフラスコに添加した。溶液 B 2 9 を 0 . 2 2 μ のフィルターを通して 5 0 m l のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 B 2 9 はフェノール 1 . 0 m g / m l を P B S 中に含有していた。

【 0 2 1 6 】

水性懸濁液 2 9

1 . 5 m l の溶液 A 2 9 を 3 . 5 m l のタイプ 1 ガラスバイアル中へピペット注入した。バイアルの内容物を磁気攪拌し、その間に 1 . 5 m l の溶液 B 2 9 をバイアル中へピペット注入した。バイアルに栓をし、アルミニウムシェルでシールした。バイアル内容物を 1 6 時間攪拌して、懸濁液を形成させた。水性懸濁液 2 9 はインシュリノトロピン 0 . 5 m g / m l およびフェノール 0 . 5 m g / m l を P B S 中に含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

10

【 0 2 1 7 】

(実施例 1 8)

インシュリノトロピン (1 m g / m l) 懸濁液

溶液 A 3 1 の調製

1 0 m g のインシュリノトロピンを 5 m l のメスフラスコ中へ秤量した。約 4 m l の P B S をフラスコに添加して、薬物を溶解した。適量の P B S をフラスコに添加した。溶液 A 3 1 を、注射器により 0 . 2 2 μ のフィルターを通して 1 0 m l のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 A 3 1 はインシュリノトロピン 2 m g / m l を P B S 中に含有していた。

20

【 0 2 1 8 】

溶液 B 3 1 の調製

溶液 B 3 1 を下記により調製した。5 0 m g のフェノールを 5 0 m l のメスフラスコ中へ秤量した。約 4 0 m l の P B S をフラスコに添加してフェノールを溶解した。適量の P B S をフラスコに添加した。溶液 B 3 1 を 0 . 2 2 μ のフィルターを通して 5 0 m l のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 B 3 1 はフェノール 1 m g / m l を P B S 中に含有していた。

【 0 2 1 9 】

水性懸濁液 3 1

1 . 5 m l の溶液 A 3 1 を 3 . 5 m l のタイプ 1 ガラスバイアル中へピペット注入した。バイアルの内容物を磁気攪拌し、その間に 1 . 5 m l の溶液 B 3 1 をバイアル中へピペット注入した。バイアルに栓をし、アルミニウムシェルでシールした。バイアル内容物を 1 6 時間攪拌して、懸濁液を形成させた。水性懸濁液 3 1 はインシュリノトロピン 1 m g / m l およびフェノール 0 . 5 m g / m l を P B S 中に含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

30

【 0 2 2 0 】

(実施例 1 9)

インシュリノトロピン (4 m g / m l) 懸濁液

溶液 A 5 1 の調製

2 2 . 2 m g のインシュリノトロピンを 1 0 m l のガラスバイアル中へ秤量した。5 m l の P B S をバイアルにピペット注入して、薬物を溶解した。この溶液を 0 . 2 2 μ のフィルター (蛋白質結合の低いもの) を通して 1 0 m l のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 A 5 1 はインシュリノトロピン 4 . 4 4 m g / m l を P B S 中に含有していた。

40

【 0 2 2 1 】

溶液 B 5 1 の調製

1 1 0 m g のフェノールおよび 3 0 m g の硫酸プロタミンを 5 m l のメスフラスコ中へ秤量した。約 4 m l の P B S をフラスコに添加してフェノールおよび硫酸プロタミンを溶解した。フラスコにマークの位置まで P B S を充填した。この溶液を 0 . 2 2 μ のフィルター (蛋白質結合の低いもの) を通して 1 0 m l のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 B

50

5 1 はフェノール 2 2 m g / m l およびプロタミン塩基 4 . 5 m g / m l を P B S 中に含有していた。

【 0 2 2 2 】

水性懸濁液 5 1

3 m l の溶液 A 5 1 および 0 . 3 3 m l の溶液 B 5 1 を 3 . 5 m l のタイプ 1 ガラスバイアル中へピペット注入した。バイアルの内容物を緩和に振盪して、確実に均質に混合した。バイアルを周囲温度に 1 6 時間静置した。水性懸濁液 5 1 はインシュリノトロピン 4 m g / m l 、プロタミン塩基 0 . 4 4 m g / m l 、およびフェノール 2 . 2 m g / m l を P B S 中に含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

【 0 2 2 3 】

(実施例 2 0)

インシュリノトロピン (4 m g / m l) 懸濁液

溶液 A 5 2 の調製

2 2 . 2 m g のインシュリノトロピンを 1 0 m l のガラスバイアル中へ秤量した。5 m l の P B S をバイアルにピペット注入して、薬物を溶解した。この溶液を 0 . 2 2 μ のフィルター (蛋白質結合の低いもの) を通して 1 0 m l のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 A 5 2 はインシュリノトロピン 4 . 4 4 m g / m l を P B S 中に含有していた。

【 0 2 2 4 】

溶液 B 5 2 の調製

1 1 0 m g のフェノールおよび 1 5 . 6 m g の酢酸亜鉛・2水和物を 5 m l のメスフラスコ中へ秤量した。約 4 m l の注射用水をフラスコに添加してフェノールおよび酢酸亜鉛・2水和物を溶解した。フラスコにマークの位置まで注射用水を充填した。この溶液を 0 . 2 2 μ のフィルター (蛋白質結合の低いもの) を通して 1 0 m l のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 B 5 2 はフェノール 2 2 m g / m l および酢酸亜鉛・2水和物 7 . 8 m g / m l を注射用水中に含有していた。

【 0 2 2 5 】

水性懸濁液 5 2

3 m l の溶液 A 5 2 および 0 . 3 3 m l の溶液 B 5 2 を 3 . 5 m l のタイプ 1 ガラスバイアル中へピペット注入した。バイアルの内容物を緩和に振盪して、確実に均質に混合した。バイアルを周囲温度に 1 6 時間静置した。水性懸濁液 5 2 はインシュリノトロピン 4 m g / m l 、酢酸亜鉛・2水和物 0 . 7 8 m g / m l 、およびフェノール 2 . 2 m g / m l を P B S 中に含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

【 0 2 2 6 】

(実施例 2 1)

インシュリノトロピン (4 m g / m l) 懸濁液

フェノール溶液の調製

2 4 4 m g のフェノールを 1 0 0 m l のメスフラスコ中へ秤量した。約 9 0 m l の注射用水をフラスコに添加してフェノールを溶解した。フラスコにマークの位置まで注射用水を充填した。この溶液の p H を 5 % N a O H 溶液により p H 9 . 0 に調整した。このフェノール溶液はフェノール 2 . 4 4 m g / m l を注射用水中に含有していた。p H 9 . 0 。

【 0 2 2 7 】

溶液 A 7 1 の調製

2 2 . 2 m g のインシュリノトロピンを 1 0 m l のガラスバイアル中へ秤量した。5 m l のフェノール溶液をバイアルにピペット注入して、薬物を溶解した。この溶液を 0 . 2 2 μ のフィルター (蛋白質結合の低いもの) を通して 1 0 m l のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 A 7 1 はインシュリノトロピン 4 . 4 4 m g / m l およびフェノール 2 . 4 4 m g / m l を注射用水中に含有していた。

【 0 2 2 8 】

溶液 B 7 1 の調製

10

20

30

40

50

116 mg の硫酸プロタミンを 10 ml のメスフラスコ中へ秤量した。約 8 ml の注射用水をフラスコに添加して硫酸プロタミンを溶解した。フラスコにマークの位置まで注射用水を充填した。この溶液を 0.22 μ のフィルター（蛋白質結合の低いもの）を通して 10 ml のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 B 7 1 はプロタミン塩基 8.7 mg / ml を注射用水中に含有していた。

【0229】

溶液 C 7 1 の調製

156 mg の酢酸亜鉛・2水和物および 1.632 g の NaCl を 10 ml のメスフラスコ中へ秤量した。約 8 ml の注射用水をフラスコに添加して酢酸亜鉛・2水和物および NaCl を溶解した。フラスコにマークの位置まで注射用水を充填した。この溶液を 0.22 μ のフィルター（蛋白質結合の低いもの）を通して 10 ml のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 C 7 1 は酢酸亜鉛・2水和物 15.6 mg / ml および NaCl 163.2 mg / ml を注射用水中に含有していた。

10

【0230】

水性懸濁液 7 1

3 ml の溶液 A 7 1、0.165 ml の溶液 B 7 1、および 0.165 ml の溶液 C 7 1 を 3.5 ml のタイプ 1 ガラスバイアル中へピペット注入した。バイアルの内容物を緩和に振盪して、確実に均質に混合した。バイアルを周囲温度に 16 時間静置した。水性懸濁液 7 1 はインシュリノトロピン 4 mg / ml、プロタミン塩基 0.435 mg / ml、酢酸亜鉛・2水和物 0.78 mg / ml、NaCl 8.16 mg / ml、およびフェノール 2.2 mg / ml を注射用水中に含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

20

【0231】

（実施例 2 2）

インシュリノトロピン（4 mg / ml）懸濁液

m - クレゾール溶液の調製

244 mg の m - クレゾールを 100 ml のメスフラスコ中へ秤量した。約 90 ml の注射用水をフラスコに添加して m - クレゾールを溶解した。フラスコにマークの位置まで注射用水を充填した。この溶液の pH を 5 % NaOH 溶液により pH 9.0 に調整した。この m - クレゾール溶液は m - クレゾール 2.44 mg / ml を注射用水中に含有していた。pH 9.0。

30

【0232】

溶液 A 1 0 0 の調製

22.2 mg のインシュリノトロピンを 10 ml のガラスバイアル中へ秤量した。5 / ml の m - クレゾール溶液をバイアルにピペット注入して、薬物を溶解した。この溶液を 0.22 μ のフィルター（蛋白質結合の低いもの）を通して 10 ml のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 A 1 0 0 はインシュリノトロピン 4.44 mg / ml および m - クレゾール 2.44 mg / ml を注射用水中に含有していた。

【0233】

溶液 B 1 0 0 の調製

116 mg の硫酸プロタミンを 10 ml のメスフラスコ中へ秤量した。約 8 ml の注射用水をフラスコに添加して硫酸プロタミンを溶解した。フラスコにマークの位置まで注射用水を充填した。この溶液を 0.22 μ のフィルター（蛋白質結合の低いもの）を通して 10 ml のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 B 1 0 0 はプロタミン塩基 8.7 mg / ml を注射用水中に含有していた。

40

【0234】

溶液 C 1 0 0 の調製

156 mg の酢酸亜鉛・2水和物および 1.632 g の NaCl を 10 ml のメスフラスコ中へ秤量した。約 8 ml の注射用水をフラスコに添加して酢酸亜鉛・2水和物および NaCl を溶解した。フラスコにマークの位置まで注射用水を充填した。この溶液を 0.

50

22 μ のフィルター（蛋白質結合の低いもの）を通して10 ml のガラスバイアル中へ濾過した。溶液C 100は酢酸亜鉛・2水和物15.6 mg/mlおよびNaCl 163.2 mg/mlを注射用水中に含有していた。

【0235】

水性懸濁液100

3 ml の溶液A 100、0.165 ml の溶液B 100、および0.165 ml の溶液C 100を3.5 ml のタイプ1ガラスバイアル中へピペット注入した。バイアルの内容物を緩和に振盪して、確実に均質に混合した。バイアルを周囲温度に16時間静置した。水性懸濁液100はインシュリノトロピン4 mg/ml、プロタミン塩基0.435 mg/ml、酢酸亜鉛・2水和物0.78 mg/ml、NaCl 8.16 mg/ml、およびm-クレゾール2.2 mg/mlを注射用水中に含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

10

【0236】

（実施例23）

インシュリノトロピン（4 mg/ml）懸濁液

溶液A 68の調製

22.2 mg のインシュリノトロピンを10 ml のガラスバイアル中へ秤量した。5 ml のPBSをバイアルにピペット注入して、薬物を溶解した。この溶液を0.22 μ のフィルター（蛋白質結合の低いもの）を通して10 ml のガラスバイアル中へ濾過した。溶液A 68はインシュリノトロピン4.44 mg/mlをPBS中に含有していた。

20

【0237】

溶液B 68の調製

116 mg の硫酸プロタミンを10 ml のメスフラスコ中へ秤量した。約8 ml の注射用水をフラスコに添加して硫酸プロタミンを溶解した。フラスコにマークの位置まで注射用水を充填した。この溶液を0.22 μ のフィルター（蛋白質結合の低いもの）を通して10 ml のガラスバイアル中へ濾過した。溶液B 68はプロタミン塩基8.7 mg/mlを注射用水中に含有していた。

【0238】

溶液C 68の調製

156 mg の酢酸亜鉛・2水和物および440 g のフェノールを10 ml のメスフラスコ中へ秤量した。約8 ml の注射用水をフラスコに添加して酢酸亜鉛・2水和物およびフェノールを溶解した。フラスコにマークの位置まで注射用水を充填した。この溶液を0.22 μ のフィルター（蛋白質結合の低いもの）を通して10 ml のガラスバイアル中へ濾過した。溶液C 68は酢酸亜鉛・2水和物15.6 mg/mlおよびフェノール44 mg/mlを注射用水中に含有していた。

30

【0239】

水性懸濁液68

3 ml の溶液A 68、0.165 ml の溶液B 68および0.165 ml の溶液C 68を3.5 ml のタイプ1ガラスバイアル中へピペット注入した。バイアルの内容物を緩和に振盪して、確実に均質に混合した。バイアルを周囲温度に16時間静置した。水性懸濁液68はインシュリノトロピン4 mg/ml、プロタミン塩基0.435 mg/ml、酢酸亜鉛・2水和物0.78 mg/ml、およびフェノール2.2 mg/mlをPBS中に含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

40

【0240】

（実施例24）

インシュリノトロピン（4 mg/ml）懸濁液

溶液A 67の調製

22.2 mg のインシュリノトロピンを10 ml のガラスバイアル中へ秤量した。5 ml のPBSをバイアルにピペット注入して、薬物を溶解した。この溶液を0.22 μ のフィルター（蛋白質結合の低いもの）を通して10 ml のガラスバイアル中へ濾過した。溶

50

液 A 6 7 はインシュリノトロピン 4 . 4 4 m g / m l を P B S 中に含有していた。

【 0 2 4 1 】

溶液 B 6 7 の調製

1 1 6 m g の硫酸プロタミンを 1 0 m l のメスフラスコ中へ秤量した。約 8 m l の注射用水をフラスコに添加して硫酸プロタミンを溶解した。フラスコにマークの位置まで注射用水を充填した。この溶液を 0 . 2 2 μ のフィルター（蛋白質結合の低いもの）を通して 1 0 m l のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 B 6 7 はプロタミン塩基 8 . 7 m g / m l を注射用水中に含有していた。

【 0 2 4 2 】

溶液 C 6 7 の調製

1 5 6 m g の酢酸亜鉛・2水和物および 4 4 0 g の m - クレゾールを 1 0 m l のメスフラスコ中へ秤量した。約 8 m l の注射用水をフラスコに添加して酢酸亜鉛・2水和物および m - クレゾールを溶解した。フラスコにマークの位置まで注射用水を充填した。この溶液を 0 . 2 2 μ のフィルター（蛋白質結合の低いもの）を通して 1 0 / m l のガラスバイアル中へ濾過した。溶液 C 6 7 は酢酸亜鉛・2水和物 1 5 . 6 m g / m l および m - クレゾール 4 4 m g / m l を注射用水中に含有していた。

【 0 2 4 3 】

水性懸濁液 6 7

3 m l の溶液 A 6 7、0 . 1 6 5 m l の溶液 B 6 7 および 0 . 1 6 5 m l の溶液 C 6 7 を 3 . 5 m l のタイプ 1 ガラスバイアル中へピペット注入した。バイアルの内容物を緩和に振盪して、確実に均質に混合した。バイアルを周囲温度に 1 6 時間静置した。水性懸濁液 6 7 はインシュリノトロピン 4 m g / m l、プロタミン塩基 0 . 4 3 5 m g / m l、酢酸亜鉛・2水和物 0 . 7 8 m g / m l、および m - クレゾール 2 . 2 m g / m l を P B S 中に含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

【 0 2 4 4 】

（実施例 2 5）

溶液 A 3 9 の調製

6 7 . 6 m g のインシュリノトロピンをガラスバイアル中へ秤量した。約 2 2 m l の注射用水をバイアルに添加してインシュリノトロピンを溶解した。バイアル内容物の p H を N a O H により 9 . 6 に調整して、透明な溶液となした。注射用水をバイアルに添加して、最終薬物濃度を 2 . 5 m g / m l とした。

【 0 2 4 5 】

溶液 B 3 9 の調製

3 8 6 . 8 m g の酢酸亜鉛・2水和物を 1 0 0 m l のメスフラスコ中へ秤量した。約 8 0 m l の注射用水をフラスコに添加して酢酸亜鉛・2水和物を溶解した。フラスコにマークの位置まで注射用水を充填した。溶液 B 3 9 は酢酸亜鉛・2水和物 3 . 9 m g / m l を注射用水中に含有していた。

【 0 2 4 6 】

溶液 C 3 9 の調製

1 . 0 9 5 g のフェノールを 5 0 m l のメスフラスコ中へ秤量した。約 4 0 m l の注射用水をフラスコに添加してフェノールを溶解した。フラスコにマークの位置まで注射用水を充填した。溶液 C 3 9 はフェノール 2 1 . 9 m g / m l を注射用水中に含有していた。

【 0 2 4 7 】

溶液 D 3 9 の調製

2 . 2 5 g の N a C l を 2 5 m l のメスフラスコ中へ秤量した。約 2 0 m l の溶液 C 3 9 をフラスコに添加して N a C l を溶解した。フラスコにマークの位置まで溶液 C 3 9 を充填した。溶液 D 3 9 は N a C l 9 % (w / v) およびフェノール 2 1 . 9 m g / m l を注射用水中に含有していた。

【 0 2 4 8 】

水性懸濁液 3 9

10

20

30

40

50

すべての溶液を0.22μのフィルター（蛋白質結合の低いもの）を通して濾過した。9mlの溶液A39を10mlの試料バイアルに移した。緩和に攪拌しながら1mlの溶液B39をバイアルに添加した。直ちに沈澱が生じた。pHは7.0と測定された。バイアルを周囲温度に約18時間静置した。4mlの試料を別個の10mlのバイアルに移し、0.44mlの溶液D39をバイアルに添加した。試料を5分間緩和に攪拌し、次いで周囲温度に一夜静置した。

【0249】

水性懸濁液39はインシュリノトロピン2mg/ml、フェノール2.2mg/ml、NaCl 0.9%、および酢酸亜鉛0.39mg/mlを含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

10

【0250】

（実施例26）

溶液A53の調製

32.5mgのインシュリノトロピンを10mlのガラスバイアル中へ秤量した。6mlの注射用水をバイアルに添加した。バイアル内容物のpHを1%（w/v）NaOHにより9.6に調整して、透明な溶液となした。適量の注射用水を添加して、薬物濃度を5.0mg/mlとなした。

【0251】

溶液B53の調製

390mgの酢酸亜鉛・2水和物を50mlのメスフラスコ中へ秤量した。約40mlの注射用水をフラスコに添加して酢酸亜鉛・2水和物を溶解した。フラスコにマークの位置まで注射用水を充填した。溶液B53は酢酸亜鉛・2水和物7.8mg/mlを注射用水中に含有していた。

20

【0252】

水性懸濁液53

すべての溶液を0.22μのフィルター（蛋白質結合の低いもの）を通して濾過した。2.4mlの溶液A53を3.5mlのバイアルに移した。緩和に攪拌しながら300μlの溶液B53をバイアルに添加した。添加後、直ちに複屈折性沈澱が生じた。pHは6.8と測定された。バイアルを周囲温度に20時間静置したのち、7.5μlのm-クレゾールを沈降した懸濁液の上清に直接に添加した。次いで懸濁液を緩和に攪拌して、m-クレゾールを溶解した。300μlの9%NaCl溶液を攪拌下に懸濁液に添加した。水性懸濁液53はインシュリノトロピン4mg/ml、NaCl 0.9%、酢酸亜鉛0.78mg/ml、およびm-クレゾール2.5mg/mlを注射用水中に含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

30

【0253】

（実施例27）

溶液A54の調製

32.5mgのインシュリノトロピンを10mlのガラスバイアル中へ秤量した。6mlの注射用水をバイアルに添加した。バイアル内容物のpHを1%（w/v）NaOHにより9.6に調整して、透明な溶液となした。適量の注射用水を添加して、薬物濃度を5.0mg/mlとなした。

40

【0254】

溶液B54の調製

390mgの酢酸亜鉛・2水和物を50mlのメスフラスコ中へ秤量した。約40mlの注射用水をフラスコに添加して酢酸亜鉛・2水和物を溶解した。フラスコにマークの位置まで注射用水を充填した。溶液B54は酢酸亜鉛・2水和物7.8mg/mlを注射用水中に含有していた。

【0255】

溶液C54の調製

1.1gのフェノールおよび4.5gのNaClを50mlのメスフラスコ中へ秤量し

50

た。約 40 ml の注射用水を添加した。フラスコにマークの位置まで注射用水を充填した。溶液 C 5 4 はフェノール 22 mg / ml および NaCl 90 mg / ml を含有していた。

【0256】

水性懸濁液 5 4

すべての溶液を 0.22 μ のフィルター（蛋白質結合の低いもの）を通して濾過した。2.4 ml の溶液 A 5 4 を 3.5 ml のバイアルに移した。攪拌しながら 300 μ l の溶液 B 5 4 をバイアルに添加した。添加後、直ちに複屈折性沈殿が生じた。pH は 6.8 と測定された。試料を周囲温度に 20 時間静置した。300 μ l の溶液 C 5 4 を緩和な攪拌下に添加した。水性懸濁液 5 4 はインシュリノトロピン 4 mg / ml、酢酸亜鉛・2 水和物 0.78 mg / ml、フェノール 2.2 mg / ml、および NaCl 9 mg / ml を注射用水中に含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

10

【0257】

（実施例 28）

溶液 A 5 7 の調製

15 mg のインシュリノトロピンを 10 ml のガラスバイアル中へ秤量した。3 ml の注射用水をバイアルに添加した。バイアル内容物の pH を 5% NaOH により 9.9 に調整して、薬物を完全に溶解した。溶液 A 5 7 はインシュリノトロピン 5.0 mg / ml を注射用水中に含有していた。

20

【0258】

溶液 B 5 7 の調製

780 mg の酢酸亜鉛・2 水和物を 100 ml のメスフラスコ中へ秤量した。約 80 ml の注射用水をフラスコに添加して酢酸亜鉛・2 水和物を溶解した。フラスコにマークの位置まで注射用水を充填した。溶液 B 5 7 は酢酸亜鉛・2 水和物 7.8 mg / ml を注射用水中に含有していた。

【0259】

溶液 C 5 7 の調製

2.2 g のフェノールおよび 9 g の NaCl を 100 ml のメスフラスコ中へ秤量した。約 80 ml の注射用水をフラスコに添加して、フェノールおよび NaCl を溶解した。フラスコにマークの位置まで注射用水を充填した。溶液 C 5 7 はフェノール 22 mg / ml および NaCl 90 mg / ml を注射用水中に含有していた。

30

【0260】

水性懸濁液 5 7

2.4 ml の溶液 A 5 7 を 3.5 ml のバイアルに移した。300 μ l の溶液 B 5 7 を添加する際、溶液を緩和に攪拌した。溶液 B 5 7 の添加後、直ちに沈殿が生じた。pH を測定して 7.1 であることが認められた。試料を周囲温度に 24 時間静置した。300 μ l の溶液 C 5 7 を緩和な攪拌下に添加した。水性懸濁液 5 7 はインシュリノトロピン 4 mg / ml、酢酸亜鉛・2 水和物 0.78 mg / ml、フェノール 2.2 mg / ml、および NaCl 9 mg / ml を注射用水中に含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

40

【0261】

（実施例 29）

溶液 A 6 4 の調製

53.3 mg のインシュリノトロピンを 30 ml のガラスバイアル中へ秤量した。11 ml の注射用水を添加したのち、バイアル内容物の pH を 5% NaOH (w/v) により 8.3 に調整して、インシュリノトロピンを溶解した。溶液をなお確実に透明な状態に維持するために、希 HCl により pH を 6.0 に調整した。適量の注射用水を添加して、薬物濃度を 4.4 mg / ml とした。溶液 A 6 4 を 0.22 μ のフィルター（蛋白質結合の低いもの）を通して 3.5 ml の試料バイアル中へ濾過した。濾過した溶液 1.8 ml を別個の無菌 3.5 ml の試料バイアルに移し、バイアルを周囲温度に 3 日間静置して結

50

晶化させた。

【0262】

溶液B64の調製

780mgの酢酸亜鉛・2水和物を50mlのメスフラスコ中へ秤量した。約40mlの注射用水をフラスコに添加して酢酸亜鉛・2水和物を溶解した。フラスコにマークの位置まで注射用水を充填した。溶液B64は酢酸亜鉛・2水和物15.6mg/mlを注射用水中に含有していた。

【0263】

溶液C64の調製

18gのNaClを100mlのメスフラスコ中へ秤量した。約80mlの注射用水をフラスコに添加してNaClを溶解した。フラスコにマークの位置まで注射用水を充填した。溶液C64はNaCl 180mg/mlを注射用水中に含有していた。

10

【0264】

水性懸濁液64

溶液A64の結晶化が完了したのち、100μlの溶液B64を1.8mlの結晶懸濁液に徐々に攪拌しながら添加した。次いで試料を周囲温度に3日間静置した。100μlの溶液C64を結晶懸濁液に緩和な攪拌下で添加した。希NaOHにより懸濁液のpHをpH7.3に調整した。pH調整した結晶懸濁液に5.0μのm-クレゾールを直接に添加した。水性懸濁液64はインシュリノトロピン4mg/ml、酢酸亜鉛・2水和物0.78mg/ml、NaCl 9mg/ml、およびm-クレゾール2.5mg/mlを注射用水中に含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

20

【0265】

(実施例30)

溶液A69の調製

1gのNaClを100mlのメスフラスコ中へ秤量した。約80mlの注射用水をフラスコに添加してNaClを溶解した。フラスコにマークの位置まで注射用水を充填した。溶液A69はNaCl 1%(w/v)を注射用水中に含有していた。

【0266】

溶液B69の調製

390mgの酢酸亜鉛・2水和物を100mlのメスフラスコ中へ秤量した。約80mlの注射用水をフラスコに添加して酢酸亜鉛・2水和物を溶解した。フラスコにマークの位置まで注射用水を充填した。溶液B69は酢酸亜鉛・2水和物3.9mg/mlを注射用水中に含有していた。

30

【0267】

エマルジョンC69の調製

2.5mlの濾過した(0.22μ、蛋白質結合の低いもの)無菌m-クレゾールを100mlのメスフラスコ中へ移した。フラスコにマークの位置まで注射用水を充填し、音波処理して均質な懸濁液を調製した。エマルジョンC69はm-クレゾール25mg/mlを注射用水中に含有していた。

40

【0268】

水性懸濁液69

35.74mgのインシュリノトロピンを10mlのガラスバイアル中へ秤量した。7mlの溶液A69を添加した。バイアル内容物のpHを9.2に調整して、薬物を溶解した。希HClにより溶液のpHを6.5に再調整した。適量の注射用水を添加して、薬物濃度を4.4mg/mlとなした。この溶液を0.22μのフィルター(蛋白質結合の低いもの)を通して濾過した。溶液を周囲温度に6日間静置し、その間にインシュリノトロピンが結晶化した。1.5mlの結晶懸濁液を別個のバイアルに移した。167μlの溶液B69を緩和な攪拌下に添加した。試料を周囲温度に1日間静置した。167μlのエマルジョンC69を、沈降した懸濁液の上清に添加した。試料を攪拌して、m-クレゾールを溶解した。水性懸濁液69はインシュリノトロピン3.6mg/ml、酢酸亜鉛0.

50

36 mg/ml、NaCl 8.17 mg/ml、および m-クレゾール 2.28 mg/ml を注射用水中に含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

【0269】

(実施例 31)

溶液 A101 の調製

10 g の酢酸ナトリウムを 100 ml のメスフラスコ中へ秤量した。約 80 ml の注射用水をフラスコに添加して酢酸ナトリウムを溶解した。フラスコにマークの位置まで注射用水を充填した。溶液 A200 は酢酸ナトリウム 100 mg/ml を注射用水中に含有していた。

10

【0270】

水性懸濁液 101

44.4 mg のインシュリノトロピンを 10 ml のガラスバイアル中へ秤量した。8 ml の注射用水をフラスコに添加した。バイアル内容物の pH を 9.3 に調整して、透明な溶液を得た。1 ml の溶液 A200 をインシュリノトロピン溶液に添加した。次いで pH を 6.5 に調整した。この溶液を 0.22 μ のフィルター（蛋白質結合の低いもの）を通して濾過した。濾過した溶液を周囲温度に 3 日間静置して結晶化させた。水性懸濁液 101 はインシュリノトロピン 4.9 mg/ml、酢酸ナトリウム 11.1 mg/ml を注射用水中に含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

20

【0271】

(実施例 32)

溶液 A82 の調製

9 g の NaCl を 100 ml のメスフラスコ中へ秤量した。約 80 ml の注射用水をフラスコに添加して NaCl を溶解した。フラスコにマークの位置まで注射用水を充填した。溶液 A82 は NaCl 9% (w/v) を注射用水中に含有していた。

【0272】

溶液 B82 の調製

789 mg の酢酸亜鉛・2水和物を 100 ml のメスフラスコ中へ秤量した。約 80 ml の注射用水をフラスコに添加して酢酸亜鉛・2水和物を溶解した。フラスコにマークの位置まで注射用水を充填した。溶液 B82 は酢酸亜鉛・2水和物 7.89 mg/ml を注射用水中に含有していた。

30

【0273】

エマルジョン C82 の調製

2.5 ml の濾過した (0.22 μ、蛋白質結合の低いもの) 無菌 m-クレゾールを 100 ml のメスフラスコ中へ移した。フラスコにマークの位置まで注射用水を充填し、音波処理して均質な懸濁液を調製した。エマルジョン C82 は m-クレゾール 25 mg/ml を注射用水中に含有していた。

【0274】

水性懸濁液 82

すべての溶液を 0.22 μ のフィルター（蛋白質結合の低いもの）を通して濾過した。45.34 mg のインシュリノトロピンを 10 ml のバイアルに添加し、これに 8 ml の水を添加した。5% NaOH により pH を 9.3 に調整した。1 ml の溶液 A82 をバイアルに添加したのち、希 HCl により溶液の pH を 6.55 に調整した。この溶液（インシュリノトロピン 5 mg/ml）を 0.22 μ のフィルター（蛋白質結合の低いもの）を通して濾過した。81 μ l の水性懸濁液 101（実施例 31 参照）を、濾過した無菌インシュリノトロピン溶液に添加し、試料を振盪することにより分散させた。次いで試料を周囲温度に 72 時間静置して、結晶懸濁液を調製した。2.4 ml の懸濁液を 3.5 ml のバイアルに移した。300 μ l の溶液 B82 を緩やかな攪拌下にバイアルに添加した。バイアル内容物の pH を希 NaOH により 7.3 に調整した。300 μ l のエマルジョン C82 を、沈降した懸濁液の上清に添加した。水性懸濁液 82 はインシュリノトロピン 4 mg

40

50

/ml、酢酸亜鉛・2水和物 0.79 mg/ml、m-クレゾール 2.5 mg/ml、および NaCl 0.9% を注射用水中に含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

【0275】

(実施例33)

GLP-1(7-36)アミド(1 mg/ml)懸濁液

溶液A26の調製

溶液A26を下記により調製した。10 mgのGLP-1(7-36)アミドを5 mlのメスフラスコ中へ秤量した。約3 mlのPBSをフラスコに添加して薬物を溶解した。適量のPBSをフラスコに添加した。溶液A26を0.22 μmのフィルターを通して10 mlのガラスバイアル中へ濾過した。溶液A26はGLP-1(7-36) 2 mg/mlをPBS中に含有していた。

10

【0276】

溶液B26の調製

溶液B26を下記により調製した。44 mgのフェノールを10 mlのメスフラスコ中へ秤量した。約8 mlのPBSをフラスコに添加してフェノールを溶解した。適量のPBSをフラスコに添加した。溶液B26を0.22 μmのフィルターを通して10 mlのガラスバイアル中へ濾過した。溶液A26はフェノール 4.4 mg/mlをPBS中に含有していた。

【0277】

水性懸濁液26

1.5 mlの溶液A26を3.5 mlのタイプ1ガラスバイアル中へピペット注入した。バイアルの内容物を磁気攪拌し、その間に1.5 mlの溶液B26をバイアル中へピペット注入した。バイアルに栓をし、アルミニウムシェルでシールした。バイアル内容物を18時間緩和に攪拌して(泡またはバブルが確実に生じないようにする)懸濁液を形成させた。水性懸濁液26はGLP-1(7-36)アミド 1 mg/mlおよびフェノール 2.2 mg/mlをPBS中に含有していた。この懸濁液をラットにおいてインビボ薬物動態研究に用いた。

20

【0278】

(実施例34)

本発明の1形態においては、溶解度の低い形態のGLP-1(7-37)が下記により製造される。pH 7-8.5の緩衝液中 2-15 mg/mlのGLP-1(7-37)を金属イオン塩の溶液と混和して、1-8 mg/mlのGLP-1(7-37)を亜鉛:GLP-1(7-37)のモル比約1:1-270:1で含有する溶液を得る。重い沈澱が生成し、これを室温で一夜放置する。金属イオン溶液中におけるGLP-1(7-37)の溶解度は、用いる金属に応じて異なる。次いで、金属を含有しない溶剤、たとえばPBSまたは水中のGLP-1(7-37)ペレットの溶解度を測定して、亜鉛、コバルトおよびニッケルイオンが溶解度の低い形態のGLP-1(7-37)を形成することが示される。

30

【0279】

40

【表 1】

各種金属イオン塩が溶解度の低い形態の G L P - 1 (7 - 3 7) を形成する能力

金属イオン塩	金属溶液中での溶解度	P B S 中での溶解度
酢酸 Zn	0.04 $\mu\text{g/ml}$	0.04 $\mu\text{g/ml}$
塩化 Zn	0.04 $\mu\text{g/ml}$	0.03 $\mu\text{g/ml}$
塩化 Co	0.11 $\mu\text{g/ml}$	0.04 $\mu\text{g/ml}$
硫酸 Ni	0.14 $\mu\text{g/ml}$	0.07 $\mu\text{g/ml}$
塩化 Mn	0.23 $\mu\text{g/ml}$	1.64 $\mu\text{g/ml}$
塩化 Mg	1.75 $\mu\text{g/ml}$	沈殿なし
塩化 Ca	1.98 $\mu\text{g/ml}$	沈殿なし

10

【 0 2 8 0 】

注釈：それぞれの場合、5 m M の金属イオン溶液 1 0 0 μl を 5 m g / m l の G L P - 1 (7 - 3 7) 1 0 0 μl に添加し、混合し、一夜放置した。不溶性ペレットを遠心分離により除去した。金属イオン溶液中に残留する G L P - 1 (7 - 3 7) の濃度を測定した。ペレットをリン酸緩衝食塩液 (P B S) に再懸濁し、音波処理し、一夜放置した。再び不溶性物質をペレット化し、G L P - 1 (7 - 3 7) の濃度を測定した。

20

【 0 2 8 1 】

(実施例 3 5)

p H 7 - 8 . 5 の緩衝液中の G L P - 1 (7 - 3 7) の溶液を特定の組み合わせの塩類および低分子量ポリエチレングリコール (P E G) と混合することによって、微結晶質形態の G L P - 1 (7 - 3 7) が得られる。表 2 に微結晶質形態の G L P - 1 (7 - 3 7) を形成する特定の 7 組の条件を記載する。

【 0 2 8 2 】

【表 2】

30

微結晶を生成する特定の試薬

試薬 注	塩	緩衝液	沈殿剤
1	無	無	0.4M K, 酒石酸 Na
2	0.2M クエン酸 Na	0.1M Tris pH 8.5	30% PEG 400
3	0.2M MgCl_2	0.1M HEPES pH 7.5	28% PEG 400
4	0.2M MgCl_2	0.1M HEPES pH 7.5	30% PEG 400
5	0.5 M K_2HPO_4	無	20% PEG 8000
6	無	無	30% PEG 1500

40

【 0 2 8 3 】

注釈：5 0 m M T r i s (p H 8 . 1) 中の 5 m g / m l の G L P - 1 (7 - 3 7) 原液に試薬を 1 : 1 で添加した。液滴を観察し、結晶質または非晶質の形態の不溶性 G L P - 1 (7 - 3 7) の存否を採点した。一般に低分子量 P E G は結晶質形態を助成すると思われる。T r i s はトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタンであり、H E P E S は N

50

- 2 - (ヒドロキシエチル) ピペラジン - N - 2 - エタンスルホン酸である。

【 0 2 8 4 】

(実施例 3 6)

微結晶形態および高収率を得るためには、特定の組み合わせの G L P - 1 (7 - 3 7) および P E G の濃度が必要である。表 3 は非晶質ではなく微結晶質の形態の薬物を生成する特定の組み合わせの P E G 6 0 0 および G L P - 1 (7 - 3 7) の濃度を示す。不溶性形態の G L P - 1 (7 - 3 7) の収率も示される。

【 0 2 8 5 】

【表 3】

結晶質 G L P - 1 (7 - 3 7) の生成／収率

GLP-1(7-37)	15 PEG 600	22.5% PEG 600	30% PEG 600
2.0 mg/ml (形態/収率)	非晶質 /8%	非晶質 /10%	非晶質 /8%
3.5 mg/ml (形態/収率)	結晶質 /62%	結晶質 /26%	結晶質 /59%
5.0 mg/ml (形態/収率)	非晶質 /34%	結晶質 /63%	結晶質 /72%
6.5 mg/ml (形態/収率)	非晶質 /52%	結晶質 /76%	結晶質 /82%
8.0 mg/ml (形態/収率)	非晶質 /55	結晶質 /82%	非晶質 /66%
9.5 mg/ml (形態/収率)	非晶質 /69%	結晶質 /85%	非晶質 /83%

【 0 2 8 6 】

注釈： G L P - 1 (7 - 3 7) の微結晶が下記により生成する。 T r i s 緩衝液 (p H 8) 中の 2 0 m g / m l の G L P - 1 (7 - 3 7) 溶液、 H ₂ O 中の 6 0 % ポリエチレングリコール 6 0 0 (P E G 6 0 0) 、および T r i s 緩衝液 (p H 8) を混和して、最終濃度 1 5 - 3 0 % の P E G および 3 - 1 0 m g / m l の G L P - 1 を得る。一夜放置したのち、 G L P - 1 (7 - 3 7) の微結晶が溶液中に 5 0 - 8 5 % の収率で生成する。

【 0 2 8 7 】

(実施例 3 7)

この実験は、予め形成された G L P - 1 (7 - 3 7) の微結晶を各種金属イオンで処理して溶解度の低い微結晶形態を形成することによる、他の形態の本発明を例示する。実施例 2 2 の記載に従って 8 m g / m l の G L P - 1 (7 - 3 7) および 2 2 . 5 % P E G において製造された微結晶 G L P - 1 (7 - 3 7) は、純粋な凍結乾燥 G L P - 1 (7 - 3 7) に等しい溶解度をもつ。長時間作用形ドラッグデリバリーのために望まれる低溶解度という特性を付与するために、これらの予め形成された微結晶を金属塩の溶液で、金属： G L P - 1 (7 - 3 7) の比率 1 : 1 - 2 6 0 : 1 において、室温で一夜処理することができる。過剰の金属塩を遠心分離 / 洗浄処理により除去した。表 4 は処理剤として数種の 2 価カチオン金属塩を用いた結果を示す。

【 0 2 8 8 】

【表 4】

各種処理剤によるGLP-1(7-37)結晶の溶解度

添加物	GLP-1(7-37) (mg/ml) 処理液中	GLP-1(7-37) (mg/ml) PBS中	GLP-1(7-37) (mg/ml) PBS/EDTA 中
無 (PBS)	1.2	1.2	ND
クエン酸塩 pH 5.2	0.15	ND	ND
ZnCl ₂ pH 5.2	0.03	0.03	1.1
ZnAc pH 5.2	0.01	0.02	1.1
ZnAc pH 6.5	0.06	0.02	0.92
MgSO ₄ pH 5.2	0.50	0.55	ND
NiSO ₄ pH 5.2	0.10	0.04	0.45
MnCl ₂ pH 5.2	0.10	0.10	ND
CaCl ₂ pH 5.2	0.40	0.27	ND

10

20

【0289】

注釈：50 mM Tris (pH 8) 中の 8 mg/ml の IST に H₂O 中の 22.5 % PEG 600 を添加したものから、GLP-1(7-37) 結晶を生長させる。添加する処理剤溶液はすべて 10 mM クエン酸 Na (pH 5.2) または Na MES (pH 6.5) 中の 100 mM 2 価金属イオン塩である。

【0290】

(実施例 38)

本明細書に記載した方法により、酢酸亜鉛を用いて非晶質および微結晶質両方の低溶解度配合物を調製した。ラット（各配合物につき 3 匹の動物）に皮下注射を行い、GLP-1(7-37) の血漿中水準を 24 時間にわたってラジオイムノアッセイ法により測定した。図 8 は、対照の可溶性 GLP-1(7-37) 皮下注射と比較して、血漿中における薬物の持続性が延長したことを示す。

30

【0291】

(実施例 39)

45 % w/v ポリエチレングリコール 3350 (PEG)

1 mg/ml インシュリノトロピン

20 mM リン酸緩衝液

十分量の無菌注射用水 (SWFI)

SWFI を用いて 50 % w/w PEG 溶液を調製した。無水の二塩基性リン酸ナトリウム (26.85 mg/ml) および一塩基性リン酸ナトリウム・1水和物 (1.41 mg/ml) を用いて、別個に 200 mM リン酸緩衝液を調製した。必要に応じ水酸化ナトリウムまたは塩酸を用いて緩衝液の pH を pH 8 とした。インシュリノトロピンの 10 mg/ml 溶液を調製するのに適した量のインシュリノトロピンを十分量の緩衝液に溶解した。適切な重量の PEG 溶液をこのインシュリノトロピン溶液に添加し、かつ溶液を目的容量となすのに十分な量の SWFI を用いた。次いでこの最終溶液を 0.2 μm のフィルターで無菌的に濾過し、無菌的にバイアルに充填した。この溶液 (0.5 ml) をラットに皮下注射し、RIA アッセイ法により血漿中インシュリノトロピン水準を追跡した。

40

【0292】

(実施例 40)

50

1.32% w/v ヒドロキシエチルセルロース (H E C)
 1mg/ml インシュリノトロピン
 20mM リン酸緩衝液
 100mM 塩化ナトリウム
 十分量の無菌注射用水 (S W F I)

S W F Iを用いて2% w/w ヒドロキシエチルセルロース溶液を調製した。無水の二塩基性リン酸ナトリウム (26.85mg/ml) および一塩基性リン酸ナトリウム・1水和物 (1.41mg/ml) を用いて、別個に200mM リン酸緩衝液を調製した。必要に応じ水酸化ナトリウムまたは塩酸を用いて緩衝液のpHをpH8となした。インシュリノトロピンの10mg/ml溶液を調製するのに適した量のインシュリノトロピンおよび塩化ナトリウムを十分量の緩衝液に溶解した。適切な重量のH E C溶液をこのインシュリノトロピン溶液に添加し、かつ溶液を目的容量となすのに十分な量のS W F Iを用いた。次いでこの最終溶液を0.2μmのフィルターで無菌的に濾過し、無菌的にバイアルに充填した。この溶液 (0.5ml) をラットに皮下注射し、R I Aアッセイ法により血漿中インシュリノトロピン水準を追跡した。

10

【0293】

(実施例41)

18% w/v プルロニック (P l u r o n i c) F 1 2 7
 1mg/ml インシュリノトロピン
 20mM リン酸緩衝液
 十分量の無菌注射用水 (S W F I)

20

S W F Iを用いて20% w/w プルロニック F 1 2 7溶液を調製した。ポリマーを溶解するために氷浴を備えたポリトロン (P o l y t r o n、プローブホモジナイザー) を用いた。無水の二塩基性リン酸ナトリウム (26.85mg/ml) および一塩基性リン酸ナトリウム・1水和物 (1.41mg/ml) を用いて、別個に200mM リン酸緩衝液を調製した。必要に応じ水酸化ナトリウムまたは塩酸を用いて緩衝液のpHをpH8となした。インシュリノトロピンの10mg/ml溶液を調製するのに適した量のインシュリノトロピンを十分量の緩衝液に溶解した。適切な重量のプルロニック溶液をこのインシュリノトロピン溶液に添加し、かつ溶液を目的容量となすのに十分な量のS W F Iを用いた。次いでこの最終溶液を0.2μmのフィルターで無菌的に濾過し、無菌的にバイアルに充填した。この溶液 (0.5ml) をラットに皮下注射し、R I Aアッセイ法により血漿中インシュリノトロピン水準を追跡した。

30

【0294】

(実施例42)

ラッカセイ油懸濁液 (ボールミル処理)

1mg/ml インシュリノトロピン
 1% ツイーン (T w e e n) 8 0

ツイーン80を1%の量でラッカセイ油に添加した。この溶液を0.2μmのフィルターで無菌的に濾過した。次いで固体インシュリノトロピンをこの油に懸濁した。セズバリ・アトリッター (S z e s v a r i A t t r i t o r) を用いて40rpmで18時間ボールミル処理することにより (冷水ジャケット)、粒度を低下させた。次いでこの懸濁液をバイアルに充填した。この懸濁液 (0.5ml) をラットに皮下注射し、R I Aアッセイ法により血漿中インシュリノトロピン水準を追跡した。

40

【0295】

(実施例43)

22.6% w/v デキストラン
 1mg/ml インシュリノトロピン
 20mM リン酸緩衝液
 十分量の無菌注射用水 (S W F I)

S W F Iを用いて50% w/w デキストラン溶液を調製した。無水の二塩基性リン

50

酸ナトリウム (26.85 mg/ml) および一塩基性リン酸ナトリウム・1水和物 (1.41 mg/ml) を用いて、別個に 200 mM リン酸緩衝液を調製した。必要に応じ水酸化ナトリウムまたは塩酸を用いて緩衝液の pH を pH 8 とした。インシュリノトロピンの 5.0 mg/ml 溶液を調製するのに適した量のインシュリノトロピンを十分量の緩衝液に溶解した。適切な重量のデキストラン溶液をこのインシュリノトロピン溶液に添加し、かつ溶液を目的容量となすのに十分な量の SWFI を用いた。次いでこの最終溶液を 0.2 μm のフィルターで無菌的に濾過し、無菌的にバイアルに充填した。この溶液 (0.5 ml) をラットに皮下注射し、RIA アッセイ法により血漿中インシュリノトロピン水を追跡した。

【0296】

10

(実施例 44)

インシュリノトロピンをリン酸緩衝食塩液 (PBS)、エタノールおよび m-クレゾールの混合物から結晶化した。ガラスバイアル中に PBS を用いて均質なインシュリノトロピンのスラリー (10 mg/ml) を調製し、大容量 (スラリーの 9 倍) のエタノールをバイアルに添加し、その間にバイアル内容物を磁気攪拌した。インシュリノトロピンの極めて微細な非晶質粒子が生成した。得られる m-クレゾール濃度が 1% (v/v) となるように m-クレゾールを添加した。溶剤が蒸発するのを防止するためにバイアルに蓋をした。この結晶化混合物を室温に数日間保存した。非晶質粒子から針状結晶板が生長した。結晶の長さは 50 - 200 μm であり、幅は 2 - 4 μm である。

【0297】

20

(実施例 45)

インシュリノトロピン (1 - 4 mg/ml) を、8 より高い pH 値の 1% 硫酸ナトリウム (または酢酸ナトリウム、または塩化ナトリウムまたは硫酸アンモニウム) 溶液に溶解し、溶液の pH を d-HCl により 6.0 - 7.5 に低下させた。この透明な溶液を周囲温度に静置した。数日後に、結晶化条件に応じて針状または板状の結晶が得られた。

【0298】

(実施例 46)

0.1 - 0.2 M NaCl を含有する pH 8.5 - 9.5 の 50 mM グリシン緩衝液に、GLP-1 (7-37) を 1 - 5 mg/ml に溶解した。亜鉛塩 (酢酸塩または塩化物) の溶液を添加して、亜鉛 : GLP-1 (7-37) のモル比 0.5 : 1 - 1.5 : 1 を得た。GLP-1 (7-37) の結晶を室温で一夜生長させ、70 - 97% の収率を得た。

30

【0299】

(実施例 47)

GLP-1 (7-37) 結晶は、100 mM Tris (pH 8 - 9.5) に 10 - 20 mg/ml で溶解したペプチドを用いる蒸気拡散法により生長させることができる。このペプチド溶液を、0.5 - 2.5 M NaCl を含有する同一緩衝液と 1 : 1 で混合し、次いで密閉系内で未希釈緩衝液 (すなわち 0.5 - 2.5 M NaCl を含有する Tris) に対して平衡化した。

【0300】

40

(配列表)

配列番号：1

配列の長さ：37

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

10

ハイボセティカル配列：NO

アンチセンス：NO

フラグメント型：N末端フラグメント

起源

・生物名：N/A

・株名：N/A

20

・個体・単離クローン名：N/A

・ハプロタイプ：N/A

・セルライン：N/A

直接の起源

・ライブラリー名：N/A

・クローン名：N/A

30

ゲノム内での位置

・染色体／セグメント名：N/A

・染色体上の位置：N/A

・単位：N/A

配列

His Asp Glu Phe Glu Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val
 1 5 10 15
 Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu
 20 25 30
 Val Lys Gly Arg Gly
 35

配列番号： 2

10

配列の長さ： 31

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

ハイボセティカル配列：NO

20

アンチセンス：NO

フラグメント型：N末端フラグメント

起源

・生物名：N/A

・株名：N/A

・個体・単離クローン名：N/A

・ハプロタイプ：N/A

30

・セルライン：N/A

直接の起源

・ライブラリー名：N/A

・クローン名：N/A

ゲノム内での位置

・染色体／セグメント名：N/A

40

・染色体上の位置：N/A

・単位：N/A

配列

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

配列番号：3

配列の長さ：30

10

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

ハイポセティカル配列：NO

アンチセンス：NO

20

フラグメント型：N末端フラグメント

起源

・生物名：N/A

・株名：N/A

・個体・単離クローン名：N/A

・ハプロタイプ：N/A

・セルライン：N/A

30

直接の起源

・ライブラリー名：N/A

・クローン名：N/A

ゲノム内での位置

・染色体／セグメント名：N/A

・染色体上の位置：N/A

40

・単位：N/A

配列

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

配列番号：4

配列の長さ：29

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

ハイポセティカル配列：NO

アンチセンス：NO

フラグメント型：N末端フラグメント

起源

・生物名：N/A

・株名：N/A

・個体・単離クローン名：N/A

・ハプロタイプ：N/A

・セルライン：N/A

直接の起源

・ライブラリー名：N/A

・クローン名：N/A

ゲノム内での位置

・染色体/セグメント名：N/A

・染色体上の位置：N/A

配列

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly
20 25

配列番号：5

配列の長さ：28

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

ハイポセティカル配列：NO

アンチセンス：NO

フラグメント型：N末端フラグメント

起源

・生物名：N/A

・株名：N/A

・個体・単離クローン名：N/A

・ハプロタイプ：N/A

・セルライン：N/A

直接の起源

・ライブラリー名：N/A

・クローン名：N/A

ゲノム内での位置

・染色体/セグメント名：N/A

・染色体上の位置：N/A

配列

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys
20 25

配列番号：6

配列の長さ：36

10

20

30

40

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

ハイボセティカル配列：NO

アンチセンス：NO

フラグメント型：N末端フラグメント

10

起源

・生物名：N/A

・株名：N/A

・個体・単離クローン名：N/A

・ハプロタイプ：N/A

・セルライン：N/A

20

直接の起源

・ライブラリー名：N/A

・クローン名：N/A

ゲノム内での位置

・染色体/セグメント名：N/A

・染色体上の位置：N/A

配列

30

His Asp Glu Phe Glu Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val
1 5 10 15
Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu
20 25 30
Val Lys Gly Arg
35

配列番号：7

配列の長さ：27

40

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

ハイボセティカル配列：NO

アンチセンス：NO

フラグメント型：N末端フラグメント

起源

10

・生物名：N/A

・株名：N/A

・個体・単離クローン名：N/A

・ハプロタイプ：N/A

・セルライン：N/A

直接の起源

20

・ライブラリー名：N/A

・クローン名：N/A

ゲノム内での位置

・染色体／セグメント名：N/A

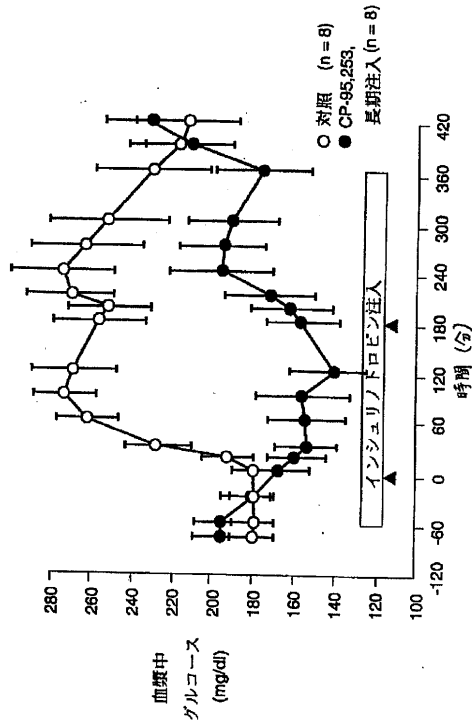
・染色体上の位置：N/A

配列

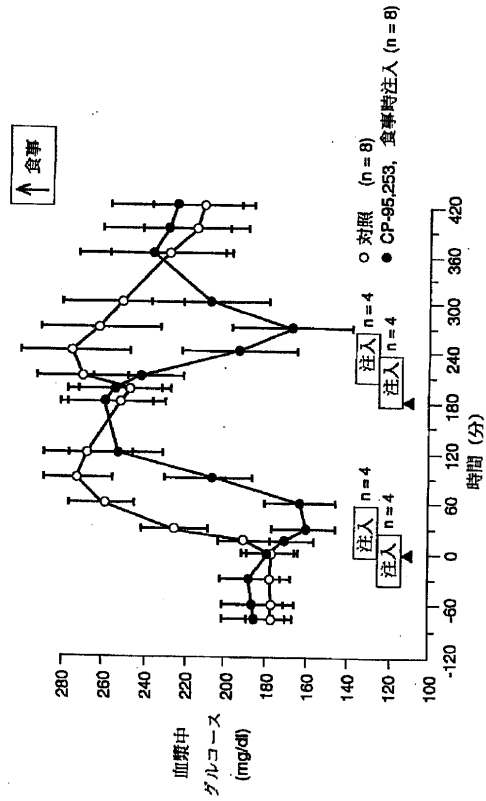
30

His	Ala	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	
Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val					
			20					25							

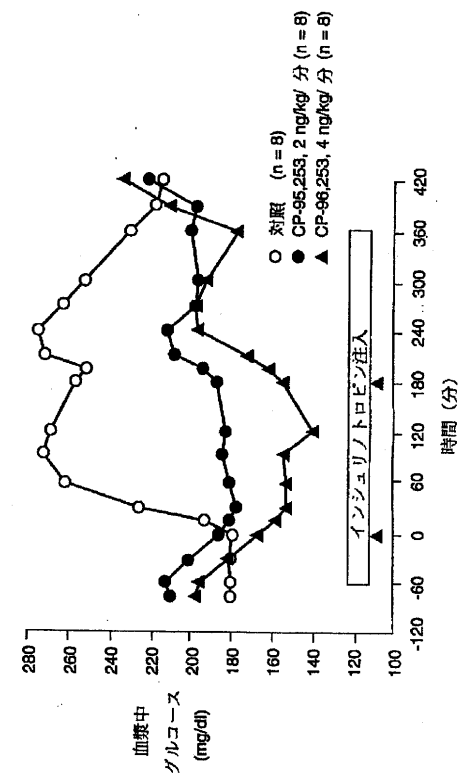
【図 1】



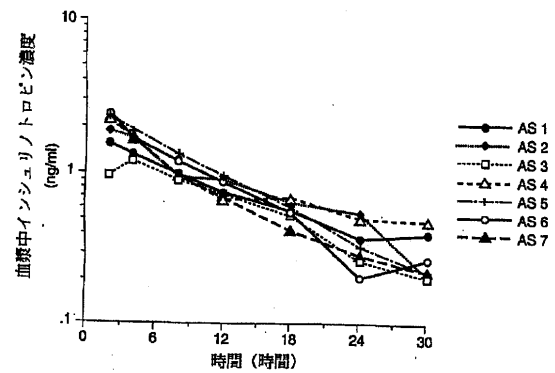
【図 2】



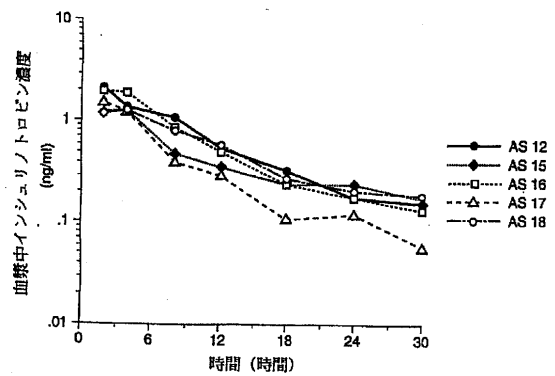
【図 3】



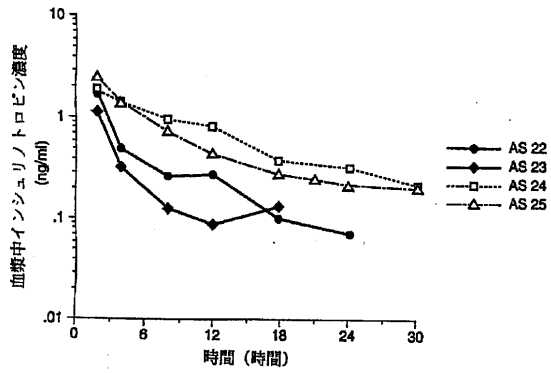
【図 4】



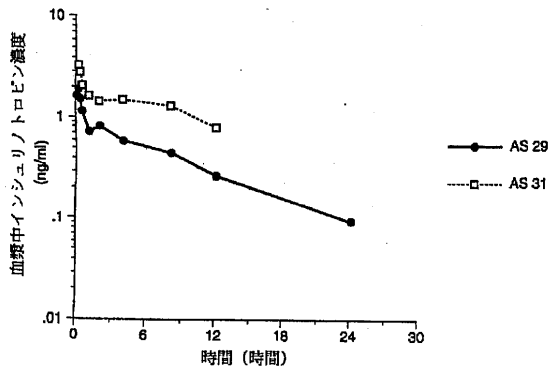
【図 5】



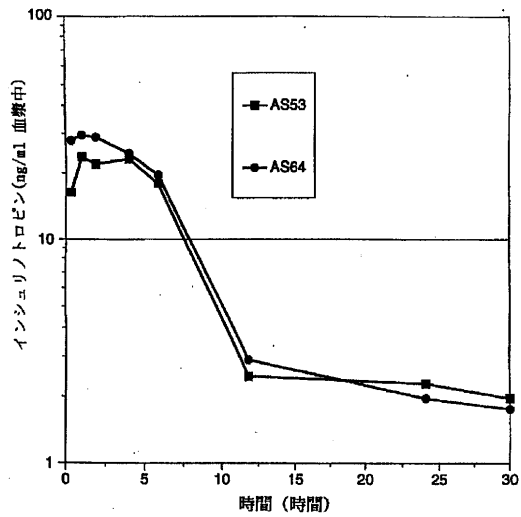
【図 6】



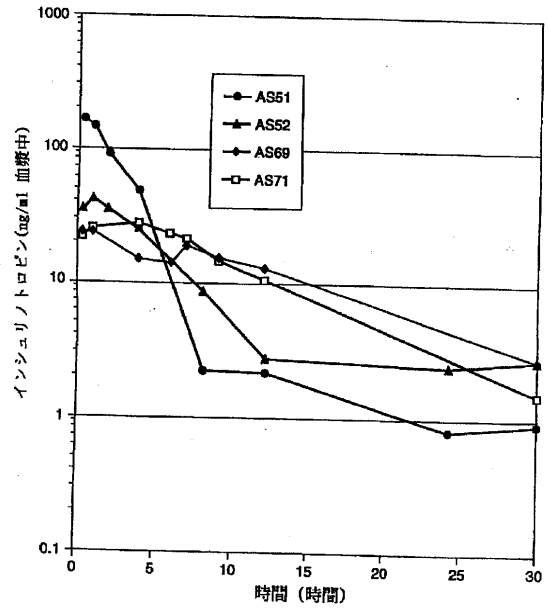
【図 7】



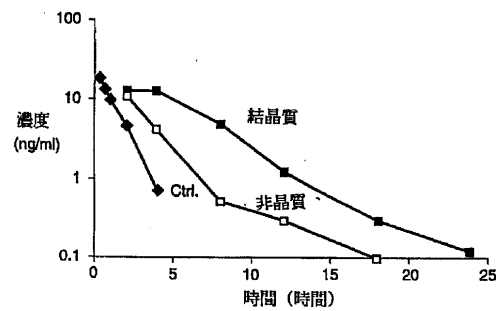
【図 9】



【図 8】



【図 10】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I										テーマコード (参考)										
A 6 1 K 47/14 (2006.01)											A 6 1 K 47/14										
A 6 1 K 47/10 (2006.01)											A 6 1 K 47/10										
A 6 1 K 47/02 (2006.01)											A 6 1 K 47/02										
A 6 1 K 47/42 (2006.01)											A 6 1 K 47/42										
A 6 1 K 9/72 (2006.01)											A 6 1 K 9/72										
A 6 1 K 9/10 (2006.01)											A 6 1 K 9/10										
A 6 1 K 9/127 (2006.01)											A 6 1 K 9/127										
(72)発明者	デニス・エドワード・ダンリー																				
	アメリカ合衆国コネチカット州 0 6 3 3 9 , レッドヤード , リー・ブルック・ドライブ 8																				
(72)発明者	ロバート・アラン・ジェルファン																				
	アメリカ合衆国コネチカット州 0 6 4 4 3 , マディソン , ランディ・ドライブ 1 0 0																				
(72)発明者	キーラン・フランシス・ジョグヘガン																				
	アメリカ合衆国コネチカット州 0 6 3 5 5 , ミスティック , フォート・レイチェル・プレイス 1 4																				
(72)発明者	イエソーク・キム																				
	アメリカ合衆国コネチカット州 0 6 4 0 5 , ブランフォード , クアリー・ドック・ロード 4 7																				
(72)発明者	ウィリアム・ジョセフ・ランバート																				
	アメリカ合衆国コネチカット州 0 6 3 3 3 , イースト・ライム , スプリング・ロック・ロード 1 7																				
(72)発明者	ホン・クウィ																				
	アメリカ合衆国コネチカット州 0 6 3 4 0 , グロートン , メリディアン・ストリート 2 9 0 , ユニット 1																				
F ターム (参考)	4C076	AA19	AA22	AA93	AA94	AA95	BB01	BB04	BB15	BB16	BB25										
		BB31	CC30	DD22	DD37	DD45	EE30	EE41	EE53	FF31	FF68										
	4C084	AA02	BA01	BA08	BA19	BA23	CA59	DB35	MA01	MA05	MA23										
		MA24	MA52	MA59	MA63	MA66	NA10	NA12	ZC031	ZC032	ZC351										