(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0042304
(43) 공개일자 2015년04월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/16 (2006.01) *A61K 9/19* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/16 (2013.01)
A61K 31/496 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7008571(분할)
(22) 출원일자(국제) 2007년04월16일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2014-7011316
원출원일자(국제) 2007년04월16일
심사청구일자 2014년05월23일
(85) 번역문제출일자 2015년04월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2007/066728
(87) 국제공개번호 WO 2007/121411
국제공개일자 2007년10월25일
(30) 우선권주장
60/744,882 2006년04월14일 미국(US)

(71) 출원인
맨카인드 코포레이션
미합중국 캘리포니아 91355 발렌시아 28903 노스 애비뉴 패인
(72) 발명자
그리네 스테파니
미국 캘리포니아주 93004 벤츄라 헤르모사 스트리트 7940
브란트 데이비드
미국 캘리포니아주 발렌시아 헤르모사 스트리트 7940
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진희, 김태홍

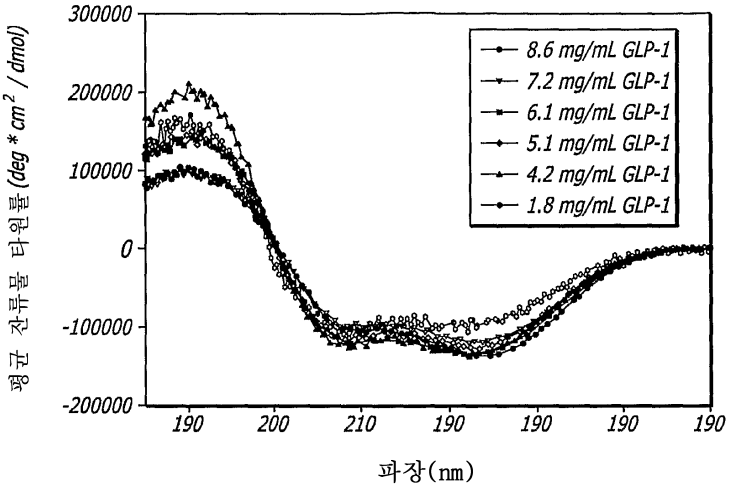
전체 청구항 수 : 총 43 항

(54) 발명의 명칭 **글루카곤 유사 펩타이드 1 (GLP-1) 약제학적 제제**

(57) 요 약

본 발명은 글루카곤 유사 펩타이드 1 (GLP-1) 입자를 시험관내 및 생체내 둘 다에서 안정한 디케토피페라진(DKP)과 배합하여 포함하는 조성물을 개시한다. 본 조성물은 당뇨병, 암 및 비만증과 같으나 이러한 질환 또는 질병에 한정되지 않는 질환을 치료하기 위한 약제학적 제제로서의 유용성을 가진다. 특히, 본 조성물은 폐 전달을 위한 약제학적 제제로서의 유용성을 가진다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
A61K 38/26 (2013.01)
A61K 9/19 (2013.01)
(72) 발명자
겔베르 코하바
미국 버지니아주 20109 마나사스 라운치 서클 #303 10330
킹 마크
미국 캘리포니아주 91106 파사데나 엔. 미시간 애브뉴 626
치트햄 웨이맨 웬델
미국 미들랜드주 21045 콜롬비아 블랙 체리 서클 6218
오베르그 케이트
미국 캘리포니아주 91355 발렌시아 엘 가토 플레이스 25850
레온-베이 안드레아
미국 코네티컷주 06977 리지필드 플로리다 힐 로드 297
호킨슨 마크 제이.
미국 캘리포니아주 91354 발렌시아 메이페어 드라이브 28337
패리스 메리
미국 캘리포니아주 90077 로스 앤젤레스 알마덴 코트 2538

명 세 서

청구범위

청구항 1

GLP-1 분자 및 디케토피페라진 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 건조 분말 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 GLP-1 분자는 천연 GLP-1, GLP-1 대사산물, GLP-1 유사체, GLP-1 유도체, 디펩티딜-펩티다아제-IV (DPP-IV) 보호된 GLP-1, GLP-1 모방체, GLP-1 펩타이드 유사체 및 생합성 GLP-1 유사체로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 건조 분말 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 디케토피레라진은 화학식 2,5-디케토-3,6-디(4-X-아미노부틸)피페라진을 가진 디케토피페라진이고, 여기서 상기 X는 숙시닐, 글루타릴, 말레일 및 푸마릴로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 건조 분말 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 디케토피페라진 염을 포함하는 건조 분말 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 디케토피페라진이 2,5-디케토-3,6-디(4-푸마릴-아미노부틸)피페라진인 건조 분말 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 GLP-1 분자가 천연 GLP-1인 건조 분말 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 GLP-1 분자가 아미드화된 GLP-1 분자인 건조 분말 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 아미드화된 GLP-1 분자가 GLP-1 (7-36) 아미드인 건조 분말 조성물.

청구항 9

GLP-1 분자 및 디케토피페라진을 포함하는 입자를 형성하는 방법으로서,

GLP-1 분자를 제공하는 단계;

입자-형성 디케토피페라진, 디케토피페라진 입자 및 이들의 배합물 중에서 선택된 형태의 디케토피레라진을 제공하는 단계; 및

상기 GLP-1 분자 및 상기 디케토피페라진을 공용액의 형태로 배합하여 상기 GLP-1 분자 및 상기 디케토피페라진을 포함하는 입자를 형성하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 동결건조, 여과 또는 분무 건조에 의해 상기 공용액으로부터 용매를 제거하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 GLP-1 분자 및 상기 디케토피페라진을 포함하는 상기 입자는 상기 용매를 제거함으로써 형성되는 것인 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 GLP-1 분자 및 상기 디케토피페라진을 포함하는 상기 입자는 상기 용매를 제거하기 전에 형성되는 것인 방법.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 GLP-1 분자는 천연 GLP-1, GLP-1 유사체, GLP-1 유도체, 디펩티딜-펩티다아제-IV (DPP-IV) 보호된 GLP-1, GLP-1 모방체, GLP-1 펩타이드 유사체 및 생합성 GLP-1 유사체로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 방법.

청구항 14

제9항에 있어서, 상기 GLP-1 분자는 약 1 ㎍/㎖-50 ㎎/㎖의 GLP-1 농도를 포함하는 용액의 형태로 제공되는 것인 방법.

청구항 15

제9항에 있어서, 상기 GLP-1 분자는 약 0.1 ㎎/㎖-10 ㎎/㎖의 GLP-1 농도를 포함하는 용액의 형태로 제공되는 것인 방법.

청구항 16

제9항에 있어서, 상기 GLP-1 분자는 약 0.25 ㎎/㎖의 GLP-1 농도를 포함하는 용액의 형태로 제공되는 것인 방법.

청구항 17

제9항에 있어서, 상기 디케토피페라진은 디케토피페라진 입자의 현탁액의 형태로 제공되는 것인 방법.

청구항 18

제9항에 있어서, 상기 디케토피페라진은 입자-형성 디케토피페라진을 포함하는 용액의 형태로 제공되고, 상기 방법은 상기 용액의 pH를 조정하여 디케토피페라진 입자를 형성하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 용액 또는 현탁액에 제제를 첨가하는 단계로서, 여기서 제제는 염, 계면활성제, 이온, 오스몰라이트(osmolyte), 카오트로프(chaotrope) 및 리오트로프(lyotrope), 산, 염기 및 유기 용매로 구성된 군 중에서 선택되는 것인 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 제제는 상기 GLP-1 분자와 상기 디케토피페라진 입자 또는 상기 입자-형성 디케토피페라진 사이의 회합을 촉진하는 것인 방법.

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 제제는 상기 GLP-1 분자의 안정성 또는 약역학을 개선하는 것인 방법.

청구항 22

제19항에 있어서, 상기 제제가 염화나트륨인 방법.

청구항 23

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 현탁액 또는 용액의 pH를 조정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 pH는 약 4 또는 그 이상으로 조정되는 것인 방법.

청구항 25

제9항에 있어서, 상기 입자내에서 상기 GLP-1 분자는 보다 큰 안정성를 가지는 것인 방법.

청구항 26

제9항에 있어서, 상기 공용액은 약 1 ㎍/㎖-50 ㎎/㎖의 GLP-1 농도를 포함하는 것인 방법.

청구항 27

제9항에 있어서, 상기 공용액은 약 0.1 ㎎/㎖-10 ㎎/㎖의 GLP-1 농도를 포함하는 것인 방법.

청구항 28

제9항에 있어서, 상기 공용액은 약 0.25 ㎎/㎖의 GLP-1 농도를 포함하는 것인 방법.

청구항 29

제9항에 있어서, 상기 공용액에 제제를 첨가하는 단계로서, 여기서 제제는 염, 계면활성제, 이온, 오스몰라이트, 카오트로프 및 리오트로프, 산, 염기 및 유기 용매로 구성된 군 중에서 선택되는 것인 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 제제는 상기 GLP-1 분자와 상기 디케토피페라진 입자 또는 상기 입자-형성 디케토피페라진 사이의 회합을 촉진하는 것인 방법.

청구항 31

제29항에 있어서, 상기 제제는 상기 GLP-1 분자의 안정성 또는 약역학을 개선하는 것인 방법.

청구항 32

제29항에 있어서, 상기 제제가 염화나트륨인 방법.

청구항 33

제9항에 있어서, 상기 공용액의 pH를 조정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 pH는 약 4 또는 그 이상으로 조정되는 것인 방법.

청구항 35

GLP-1 분자를 필요로 하는 대상에게 유효량의 GLP-1 분자를 투여하는 방법으로서, 상기 대상에게 GLP-1 및 디케토피페라진을 포함하는 입자를 제공하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 제공 단계는 정맥내, 피하, 경구, 비강, 구강, 직장 또는 폐 전달에 의해 수행되는 것인 방법.

청구항 37

제35항에 있어서, 상기 제공 단계는 폐 전달에 의해 수행되는 것인 방법.

청구항 38

제35항에 있어서, 상기 필요로 하는 것은 당뇨병, 허혈, 재관류 조직 손상, 이상지혈증, 당뇨병성 심근병증, 심근 경색증, 급성 관상동맥 증후군, 비만증, 수술후 이화작용의 변화, 고혈당증, 과민성 대장 증후군, 뇌졸중, 신경변성 장애, 기억 및 학습 장애, 섬 세포 이식 및 재생 치료로 이루어진 군 중에서 선택된 질병 또는 질환의 치료를 포함하는 것인 방법.

청구항 39

제35항에 있어서, 상기 입자의 공급은 천연 GLP-1과 비교시 GLP-1의 개선된 약물동태학적 반감기 및 생체이용효율을 생성하는 것인 방법.

청구항 40

GLP-1의 약물동태학적 프로파일이 개선된 분말 조성물을 형성하는 방법으로서,

GLP-1 분자를 제공하는 단계;

입자-형성 디케토피페라진을 용액으로 제공하는 단계;

디케토피페라진 입자를 형성하는 단계;

상기 GLP-1 분자 및 상기 용액을 배합하여 공용액을 형성하는 단계; 및

분무-건조에 의해 상기 공용액으로부터 용매를 제거하여 GLP-1의 약물동태학적 프로파일이 개선된 분말을 형성하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 개선된 GLP-1의 약물동태학적 프로파일은 증가된 GLP-1 반감기를 포함하는 것인 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 증가된 GLP-1 반감기는 7.5 분과 동일하거나 그 이상인 것인 방법.

청구항 43

제40항에 있어서, 상기 개선된 GLP-1의 약물동태학적 프로파일은 천연 GLP-1과 비교시 개선된 GLP-1 생체이용효율을 포함하는 것인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련출원의 상호참조**

[0002] 본 출원은 2003년 7월 22일 출원된 미국 특허출원 제10/632,878호의 일부 계속 출원으로서, 35 U.S.C. § 119(e) 하에 2006년 4월 14일 출원된 미국 가출원 제60/744,882호의 이익을 청구한다. 각각의 상기 언급된 우선권 출원은 그의 전체내용이 본원에 참고로 포함된다.

[0003] **발명의 분야**

[0004] 본 발명은 약제학적 제제의 분야에 관한 것이다. 본 발명은 글루카곤 유사 펩타이드 1 (GLP-1)과 함께 디케토피페라진(DKP, diketopiperazine) 입자를 포함하는 건조 분말 제제를 개시한다. 본 발명은 당뇨병, 암 및 비만증과 같으나 이들 질환에 한정되지 않는 질환을 치료하기 위한 약제학적 제제로서의 유용성을 가진다. 보다 특히, 본 발명은 폐 전달(pulmonary delivery)을 위한 약제학적 제제(pharmaceutical formulation)로서의 유용성을 가진다.

배 경 기 술

[0005] 문헌에 개시된 글루카곤 유사 펩타이드 1 (GLP-1)은 음식물로부터의 단백질, 탄수화물 섭취 및 지방에 반응하여

장내 내분비(intestinal endocrine) L-세포로부터 방출된 30 개 또는 31 개의 아미노산 인크레틴(incretin)이다. 이러한 펩타이드 호르몬의 분비는 그것으로 하여금 이러한 질환 및 다른 관련 질환들을 치료하기 위한 강력한 후보자가 되도록 하는 2형 당뇨병을 가진 개체에서 악화되는 것으로 밝혀졌다.

[0006] 비질환 상태에서, GLP-1은 장관 및 뇌에 대한 다른 효과뿐만 아니라 간으로부터의 글루카곤 방출의 억제, 이자로부터의 음식물-유도 인슐린 방출의 자극 및 경구 섭취된 영양소(특히, 당)에 반응하여 장내 L-세포로부터 분비된다. 이자에서의 GLP-1 효과는 포도당 의존적인 것으로서, 외인성 펩타이드를 투여하는 동안 저혈당의 위험을 최소화한다. GLP-1은 또한 인슐린 생합성의 모든 단계를 촉진하고 β-세포 분화뿐만 아니라 β-세포 성장 및 생존을 직접적으로 자극한다. 이러한 효과들의 배합은 β-세포괴(cell mass)를 증가시킨다. GLP-1 수용체 신호전달은 β-세포 세포자멸사를 감소시키는데, 이것 또한 β-세포괴의 증가에 기여한다.

[0007] 위장관에서, GLP-1은 위장 운동(GI motility)을 억제하고, 포도당에 반응하여 인슐린의 분비를 증가시키며, 글루카곤의 분비를 감소시키는데, 이로써 포도당 일탈의 감소에 기여한다. GLP-1의 중추 투여(central administration)는 설치류에서의 음식물 섭취를 억제하는 것으로 나타났는데, 이는 말초적으로 방출된 GLP-1이 뇌에 직접적으로 영향을 미칠 수 있다는 것을 제시하는 것이다. 이것은, 순환하는 GLP-1이 특정의 뇌 구역, 즉 뇌궁하부기관 및 최하구역에서 GLP-1 수용체를 이용할 수 있는 것으로 되어 있기 때문에 실행가능하다. 뇌의 이러한 구역은 식욕 및 에너지 항상성의 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다. 흥미롭게도, 위 확장(gastric distension)은 고립로(solitary tract)의 미상핵(caudal nucleus)에 있는 GLP-1 함유 신경을 활성화시켜, 중심적으로 발현된 GLP-1의 식욕 억제제로서의 역할이 예측된다. 이러한 가설은 반대 효과를 보인 GLP-1 수용체 길항제 엑센딘(exendin)(9-39)을 사용하는 연구에 의해 뒷받침된다. 인간에서, 투여된 GLP-1은 포만 효과를 가지는데(Verdich et al., 2001), 6 주간 연속적 피하 주입 요법에 의해 제공된 경우 당뇨병 환자의 식욕이 감소된 것으로 나타났고, 이로 인해 체중의 유의적인 감소가 야기되었다(Zander et al., 2002).

[0008] GLP-1은 또한 연속적 정맥내 주입으로서 제공된 경우 인슐린 분비를 증가시키고 공복시 혈당 및 식후 혈당 모두를 정상화시키기 때문에 2형 당뇨병을 가진 환자에 있어서 효과적인 것으로 나타났다(Nauck et al., 1993). 또한, GLP-1을 주입하면 설포닐우레아 치료법 실패후 인슐린 치료법이 필요한 환자 및 비인슐린성 경구 의약으로 사전 치료한 환자의 포도당 수준을 낮추는 것으로 나타났다(Nauck et al., 1993). 그러나, 당업계에 언급되어 있으며 본원에 이하에 논의되는 바와 같이, GLP-1의 단일 피하 주입의 효과는 기대에 어긋나는 결과를 제공하였다. 면역반응성 GLP-1의 높은 혈장 수준은 달성되었지만, 치료전 수치 및 혈당 농도로 신속하게 회복된 인슐린 분비는 표준화되지 않았다(Nauck et al., 1996). 반복된 피하 투여가 수행된 경우에만 정맥내 투여에 필적하는 효과를 공복시 혈당에 미쳤다(Nauck et al., 1996). 6 주간 연속적 피하 투여는 공복시 및 식후 포도당 농도를 감소시키고 HbA1c 수준을 낮추는 것으로 나타났다(Zander et al., 2002). GLP-1의 단일 피하 주사의 일시적인 유효성은 그것의 순환상의 불안정성과 관련이 있다. GLP-1은 시험관내에서 혈장에 의해 대사되고, 효소 디펩티딜 펩티다아제-IV(dipeptidyl peptidase -IV, DPP-IV)는 이러한 분해에 관여하는 것으로 나타났다(Mentlein et al., 1993).

[0009] 당뇨병에 있어서 GLP-1의 생리학적 중요성 및 외인성 GLP-1이 건강한 대상 및 2형 당뇨병 대상 모두에서 신속하게 아미노-말단 분해된다는 실증에 의해, 당뇨병 치료용 항당뇨병 제제에 대한 신규한 접근법으로서 GLP-1의 생체내 안정성의 조작 가능성이 많은 연구에서 다루어졌다(Deacon et al., 2004). 두 가지의 독립된 방법이 수행되었다: 1) 효소적으로 분해되기 어려운 GLP-1 유사체를 개발하는 방법 및 2) 선택적 효소 억제제를 사용하여 생체내 분해를 방지하고 무손상 생물활성 펩타이드의 수준을 증대시키는 방법. "인크레틴 모방체" 라 불리며 내분해성을 띠는 장기작용성(long-acting) GLP-1 유사체{예, 리라글루티드[Liraglutide, 덴마크 코펜하겐 소재 노보 노르디스크(Novo Nordisk)]; 엑세네이티드[exenatide(엑센딘-4; Byetta®) (캘리포니아 샌디에고 소재 아밀린 인코포레이션(Amylin Inc.)) 및 (엑세네이티드-LAR, 인디애나 인디애나폴리스 소재 엘리 릴리(Eli Lilly))]}가 임상 시험에서 연구되었다. 인크레틴 분해에 관여하는 효소를 억제하는 디펩티딜 펩티다아제 IV 억제제[예, 스위스 바젤 소재 노파르티스(Novartis)에 의해 개발된 빌다글립틴(Vildagliptin)(Galvus) 및 뉴저지 화이트하우스 스테이션 소재 머크(Merck)에 의해 개발된 자누비아(Januvia)(sitagliptin)]가 또한 연구중에 있다(Deacon et al., 2004). 따라서, 낮은 저혈당 성향과 함께 다양한 방식의 GLP-1 작용(예, 인슐린 방출의 증가, 위내용배출의 지연 및 포만감 증가)이 현재 이용가능한 치료법에 이점을 제공하는 것으로 보인다.

[0010] 그러나, GLP-1 치료법에 있어서의 이러한 접근/진보에도 불구하고, 현재 당뇨병에 이용가능한 약물 중 어느 것도 모든 환자에게서 치료 표적(HbA1c, 공복시 혈당, 포도당 일탈)을 달성할 수 없고 이들은 모두 독성, 저혈당, 체중 증가, 구역 및 구토로 인한 스트레스와 같은 부작용이 있다. 따라서, 약제로서 투여시 장기간 유효성 및

최적 흡수성을 가진 안정한 GLP-1 제제에 대한 필요성이 당업계에 여전히 존재한다.

발명의 내용

[0011] **발명의 개요**

[0012] 당업계에 있어서 약제로서 사용하기에 안정한 흡입가능한(inhalable) 글루카곤 유사 펩타이드 1 (GLP-1) 제제는 부족하다. 당업계에서의 이러한 불충분한 점을 극복함에 있어서, 본 발명은 약제로서 디케토피페라진(DKP) 입자와 배합된 GLP-1의 제제를 제공한다.

[0013] 따라서, 본 발명의 특정의 구체예에서, GLP-1 분자 및 디케토피페라진 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 건조 분말 조성물이 제공된다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 건조 분말 조성물은 천연 GLP-1, GLP-1 대사산물, GLP-1 유사체, GLP-1 유도체, 디펩티딜-펩티다아제-IV (DPP-IV) 보호된 GLP-1, GLP-1 모방체, 엑센딘, GLP-1 펩타이드 유사체 및 생합성 GLP-1 유사체로 이루어진 군 중에서 선택된 GLP-1 분자를 포함한다. 본 발명의 또 다른 추가의 구체예에서, 건조 분말 조성물은 화학식 2,5-디케토-3,6-디(4-X-아미노부틸)피페라진을 가진 디케토피페라진을 포함하고, 여기서 X는 숙시닐, 글루타릴, 말레일 및 푸마릴로 이루어진 군 중에서 선택된다. 또 다른 구체예에서, 건조 분말 조성물은 디케토피페라진 염을 포함한다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 디케토피페라진이 2,5-디케토-3,6-디(4-푸마릴-아미노부틸)피페라진인 건조 분말 조성물이 제공된다.

[0014] 본 발명은 GLP-1 분자가 천연 GLP-1 또는 아미드화된 GLP-1 분자인 건조 분말 조성물을 고려한 것이며, 여기서 아미드화된 GLP-1 분자는 GLP-1 (7-36) 아미드이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 특정의 구체예에서, LP-1 분자 및 디케토피페라진을 포함하는 입자의 제조 방법으로서, GLP-1 분자를 포함하는 GLP-1 용액을 제공하는 단계; 입자-형성 디케토피페라진의 용액 또는 디케토피페라진 입자의 현탁액을 제공하는 단계; 및 GLP-1 용액을 디케토피페라진 용액 또는 현탁액과 배합하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 본 발명의 다른 특정의 구체예에서, GLP-1 분자 및 디케토피페라진을 포함하는 입자의 제조 방법은 동결건조, 여과 또는 분무 건조에 의해 용액 또는 현탁액으로부터 용매를 제거하는 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 추가의 구체예에서, 본 발명의 입자는 용매 제거에 의해 형성되거나 용매 제거 이전에 형성된다.

[0016] 본 발명의 구체예에서, GLP-1 분자 및 디케토피페라진을 가진 입자의 제조 방법에 있어서, 상기 GLP-1 분자는 천연 GLP-1, GLP-1 유사체, GLP-1 유도체, 디펩티딜-펩티다아제-IV (DPP-IV) 보호된 GLP-1, GLP-1 모방체, 엑센딘, GLP-1 펩타이드 유사체 및 생합성 GLP-1 유사체로 이루어진 군 중에서 선택된다. 다른 구체예에서, GLP-1 분자 및 디케토피페라진을 가진 입자의 제조 방법은 입자의 현탁액으로서 제공된 디케토피페라진을 포함한다. 추가의 구체예에서, 상기 디케토피페라진은 용액으로 제공되고, 상기 방법은 용액의 pH를 조정하여 디케토피페라진을 침전시키고 입자를 형성하는 단계를 포함한다.

[0017] 본 발명의 다른 특정의 구체예에서, GLP-1 용액의 농도는 약 1 ㎍/㎖-50 ㎎/㎖, 더욱 바람직하게는 약 0.1 ㎎/㎖-10 ㎎/㎖이다. 본 발명의 또 다른 특정의 구체예에서, GLP-1 용액의 농도는 약 0.25 ㎎/㎖이다.

[0018] GLP-1 분자 및 디케토피페라진을 포함하는 입자의 또 다른 제조 방법에 있어서, 상기 방법은 상기 용액에 제제를 첨가하는 단계로서, 여기서 제제는 염, 계면활성제, 이온, 오스몰라이트(osmolyte), 카오트로프(chaotrope) 및 리오트로프(lyotrope), 산, 염기 및 유기 용매로 구성된 군 중에서 선택되는 것인 단계를 추가로 포함한다. 제제는 GLP-1 분자와 디케토피페라진 입자 사이의 회합을 촉진하며, 또한 GLP-1 분자의 안정성 및/또는 약역학(pharmacodynamics)을 개선한다. 본 발명의 일부 구체예에서, 상기 제제는 염화나트륨과 같지만 이에 한정되지 않는 염이다. 상기 제제는 Tween, Triton, 플루론산(pluronic acid), CHAPS, 세트리미드(cetrimide) 및 Brij, $H(CH_2)_7SO_4Na$와 같으나 이들에 한정되지 않는 계면활성제일 수 있는 것으로 고려된다. 상기 제제는 이온, 예를 들어 양이온 또는 음이온일 수 있다. 상기 제제는 헥실렌-글리콜(Hex-Gly), 트레할로스, 글리신, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 트리메틸아민 n-옥사이드(TMAO), 만니톨 및 프롤린과 같으나 이들에 한정되지 않는 오스몰라이트(안정화제)일 수 있다. 상기 제제는 염화세슘, 시트르산나트륨 및 황산나트륨과 같으나 이들에 한정되지 않는 리오트로프 또는 카오트로프일 수 있다. 상기 제제는 유기 용매, 예를 들어 메탄올(MeOH), 에탄올(EtOH), 트리플루오로에탄올(TFE) 및 헥사플루오로이소프로판올(HFIP) 중에서 선택된 알코올일 수 있다.

[0019] 본 발명의 또 다른 특정의 구체예에서, GLP-1 분자 및 디케토피페라진을 포함하는 입자의 제조 방법이 고려되며, 여기서 방법은 입자 현탁액의 pH를 약 4 또는 그 이상으로 조정하는 단계를 포함한다. 본 발명의 추가의 구체예에서, 입자의 제조 방법은 GLP-1 분자 및 디케토피페라진을 포함하며, 여기서 입자내에서 상기 GLP-1 분자는 보다 큰 안정성을 갖는다.

[0020] GLP-1 분자를 필요로 하는 대상에게 유효량의 GLP-1 분자를 투여하는 방법으로서, 상기 대상에게 GLP-1/디케토피페라진 입자를 제공하는 단계를 포함하는 방법 추가로 고려된다. 투여 방법은 정맥내, 피하, 경구, 비강, 구강, 직장일 수 있거나 폐 전달에 의할 수 있으나 이들에 한정되지 않는다. 하나의 구체예에서, 투여 방법은 폐 전달에 의한다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 투여 방법은 당뇨병, 허혈, 재관류 조직 손상, 이상지혈증, 당뇨병성 심근병증, 심근 경색증, 급성 관상동맥 증후군, 비만증, 수술후 이화작용의 변화, 고혈당증, 과민성 대장 증후군, 뇌졸중, 신경변성 장애, 기억 및 학습 장애, 섬세포 이식 및 재생 치료로 이루어진 군 중에서 선택된 질병 또는 질환을 치료하는 단계를 포함한다.

[0021] 본 발명의 또 다른 구체예에서, GLP-1/디케토피페라진 입자 조성물의 투여 방법은 GLP-1의 약물동태학적 반감기 및 생체이용효율을 개선시킨다.

[0022] 본 발명의 또 다른 추가의 특정 구체예에서, 약물동태학적 프로파일이 개선된 건조 분말 조성물의 제조 방법으로서, GLP-1 분자의 용액을 제공하는 단계; 입자-형성 디케토피페라진을 제공하는 단계; 입자를 형성하는 단계; GLP-1 및 디케토피페라진을 배합하는 단계; 및 이후 건조 방법에 의해 용매를 제거하여 약물동태학적 프로파일이 개선된 건조 분말을 수득하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 개선된 약물동태학적 프로파일은 GLP-1 반감기의 증가 및/또는 GLP-1 생체이용효율의 개선을 포함한다. GLP-1 반감기의 증가는 7.5 분 보다 크거나 같다.

[0023] 본 발명의 하나의 구체예에서, GLP-1 분자 및 디케토피페라진 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 건조 분말 조성물이 제공된다. 또 다른 구체예에서, GLP-1 분자는 천연 GLP-1, GLP-1 대사산물, GLP-1 유사체, GLP-1 유도체, 디펩티딜-펩티다아제-IV (DPP-IV) 보호된 GLP-1, GLP-1 모방체, GLP-1 펩타이드 유사체 및 생합성 GLP-1 유사체로 이루어진 군 중에서 선택된다.

[0024] 본 발명의 구체예에서, 상기 디케토피페라진은 화학식 2,5-디케토-3,6-디(4-X-아미노부틸)피페라진을 가진 디케토피페라진이며, 여기서 X는 숙시닐, 글루타릴, 말레일 및 푸마릴로 이루어진 군 중에서 선택된다. 또 다른 구체예에서, 상기 디케토피페라진은 디케토피페라진 염이다. 또 다른 구체예에서, 상기 디케토피페라진은 2,5-디케토-3,6-디(4-푸마릴-아미노부틸)피페라진이다.

[0025] 본 발명의 구체예에서, 상기 GLP-1 분자는 천연 GLP-1이다. 또 다른 구체예에서, 상기 GLP-1 분자는 아미드화된 GLP-1 분자이다. 또 다른 구체예에서, 아미드화된 GLP-1 분자는 GLP-1 (7-36) 아미드이다.

[0026] 본 발명의 하나의 구체예에서, GLP-1 분자 및 디케토피페라진을 포함하는 입자를 형성하는 방법으로서, 상기 GLP-1 분자를 제공하는 단계; 입자-형성 디케토피페라진, 디케토피페라진 입자 및 그의 배합물 중에서 선택된 형태로 디케토피페라진을 제공하는 단계; 및 GLP-1 분자 및 디케토피페라진을 공용액의 형태로 배합하여 GLP-1 분자 및 디케토피페라진을 포함하는 입자를 형성하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

[0027] 본 발명의 하나의 구체예에서, 상기 방법은 동결건조, 여과 또는 분무 건조에 의해 상기 공용액으로부터 용매를 제거하는 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 구체예에서, 상기 GLP-1 분자 및 디케토피페라진을 포함하는 입자는 용매를 제거함으로써 형성된다. 또 다른 구체예에서, GLP-1 분자 및 디케토피페라진을 포함하는 입자는 용매를 제거하기 이전에 형성된다.

[0028] 또 다른 구체예에서, 상기 GLP-1 분자는 천연 GLP-1, GLP-1 유사체, GLP-1 유도체, 디펩티딜-펩티다아제-IV (DPP-IV) 보호된 GLP-1, GLP-1 모방체, GLP-1 펩타이드 유사체 및 생합성 GLP-1 유사체로 이루어진 군 중에서 선택된다. 또 다른 구체예에서, 상기 GLP-1 분자는 약 1 ㎍/㎖-50 ㎎/㎖의 GLP-1 농도를 포함하는 용액의 형태로 제공된다. 또 다른 구체예에서, 상기 GLP-1 분자는 약 0.1 ㎎/㎖-10 ㎎/㎖의 GLP-1 농도를 포함하는 용액의 형태로 제공된다. 또 다른 구체예에서, 상기 GLP-1 분자는 약 0.25 ㎎/㎖의 GLP-1 농도를 포함하는 용액의 형태로 제공된다.

[0029] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 디케토피페라진은 디케토피페라진 입자의 현탁액의 형태로 제공된다. 또 다른 구체예에서, 상기 디케토피페라진은 입자-형성 디케토피페라진을 포함하는 용액의 형태로 제공되고, 상기 방법은 용액의 pH를 조정하여 디케토피페라진 입자를 형성하는 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 구체예에서, 상기 방법은 상기 용액 또는 현탁액에 제제를 첨가하는 단계로서, 여기서 제제는 염, 계면활성제, 이온, 오스몰라이트, 카오트로프 및 리오트로프, 산, 염기 및 유기 용매로 구성된 군 중에서 선택되는 것인 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 구체예에서, 상기 제제는 GLP-1 분자와 디케토피페라진 입자 또는 입자-형성 디케토피페라진 사이의 회합을 촉진한다. 또 다른 구체예에서, 상기 제제는 상기 GLP-1 분자의 안정성 또는 약역학을 개선한다. 또 다른 구체예에서, 상기 제제는 염화나트륨이다.

[0030] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 방법은 현탁액 또는 용액의 pH를 조정하는 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 구체예에서, 상기 pH는 약 4.0 또는 그 이상으로 조정된다. 또 다른 구체예에서, 입자내 GLP-1 분자는 천연 GLP-1 보다 안정성이 더 크다.

[0031] 또 다른 구체예에서, 상기 공용액은 약 1 ㎍/㎖-50 mg/㎖의 GLP-1 농도를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 상기 공용액은 약 0.1 mg/㎖-10 mg/㎖의 GLP-1 농도를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 상기 공용액은 약 0.25 mg/㎖의 GLP-1 농도를 포함한다.

[0032] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 방법은 상기 공용액에 제제를 첨가하는 단계로서, 여기서 제제는 염, 계면활성제, 이온, 오스몰라이트, 카오트로프 및 리오트로프, 산, 염기 및 유기 용매로 구성된 군 중에서 선택되는 것인 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 구체예에서, 상기 제제는 GLP-1 분자 및 디케토피페라진 또는 입자-형성 디케토피페라진 사이의 회합을 촉진한다. 또 다른 구체예에서, 상기 제제는 GLP-1 분자의 안정성 또는 약역학을 개선한다. 또 다른 구체예에서, 상기 제제는 염화나트륨이다.

[0033] 또 다른 구체예에서, 상기 방법은 공용액의 pH를 조정하는 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 구체예에서, 상기 pH는 약 4.0 또는 그 이상으로 조정된다.

[0034] 본 발명의 하나의 구체예에서, GLP-1 분자를 필요로 하는 대상에게 유효량의 GLP-1 분자를 투여하는 방법으로서, 상기 대상에게 GLP-1 및 디케토피페라진을 포함하는 입자를 제공하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 또 다른 구체예에서, 제공 단계는 정맥내, 피하, 경구, 비강, 구강, 직장, 또는 폐 전달에 의해 수행된다. 또 다른 구체예에서, 제공 단계는 폐 전달에 의해 수행된다.

[0035] 또 다른 구체예에서, 상기 필요는 당뇨병, 허혈, 재관류 조직 손상, 이상지혈증, 당뇨병성 심근병증, 심근 경색증, 급성 관상동맥 증후군, 비만증, 수술후 이화작용의 변화, 고혈당증, 과민성 대장 증후군, 뇌졸중, 신경변성 장애, 기억 및 학습 장애, 섬세포 이식 및 재생 치료로 이루어진 군 중에서 선택된 질병 또는 질환의 치료를 포함한다.

[0036] 또 다른 구체예에서, 입자의 제공은 천연 GLP-1과 비교시 GLP-1의 개선된 약물동태학적 반감기 및 생체이용효율을 생성한다.

[0037] 본 발명의 하나의 구체예에서, GLP-1의 약물동태학적 프로파일이 개선된 분말 조성물을 형성하는 방법으로서, GLP-1 분자를 제공하는 단계; 입자-형성 디케토피페라진의 용액을 제공하는 단계; 디케토피페라진 입자를 형성하는 단계; GLP-1 분자와 상기 용액을 배합하여 공용액을 형성하는 단계; 및 분무 건조에 의해 공용액으로부터 용매를 제거하여 GLP-1의 약물동태학적 프로파일이 개선된 분말을 형성하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

[0038] 또 다른 구체예에서, 개선된 GLP-1의 약물동태학적 프로파일은 GLP-1 반감기의 증가를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 상기 GLP-1 반감기의 증가는 7.5 분 보다 크거나 같다. 또 다른 구체예에서, 개선된 GLP-1의 약물동태학적 프로파일은 천연 GLP-1과 비교시 개선된 GLP-1의 생체이용효율을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0039] 다음의 도면은 본 명세서의 일부를 형성하며, 본 발명의 특정 양태를 더 잘 설명하기 위해 포함된다. 본 발명은 본원에 제시된 특정 구체예의 상세한 설명과 함께 도면 중 하나 이상을 참조함으로써 더 잘 이해될 수 있다.

도 1A-1D는 다양한 농도의 GLP-1에 대한 구조 분석을 나타낸다(pH 4, 20℃). 도 1A는 GLP-1의 원자외선 원편광 이색성(원편광 이색성, CD)을 나타낸 것으로, 이것은 농도가 증가함에 따라 펩타이드의 이차 구조가 우세한 구조가 없는 형상에서 나선형 형상으로 변형된다는 것을 설명한다. 도 1B는 근자외선 CD를 나타낸 것으로, 펩타이드의 농도가 증가함에 따라 삼차 구조가 증가하는데, 이는 GLP-1이 자기회합하는 것을 제시하는 것이다. 도 1C는 280 ㎚의 트립토판 여기에 의해 생성된 다양한 농도의 GLP-1에 대한 형광 방출을 나타낸다(pH 4, 20℃). 도 1D는 다양한 농도의 GLP-1에 대한 투과 FTIR을 나타낸다(pH 4, 20℃). 1656 cm^{-1}에서의 아미드 I 밴드는 GLP-1이 2 mg/㎖와 같거나 큰 농도로 α-나선형 구조를 가진다는 것을 나타낸다.

도 2A-2D는 다양한 이온 세기에서 저농도 GLP-1의 구조 분석을 나타낸다(pH 4, 20℃). 도 2A는 1.0 mg/㎖ GLP-1의 원자외선 CD를 나타낸 것으로서, 이것은 염의 농도가 증가함에 따라 GLP-1의 불규칙적인 구조가 보다 규칙적인 α-나선형 구조로 전환된다는 것을 나타낸다. 도 2B는 1.0 mg/㎖ 펩타이드의 근자외선 CD를 나타낸 것으로서, 이는 NaCl 농도를 증가시키면 역시 GLP-1의 삼차 구조가 증대된다는 것을 설명하는 것이다. 도 2C는 280 ㎚의 트립토판 여기 이후 다양한 NaCl 농도에서 1.0 mg/㎖ GLP-1의 고유 형광 방출을 나타낸다(pH 4, 20℃). 높은

펩타이드 농도에서, 최대는 그 세기가 감소하고 낮은 파장으로 이동하는데, 이것은 명확하게 한정된(well-defined) 삼차 구조를 나타낸다. 도 2D는 다양한 이온 세기에서 10 mg/mℓ GLP-1의 삼차 구조 분석을 나타낸다(pH 4, 20℃). 근자외선 CD 스펙트럼은 이온 세기가 증가하면 자기-회합 GLP-1의 삼차 구조가 증대한다는 것을 설명하는 것이다.

도 3A-3B는 다양한 온도에서 10 mg/mℓ GLP-1의 구조 분석을 나타낸다(pH 4). 도 3A는 근자외선 CD를 나타낸 것으로서, 이것은 온도가 증가함에 따라 GLP-1 올리고머가 분리된다는 것을 나타낸다. 도 3B는 다양한 온도에서 10 mg/mℓ GLP-1의 구조 분석을 나타낸다(pH 4). 도 3C는 다양한 온도에서 0.05 mg/mℓ GLP-1의 구조 분석을 나타낸다(pH 4). 원자외선 CD는 펩타이드가 온도에 민감하지 않다는 것을 나타낸다.

도 4A-4B는 다양한 pH에서 GLP-1의 구조 분석을 나타낸다(20℃). 도 4A는 다양한 pH에서 10 mg/mℓ GLP-1의 원자외선 CD를 나타낸다(20℃). pH가 증가함에 따라 자가-회합된 GLP-1은 pH 6.3 내지 7.6 사이에서 침전하지만 pH 1.5 및 11.7에서는 나선형 구조를 유지한다. 도 4B는 pH 7.6에서 스펙트럼이 확장되는 것을 나타낸 것으로, 이것은 농도 감소의 결과로서 GLP-1의 이차 구조가 불규칙하다는 것을 입증한다.

도 5는 HPLC에 의해 입증된 탈아미드화 및 산화 모두에 대한 1 mg/mℓ GLP-1의 내성을 나타낸다. 탈아미드화 조건은 GLP-1을 pH 10.5, 40℃에서 5 일동안 인큐베이션함으로써 달성되었다. 산화 조건은 GLP-1을 실온에서 2 시간동안 0.1% H_2O_2에서 인큐베이션함으로써 달성되었다.

도 6A-6B는 1.5 및 9.4 mg/mℓ GLP-1(pH 4)의 삼차 구조에 대한 교반의 효과를 나타낸다. GLP-1의 근자외선 CD(도 6A) 및 형광 방출(도 6B) 모두는 GLP-1 펩타이드의 삼차 구조가 교반에 의해 유의적으로 변화하지 않는 것을 나타낸다. 시료는 실온에서 30 분 및 90 분동안 교반하였고, 형광 방출 스펙트럼은 280 nm에서 트립토판 여기후 수집하였다.

도 7A-7C는 1.6, 5.1 및 8.4 mg/mℓ GLP-1(pH 4)의 삼차 구조에 대한 10회 동결-해동 사이클의 효과를 나타낸다. GLP-1의 근자외선 CD(도 7A) 및 형광 방출(도 7B) 모두는 펩타이드의 삼차 구조가 복수의 동결-해동 사이클에 의해 크게 변화하지 않는 것을 보여준다. 시료는 -20℃에서 동결시키고 실온에서 해동하였다. 형광 방출 스펙트럼은 280 nm에서 트립토판 여기후 수집하였다. 원자외선 CD에 의해 10 mg/mℓ GLP-1(pH 4)의 이차 구조에 대한 11회 동결-해동 사이클의 효과를 보여주는 유사한 실험을 수행하였다(도 7C).

도 8A-8B는 염 연구를 나타낸다. 도 8A는 pH 및 NaCl 농도의 함수로서 GLP-1/FDKP에 대한 로딩 곡선이다. 로딩은 5 mg/mℓ FDKP 및 0.25 mg/mℓ GLP-1로 수행하였다. NaCl 농도는 mM으로 나타내었다. 도 8B는 pH 및 NaCl 농도의 함수로서 재구성 FDKP-무함유 대조군 시료에서 검출된 GLP-1의 양을 도시하였다.

도 9A-9B는 계면활성제 연구를 나타낸다. 도 9A는 pH 및 계면활성제의 함수로서 GLP-1/FDKP에 대한 로딩 곡선이다. 로딩은 5 mg/mℓ FDKP 및 0.25 mg/mℓ GLP-1로 수행하였다. 도 9B는 pH 및 첨가된 계면활성제의 함수로서 재구성 FDKP-무함유 대조군 시료에서 검출된 GLP-1의 양을 도시하였다.

도 10A-10D는 이온 연구를 나타낸다. pH 및 이온의 함수로서 GLP-1/FDKP에 대한 로딩 곡선이다. 로딩은 5 mg/mℓ FDKP 및 0.25 mg/mℓ GLP-1로 수행하였다(도 10A 및 도 10C). 이온 농도는 부호(mM)로 나타내었다. 우측 곡선은 1M NaCl에 대한 결과를 도시한 것이다. 도 10B 및 10D는 pH, 이온 및 1M NaCl의 함수로서 재구성 FDKP-무함유 대조군 시료에서 검출된 GLP-1의 양을 도시한 것이다.

도 11A-11B는 오스몰라이트 연구를 나타낸다. 통상의 안정화제의 존재하에 pH의 함수로서 GLP-1/FDKP에 대한 로딩 곡선이다(오스몰라이트; 도 11A). 로딩은 5 mg/mℓ FDKP 및 0.25 mg/mℓ GLP-1로 수행하였다. 도 11B는 pH 및 오스몰라이트의 함수로서 재구성 FDKP-무함유 대조군 시료에서 검출된 GLP-1의 양을 도시한 것이다. "N/A"는 오스몰라이트가 시료에 존재하지 않음을 나타낸다.

도 12A-12B는 카오트로프/리오트로프 연구를 나타낸다. pH 3.0(도 12A) 및 pH 4.0(도 12C)에서 카오트로프 또는 리오트로프 농도의 함수로서 GLP-1/FDKP에 대한 로딩 곡선이다. 로딩은 5 mg/mℓ FDKP 및 0.25 mg/mℓ GLP-1로 수행하였다. 도 12B 및 도 12D는 다양한 카오트로프 또는 리오트로프의 존재하에 pH의 함수로서 재구성 FDKP-무함유 대조군 시료에서 검출된 GLP-1의 양을 나타낸다. "N/A"는 카오트로프 또는 리오트로프가 시료에 존재하지 않음을 나타낸다.

도 13A-13B는 알코올 연구를 나타낸다. pH 및 알코올의 함수로서 GLP-1/FDKP에 대한 로딩 곡선이다. 로딩은 5 mg/mℓ FDKP 및 0.25 mg/mℓ GLP-1로 수행하였다. 각각의 알코올 5%, 10%, 15% 및 20% v/v에 대하여 4 개의 알코올 농도를 평가하였다(도 13A). TFE=트리플루오로에탄올; HFIP=헥사플루오로이소프로판올. 도 13B는 pH 및 알코

올(20%)의 함수로서 재구성 FDKP-무함유 대조군 시료에서 검출된 GLP-1의 양을 나타낸다.

도 14A-14B에서, 도 14A는 GLP-1/FDKP 농도 연구로부터의 로딩을 나타낸 것으로, 로딩은 5 ㎎/㎖ FDKP에서 수행되었고, 분석된 GLP-1 농도는 X-축에 열거하였다. 도 14B는 복수의 GLP-1/FDKP 제제의 주사 전자 현미경(SEM) 이미지(10000배 확대)를 나타낸 것으로서, 이는 구형상 및 봉형상의 GLP-1/FDKP 입자 제제의 클러스터를 나타낸 것이다. (패널 A) 0.5 ㎎/㎖ GLP-1 및 2.5 ㎎/㎖ FDKP; (패널 B) 0.5 ㎎/㎖ GLP-1 및 10 ㎎/㎖ FDKP; (패널 C) 20 mM 염화나트륨, 20 mM 아세트산칼륨 및 20 mM 인산칼륨 중 0.5 ㎎/㎖ GLP-1 및 10 ㎎/㎖ FDKP, pH 4.0; 및 (패널 D) 20 mM 염화나트륨, 20 mM 아세트산칼륨 및 20 mM 인산칼륨 중 10 ㎎/㎖ GLP-1 및 50 ㎎/㎖ FDKP, pH 4.0.

도 15는 복수의 GLP-1/FDKP 제제에 대한 응력의 효과를 나타낸 것이다. 부호는 동결건조 이전에 용액 중에 존재한 FDKP 입자 및 나머지 성분에 대한 GLP-1의 질량대질량 비율을 가리킨다. 시료는 40℃에서 10 일동안 인큐베이션하였다.

도 16A-16C는 GLP-1의 구조를 나타낸다. 도 16A는 GLP-1의 글리신-확장된 형태(서열번호 1) 및 아미드화된 형태(서열번호 2)를 나타낸 것이다. 도 16B는 아프로티닌(aprotinin)에 의한 DPPIV 활성의 억제를 나타낸다. 도 16C는 DPPIV 억제제에 의한 DPPIV 활성의 억제를 나타낸다.

도 17은 폐 세척액 중에서 인큐베이션한 후 GLP-1의 검출을 나타낸다.

도 18A-18B는 혈장내 GLP-1의 정량을 나타낸 것이다. 도 18A는 1:2 혈장 희석액에서의 정량을 나타낸다. 도 18B는 1:10 혈장 희석액에서의 정량을 나타낸다.

도 19A-19B는 세포 생존율에 대한 GLP-1 및 GLP-1 유사체의 효과를 나타낸다. 도 19A는 래트의 이자 상피(ARIP) 세포사에 대한 GLP-1의 효과를 나타낸다. 도 19B는 단일 제제 또는 병용 제제로서 스타우로스포린(Stau, staurosporine) 및 GLP-1의 존재하에서 세포자멸사의 억제를 묘사한 아넥신 V 염색을 나타낸다. GLP-1의 농도는 15 nM이고 스타우로스포린의 농도는 1 ㎛M이다.

도 20은 세포 생존율에 대한 GLP-1 유사체 엑센딘-4의 효과를 나타낸다. ARIP 세포는 16, 24 및 48 시간동안 0, 10, 20 및 40 nM 엑센딘 4로 처리하였다.

도 21은 스타우로스포린-유도 세포사에 대한 복수의 GLP-1/FDKP 제제의 효과를 나타낸다. GLP-1 시료로 예비처리한 ARIP 세포를 5 ㎛M 스타우로스포린에 4 시간동안 노출시킨 다음 Cell Titer-Glo™으로 분석하여 세포 생존율을 측정하였다. 시료는 4℃ 및 40℃에서 4 주동안 응력을 가하였다. 우측에 도시된 대조군 시료(Media, GLP-1, STAU, GLP+STAU)는 배지(GLP-1 또는 스타우로스포린 무함유, GLP-1 함유, 스타우로스포린 함유 및 GLP-1과 스타우로스포린 함유)에서 세포의 생존율을 나타낸다(주: 그래프의 부호는 대조군 시료에 적용하지 않음). 도시된 모든 결과는 삼중으로 수행한 값의 평균이다.

도 22A-22B는 다양한 농도의 GLP-1/FDKP 제제를 사용하여 래트에서의 단일 정맥내 주입(IV; 도 22A) 및 폐 통기(insufflation(IS); 도 22B)를 묘사한 약물동태학적 연구를 나타낸다. 부호는 분석된 제제에 대하여 FDKP 입자에 대한 GLP-1의 질량대질량 비율을 가리킨다.

도 23A-23B는 GLP-1/FDKP 제제를 투여한 래트에서 투여하고 2 시간후(도 23A) 및 6 시간후(도 23B) 누적 음식물 소비량의 감소를 나타낸다.

도 24는 비만한 수컷 주커 래트(Zucker rat)에서 폐 통기를 통해 투여된 GLP-1/FDKP의 약물동태학적 연구를 나타낸다. 데이터는 대조군(공기; 그룹 1) 및 GLP-1/FDKP 처리군(그룹 2)에 대한 0, 15, 30, 45, 60 및 90 분에서의 포도당 측정을 나타낸 것이다.

도 25는 비만한 수컷 주커 래트에서 폐 통기를 통해 투여된 GLP-1/FDKP의 약물동태학적 연구를 나타낸다. 데이터는 대조군(공기; 그룹 1) 및 GLP-1/FDKP 처리군(그룹 2)에 대한 0, 15, 30, 45, 60 및 90 분에서의 포도당 측정을 나타낸 것이다.

도 26은 비만한 수컷 주커 래트에서 폐 통기를 통해 투여된 GLP-1/FDKP의 약물동태학적 연구를 나타낸다. 데이터는 대조군(공기; 그룹 1) 및 GLP-1/FDKP 처리군(그룹 2)에 대한 0, 15, 30, 45, 60 및 90 분에서의 인슐린 측정을 나타낸 것이다.

도 27은 암컷 래트에서 폐 통기를 통해 투여된 다양한 GLP-1 농도를 가진 GLP-1/FDKP의 약물동태학적 연구를 나타낸다. 데이터는 대조군(공기; 그룹 1) 및 각각 5%, 10% 및 15% GLP-1을 투여한 GLP-1/FDKP 처리군 그룹 2, 3

및 4에 대한 0, 2, 5, 10, 20, 30, 40 및 60 분에서의 GLP-1 측정을 나타낸 것이다.

도 28은 암컷 래트에서 폐 통기를 통해 투여된 다양한 GLP-1 농도를 가진 GLP-1/FDKP의 약물동태학적 연구를 나타낸다. 데이터는 대조군(공기; 그룹 1) 및 각각 5%, 10% 및 15% GLP-1을 투여한 GLP-1/FDKP 처리군 그룹 2, 3 및 4에 대한 0, 2, 5, 10, 20, 30, 40 및 60 분에서의 FDKP 측정을 나타낸 것이다.

도 29는 1일 1회 폐 통기를 통해 15% GLP-1을 함유하는 GLP-1/FDKP (0.3 mg GLP-1)을 4 일간 연속 투여한 암컷 래트(n=10)에서의 GLP-1/FDKP의 약물동태학적 연구를 나타낸다. 데이터는 투여전, 4 일간 연속 투여하고 1, 2, 4 및 6 시간후에 측정된 평균 음식물 소비량을 나타낸 것이다.

도 30은 1일 1회 폐 통기를 통해 15% GLP-1을 함유하는 GLP-1/FDKP(0.3 mg GLP-1)을 4 일간 연속 투여한 암컷 래트(n=10)에서의 GLP-1/FDKP의 약물동태학적 연구를 나타낸다. 데이터는 투여전, 4 일간 연속 투여하고 1, 2, 4 및 6 시간후에 측정된 평균 체중을 나타낸 것이다.

도 31은 1일 1회(1일 30분간) 구비강 투여를 통해 GLP-1/FDKP를 5 일간 연속 투여한 원숭이에서의 GLP-1/FDKP의 독성동태학적(toxicokinetic) 연구를 나타낸다. 데이터는 수컷 및 암컷에서의 GLP-1의 최고 혈장 농도(C_{max})를 나타낸 것이다. 동물은 대조군(공기; 그룹 1), 2 mg/kg FDKP(그룹 2) 또는 0.3, 1.0 또는 2.0 mg/kg GLP-1/FDKP(각각 그룹 3, 4 및 5)을 투여받았다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] **바람직한 구체예의 상세한 설명**

[0041] 당업계에 있어서 약제로서 사용하기에 안정한 흡입가능한 글루카곤 유사 펩타이드 1 (GLP-1) 제제는 부족하다. 이는 생체내 GLP-1 펩타이드의 불안정성에 기인한다. GLP-1 화합물은 다수의 조건하에서 용액으로 남아있으려는 경향이 있으며, 용액 제제로서 투여된 경우 생체내 반감기가 비교적 짧다. 또한, 폐 및 혈액과 같은 다양한 생체액(biological fluid)에 존재하는 것으로 알려진 디펩티딜-펩티다아제 IV (DPP-IV)는 GLP-1 분자의 생물학적 반감기를 크게 감소시킨다. 예를 들어, GLP-1(7-37)의 생물학적 반감기는 3 내지 5 분으로 나타났다; 미국특허 제5,118,666호를 참고할 수 있다. GLP-1은 또한 비경구 투여 이후 생체내에 신속히 흡수되는 것으로 나타났다. 유사하게, 아미드 GLP-1(7-36)의 반감기는 피하 투여된 경우 약 50 분이다; 미국 특허 제5,118,666호를 참고할 수 있다.

[0042] 당업계에서 GLP-1 조성물의 신속한 클리어란스 및 짧은 반감기는 본 발명이 극복한 결함을 나타낸다. 본 발명은 폐 전달에 특히 적합한 최적화 천연 GLP-1/FDKP (푸마릴 디케토피페라진) 제제를 제공함으로써 당업계에서의 결함을 극복한다. 다른 특정 양태에서, 본 발명은 생체내에서 GLP-1 반응을 유발시킬 수 있는 천연 GLP-1 분자의 제제를 제공한다. 이러한 제제로 천연 GLP-1의 변이체의 사용이 또한 예측된다.

[0043] 당업계의 결함을 극복하기 위해, 본 발명은 디케토피페라진(DKP) 입자와 배합된 GLP-1의 제제를 제공한다. 본 발명의 특정의 구체예에서, GLP-1/DKP 제제는 대상에게 투여하기 위해 제공된다. 추가적인 특정의 구체예에서, GLP-1/DKP 제제는 푸마릴 디케토피페라진(FDKP)을 포함하지만, 이에 한정되지 않으며, DKP 환에서 한 위치만 치환된 것(예를 들어 FDKP의 "하나의 가지가 달린(one armed)" 유사체)을 비롯한 비대칭 디케토피페라진인 2,5-디케토-3,6-디(4-숙시닐-아미노부틸)피페라진(SDKP)과 같은 다른 DKPs(비대칭 DKPs, xDKPs), 및 DKP 염을 포함할 수 있다. 본 발명의 다른 특정의 구체예에서, GLP-1/FDKP 제제의 투여는 폐 전달에 의한다.

[0044] GLP-1 분자의 치료 제제를 개발함에 있어서, 용액내 GLP-1의 구조적 특징은 원자외선 원편광 이색성(원자외선 CD), 근자외선 원편광 이색성(근자외선 CD), 고유 형광, 푸리에 변환 적외선 분광(FTIR, Fourier transform infrared spectroscopy), 고압 액체 크로마토그래피(HPLC) 및 질량 분석(MS, mass spectroscopy)이 포함되는 다양한 생물물리학적 및 분석 기술을 사용함으로써 평가되었다. 원편광 이색성(CD)의 기술은 다양한 실험 조건하에서 단백질의 구조 변화를 분석하는데 사용되는 강력한 도구로서 당업계에 널리 알려져 있다. 이들 분석이 수행된 실험 조건으로는 GLP-1 펩타이드에 대한 복수의 동결-해동 사이클, 교반, 산화 스트레스, pH, 온도, 이온 세기, 농도의 영향이 포함되었다. 이들 분석은 GLP-1 펩타이드의 구조를 조작하여 바람직한 약물동태학적(PK) 및 약역학적(PD) 특징을 가진 바람직한 GLP-1/DKP 제제가 획득되도록 하는 조건을 확립하도록 할 뿐만 아니라 주요 분해 경로를 특징화하도록 설계되었다.

[0045] GLP-1의 농도가 증가함에 따라 펩타이드의 이차 구조는 우세한 구조가 없는 형상에서 더 많은 나선형 형상으로 변형된다는 것이 관찰되었다. 용액내 이온 세기의 증가는 그것이 가역적으로 침전될 때까지 GLP-1의 구조를 증가시켰다. 도 2D에 도시된 바와 같이 큰 CD 밴드 강도의 증가에 의해 입증된 바, NaCl의 존재는 GLP-1의 삼차

구조를 증가시켰다. 이러한 현상은 자기-회합의 흔적이 없는 저농도 펩타이드인 경우에조차 발생한다. 증가된 이온 세기는 비구조화 GLP-1을 208 ㎚ 및 222 ㎚로의 원 CD 최소 이동에 의해 도시된 바와 같이 α-나선형 형태로(도 2A) 및 도 2B 및 2D에 근 CD 패턴 및 염 증가에 따른 더 낮은 파장으로의 트립토판 방사 이동에 의해 도시된 바와 같이 자기-회합 형상으로 쉽게 전환시켰다. 온도 및 pH는 GLP-1의 불규칙적 구조가 이들 파라미터 중 어느 것에 의해서도 변경되지 않았다는 점에서 다르게 GLP-1의 형상에 영향을 미쳤다. 다른 한편으로는, GLP-1의 자기-회합 형상은 열변성에 민감하며, 그의 용해성은 펩타이드 농도가 10 ㎎/㎖인 경우 pH 6.3-7.6에서 GLP-1 펩타이드가 가역적으로 침전된다는 것을 보여주는 도 4A 및 도 4B에 도시된 바와 같이 pH에 민감한 것으로 밝혀졌다. GLP-1의 다양한 형상은 일반적으로 교반 및 복수의 동결-해동 사이클에 안정한 것으로 밝혀졌다. GLP-1에 대한 탈아미드화 및 산화는 모두 관찰되지 않았다.

[0046] FDKP 입자에의 GLP-1의 흡착에 대해서도 다양한 조건하에서 관찰되었는데, 여기서 다양한 조건으로는 pH 변화, GLP-1 농도 변화, 및 각종 계면활성제, 염, 이온, 카오트로프 및 리오트로프, 안정화제 및 알코올의 농도 변화가 포함된다. FDKP 입자에의 GLP-1의 흡착은 pH에 크게 영향을 받으며, 특히 약 pH 4.0 또는 그 이상에서는 결합이 일어나는 것으로 밝혀졌다. 다른 부형제는 FDKP 입자에의 GLP-1의 흡착에 대해 제한적으로 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다.

[0047] 본 발명의 GLP-1/DKP 제제를 개발함에 있어서, 생체내에서 그의 전달능 및 흡수능에 작용하거나 영향을 미치는 다수의 파라미터를 평가하였다. 이러한 파라미터로는 예를 들어 GLP-1 펩타이드의 구조, 특정 제제 조건하에서 분자에 대한 표면 변화 및 용해도 및 제제로서의 안정성뿐만 아니라 세린 프로테아제 분해에 대한 감수성 및 생체내 안정성이 포함되며, 이러한 파라미터는 모두, 쉽게 흡수될 수 있고 생물학적 반감기가 확장된 제제를 생성함에 있어서 중요한 역할을 한다.

[0048] 수득된 GLP-1/FDKP 제제의 안정성을 시험관내 및 생체내 모두에서 다양한 조건하에 시험하였다. GLP-1의 안정성을 HPLC 분석법 및 세포-기초 측정법에 의해 분석하였다. 또한, GLP-1의 안정성을 폐 세척액(DPP-IV을 함유함)에서 조사하였다. 천연 GLP-1의 안정성은 용액내에서 농도 의존적인 것으로 밝혀졌다.

[0049] GLP-1/FDKP 로딩의 연구를 위해 시험관내 GLP-1 생물학적 활성 연구가 또한 이용되었다. 이러한 전략은 우세한 GLP-1/FDKP 제법의 추가적인 확인에 기여하였다. 추가로, GLP-1이 세포자멸사를 억제하여 β-세포 증식 및 소도 신생(islet neogenesis)을 자극함으로써 β-세포괴를 증가시키는 역할을 한다는 사실에 기초하여, 본 발명에 따른 GLP-1/FDKP 제제의 증식성 및 항-세포자멸사 가능성이 세포-기초 측정법을 통해 조사되었다.

[0050] 따라서, 본 발명은 안정하고 내분해성이 있는 푸마릴 디케토피페라진(FDKP)과 배합된 천연 인간 GLP-1을 포함하는 최적화 제제를 제공한다.

[0051] **II. GLP-1 분자**

[0052] 본 발명의 특정의 구체예에서, 푸마릴 디케토피페라진(FDKP)과 같은 디케토피페라진과 배합된 천연 인간 글리카곤 유사 펩타이드 1 (GLP-1)을 포함하는 최적화 제제가 제공된다. 본 발명의 이러한 GLP-1/FDKP 제제는 안정하고 내분해성이 있다.

[0053] 인간 GLP-1은 당업계에 널리 알려져 있으며, 회장원위부, 이자 및 뇌에 있는 L-세포에서 합성된 프리프로글루카곤 폴리펩타이드(preproglucagon polypeptide)로부터 유래한다. GLP-1은 두 가지의 분자 형태 7-36 및 7-37로 존재하고 7-36 형태가 지배적인 30-31 개의 아미노산 펩타이드이다. 프리프로글루카곤의 GLP-1(7-36) 아미드 및 GLP-1(7-37) 확장된 형태로의 진행은 주로 L-세포에서 일어난다. 공복 상태에서 GLP-1의 혈장 수준은 약 40 pg/㎖인 것으로 당업계에 알려져 있다. 식후, GLP-1 혈장 수준은 약 50-165 pg/㎖로 빠르게 증가한다.

[0054] 본원에 사용된 용어 "GLP-1 분자"는 GLP-1 단백질, 펩타이드, 폴리펩타이드, 유사체, 모방체, 유도체, 아이소형, 분절 등을 말한다. 이러한 GLP-1 분자로는 자연발생 GLP-1 폴리펩타이드(GLP-1(7-37)OH, GLP-1(7-36)NH_2) 및 GLP-1 대사산물, 이를 테면 GLP-1(9-37)이 포함될 수 있다. 따라서, 본 발명의 특정의 구체예에서, GLP-1 분자로는 천연 GLP-1, GLP-1 유사체, GLP-1 유도체, 디펩티딜-펩티다아제-IV (DPP-IV) 보호된 GLP-1, GLP-1 모방체, GLP-1 펩타이드 유사체 및 생합성 GLP-1 유사체가 포함된다.

[0055] 본원에 사용된 용어 "유사체"로는 또 다른 화합물과 유사한 구조를 가진 화합물이 포함된다. 예를 들어, 항바이러스 화합물인 아시클로비어(acyclovir)는 뉴클레오사이드 유사체로서, 염기 구아닌으로부터 유래된 뉴클레오사이드 구아노신과 구조적으로 유사하다. 즉, 아시클로비어는 구아노신을 모방하여 (그것과 생물학적으로 유사하며) 바이러스성 핵산내에서 구아노신 잔기를 대체함으로써(또는 이것과 경쟁함으로써) DNA 합성을 간섭하여 번

역/전사를 방해한다. 따라서, 모 화합물의 생물학적 또는 화학적 활성을 모방하는 다른 화합물(모 화합물)과 구조적 유사성을 가진 화합물은 유사체이다. 유사체가 모 화합물의 생물학적 또는 화학적 특성과 동일하게, 상보적으로 또는 경쟁적으로 일부 적절한 방식으로 모방가능하다면, 유사체로서 화합물을 정량하는데 최소수 또는 최대수의 원소 또는 작용기 치환은 필요하지 않다. 유사체는 모 화합물의 유도체일 수 있거나 종종 모 화합물의 유도체이다(아래 "유도체"를 참고하기 바람). 본원에 개시된 화합물의 유사체의 활성은 그것들의 모 화합물과 동일하거나 더 적거나 더 클 수 있다.

[0056] 본원에 사용된 "유도체"는 모 화합물로부터 그대로 또는 합성적으로 제조된(또는 그것으로 부터 유래된) 화합물이다. 유도체는 유사체(위 "유사체"를 참고하기 바람)일 수 있으며, 따라서 유사한 화학적 또는 생물학적 활성을 가질 수 있다. 그러나, 유사체와는 달리, 유도체는 모 화합물의 생물학적 또는 화학적 활성을 반드시 모방해야할 필요는 없다. 유도체로서 화합물을 정량하는데 최소수 또는 최대수의 원소 또는 작용기의 치환은 필요하지 않다. 예를 들어, 항바이러스 화합물인 간클로비어(ganclovir)는 아시클로비어의 유도체이나, 간클로비어는 아시클로비어와 상이한 스펙트럼의 항바이러스 활성 및 상이한 독물학적 특성을 가진다. 본원에 개시된 화합물의 유도체의 활성은 그것들의 모 화합물과 비교했을 때 동일하거나, 더 적거나, 더 크거나 심지어 유사하지 않을 수 있다.

[0057] 본원에 사용된 "대사산물"은 대사작용의 임의의 중간물 또는 생성물로서, 대분자 및 소분자 둘 다를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이 그리고 필요에 따라 정의는 일차 또는 이차 대사산물 둘 다에 적용된다. 일차 대사산물은 살아있는 유기체의 정상적인 성장, 발달 및 재생에 직접 관여한다. 이차 대사산물은 상기한 과정들에 직접 관여하지는 않지만, 전형적으로 중요한 생태학적 기능(예, 항생성)을 가진다.

[0058] 본원에 사용된 용어 "생합성"은 살아있는 유기체에 의한 화학 화합물의 임의의 생성을 말한다.

[0059] 본원에 사용된 "입자-형성"은 통상 액체 매질에서 고체 입자를 형성할 수 있는 화학적, 생합성적 또는 생물학적 실체 또는 화합물을 말한다. 입자의 형성은 전형적으로 입자-형성 실체가 예를 들어 pH, 온도, 습기 및/또는 오스몰농도(osmolarity/osmolality)의 변화와 같은 특정 조건(들)에 노출되었을 때 일어난다. 조건(들)에 노출되면 입자가 형성되도록 하는 결합, 합체(coalescence), 고체화 및/또는 탈수가 일어날 수 있다. 침전 반응은 입자-형성 사건의 일례이다.

[0060] 본원에 사용된 "공용액(co-solution)"은 적어도 2 가지의 화학적, 생물학적 및/또는 생합성적 실체로 이루어진 임의의 매질이다. 예를 들어, 공용액은 적어도 하나의 화학적, 생물학적 및/또는 생합성적 실체를 포함하는 액체를 화학적, 생물학적 및/또는 생합성적 실체를 포함하는 고체와 혼합함으로써 형성될 수 있다. 또 다른 예로, 공용액은 적어도 하나의 화학적, 생물학적 및/또는 생합성적 실체를 포함하는 액체를 화학적, 생물학적 및/또는 생합성적 실체를 포함하는 또 다른 액체와 혼합함으로써 형성될 수 있다. 추가의 예로, 공용액은 각각 적어도 하나의 화학적, 생물학적 및/또는 생합성적 실체를 포함하는 적어도 2 가지의 고체를 단일 용액에 첨가함으로써 형성될 수 있다.

[0061] 본 발명에서 고려되는 바와 같은 천연 GLP-1은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 가진 폴리펩타이드이다. 천연 GLP-1 펩타이드는 생체내에서 수 분이내에 신속하게 절단되고 비활성화된다.

[0062] 본 발명의 GLP-1 유사체는 GLP-1 수용체 작용제로 알려진 펩타이드인 엑센딘을 포함할 수 있고; 이러한 유사체는 엑센딘 1 내지 4를 추가로 포함할 수 있다. 엑센딘은 독도마뱀(Gila-monster)의 독에서 발견되며, 포유동물의 GLP-1과 약 53%의 아미노산 상동성을 공유한다. 엑센딘은 또한 GLP-1 수용체에 대하여 유사한 결합 친화력을 가진다. 엑센딘-3 및 엑센딘-4는 이자선방세포(pancreatic acinar cell)에서의 cAMP 생성 및 이자선방세포로부터의 아밀라아제 방출을 자극하는 것으로 보고되어 있다(Malhotra et al., 1992; Raufman et al., 1992; Singh et al., 1994). 당뇨병을 치료하고 고혈당증을 예방하기 위한 인슐린친화성(insulino-trophic) 약제로서 엑센딘-3 및 엑센딘-4가 사용되고 있는 것으로 제안되어 있다(미국특허 제5,424,286호).

[0063] 카르복시아미드화된 분자인 엑센딘[9-39]과 같은 엑센딘의 카르복실 말단분절 및 9-39 중 분절 3-39는 GLP-1의 강력하고 선택적인 길항제로 보고되어 있다(Goke et al., 1993; Raufman et al., 1991; Schepp et al., 1994; Montrose- Rafizadeh et al., 1996). 이 문헌에는 엑센딘[9-39]이 생체내에서 내인성 GLP-1을 차단하여 인슐린 분비를 감소시킨다는 것이 입증되어 있다(Wang et al., 1995; D'Alessio et al., 1996). 엑센딘-4는 인슐린-분비(insulin-secreting) β-TC1 세포위의 GLP-1 수용체, 이자의 분산 선방 세포 및 위의 벽세포와 강하게 결합한다. 엑센딘-4 펩타이드는 또한 소마토스타틴 방출을 자극하고 적출 위에서의 가스트린 방출을 억제하는 역할을 한다(Goke et al., 1993; Schepp et al., 1994; Eissele et al., 1994). 클론(cloned) GLP-1 수용체로 핵산전

달감염된 세포에서, 보고된 바에 따르면 엑센딘-4는 작용제로서 즉 cAMP를 증가시키는 반면, 엑센딘[9-39]은 길항제로서 확인되는 것으로 즉 엑센딘-4 및 GLP-1의 촉진 작용을 차단한다. 엑센딘은 또한 내분해성이 있는 것으로 밝혀졌다.

[0064] 본 발명의 또 다른 구체예는 펩타이드 모방체의 용도를 고려한 것이다. 당업자들에게 알려진 펩타이드 모방체는 호르몬, 시토카인, 효소 기질, 바이러스 또는 다른 생체분자 위에서 활성 결정인자를 생물학적으로 모방하여, 천연 리간드의 생리학적 활성을 길항하거나 자극하거나 그렇지 않으며 조절할 수 있는 펩타이드이다. 펩타이드 모방체는 약물 개발에 특히 유용하다. 예를 들어 문헌[Johnson et al., "Peptide Turn Mimetics" in BIOTECHNOLOGY AND PHARMACY, Pezzuto et al., Eds., Chapman and Hall, New York (1993)]을 참고할 수 있다. 펩타이드 모방체 사용의 배후가 되는 근원적인 이론적 해석은 단백질의 펩타이드 골격이 주로 분자 상호작용을 용이하게 하는 방식으로 아미노산 측쇄를 배향하도록 존재한다는 것이다. 펩타이드 모방체는 천연 분자와 유사한 분자 상호작용을 허용할 것으로 기대된다.

[0065] 추가의 구체예에서, 본 발명의 GLP-1 분자는 천연 GLP-1의 적어도 하나의 생물학적 활성, 이를 테면 GLP-1 수용체와의 결합능을 가지며, 신호 변환 경로를 개시하여 인슐린친화적 활성을 생성할 것으로 고려된다. 본 발명의 추가의 구체예에서, GLP-1 분자는 자연 발생 GLP-1의 적어도 하나의 생물학적 활성을 보유하는 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, 유사체, 모방체, 유도체, 아이소형, 분절 등일 수 있다. GLP-1 분자는 또한 자연발생 인간 GLP-1의 작용제, 모방체 및 길항제 변이체, 엑센딘 1 내지 4를 비롯한 엑센딘군 및 그의 폴리펩타이드 융합체 뿐만 아니라 자연발생 인간 GLP-1의 약제학적으로 허용가능한 염 및 프로드러그, 및 프로드러그의 염, 다형체, 수화물, 용매화물, 생물학적 활성 분절, 생물학적 활성 변이체 및 입체이성질체를 포함할 수 있다. 본 발명의 GLP-1 분자는 또한 GLP-1의 분해를 예방하거나 억제하는 디펩티딜- 펩티다아제-IV (DPP-IV) 보호된 GLP-1을 포함할 수 있다.

[0066] 본 발명의 GLP-1 분자는 아미노산 치환을 가지거나 용해도를 향상시키거나 내산화성을 부여하거나 생물학적 효과를 증가시키거나 순환상의 반감기를 증가시키는 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질 및 그의 유도체를 포함한다. 따라서, 본 발명에서 고려된 바와 같은 GLP-1 분자는 아미노산 치환, 결실 또는 첨가를 포함하며, 여기서 상기 아미노산은 당업계에 널리 알려진 것들 중에서 선택된다. 분자의 N- 또는 C- 말단은 또한 이를 테면 아실화, 아세틸화, 아미드화에 의해 변형될 수 있지만 상기한 것들에 한정되지 않는다. 따라서, 본 발명에서 용어 "아미노산"은 자연발생 및 비자연발생 아미노산 뿐만 아니라 자연발생 아미노산과 유사한 방식으로 작용하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모방체를 말한다. 자연적으로 코드화된 아미노산은 20 개의 통상의 아미노산(알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 및 발린), 피롤리신 및 셀레노시스테인이다. 아미노산 유사체는 자연발생 아미노산과 동일한 기본 화학 구조, 즉 수소, 카르복실기, 아미노기과 결합된 α 탄소, 및 호모세린, 노르류신, 노르발린, 메티오닌 설폭사이드, 메티오닌 메틸 설포늄, 시트룰린, 하이드록실글루탐산, 하이드록시프롤린 및 프랄린과 같은 R기를 가진 화합물을 말한다. 이러한 유사체는, R기(이를 테면 노르류신)가 변형되더라도 자연발생 아미노산과 동일한 기본 화학 구조를 보유한다. 본 발명에서 고려되는 아미노산은 또한, 아미노 말단 및 카르복실 말단을 가진다는 점에서 α-아미노산과 유사한 β-아미노산을 포함한다. 그러나, β-아미노산에서, 2 개의 탄소 원자는 이들의 작용 말단을 분리한다. 특정의 측쇄를 가진 β-아미노산은 알파 (C2) 탄소 또는 베타 (C3) 탄소에서 R 또는 S 이성질체로서 존재한다. 이는 임의의 주어진 측쇄에 대하여 모두 네 가지의 가능한 부분입체이성질체를 생성한다.

[0067] 또한 재조합(cDNA, 게놈 DNA, 합성 DNA로부터 생성되든 핵산의 다른 형태로부터 생성되든 상관없이), 합성 및 유전자 활성화 방법을 포함하나 이들에 한정되지 않는 합성 또는 제조 방법에 관계없이, 천연 분자의 적어도 하나의 생물학적 활성을 가진 본 발명의 GLP-1 분자는 또한 하이브리드 GLP-1 단백질, 융합 단백질, 올리고머 및 다합체, 동족체, 당화형태 변이체(glycosylation pattern variant) 및 그의 뮤테인을 포함할 수 있다. 재조합 DNA 기술은 당업자들에게 널리 알려져 있다{문헌[Russell, D. W., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001]을 참고할 수 있다.

[0068] **III. 디케토피페라진**

[0069] 디케토피페라진은 약물 전달 및 안정화에 유용한 미립자를 형성하는 그의 능력에 대하여 널리 알려져 있다. 본 발명에서, 디케토피페라진은 GLP-1 분자의 흡착을 촉진함으로써 내분해성이 있는 안정한 제제를 제공하기 위해 사용된다.

[0070] 디케토피페라진이 GLP-1 분자를 혼입하는 입자 또는 그 위에 GLP-1 분자가 흡착될 수 있는 입자로 형성될 수 있

는 다양한 방법이 이용될 수 있다. 이것은 디케토피페라진 용액을 GLP-1 분자의 용액 또는 현탁액과 혼합하는 단계, 이어 침전 단계 및 후속하는 디케토피페라진 및 GLP-1을 포함하는 입자의 형성 단계를 포함한다. 다르게는, 디케토피페라진을 침전시켜 입자를 형성하고 후속적으로 GLP-1 분자의 용액과 혼합시킬 수 있다. 디케토피페라진 입자와 GLP-1 분자 사이의 회합은 용매 제거에 의해 이루어질 수 있으며, pH 조절과 같은 특정 단계는 회합을 촉진하기 위해 건조 단계 이전에 포함될 수 있다.

[0071] 바람직한 구체예에서, 본 발명의 디케토피페라진으로는 (E)-3,6-비스[4-(N-카르복실-2-프로페닐)아미도부틸]-2,5-디케토피페라진(푸마릴 디케토피페라진 또는 FDKP로도 언급될 수 있음)으로도 알려진 3,6-디(푸마릴-4 아미노부틸)-2,5-디케토피페라진이 포함되나 이에 한정되지 않는다.

[0072] 본 발명에서 고려되는 다른 디케토피페라진으로는 3,6-디(4-아미노부틸)-2,5-디케토피페라진의 유도체, 이를 테면 3,6-디(숙시닐-4-아미노부틸)-2,5-디케토피페라진(본원에서 3,6-비스(4-카르복시프로필)아미도부틸-2,5-디케토피페라진; 숙시닐 디케토피페라진 또는 SDKP로도 언급됨); 3,6-디(말레일-4-아미노부틸)-2,5-디케토피페라진; 3,6-디(시트라코닐-4-아미노부틸)-2-5-디케토피페라진; 3,6-디(글루타릴-4-아미노부틸)-2,5-디케토피페라진; 3,6-디(말로닐-4-아미노부틸)-2,5-디케토피페라진; 3,6-디(옥살릴-4-아미노부틸)-2,5-디케토피페라진 및 이들로부터의 유도체가 포함되나 이들에 한정되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 디케토피페라진염의 사용이 고려된다. 이러한 염으로는 예를 들어 디케토피페라진의 Na, K, Li, Mg, Ca, 암모늄, 또는 모노-, 디- 또는 트리-알킬암모늄(트리에틸아민, 부틸아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민 또는 피리딘 등으로부터 유래됨) 염과 같은 임의의 약제학적으로 허용가능한 염이 포함될 수 있다. 상기 염은 모노-, 디- 또는 혼합 염일 수 있다. R기가 둘 이상의 산 기(acid group)를 함유하는 디케토피페라진에 대하여 고차 염(higher order salt)이 또한 고려된다. 본 발명의 다른 양태에서, 약물이 디케토피페라진의 카운터 양이온이 되도록 약제의 기본 형태는 디케토피페라진의 약물 염을 형성하기 위해 디케토피페라진과 혼합될 수 있다. 본원에 고려된 염의 예로는 비한정적인 방식으로 FDKP 이나트륨이 포함된다. DKP 염을 이용한 약물 전달이 미국 특허출원 제11/210,710호에 교시되어 있으며, DKP 염과 관련하여 포함된 모든 내용이 참고로서 본원에 포함된다.

[0073] 그외에 본원에 개시된 바와 같이, 본 발명은 또한 FDKP의 신규한 비대칭 유사체인 xDKPs, 이를 테면: (E)-3-(4-(3,6-디옥소피페라진-2-일)부틸카바모일)-아크릴산; (E)-3-(3-(3,6-디옥소피페라진-2-일)프로필-카바모일)아크릴산; 및 (E)-3-(4-(5-이소프로필-3,6-디옥소피페라진-2-일)-부틸카바모일)아크릴산을 이용하며, 본원과 동일자로 출원되고 그의 전체 내용이 본원에 참고로 포함되는 "약물 전달제로서 사용하기 위한 비대칭 FDKP 유사체"라는 명칭의 미국 가특허출원에 개시되어 있다(Atty Decket No. 51300-00041).

[0074] 디케토피페라진은 문헌[Katchalski, et al., (J. Amer. Chem. Soc. 68:879-80; 1946)]에 개시된 바와 같이 아미노산 에스테르 유도체의 고리이량체화반응(cyclodimerization)에 의하거나, 디펩타이드 에스테르 유도체의 고리화반응에 의하거나, 그의 교시내용이 본원에 참고로 포함되는 문헌[Kopple, et al., (J. Org. Chem. 33:862-64;1968)]에 개시된 바와 같이 고비점 용매중에서 아미노산 유도체의 가열탈수반응에 의해 형성될 수 있다.

[0075] 디케토피페라진의 합성 및 제조 방법은 당업자에게 널리 알려져 있고, 미국 특허 제5,352,461호; 제5,503,852호; 제6,071,497호; 제6,331,318호; 제6,428,771호 및 미국 특허출원 제20060040953호에 개시되어 있다. 미합중국 특허 제6,444,226호 및 제6,652,885호에는 활성제를 입자에 결합시키기 위해 활성제의 용액에 첨가되는 디케토피페라진 미립자의 수성 현탁액을 제조 및 제공하는 방법에 대하여 개시되어 있다. 이들 특허에는 또한 액체 매질을 동결건조에 의해 제거하여 활성제를 포함하는 미립자를 수득하는 방법이 개시되어 있고, 입자와 활성제의 결합을 촉진하기 위해 이러한 현탁액의 용매 조건을 변경시키는 방법이 둘 모두 "결정성 미립자 표면에 대한 활성제의 친화력 증가에 기초한 약물 제조 방법"이라는 발명의 명칭을 가진 미국 특허출원 제60/717,524호와 제11/532,063호; 및 "결정성 미립자 표면에 대한 활성제의 친화력 증가에 기초한 약물 제조 방법"이라는 발명의 명칭을 가진 미국 특허출원 제11/532,065호에 개시되어 있다. 또한 미합중 특허 제6,440,463호, 2005년 8월 23일 출원된 미국 특허출원 제11/210,709호 및 미국 특허출원 제11/208,087호를 참고할 수 있다. 일부의 경우에, 본 발명의 로딩된 디케토피페라진 입자는 예를 들어 "디케토피페라진 및 활성제를 포함하는 미립자의 약제학적 특성을 개선시키는 방법"이라는 명칭으로 2006년 2월 22일 출원된 미국 특허출원 제11/678,046호에 개시된 바와 같은 분무 건조 방법에 의해 건조될 수 있다. 상기한 특허 및 특허출원은 각각 디케토피페라진과 관련하여 포함된 모든 내용이 본원에 참고로 포함된다.

[0076] **IV. GLP-1/DKP 입자의 치료 제제**

[0077] 본 발명은 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하기 위한 GLP-1/FDKP 제제를 추가로 제공한다. 본 발명에서 고려되는 대상은 가정용 애완동물 또는 인간일 수 있다. 특정 구체예에서, 치료는 II형 당뇨병, 비만증, 암 또는 이

들로부터의 임의의 관련 질환 및/또는 질병을 위한 것이다. 인간이 특히 바람직한 대상이다.

[0078] 본 발명에서 고려되는 다른 질환 또는 질병으로는 과민성 대장 증후군, 심근 경색증, 허혈, 재관류 조직 손상, 이상지혈증, 당뇨병성 심근병증, 급성 관상동맥 증후군, 대사 증후군, 수술후 이화작용의 변화, 신경변성 장애, 기억 및 학습 장애, 섬세포 이식 및 재생 치료 또는 뇌졸중이 포함되나 이들에 한정되지 않는다. 본 발명에서 고려되는 다른 질환 및/또는 질병으로는 GLP-1/FDKP 건조 분말 제제를 이를 필요로 하는 대상에게 투여함으로써 치료될 수 있는 상기 열기된 것들과 관련된 임의의 질환 및/또는 질병이 포함된다. 본 발명의 GLP-1/FDKP 건조 분말 제제는 또한 II형 당뇨병 및 고혈당증의 인간 세포에서 베타 세포 분화를 유도하는 치료에 사용될 수 있다.

[0079] 본 발명의 또 다른 추가의 구체예에서, 대상은 래트, 토끼, 햄스터, 기니아 피그, 게르빌루스쥐, 마멋(woodchuck), 고양이, 개, 양, 염소, 돼지, 소, 말, 원숭이 및 유인원(침팬지, 긴팔원숭이 및 개코원숭이 포함)을 비롯한 가정용 애완동물 또는 동물일 수 있는 것으로 고려된다.

[0080] 본 발명의 GLP-1/FDKP 입자 제제가 임상적 또는 비임상적 목적으로 당업자들에게 알려진 다양한 투여 경로에 의해 투여될 수 있다는 점도 또한 고려된다. 본 발명의 GLP-1/FDKP 조성물은 임의의 표적 생체막, 바람직하게는 대상의 점막에 투여될 수 있다. 경구, 비강, 구강, 전신 정맥 주사, 피하, 혈액 또는 림프 공급을 통한 국부 투여, 환부에 직접 또는 심지어 국소용 수단을 포함하나 이들에 한정되지 않는 임의의 경로에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 바람직한 구체예에서, GLP-1/FDKP 조성물의 투여는 폐 전달에 의한다.

[0081] 본 발명에 사용될 수 있는 다른 대안적인 투여 경로로는 에어로졸, 주사, 주입, 연속 주입, 표적 세포를 직접 침지하는(bathing) 국소 관류를 이용하거나, 카테터를 통해, 세척을 통해, 크림으로, 액체 조성물(예, 리포솜)로, 또는 당업자에게 알려진 기타 방법 또는 전술한 것들의 임의 조합에 의해, 국부 투여인 피내, 동맥내, 복막내, 병변내, 두개내, 관절내, 전립선내, 흉막내, 기관내, 유리체내, 질내, 직장, 종양내, 근육내, 소포내, 점막상(mucosally), 심막내, 기관지 투여가 포함될 수 있다(예를 들어 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 1990]을 참고할 수 있으며, 이 문헌은 투여 방법과 관련하여 포함된 모든 내용이 참고로 본원에 포함된다).

[0082] 건조 분말 제제로서, 본 발명의 GLP-1/DKP 입자는 입자의 크기에 따라 호흡기 계통의 특정 영역에 흡입(inhalation)에 의해 전달될 수 있다. 추가로, GLP-1/DKP 입자는 정맥내 현탁액 투여형에 혼입하기에 충분히 작게 제조될 수 있다. 경구 전달의 경우, 입자는 현탁액, 정제 또는 캡슐제에 혼입될 수 있다. GLP-1/DKP 조성물은 흡입 장치(inhalation device), 이를 테면 네뷸라이저(nebulizer), 정량 흡입기(inhaler), 건조 분말 흡입기 및 분무기로부터 전달될 수 있다.

[0083] 추가의 구체예에서, "유효량"의 GLP-1/DKP 제제를 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것이 고려된다. 본 발명에서 고려된 GLP-1/DKP 건조 분말 제제의 "유효량"은 치료될 질환, 질병 또는 장애의 증상 중 하나 이상을 어느 정도 경감시키게 되는 GLP-1 화합물, 유사체 또는 펩타이드 모방체 등의 양을 말한다. 하나의 구체예에서, GLP-1/DKP 건조 분말 제제의 "유효량"은 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50% 또는 그 이상이나 이에 한정되지 않는 정도까지 혈장 인슐린 수준을 증가시키고, 공복시 혈당 수준을 감소시키거나 저하시키고, 이자 베타 세포괴를 증가시킴으로써 당뇨병을 치료하기 위한 GLP-1 분자의 양이다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 약제학적 유효량의 GLP-1 분자를 이러한 치료를 필요로 하는 대상에게 투여함으로써 비만증을 치료하는 것을 고려한다. 이러한 경우에, GLP-1/DKP 건조 분말 제제의 "유효량"은 적어도 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50% 또는 그 이상이나 이에 한정되지 않는 정도까지 체중을 감소시키거나 저하시킴으로써 비만증을 치료하기 위한 GLP-1 분자의 양이다. 본 발명은 또한 약제학적 유효량의 GLP-1 분자를 이러한 치료를 필요로 하는 대상에게 투여함으로써, 포만감을 조절하기 위한 "유효량"의 GLP-1/DKP 건조 분말 제제를 투여하는 것을 고려한다. 비한정적인 방식으로, GLP-1 분자는 엑센딘 분자, 이를 테면 엑센딘-1 또는 -4일 수 있다. 이러한 경우에, GLP-1/DKP 건조 분말 제제의 "유효량"은 적어도 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50% 또는 그 이상이나 이에 한정되지 않는 정도까지 식품섭취량(예를 들어 질량 또는 칼로리량으로서 측정된 것) 및 허기의 지각을 감소시키는 GLP-1 분자의 양이다. GLP-1/DKP 건조 분말 제제의 "유효량"은 질환 또는 질병 또는 그의 증상의 정도를 검출가능하고 반복적으로 개선시키거나 감소시키거나 최소화하거나 제한하는데 충분한 양으로써 추가로 정의될 수 있다. 질환 또는 질병의 제거, 근절 또는 치유는 또한 본 발명의 제제의 "유효량"을 이용하는 것이 가능할 수 있다.

[0084] 본 발명의 GLP-1/FDKP 조성물을 이를 필요로 하는 대상에게 투여함에 있어서, 조성물의 실제 투여량은 체중, 질병의 중증도, 치료될 질환의 형태, 이전 또는 동시적인(concurrent) 치료 개입(therapeutic intervention), 환

자의 특발증 및 투여 경로와 같은 물리학적 및 생리학적 인자에 기초하여 결정될 수 있다. 당업자는 이들 인자 중 하나 이상에 기초한 실제 투여량을 결정할 수 있다.

[0085] 본 발명의 GLP-1/DKP 제제는 치료할 질환 또는 질병에 따라 일회 또는 일회 이상 투여될 수 있다. GLP-1/DKP 제제의 투여는 분, 시간, 일, 주 또는 달에 걸친 범위의 간격으로 대상에게 제공될 수 있다. 일부의 경우에, 치료 계획의 시간은 투여시 GLP-1 분자의 반감기와 관련될 수 있다. 추가의 구체예에서, 예를 들어 암과 같은 특정 또는 복합적인 질환 또는 질병을 치료하는데 있어서, 본 발명의 GLP-1/DKP 제제를 약제학적 부형제 또는 약제와 함께 투여하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 경우에, 투여 계획은 약제학적 부형제 또는 약제에 의해 결정될 수 있다.

[0086] **V. 실시예**

[0087] 하기 실시예들은 본 발명의 특정의 구체예를 증명하기 위해 포함된다. 당업자들이라면 실시예에 개시된 기술이 본 발명의 실시에서 우수하게 작용하는 대표적인 기술이라는 것을 설명하는 것임을 이해하여야 한다. 그러나, 당업자들이라면 본 설명에 비추어 개시된 특정의 구체예에서 다수의 변경이 이루어질 수 있고, 본 발명의 정신 및 범위를 벗어남이 없이 동일 또는 유사한 결과를 얻을 수 있음을 이해하여야 한다.

[0088] **실시예 1**

[0089] **GLP-1 구조의 생물물리학적 및 분석학적 분석**

[0090] GLP-1의 구조 및 거동 둘 다를 분석하기 위해, 다수의 생물물리학적 및 분석학적 기술을 사용하였다. 이들 기술로는 원자외선 원편광 이색성(원자외선 CD), 근자외선 원편광 이색성(근자외선 CD), 고유 형광, 푸리에 변환 적외선 분광(FTIR), 고압 액체 크로마토그래피(HPLC) 및 질량 분석(MS)이 포함되었으며; 이들 기술 모두는 당업자에게 널리 알려져 있다. 폭넓은 질병에 대하여 GLP-1 펩타이드에 대한 복수의 동결-해동 사이클, 교반, 산화 스트레스, pH, 온도, 이온 세기 및 농도의 영향을 조사하였고; 이들 모두가 이하에 추가적으로 상세히 개시되어 있다. 이러한 분석들은 또한 분해의 주요 경로를 특징화하고 GLP-1의 펩타이드 구조를 조정하는 조건을 확립하여 특정의 GLP-1/DKP 제제를 달성하기 위해 사용되었다.

[0091] **실험 방법**

[0092] GLP-1은 아메리칸 펩타이드(American Peptide)(캘리포니아 서니베일 소재) 또는 아나스펙(AnaSpec)(캘리포니아 샌 조 소재)으로부터 구입하거나 회사내(캘리포니아 발렌시아 소재 맨카인드 코포레이션(Mannkind Corporation))에서 제조하였다. 다양한 농도의 수성 GLP-1 시료를 pH 4.0 및 20℃(달리 언급하지 않는 한)에서 분석하였다. 시료는 일반적으로 신선하게 제조하였고 각각의 실험 이전에 적절한 첨가제(예를 들어, 필요에 따라 염, pH 완충액, H_2O_2 등)과 혼합하였다. 다양한 조건하에서 GLP-1의 이차 구조 측정은 원자외선 CD 및 투과(transmission) 푸리에 변환 적외선 분광 (FTIR)으로 수집하였다. 또한, 근자외선 CD 및 고유 형광 둘 다를 사용하여 그의 방향족 잔기, 즉 트립토판을 둘러싸는 환경을 모니터링함으로써 GLP-1의 삼차 구조를 분석하였다.

[0093] **GLP-1의 농도-의존성 구조**

[0094] 원편광 이색성(CD) 스펙트럼을 사용하여 단백질 또는 펩타이드와 같은 분자에 의해 나타내어질 수 있는 α-나선형, 랜덤 코일형(random coil), β-주름진 시트형(pleated sheet), β-턴형(turn) 및 랜덤 코일형을 분석하였다. 특히, 이차 구조의 형태, 예를 들어 단백질 및 펩타이드에서 순수한 α-나선형, β-시트형 구조 등을 결정하기 위해 원자외선 CD를 사용하였다. 한편, 분자의 삼차 구조를 분석하기 위해서는 근자외선 CD를 사용하였다. 즉, GLP-1 구조에 대한 농도의 영향을 조사하기 위해 원자외선 및 근자외선 CD 기술을 이용하였다.

[0095] 도 1A의 원자외선 CD에 의해 GLP-1이 넓은 범위의 농도(예를 들어: 1.8, 4.2, 5.1, 6.1, 7.2 및 8.6 ㎎/㎖)에 걸쳐 α-나선형 및 랜덤 코일형을 포함하는 두 개의 상이한 구조를 형성한다는 것이 입증되었다. 205 ㎚에서의 큰 단일 최소치에 의해 결정된 바와 같이 저농도(≤ 2 ㎎/㎖)에서, GLP-1은 본래 구조화되어 있지 않다. 농도가 증가함에 따라, 208 ㎚ 및 224 ㎚에서의 두 개의 최소치에 의해 결정된 바와 같이 펩타이드는 α-나선형 구조를 취하였다(도 1A).

[0096] 삼차 구조 분석은 GLP-1의 고농도 구조는 자기-회합 형상(즉, 올리고머)임을 제시한다. 근자외선 CD 및 형광 방출 데이터 둘 다에 의해 이러한 가설이 뒷받침된다. 근자외선 CD의 250-300 ㎚에서의 양성 밴드(도 1B)는 GLP-1이 한정된 삼차 구조를 가지며 더 높은 농도에서 증가하는 것으로 드러났다. 더욱 특히, 이들 밴드는 펩타이드의 방향족 잔기가 대부분 고정되어 있고 명확하게 한정된 환경으로 존재하고 있다는 것을 나타내는 것이다.

[0097] 마찬가지로, 다양한 농도에서의 GLP-1의 형광 방출(pH 4.0, 20℃)은 방향족 잔기 트립토판(근자외선 CD 스펙트럼에서 또한 강한 밴드가 나타났음)이 명확하게 한정된 삼차 구조로 존재한다는 것을 보여주었고; 도시된 데이터는 280 ㎚에서의 트립토판 여기로부터 생성되었다(도 1C). 저농도의 GLP-1에 대한 355 ㎚에서의 형광 최대치는 트립토판이 노출 용매라는 것과 유의한 삼차 구조가 없다는 것을 나타내는 것이다. 높은 펩타이드 농도에서, 최대치는 그 강도가 감소하였고 더 작은 파장으로 이동하였는데, 이는 더욱 한정된 삼차 구조를 나타내는 것이다.

[0098] GLP-1 자기-회합 형상의 기본 이차 구조를 추가로 결정하기 위해 다양한 농도에서 FTIR 분석을 수행하였다(pH 4.0, 20℃). 1656 cm^{-1} 에서의 아미드 I 밴드는 농도 ≥ 2 ㎎/㎖에서 GLP-1이 α-나선형 구조임을 명확하게 나타낸다(도 1D). 따라서, GLP-1은 β-시이트 구조를 형성하지 않고; 대신 펩타이드가 고농도에서 나선형 다발(helix bundle)을 형성할 가능성이 크다.

[0099] 추가적으로, GLP-1의 이러한 다양한 구조는 시료 취급을 통해 생성되지 않았다는 것을 실험적으로 보여주었다. 펩타이드를 완충액에 직접 용해하여 제조한 GLP-1에 비해 농축 원액의 희석액이 유사한 원자외선 CD, 근자외선 CD 및 형광 방출 스펙트럼을 생성하였다.

[0100] **GLP-1에 대한 이온 세기의 영향**

[0101] GLP-1 펩타이드에 대한 이온 세기의 영향을 측정하기 위한 연구가 또한 수행되었다. 도 2A(원자외선-CD)는 염의 농도를 증가시키면(100 mM에서 1000 mM으로) 208 및 224 ㎚에서의 최소치에 의해 입증된 바와 같이 불규칙한 GLP-1의 구조가 α-나선형 형상으로 전환된다는 것을 나타낸다. NaCl 농도가 1M로 증가하면 많은 펩타이드(1.0 ㎎/㎖에서)가 용액으로부터 침전한다(도 2A). 그럼에도 불구하고, 이러한 형태의 침전은 물로 희석시 용해하는 것으로 나타났으며, 따라서 이는 높은 이온 세기에서 GLP-1이 가역적으로 침전될 수 있다는 것을 확립하는 것이다.

[0102] GLP-1의 삼차 구조를 생성하고 개선하기 위해 염이 또한 제시되었다. 이러한 것은 도 2B(근자외선-CD)에 예시되어 있는데, 여기서 1.0 ㎎/㎖의 GLP-1은 염의 부재하에서 시그널이 존재하지 않지만 이온 세기가 증가함에 따라 증대되는 명확한 삼차 구조를 나타낸다. 이들 결과는 280 ㎚에서 트립토판 여기후 다양한 NaCl 농도에서 1.0 ㎎/㎖ GLP-1의 형광 방출을 사용하여 확인되었다(도 2C)(pH 4.0, 20℃). 이온 세기의 증가에 의해 형광 최대치가 더 낮은 파장으로 이동되었는데, 이는 1.0 ㎎/㎖ GLP-1의 삼차 구조가 모두 생성 및 증강되었다는 것을 나타내는 것이다.

[0103] 추가적으로, 근자외선 CD 스펙트럼을 사용한 다양한 이온 세기(pH 4.0, 20℃)에서의 10 ㎎/㎖ GLP-1의 삼차 구조 분석을 통해 이온 세기가 증가함에 따라 GLP-1 자기-회합 형상이 증대되는 것이 입증되었다(도 2D).

[0104] 따라서, 이온 세기가 GLP-1 구조에 크게 영향을 미쳐 단백질로 하여금 α-나선형 형상을 나타내도록 하고 올리고머에 회합하도록 한다는 것이 데이터를 통해 제시된다. 또한, 용액의 이온 세기를 증가시키면 그것이 가역적으로 침전될 때까지 GLP-1의 올리고머화를 증가시킨다. 이러한 사실은 초기에 삼차 구조가 없는 저농도의 펩타이드 및 이미 상당한 이차 및 삼차 구조를 나타내는 고농도의 펩타이드에서 명백하다. 따라서, 증가된 이온 세기는 구조화되지 않은 GLP-1을 α-나선형 및 자기-회합 형상으로 쉽게 전환시킨다. 또한, 관찰된 분광학적 결과는 앞서 나타낸 펩타이드 농도 증가에 대한 영향과 비슷하다.

[0105] **GLP-1에 대한 온도 및 pH의 영향**

[0106] GLP-1의 자기-회합된 형상이 온도나 pH의 변화에 민감한 지를 결정하기 위한 연구를 또한 수행하였다. 도 3A(근자외선-CD)는 온도가 증가함에 따라 10 ㎎/㎖ GLP-1의 삼차 구조가 유의적으로 해리된다는 것을 설명하는 것이다. 한편, 다양한 온도 및 pH 4.0에서 저농도(0.05 ㎎/㎖)의 GLP-1은 온도에 영향을 받지 않는다. 도 3B 및 3C를 참조하기 바란다(원자외선-CD). 원자외선 CD는 펩타이드가 온도에 민감하지 않다는 것을 나타내고 있다. 따라서, 분자 운동의 증가는 GLP-1의 자기-회합을 유의적으로 방해한다.

[0107] 반대로, 도 4A(원자외선-CD)는 α-나선형 GLP-1 형상의 용해도가 pH에 민감하다는 것을 나타낸다. 10 ㎎/㎖ GLP-1의 구조는 pH 4.4 이하에서 비교적 균일하지만(즉, GLP-1이 나선형을 유지한다), pH가 중성 또는 그에 가깝게(pH 6.3 내지 7.6) 상승한 경우 약간의 침전이 생기고 불규칙한 스펙트럼을 생성한다. 침전이 생긴 시료는 용액중에 존재하는 덜 가용된 GLP-1의 결과로서 그의 강도가 낮다. 이러한 불규칙한 구조는 도 4A(원자외선-CD)의 208 ㎚에서 관찰된 단일 최소치에 의해 결정되며, 이에 대해 도 4B(근자외선-CD)에 추가로 도시되어 있고, 아마도 침전후 용액중 GLP-1의 감소로부터 생성되었을 것이다. 이러한 침전은 pH가 GLP-1에 대하여 pH 5.5 이상으로

상승했을때 발생할 수 있다. 그러나, pH가 중성 부근에서 11.7로 증가되었을 때, 대부분의 침전은 재용해되었고, 이는 침전이 가역적임을 나타내는 것이다. pH 11.7에서 GLP-1의 재용해되지 않은 침전은 용액중 펩타이드의 양을 감소시키게 되고 따라서 도 4A에서 관찰된 바와 같이 원자외선 CD 스펙트럼의 강도를 감소시킨다. GLP-1은 동결건조된 GLP-1 분말이 pH 9의 완충액과 혼합되어 고농도의 GLP-1으로 되는 경우 극히 불용성임이 또한 관찰되었다.

[0108] **GLP-1의 안정성**

[0109] 교반 및 동결-해동 사이클의 영향 이외에 탈아미드화 및 산화에 대한 그의 내성을 결정함으로써 GLP-1 펩타이드의 안정성을 조사하였다.

[0110] pH 10.5에서 GLP-1(1 mg/mℓ)을 40℃에서 5일간 인큐베이션한 다음 탈아미드화 및 산화 분석을 위해 역상 HPLC 및 전자분사 질량 분석(MS)을 실시하였다. 산화 연구는 또한 HPLC 및 MS 둘 다를 사용하여 0.1% H_2O_2의 존재하에 2 시간동안 인큐베이션시킨 GLP-1 시료(1 mg/mℓ) 대해서도 수행하였다.

[0111] 도 5는 탈아미드화 및 산화의 조건하에서 GLP-1의 안정성을 나타낸다. HPLC 크로마토그램은 GLP-1이 동일한 체류 시간으로 용출되며 분석된 탈안정화 조건에 대해서는 어떠한 피크도 저하되지 않음을 나타낸다. 추가적으로, MS 분석을 통해 시료 모두에 대해 유사한 질량 3297 g/몰이 수득되었는데, 이는 질량이 변하지 않음을 나타내는 것이다. 데이터는 또한 다양한 조건하에 인큐베이션시켰을때 펩타이드는 순수하고 온전한 상태를 유지한다는 것을 나타낸다. 따라서, GLP-1의 탈아미드화는 관찰되지 않았다. 0.1% H_2O_2의 존재하에서 관찰된 바 GLP-1은 또한 산화 스트레스에 대해 안정한 것으로 나타났으며, 각각 HPLC 및 MS에 의해 결정된 바와 같이 GLP-1의 순도 및 질량이 온전하게 유지되었다. 전반적으로, 체류 시간 또는 질량값의 변화도 없었고 어떠한 피크도 저하되지 않았는데, 이는 GLP-1 펩티드가 탈아미드화 및 산화 둘 다에 대해 내성이 있다는 것을 입증하는 것이다.

[0112] 근자외선 CD 및 고유 형광을 사용하여 다양한 농도의 GLP-1에 대한 교반 및 연속적 동결-해동 사이클의 영향을 분석하였다. 9.4 및 1.5 mg/mℓ GLP-1을 교반한 경우 근자외선 CD(도 6A) 및 형광 방출(도 6B)에 의해 관찰된 바와 같이 펩타이드의 어떠한 유의적 변화도 생성되지 않았다. 시료를 실온에서 30분 및 90분동안 교반하고 280 nm에서 트립토판 여기후 형광 방출 스펙트럼을 수집하였다. 독립적인 동결-해동 연구에서, 1.6, 5.1 및 8.4 mg/mℓ의 GLP-1(pH 4.0)을 함유하는 용액을 -20℃에서 동결하고 실온에서 해동하였다. GLP-1에 대한 10회 동결-해동 사이클의 영향을 근자외선 CD(도 7A) 및 형광 방출(도 7B)에 의해 수행 및 분석하였다. 280 nm에서 트립토판 여기후 형광 방출 스펙트럼을 수집하였다. 두 분석 모두 펩타이드의 삼차 구조 변화가 복수의 동결-해동 사이클에 의해 크게 변화하지않는다는 것을 보여준다. 유사한 실험에서, 10 mg/mℓ GLP-1(pH 4.0)의 이차 구조에 대한 11회의 동결-해동 사이클의 영향을 분석하였다(도 7C). 원자외선 CD는 펩타이드의 이차 구조가 복수의 동결-해동 사이클의 결과로서 유의적으로 변화하지 않는다는 것을 나타낸다.

[0113] 전반적으로, 상기 실험들로부터 수득된 생물물리학 분석은 GLP-1 펩타이드의 구조가 용액 중 그의 농도에 의해 크게 영향을 받는다는 것을 보여준다. GLP-1의 농도가 증가함에 따라, α-나선형 구조가 더 두드러졌다. 또한, 이온 세기를 증가시키면 증대되었고 일부의 경우에는 삼차 GLP-1 구조가 생성되었다.

[0114] **실시예 2**

[0115] **GLP-1/FDKP 흡착 연구**

[0116] 흡착 연구를 수행하여 현탁액 중 디케토피페라진(DKP) 입자와 GLP-1의 상호작용을 평가하였다. 흡착 연구에서의 변화를 통해 GLP-1/DKP 상호작용에 대한 정전기, 수소 결합, 물 구조, 단백질 유연성(protein flexibility) 및 염-페어링(salt-pairing) 상호작용의 영향을 조사하였다. 또한, DKP 표면에 대한 GLP-1 흡착의 간섭에 대하여 몇몇 통상의 단백질 안정화제를 시험하였다.

[0117] 예비-형성된 DKP 현탁액 입자(즉, FDKP)를 사용하여, GLP-1이 예비형성된 DKP 입자의 표면에 흡착하는 조건을 연구하였다. FDKP 입자가 예비형성되어 있는 FDKP 입자 현탁액을 3X pH 완충액 및 첨가제 또는 부형제의 3X 용액과 배합하였다. 최종 용액은 5 mg/mℓ 농도의 FDKP 및 0.25 mg/mℓ (5% w/w) 농도의 GLP-1을 함유하였다. 상청액 중의 결합하지 않은 GLP-1을 현탁액으로부터 여과해내었다. 회합된 GLP-1 단백질과 FDKP 입자를 100 mM 중탄산암모늄으로 용해시키고(재구성시키고) 여과하여 임의의 응집된 GLP-1 단백질을 분리하였다. 상청액 및 재구성된 분획 둘 내부에 존재하는 GLP-1의 양을 HPLC에 의해 정량하였다. 첨가제, 이를 테면 염, 계면활성제, 이온, 오스몰라이트, 카오트로프, 유기물 및 다양한 농도의 GLP-1의 사용을 포함하는 사용 조건에서 일련을 실험을 수행하였다. 이들 연구의 결과가 이하에 기술되어 있다.

[0118] **염 연구** - FDKP 입자에의 GLP-1의 결합에 대한 염의 영향을 HPLC 분석에 의해 관찰하였다. GLP-1/FDKP 입자의 로딩은 0, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 및 1500 mM NaCl의 존재하에 5 mg/mℓ FDKP 및 0.25 mg/mℓ GLP-1으로 수행하였다(도 8A). 재구성된 FDKP-무함유 대조군 시료에서 검출된 GLP-1의 양도 또한 pH 및 NaCl 농도의 함수로서 평가하였다(도 8B). 두 데이터 세트 모두에서 pH는 20 mM 인산염/20 mM 아세트산염 혼합물로 조절하였다.

[0119] 도 8A에서 관찰된 바와 같이, FDKP 입자에의 GLP-1의 최적 결합(흡착)은 현탁액의 pH에 의해 크게 영향을 받았다. 4 이상의 pH에서, 용액 중 GLP-1/FDKP 비율이 5% w/w인 경우 FDKP 입자에 대하여 약 3.2% 내지 약 4%의 GLP-1 결합이 관찰되었다. 본래, 0 및 25 mM NaCl의 존재하에 pH 2.0에서는 FDKP 입자에 대한 GLP-1의 흡착이 전혀 나타나지 않았지만, 이온 세기가 증가됨에 따라 약간 식별가능한(apparent) 로딩이 관찰되었다. ≥1M NaCl을 함유하는 FDKP-무함유 대조군에서 GLP-1 침전이 관찰되었다(도 8B). ≥1M NaCl에서 이와 같은 식별가능한 로딩은 높은 이온 세기에서 GLP-1 펩타이드의 가역적 침전(염석)의 결과이다. FDKP 입자 무함유 GLP-1의 고염(high-salt) 대조군이 또한 재구성된 시료에서 높은 GLP-1 수준을 보였는데, 이는 상청액이 수집되었을 때 GLP-1이 필터에 포획되었음을 나타내는 것이다. 1M 이하의 NaCl의 경우, FDKP 입자의 부재하에 GLP-1은 전혀 침전되지 않았다.

[0120] **계면활성제 연구** - FDKP 입자에의 GLP-1의 결합에 대한 계면활성제의 영향을 HPLC 분석에 의해 관찰하였다. 로딩은 계면활성제의 존재하에 5 mg/mℓ FDKP 및 0.25 mg/mℓ GLP-1로 수행하였다(도 9A). 재구성된 FDKP-무함유 대조군 시료에서 검출된 GLP-1의 양도 또한 pH 및 계면활성제 농도의 함수로서 평가하였다(도 9B). pH 및 대조군 시료의 조건은 상기 이온 세기 연구에 대하여 기술된 바와 같았다. 본 연구에 사용된 계면활성제로는 Brij 78 0.09 mM, Tween 80 0.01 mM, Triton X 0.2 mM, Pluric F68 0.12 mM, $H(CH_2)_7SO_4Na$ 0.9 mM, CHAPS 0.9 mM, 세트리미드 0.9 mM이 포함되었다. 각각의 계면활성제의 존재하에 GLP-1에 대한 로딩 곡선을 pH의 함수로서 GLP-1/FDKP에 대하여 도시하였다.

[0121] GLP-1/FDKP 입자에 대한 pH-흡착 곡선은 그의 임계미셀농도(CMC, critical micelle concentration) - 즉 실질적으로 응집체/미셀이 전혀 검출되지 않는 한계 이하 및 실질적으로 추가적인 계면활성제 분자가 응집체를 형성하는 한계 이상으로 분리하는 좁은 범위의 농도 가까이에서 계면활성제의 존재에 의해 영향을 받지 않았다는 것이 데이터에 의해 제시되어 있다. 따라서, 이들 계면활성제 중 어느 것도 이하에 논의된 바와 같이 안정성 및/또는 약물동태(PK)를 최적화하기 위해 사용될 수 있다는 것이 추가로 제시된다. 염 연구에 대하여 상기 입증된 바와 같이, FDKP 입자와 GLP-1의 상호작용은 현탁액의 pH에 영향을 받았다.

[0122] **이온 연구** - 본 실험의 경우, 두 개의 상이한 이온 연구를 실시하여 FDKP 입자에의 GLP-1의 결합에 대한 이온의 영향을 결정하였다. 두 연구에서, Cl^-은 양이온에 대한 카운터이온이었고, Na^+는 음이온의 카운터이온이었다. GLP-1/FDKP 입자의 로딩은 이전 실험에 대하여 기술된 바와 같이 수행하였다. pH는 위에 기술된 바와 같이 조절하였다. 시료는 NaCl(이온 세기가 높은 경우 더 잘 평가하기 위해 사용됨)의 존재 및 부재하에 pH 3.0, 3.5, 4.0 또는 5.0의 pH 완충액을 사용하여 준비하였다. LiCl 20 또는 250 mM, NH_4Cl 20 또는 250 mM, NaF 20 또는 250 mM 및 $NaCH_3COO$ 20 또는 250 mM와 같은 추가의 이온이 개개의 시료에 포함되었다.

[0123] 도 10A에 도시된 바와 같이 제 1 이온 연구로부터의 데이터는 pH 및 이온의 함수로서 GLP-1/FDKP에 대한 로딩 곡선을 보여준다. NaCl의 부재하에, 20 또는 250 mM의 농도의 불화물은 낮은 pH에서 흡착에 크게 영향을 미쳤으며(증대됨), 농도 250 mM의 NaF는 pH에 상관없이 최대의 결합을 나타내었다. 중탄산나트륨은 20 및 250 mM에서 동일한 효과를 보이지 않았기 때문에 이러한 패턴은 나트륨이 아닌 용액내 불화물에 의해서는 관찰된 것이다. 더욱이, 도 8에 도시된 바와 같이 동일한 농도의 염은 이러한 효과를 보이지 않았기 때문에, 이러한 효과들은 시료내 나트륨으로 인한 결과가 아니었다. 1M NaCl의 존재하에, 모든 이온은 높은 '식별가능한' 로딩을 제공하였다. 1M NaCl 시료에 대한 '식별가능한' 로딩은 높은 이온 세기의 존재하에 용액으로부터 GLP-1 펩타이드 염석으로부터 기인하였다. 이는 1M NaCl을 함유하는 재구성 FDKP-무함유 대조군 시료에 GLP-1이 존재한다는 것을 보여주는 도 10B에 추가로 설명되어 있다. 이들 대조군 시료에 대해 검출된 GLP-1의 양은 더 큰 이온 농도의 경우에 증가하였는데, 이는 이들이 시료내 총 이온 세기를 증가시켰기 때문이다.

[0124] 제 2 이온 실험에서(도 10C), KCl 20 또는 250 mM, 이미다졸 20 또는 250 mM, NaI 20 또는 250 mM 또는 $NaPO_4$ 20 또는 250 mM의 존재하에 GLP-1/FDKP 시료를 제조하였다. 250 mM 이미다졸의 경우 1M NaCl의 존재하에서 로딩이 감소하였고, 250 mM 인산염 및 250 mM 둘 다의 경우 높은 '식별가능한' 로딩을 제공하였음이 데이터를 통해 나타났다(도 10C). 0M 및 1M NaCl 농도의 재구성 FDKP-무함유 대조군 시료에서 검출된 GLP-1의 양에 기초한 바(도 10D), 이러한 효과들은 FDKP 입자와 펩타이드의 상호작용에 대한 것이 아니라 GLP-1 펩타이드 자체에 대한

이온의 영향으로부터 발생한 것이다. 인산나트륨 및 요오드화나트륨은 NaCl의 부재하에서 약간의 GLP-1 염석을 유발하였다. 추가적으로, 이미다졸이 1M NaCl 시료내 GLP-1의 용해를 도와 더 낮은 '식별가능한' 로딩을 제공하였다. 250 mM 인산염 및 요오드화물을 함유하는 OM NaCl 대조군에서 침전이 또한 관찰되었다.

[0125] **오스몰라이트 연구** - FDKP 입자에의 GLP-1의 결합에 대한 오스몰라이트의 영향을 또한 HPLC 분석에 의해 관찰하였다. 도 11A는 통상의 안정화제(오스몰라이트)의 존재하에 pH의 함수로서 GLP-1/FDKP에 대한 로딩 곡선을 나타낸다. GLP-1/FDKP 입자의 로딩은 이전 실험에 대하여 기술된 바와 같이 수행하였다. 마찬가지로, pH는 위에 기술된 바와 같이 제어하였다. 시료를 pH 3.0 및 20, 50, 100, 150, 200 또는 300 mM의 오스몰라이트(안정화제)의 존재하에 제조하였다. 오스몰라이트는 헥실렌-글리콜(Hex-Gly), 트레할로스, 글리신, PEG, TMAO, 만니톨 또는 프롤린이었고; N/A는 오스몰라이트 무함유를 가리킨다. 비슷한 실험에서, 시료내 오스몰라이트(안정화제)의 농도는 100 mM으로 일정하게 하였고, pH는 2.0에서 4.0으로 변경하였다.

[0126] pH를 3.0으로 유지하고 오스몰라이트의 농도를 변화시킨 경우(도 11A; 좌측 곡선)나 오스몰라이트 농도를 100 mM으로 일정하게 유지하고 pH를 변화시킨 경우(도 11A; 우측 곡선), 연구된 오스몰라이트(안정화제) 중 어느 것도 FDKP 표면에의 GLP-1 흡착에 대하여 극적인 충격이 없었다. 재구성된 FDKP-무함유 대조군 시료에서는 GLP-1의 침전이 전혀 검출되지 않았다(도 11B). 이들 오스몰라이트는 안정성 및/또는 약물동태를 최적화시키는데 사용될 수 있다.

[0127] **카오트로프 및 리오트로프 연구** - 물과 단백질(카오트로프 및 리오트로프)의 구조에 영향을 미치는 이온종을 연구하여 FDKP에의 GLP-1 흡착에서 이들 인자의 역할을 결정하였다. GLP-1/FDKP 입자의 로딩은 이전 실험에 대하여 기술된 바와 같이 수행하였다. 마찬가지로, pH는 위에 기술된 바와 같이 제어하였다. 시료는 0, 20, 50, 100, 150, 200 또는 300 mM의 하기 카오트로프 또는 리오트로프의 존재하 및 pH 3.0에서 제조하였다: NaSCN, CsCl, Na_2SO_4, $(CH_3)_3N$-HCl, Na_2NO_3, 시트르산나트륨 및 $NaClO_4$. 유사한 실험에서, 시료내 카오트로프 또는 리오트로프의 농도는 100 mM으로 일정하게 유지하였고 pH는 2.0에서 4.0으로 변화시켰다.

[0128] 도 12A는 pH와 카오트로프 및/또는 리오트로프의 함수로서 GLP-1/FDKP에 대한 로딩 곡선을 나타낸다. 낮은 pH (≤ 3)에서, 분석된 상이한 카오트로프, 특히 높은 카오트로프 농도에서 유의적인 로딩의 변화가 발생하였다. 그러나, pH 4에서는 이러한 변화가 관찰되지 않았다(도 12C). 따라서, 이들 제제는 불리한 더 낮은 pH에서 FDKP 입자에 대한 GLP-1의 결합을 촉진하나 결합에 유리한 더 높은 pH 조건에서 충격은 적은 것처럼 보인다. 재구성된 FDKP-무함유 대조군 시료로부터의 데이터는 pH 3.0에서 관찰된 로딩 변화가 일부 GLP-1 펩타이드의 염석(침전)에 여러 등급으로 영향을 미치는 특정의 카오트로프에 의한 것임을 제시한다(도 12B 및 도 12D). 이는 NaSCN 및 $NaClO_4$와 같은 강한 카오트로프의 경우에 현저하였다.

[0129] **유기물 연구** - 수소-결합 세기를 증가시켜 비구조화된 펩타이트에서 나선형 형상을 유도하는 것으로 알려진 알코올을 평가하여 FDKP에의 GLP-1 흡착에서 나선형 형상의 역할을 결정하였다. GLP-1/FDKP 입자의 로딩은 이전 실험에 대하여 기술된 바와 같이 수행하였다. 마찬가지로, pH는 위에 기술된 바와 같이 제어하였다. 각 알코올의 영향을 pH 2.0, 3.0, 4.0 및 5.0에서 관찰하였다. 사용된 알코올은 메탄올(MeOH), 에탄올(EtOH), 트리플루오로에탄올(TFE) 또는 헥사플루오로이소프로판올(HFIP)이었다. 각각의 알코올을 5%, 10%, 15% 및 20% v/v의 농도에서 평가하였다.

[0130] 도 13A는 GLP-1/FDKP에 대한 로딩 곡선을 각 농도의 각각의 알코올에 대한 pH의 함수로서 나타낸 것이다. FDKP 입자에 대한 GLP-1의 질량비에 의해 입증된 바와 같이, pH 3.0에서 저농도의 HFIP(5%)는 높은 흡착률을 생성하였다. 가장 강한 H-결합 강화(나선형-형성화) 알코올인 HFIP는 완충된 현탁액에서 흡착에 영향을 미쳤다. 더 높은 농도의 HFIP(20%)에서 GLP-1/FDKP 흡착은 억제되었다. 도 13B는 20% 알코올 농도의 경우에서 재구성된 FDKP-무함유 대조군 시료에서 GLP-1의 유의적인 침전은 전혀 없었음을 나타내는 것이다.

[0131] 이는 약물의 형상 유연성(즉, 형성될 수 있는 FDKP-접촉의 수 및 엔트로피)이 흡착에 영향을 미칠 수 있음을 제시한다. 상기 데이터는 H-결합이 상기한 조건하에서 FDKP 표면과의 GLP-1 상호작용에 영향을 미칠 수 있음을 제시한다. 데이터에 기초한 바, H-결합이 FDKP-GLP-1 상호작용에 우세하고 전반적인 힘으로 제공되었다면 더 크고 더 강한 영향이 고려되었을 것이 추가로 추측된다.

[0132] **농도 연구** - FDKP 입자 표면에 대한 GLP-1의 흡착을 다양한 농도의 GLP-1에서 조사하였다. 도 14A는 GLP-1/FDKP로부터의 로딩 곡선을 다양한 pH에서 GLP-1 농도의 함수로서 나타낸 것이다. GLP-1 농도는 0.15, 0.25, 0.4, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 5.0 또는 10 mg/mℓ이었다. 시료의 pH는 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 또는 5.0였다.

[0133] FDKP 농도를 5 ㎎/㎖로 일정하게 유지하고 GLP-1 농도를 증가시킨 경우, FDKP 입자에 대한 GLP-1 로딩의 증가가 관찰되었다. pH 4에서 GLP-1의 농도가 10 ㎎/㎖이었을 때 FDKP 입자에 대해 대략 20% GLP-1 흡착이 관찰되었다. 놀랍게도, FDKP 입자에 대한 GLP-1 로딩의 흡착 포화는 높은 농도에서 관찰되지 않았다. 이러한 관찰은 아마도 다층내로의 GLP-1의 자기회합에 기인한 것이다.

[0134] 주사전자현미경(SEM)에 의한 GLP-1/FDKP 제제의 형태 분석에 의해, GLP-1/FDKP 입자는 둘 이상의 GLP-1/FDKP 입자를 포함하는 응집체를 형성할 수 있는 결정형 또는 판형 구조로서 존재할 수 있는 것으로 나타났다(도 14B). 이들 제제는 pH 4.0에서 (패널 A) 0.5 ㎎/㎖ GLP-1 및 2.5 ㎎/㎖ FDKP; (패널 B) 0.5 ㎎/㎖ GLP-1 및 10 ㎎/㎖ FDKP; (패널 C) 20 mM 염화나트륨, 20 mM 아세트산칼륨 및 20 mM 인산칼륨 중 10 ㎎/㎖ FDKP 및 0.5 ㎎/㎖ GLP-1; (패널 D) 20 mM 염화나트륨, 20 mM 아세트산칼륨 및 20 mM 인산칼륨 중 50 ㎎/㎖ FDKP 및 10 ㎎/㎖ GLP-1을 함유하는 용액을 동결건조시킴으로써 제조되었다.

[0135] **결과의 요약**

[0136] 전반적으로, FDKP 입자와 GLP-1의 상호작용에 대한 흡착 연구에 의해 GLP-1이 pH-의존 방식으로 DKP 입자 표면에 결합하며 pH 4 이상에서 흡착률이 높은 것으로 나타났다. DKP 입자 표면에의 GLP-1의 흡착은 pH에 가장 강하게 영향을 받으며, pH 2.0에서는 흡착되지 않고 pH ≥ 4.0에서 실질적인 상호작용이 있는 것으로 밝혀졌다. 관찰된 바, 나트륨 및 불화물 이온은 낮은 pH에서의 흡착을 증대시켰다. 다른 첨가제, 이를 테면 계면활성제 및 통상의 안정제는 FDKP 입자 표면에의 GLP-1의 흡착에 대해 조금 밖에 영향을 미치지 않았다.

[0137] 게다가, GLP-1 자체의 특성이 이들 실험의 결과에 영향을 미쳤다. GLP-1의 거동은 고농도에서 GLP-1의 자기-회합에 기인된 흡착의 포화가 전혀 관찰되지 않았다는 점에서 비전형적이고 놀라운 것으로 밝혀졌다. 고농도에서 GLP-1의 자기-회합은 DKP 입자가 GLP-1 펩타이드의 복수층으로 코팅될 수 있도록 함으로써 GLP-1 펩타이드의 로딩률을 더욱 촉진한다. 이와 같은 놀라운 자기-회합 특성은 안정한 GLP-1 투여 형태의 제조에 있어 유리한 것으로 판명된다. 또한, GLP-1의 자기-회합된 형상은 혈액에서 그의 분해를 감소시키거나 지연시킬 수 있다. 그러나, 온도 및 높은 pH에 민감하므로 회합된 GLP-1을 사용할 경우 주의해야 한다는 것이 주목된다.

[0138] **실시예 3**

[0139] **GLP-1/FDKP 제제의 보전성 분석**

[0140] 실시예 1 및 2의 실험으로부터 얻은 결과에 기초한 바, 본원에 논의된 바와 같이 세포 생존율을 측정하기 위해 표 1에 기술된 특징을 가진 일련의 GLP-1 제제를 선택하였다. 제제의 대부분은 GRAS("통상적으로 안전한 것으로 인정된 것(generally recognized as safe)") 부형제를 함유하였지만, 일부는 안정성 및 흡착성 사이의 상호관계의 연구가 가능하도록 선택되었다.

[0141] 표 1. 보전성 위상 분석을 위해 선택된 GLP-1/FDKP 제제

조절제	양(mM)	완충액 무함유	pH 3.0	pH 4.0	pH 5.0
무		X	X	X	X
NaCl	1000		X	X	
NaCl	20			X	
Tween 80	0.01%			X	
HepSulf	0.90%			X	
Brij 78	0.09%			X	
F-	250			X	
F-	20	X		X	
Li+	20	X	X	X	
인산염	250		X	X	
인산염	20		X	X	X
이미디졸	250			X	
만니톨	20			X	
글리신	20			X	
Me_3N•HCl	50			X	
시트르산염	50			X	
Am_2SO_4	50			X	
ClO_4	50			X	
EtOH	20%			X	
TFE	20%			X	

[0142]

[0143] 또한, 실시예 1 및 2에서 수득된 결과에 기초한 바, GLP-1/FDKP의 위상 II 보전성 연구를 위해 일련의 제제가 또한 선택되었다. 아래 표 2는 위상 II 보전성을 위해 선택된 6 가지의 GLP-1제제를 나타낸 것이다. 분말을 제조한 후, 이들을 공시험(blank) FDKP와 혼합하여 각각의 제제내 GLP-1 펩타이드 및 FDKP 둘 다가 존재하는 비슷한 질량으로 수득하였다.

[0144] 표 2. 위상 II 보전성을 위해 선택된 GLP-1/FDKP 제제. pH 4.0 완충액 및 20mM NaCl 중 10 mg/mℓ GLP-1으로부터 제조된 제제는 염-회합 제제로서 기술되어 있다.

GLP-1 농도	질량비 (GLP/FDKP)	물 (완충액 무함유)	20mM NaCl + pH 4.0 완충액
0.5 mg/mL	0.05	X	X
3.0 mg/mL	0.10	X	X
10 mg/mL	0.20	X	X

[0145]

[0146] 표 2의 GLP-1/FDKP 제제에 대한 스트레스의 영향을 HPLC에 의해 분석하였다(도 15). H_2O에 로딩된 5%, 10% 또는 20% GLP-1/FDKP를 함유하는 시료 또는 NaCl + pH 4.0 완충액에 로딩된 5% 또는 10% GLP-1/FDKP를 40℃에서 10일간 인큐베이션하였다. HPLC 크로마토그램은 GLP-1 펩타이드가 동일한 체류 시간에 용출하고 피크 저하가 전혀 존재하지 않는다는 것을 입증한다. 더욱이, MS 분석은 모든 시료에 대해 유사한 질량 3297 g/mol을 수득하였으며, 이는 분석한 시료 모두의 질량이 균일하다는 것을 나타내는 것이다. 데이터는 동결건조 이전 용액에 존재한 다른 성분 및 FDKP 입자에 대한 GLP-1의 질량-대-질량 비를 나타낸다. 전반적으로, GLP-1/FDKP 제제는 스트레스에 안정한 것으로 나타났다.

[0147] **실시예 4**

[0148] **폐 세척액에서 인큐베이션 처리된 GLP-1의 안정성**

[0149] 폐액 및 혈액과 같은 생체액에서 GLP-1의 안정성을 분석한 바, 생체액에서 발견된 디펩티딜-펩티다아제 IV (DPP-IV)은 GLP-1을 절단하여 비활성화시킨다.

[0150] 디펩티딜-펩티다아제 IV (DPP-IV)는 몇몇 세포 형태(특히, $CD4^+$ T-세포)의 표면에 발현되는 세포외막-결합 세린 프로테아제이다. DPP-IV는 또한 혈액 및 폐액에서 발견된다. DPP-IV의 기질에는 두 개의 N-말단 아미노산을 제거함으로써 비활성화되는 인슐린친화적 호르몬 GLP-1이 포함되어 있기 때문에, DPP-IV는 포도당 대사의 조절에 관여한다; 도 16A를 참고할 수 있다. DPP-IV는 인간 GLP-1(GLP-1 (7-36))의 주된 순환 형태인 Ala-Glu 결합을 절단하여 N-말단의 두 개의 잔기를 방출한다. DPP-IV는 GLP-1을 분해하여 포도당 처리의 음성적인 조절을 행사함으로써 이자의 β 세포에 대한 인크레틴 영향을 낮춘다.

[0151] 아프로티닌 또는 DPP-IV 억제제의 존재하에 래트의 혈액 및 폐액에서 GLP-1 분해의 억제능을 결정하기 위해 연구를 수행하였다. 단백질 분해를 억제하는 것으로 당업계에 알려진 자연발생 세린 프로테아제 억제제인 아프로티닌을 1, 2, 3, 4 및 5 TIU/㎖로 수집후의 시료에 첨가하였다. 이어 DPP-IV 인식 Gly-Pro 서열을 가진 발광 기질(luminescent substrate)의 절단을 검출함으로써 DPP-IV 활성을 측정하였다. 기관지 폐 세척액을 30분동안 전구발광(proluminescent) 기질과 함께 인큐베이션하고 절단 생성물을 발광에 의해 검출하였다.

[0152] 아프로티닌 농도가 증가함에 따라 다양한 생체액(본원에 논의된 바와 같이)에서 펩타이드 분해의 억제가 검출되었는 바, 데이터는 DPP-IV 활성 억제의 증가를 나타내었다(도 16B). 1.25, 2.5, 5, 10 및 20 ㎕/㎖로 수집후 시료에 첨가된 DPP-IV 억제제에 의해 유사한 결과가 관찰되었다(도 16C). 시료 수집후 억제제의 첨가에 의해 더욱 정확한 시료의 평가가 가능해졌다.

[0153] GLP-1의 안정성을 또한 GLP-1 아미노산 7-9를 인식하는 포획(capture) ELISA mAb를 사용하여 폐 세척액에서 조사하였다. GLP-1을 폐 세척액(LLF)에서 2, 5, 20 및 30 분동안 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 조건은 도 17에 도시된 바와 같이 1 또는 10 ㎍ (w/w)의 LLF 및 1 또는 10 ㎍ (w/w)의 GLP-1이었다. LLF 단독인 경우 GLP-1은 검출되지 않았다. 다양한 농도의 GLP-1과 LLF의 배합물의 경우, GLP-1 단독인 경우에 상당하는 정도로 GLP-1이 높게 검출되었는데, 이는 폐 세척액내에서 GLP-1이 장기간에 걸쳐 안정하다는 것을 나타내는 것이다(도 17). 희석되지 않은 폐 세척액에서의 GLP-1의 안정성을 유사한 연구로 확인하였으며; 20분에 70-72% GLP-1 보전성이 주목되었다(데이터 도시하지 않음).

[0154] 게다가, 래트 혈장에서 GLP-1의 안정성을 조사하였다. 혈장은 여러 래트로부터 얻었고(도면 설명에서 혈장 1 및 혈장 2로 표시됨), 1:2 또는 1:10 (v/v)으로 희석하였다. 1 ㎍의 GLP-1을 10 ㎕의 혈장 또는 PBS에 첨가하였다. 시료를 37℃에서 5, 10, 30 또는 40 분동안 인큐베이션시켰다. 반응을 얼음으로 정지시키고, 0.1U의 아프로티닌을 첨가하였다. 데이터는 시험한 모든 시점에 걸쳐 혈장 희석액 1:2 및 1:10에서 GLP-1이 고농도임을 보여주고 있다(도 18A 및 도 18B). 전반적으로, 상기 데이터는 GLP-1이 놀랍게도 세린 프로테아제 DPP-IV가 발견되는 혈장 및 폐 세척액 모두에서 안정하다는 것을 나타낸다.

[0155] **실시예 5**

[0156] **세포자멸사 및 세포 증식에 대한 GLP-1 분자의 영향**

[0157] GLP-1이 세포자멸사를 억제하는 지를 조사하기 위해, 스크리닝 측정법을 수행하여 β-세포사 억제에 대한 GLP-1의 영향을 결정하였다. 래트의 이자 상피 (ARIP) 세포(이자 β-세포 모델로서 사용됨; 버지니아 머네서스 소재 ATCC로부터 구입)를 0, 2, 5, 10, 15 또는 20 nm 농도의 GLP-1으로 10 분동안 예비처리하였다. 이어, 세포를 처리하지 않거나 5 μM 스타우로스포린(세포자멸사 유도물질)으로 4.5 시간동안 처리하였다. Cell Titer-Glo™(위스콘신주 매디슨 소재 프로메가(Promega))를 사용하여 세포 생존율을 산출하였다. 스타우로스포린 처리 세포에서 최대 10 nM까지 GLP-1 농도가 증가함에 따라 세포사의 비율이 감소하였다(도 19A).

[0158] 세포자멸사에 대한 GLP-1의 영향의 추가 조사가 아넥신 V 염색을 사용하여 FACS 분석에 의해 결정되었다. 아넥신 V 염색은 세포자멸사 세포를 검출하는데 있어서 유용한 도구로서 당업자들에게 널리 알려져 있다. 세포막에의 아넥신 V의 결합은 세포자멸사와 관련된 형태학적 변화가 일어나기 전 및 막 보전성을 잃기 전 인지질(PS, phospholipid) 비대칭 변화를 분석가능하게 한다. 따라서, 세포자멸사에 대한 GLP-1의 영향은 15 nm GLP-1로 처리한 세포, 4 시간동안 1 μM 스타우로스포린으로 처리한 세포, 1 μM 스타우로스포린 + 15 nm GLP-1로 처리한 세포 또는 스타우로스포린 또는 GLP-1로 처리하지 않은 세포(실험 대조군)에서 결정하였다. 데이터는 GLP-1 억

제 스타우로스포린이 약 40%의 세포자멸사를 유도하였다는 것을 보여주고 있다(도 19B).

[0159] GLP-1과 유사한 방식으로 GLP-1 수용체에 결합하는 GLP-1 유사체인 엑센딘-4를 사용하는 경우 유사한 세포자멸사 억제의 결과가 관찰되었다. ARIP 세포를 0, 10, 20 또는 40 nM 엑센딘의 존재하에 각각 16, 24 또는 48 시간 동안 5 μM 스타우로스포린으로 처리하였다. 데이터(도 20)는 100% 세포사였던 바 10 nM에서 엑센딘은 세포자멸사 억제에 전혀 효과가 없었음을 보여주고 있다. 20 및 40 nM에서 엑센딘은 40 nM 엑센딘-4의 존재하 48 시간에서 약 50% 억제율로 어느 정도 세포자멸사를 억제하였다.

[0160] **실시예 6**

[0161] **세포사에 대한 후보 GLP-1/FDKP 제제의 영향**

[0162] 세포-기초 측정을 수행하여 GLP-1/FDKP 제제(상기 실시예 3, 표 1에 개시된 바와 같음)의 세포사 억제능을 평가하였다. 이들 GLP-1/FDKP 입자 제제를 현탁액으로 하거나 동결건조시켰다. 제제를 ARIP 세포에서 스타우로스포린-유도 세포사를 억제하는 그의 능력에 대해 분석하였다. GLP-1 시료로 예비처리한 ARIP 세포를 5 μM 스타우로스포린에 4 시간동안 노출시키고 Cell Titer-Glo^{M}(위스콘신주 매디슨 소재 프로메가(Promega))로 분석하여 세포 생존율을 측정하였다.

[0163] 다양한 GLP-1/FDKP 제제의 시료에 스트레스를 가하지 않거나 4℃ 또는 40℃에서 4 주간 스트레스를 가하였다. 각각의 GLP-1/FDKP 시료를 45 nM으로 세포-기초 측정법에 사용하여 스타우로스포린-유도 세포사를 억제하는 그의 능력을 측정하였다. 우측에 도시된 대조군 시료는 배지 단독, GLP-1 단독, 스타우로스포린 단독, 또는 GLP-1 및 스타우로스포린 둘 다의 존재하에서의 세포의 생존율을 나타낸다(주: 그래프의 설명은 대조군 시료에 적용되지 않는다. 각각의 막대는 분리된 삼중 실험을 나타낸다). 도시된 모든 결과는 삼중 실험의 평균이다.

[0164] 데이터는 스트레스를 가한 GLP-1/FDKP 동결건조 제제 모두가 스타우로스포린-유도 세포사를 억제하였다는 것을 보여준다(도 21). 그러나, 세포사는 다수의 GLP-1/FDKP 현탁액 제제에 의해 억제되지 않았다.

[0165] **실시예 7**

[0166] **GLP-1/DKP 입자의 폐 통기**

[0167] GLP-1/FDKP의 약물동태를 조사하기 위해, 정맥내 주사 또는 폐 통기를 통해 GLP-1/FDKP의 다양한 제제를 투여한 암컷 스프래그 돌리 래트에서 GLP-1의 혈장 농도를 평가하였다. 예비 연구에서, GLP-1/FDKP 입자 제제 중 대략 4% 및 16% (w/w)의 GLP-1을 사용하였다. 래트를 무작위로 12 그룹으로 나누고, 그룹 1, 4, 7 및 10에는 폐 액체 점적 주입(plumonary liquid instillation) 또는 IV 주사를 통해 GLP-1 용액을 투여하였다. 그룹 2, 5, 8 및 11에는 폐 통기 또는 IV 주사를 통해 GLP-1/FDKP 염-관련 제제를 투여하였다(표 2에 기술된 바와 같이). 그룹 3, 6, 9, 12에는 폐 통기 또는 IV 주사를 통해 GLP-1/FDKP 염-관련 혼련 제제를 투여하였다. GLP-1/DKP 제제는 대략 16% 로딩률의 염-관련 제제였다. 대략 4% 로딩률을 달성하기 위해, 16% 제제를 DKP 입자와 3:1의 혼합비로 혼련하였다. 총 GLP-1 투여량 0.08 mg에 대해 0.5 또는 2.0 mg의 입자를 폐 통기 또는 정맥내 주사하였다(각각 16% 또는 4% GLP-1 로딩률).

[0168] 별도의 동물 그룹(그룹 7-12)에서, 2 일째 투여를 반복하였다. 그룹 1, 4, 7 및 10에는 80 ㎍의 GLP-1 용액을 투여하였다. 그룹 2, 5, 8 및 11에는 GLP-1/DKP 염-관련 제제를 투여하였다(약 16% GLP-1 로딩률). 그룹 3, 6, 9 및 12에는 GLP-1/DKP 염-관련 혼련 제제를 투여하였다(약 4% GLP-1 로딩률).

[0169] 실험을 동일한 제제를 사용하여 2회 수행하였고, 2일 연속 투여 및 혈액 수집하였다. 각각의 그룹에 대하여 투여 당일 투여전(시간 0) 및 투여하고 2, 5, 10, 20, 30, 60 및 120 분후에 혈액 시료를 취했다. 각각의 시점마다 대략 150 ㎕의 전혈(whole blood)을 외측 꼬리 정맥으로부터 대략 3 U/㎖ 아프로티닌 및 0.3% EDTA를 함유하는 사이로-바이얼(cyro-vial) 튜브로 수집한 다음, 역전시켜(inverted) 얼음위에 저장하였다. 혈액 시료를 4000 rpm으로 원심분리하고 40 ㎕의 혈장을 96-웰 플레이트에 피펫으로 옮겨 -80℃에서 저장한 다음 제조업자의 권고(미주리 세인트 챨스 소재 린코 리서치(Linco Research))에 따라 ELISA로 GLP-1 수준을 분석하였다. 측정 완충액이 혈청(5% FBS)만 존재하고 매트릭스가 없는 GLP-1인 경우 최적 조건인 것으로 결정되었다.

[0170] *정맥내 투여:* 그룹 5, 6, 10, 11 및 12에는 다양한 GLP-1/FDKP 제제 및 GLP-1 용액을 정맥내(IV) 투여하였다; (도 22A). 그룹 5 및 6에는 15.8% GLP-1/FDKP를 투여하였고, 그룹 11 및 12에는 연일 15.8% GLP-1/FDKP를 추가 투여하였으며; 그룹 10은 대조군으로서 GLP-1 용액을 투여하였다. GLP-1/FDKP의 농도는 0, 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 및 120 분의 시점에 검출하였다. 모든 그룹에서 정맥내 투여후 검출가능한 정도의 GLP-1 혈장 수준

의 증가를 보였으며, 처리하고 2 분후에 최대 농도가 관찰되었다. 활성 GLP-1의 혈장 수준은 모든 그룹에 대해 처리하고 20 분후에 배경 수준(background level)으로 회복하였다. 정맥내 주사에 의해 투여한 경우, GLP-1 용액 및 GLP-1/FDKP의 이들 다양한 제제의 동력학에서 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. GLP-1의 혈장 수준이 정맥내 주사를 통해 처리된 래트에서 투여하고 10-20 분후에 기준선 수준으로 회복되었다는 것은 생리학적 동력학(즉, 약 95%의 GLP-1이 10 분이내에 제거된다)을 제시하는 것임을 알 수 있다.

[0171] *단일 통기 투여:* 그룹 1, 2, 3, 7, 8, 9 및 12에는 폐 통기에 의해 다양한 GLP-1/FDKP 제제 또는 GLP-1 용액을 제공하였다(도 22B). 그룹 1에는 폐 액체 점적 주입(LIS, liquid instillation)에 의해 80㎍의 GLP-1 대조군을 투여하였고; 그룹 2에는 폐 통기(IS)에 의해 15.8% GLP-1/FDKP를 투여하였으며; 그룹 3에는 폐 통기(IS)에 의해 3.8% GLP-1/FDKP를 투여하였고; 그룹 7에는 폐 액체 점적 주입(LIS)에 의해 80㎍의 GLP-1 대조군을 투여하였으며; 그룹 8에는 폐 통기(IS)에 의해 15.8% GLP-1/FDKP를 투여하였고; 그룹 9에는 폐 통기(IS)에 의해 3.8% GLP-1/FDKP를 투여하였다. GLP-1/FDKP의 농도는 시점 0, 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 및 120 분에 측정하였다.

[0172] 모든 그룹에서 폐 투여후 검출가능한 정도의 혈장 GLP-1 농도의 증가를 보였다. GLP-1의 최대 혈장 농도는 사용된 제제/조성물에 따라 변하였다. 그룹 2 및 8은 AUC에 의해 나타낸 바와 같이 처리 10-20 분후에 GLP-1의 최대 혈장 수준을 보인 반면, 그룹 3 및 9는 5-10 분에 활성 GLP-1의 유의적인 수준을 보였고, 그룹 1 및 7은 활성 GLP-1의 혈장 수준의 더욱 신속하고 순간적인 증가를 보였다. 활성 GLP-1의 혈장 수준은 그룹 2, 3, 7 및 8에서 처리 60 분후에 배경 수준으로 회복한 반면, 그룹 1 및 7은 처리 20 분후에 배경 수준에 도달하였다.

[0173] 8 나노몰의 GLP-1은 당뇨병 래트 모델에 효능이 있는 것처럼 보였고; GLP-1 투여량은 80㎍(보고된 유효 투여량보다 3000-배 많은 양)이었으며; 투여 30 분후 혈장 GLP-1 수준은 3 시간 주입(Chelikani et al., 2005)에 비해 폐 전달의 경우 10-배 컸고; 폐 통기를 통해 전달된 GLP-1/FDKP의 생체이용효율은 71%이었다. 이들 결과가 아래 표 4에 추가로 기록되어 있다. GLP-1의 혈장 수준은 폐 전달을 통해 처리된 대부분의 래트에서 투여 30-60 분후에 기준선 수준으로 회복되었다. 그룹 1에서 한 마리를 제외하고, 래트 모두에서 다양한 GLP-1/FDKP 제제의 정맥내 투여 또는 폐 통기후 GLP-1의 혈장 농도가 증가한 것으로 나타났다.

[0174] *결론:* GLP-1 용액과 비교하여 GLP-1/FDKP 제제의 약물동태학적 프로파일에서 차이가 관찰되었다. GLP-1의 혈장 농도는 GLP-1 용액으로 처리한 래트에 비해 GLP-1/FDKP 제제로 폐 통기에 의해 처리한 래트에서 더욱 지속되었다. 동물 모두에서 투여하고 20 내지 60 분사이에 GLP-1의 혈장 농도의 점진적 감소를 보였다. 이러한 결과는 연속 2 일간 수행된 2번의 실험에서 비교적 일관성있게 나타났다.

[0175] 표 4. GLP-1/FDKP 제제의 생체이용효율

그룹	제제	**GLP-1** 투여량 **(㎍)/ ㎛M**	경로	$T_{1/2}$ (분)	T_{max} (분)	C_{max} **(pM)**	투여하고 30분후 **(~pM)**	**AUC (pM* 분 /mL)**
1	GLP-1	80/24	LIS	1.0	5	1933	0	29350
2	FDKP-GLP-1	80/24	IS	9.9	10	3154	1000	145082
3	FDKP-GLP-1*	80/24	IS	7.7	10	2776	400	60171

[0176] * 3:1로 FDKP 입자와 혼련된 것

[0177] **실시예 8**

[0178] **GLP-1/FDKP는 래트의 음식물 섭취량을 감소시킨다.**

[0179] GLP-1은 또한 뇌에 포만감을 유발하도록 작용하여 음식물 섭취량을 감소시키는 것으로 당업계에 알려져 있다. 포만감을 유발하고 음식물 섭취량을 감소시키는 역할에 기초하여, 본 발명의 GLP-1/FDKP 제제가 음식물 섭취량을 감소시킴으로써 비만증의 억제 가능성이 있는 제제로서 유효한 지를 결정하기 위한 실험을 수행하였다.

[0180] 두 그룹의 암컷 스프래그 돌리 래트에 폐 통기에 의해 대조군(공기) 또는 2 ㎎/일의 투여량(0.32 ㎎ GLP-1/투여)으로 15.8% GLP-1/FDKP 제제를 투여하였다. 대조군 그룹은 5 마리의 래트로 이루어졌고, 시험군 그룹은 10 마리의 래트로 이루어졌다. 각 래트에 단일 투여로 연속 5 일동안 제공하고 각각 투여하고 2 및 6 시간 후에 음식물 섭취량을 측정하였다. 각 래트의 체중을 매일 수집하였다.

[0181] 예비 데이터에 따르면, GLP-1/FDKP 제제가 투여된 래트에서 누적하는 음식물 소비량은 투여하고 2 및 6 시간후

에 전반적으로 감소한 것으로 나타났다(도 23A 및 23B). 이러한 감소는 4 일째 투여하고 2 시간후에 더욱 두드러졌다(p=0.01). 1 및 2 일째 6 시간에, 더욱 두드러지게 감소하였다(p<0.02). 투여하고 24 시간후에는 음식물 소비량에 대한 영향이 없었다.

[0182] **실시예 9**

[0183] **독성 연구**

[0184] 복수회 투여후 GLP-1/DKP의 잠재 독성 효과 및 독성동태학적 프로파일을 평가하기 위해 반복 투여 독성 연구를 수행하였다. 래트에서 14 일간 연구 및 원숭이에서 28 일간 연구를 실시하였다. 흡입 경로를 통해 GLP-1/DKP를 매일 투여하였다. 28 일간 투여한 동물의 연구에서, 동물의 일부는 투여 처방후 즉시 희생된 반면 나머지 동물은 희생전에 1 개월의 회복 기간이 허용되었다. 동물 모두를 임상 징후, GLP-1, 포도당, 인슐린을 비롯한 각종 생리학적 파라미터, 장기 중량 및 각종 장기의 임상 병리학 및 조직병리학에 대하여 평가하였다.

[0185] 일련의 GLP 돌연변이유발성 연구를 수행하여 디케토피페라진 입자의 돌연변이유발 잠재력을 평가하였다. 이들 연구에는 시험관내 에임스법(Ames) 및 염색체 이상 측정법이 포함되었는데, 이 방법 둘 다 당업자들에 널리 알려져 있다. 그에 더하여, 당업자들에게 알려진 생체내 마우스 미소핵 측정법(micronucleus assay)이 또한 수행되었다. 유전독성 데이터에 의해, 디케토피페라진 입자에 의한 유전 독성 또는 돌연변이유발성의 잠재가능성에 대한 징후가 전혀 없는 것으로 나타났다.

[0186] 생식 독성(reproductive toxicity)에 대한 디케토피페라진 입자의 영향을 평가하기 위한 연구를 또한 수행하였다. 이들 연구에는 래트 및 토끼의 수정력, 배태자 발생(embryo-fetal development) 및 출생후 발육 연구가 포함되었다. 피하 주사를 통해 투여된 디케토피페라진 입자는 래트의 수정력 또는 착상력을 손상시키지 않으며, 래트 또는 토끼의 최기형성에 대한 징후가 전혀 없다. 디케토피페라진 입자는 수정력 및 조기 배발생, 배태아 발생, 또는 출생전 또는 출생후 발육에 악역향을 미치지 않았다.

[0187] 다수의 의약품이 LQT 증후군(후천성 LQTS 또는 Q-T 연장 증후군은 다른 점에서는 건강한 사람에게서 발생할 수 있는 드문 심장의 전기적 율동의 유전성 장애임)을 일으키는 경향이 있어 임상 시장으로부터 배제된 것을 고려한 바, hERG(human ether-a-go-go related gene) 측정법을 사용하여 디케토피페라진 입자의 약리학을 조사하였다. 후천성 LQTS를 유발하는 의약품의 대부분이 심실 심장 활동 전위의 재분극에 관여하는 hERG 칼륨 통로를 차단함으로써 그와 같이 유발하는 것으로 고려하여 hERG 측정법을 이용하였다. hERG 측정법의 결과는 디케토피페라진 입자에 대해 IC_{50}>100 μM을 나타내었다. 그에 더하여, 개에서 연장이 관찰되지 않은 바(9 개월 또는 안전성 약리 심장혈관 연구), 디케토피페라진 입자에 의한 비임상적 연구의 결과는 QTc 간격(심박수에 따라 보정한 QT 간격)에 대한 영향이 없음을 보여주었다. 정맥내 투여되었을 때 안전성 약리 핵심 시험계(safety pharmacology core battery)에서 평가된 CNS 또는 심장혈관계에 대한 영향은 없었다.

[0188] **실시예 10**

[0189] **β-세포괴에 대한 GLP-1의 영향**

[0190] GLP-1은 인슐린 생합성의 모든 단계를 촉진하고 β-세포 분화뿐만 아니라 β-세포 성장 및 생존을 직접적으로 자극하는 것으로 알려져 있다. 이러한 영향들의 조합에 의해 β-세포괴가 증가한다. GLP-1 수용체 신호전달은 β-세포 세포자멸사를 감소시키는데, 이것 또한 β-세포괴의 증가에 기여한다. GLP-1은 다음과 같은 세 가지 가능한 경로에 의해 β-세포괴를 조절하는 것으로 알려져 있다: β-세포 증식의 증대; β-세포 세포자멸사의 억제; 및 도관 상피내 추정 줄기 세포의 분화.

[0191] β-세포괴에 대한 GLP-1의 영향을 입증하기 위해, 세포를 1, 3 및 5 일째에 GLP-1/FDKP로 처리한 다음 미처리 세포와 비교하였다. 활성 GLP-1의 투여에 의해 β-세포괴가 문헌(Sturis et al., 2003)에 제시된 것의 최대 2-배까지 증가하였다. 그에 더하여, 당뇨병에 대한 각종 GLP-1 수용체 (GLP-1R) 작용제의 영향을 조사하여 GLP-1R 작용제가 당뇨병의 발생 또는 진행을 예방하거나 지연시킨다는 것을 입증하였다.

[0192] 수컷 쥬크 당뇨병 지방/비만(ZDF, Zucker Diabetic Fatty/Obese) 래트(n=8/그룹)에서 β 세포 증식, 인슐린 및 포도당에 대한 GLP-1/FDKP의 영향을 평가하였다. 동물에 대조군(공기) 또는 연속 3 일간 매일 15% (0.3 ㎎) GLP-1을 함유하는 GLP-1/FDKP 2 ㎎을 제공하였다. 복막내(IP) 포도당 부하 시험을 수행하였고, 혈장 GLP-1 및 포도당 분석을 위해 투여전 및 투여하고 15, 30, 45, 60 및 90 분후 혈액 시료를 수집하였다. 면역조직화학을 통한 인슐린 분비, β 세포괴 및 세포자멸사 분석을 위해 이자 조직을 수집하였다.

[0193] IP 포도당 부하 시험(IPGTT, 도 24)를 투여 4 일째에 수행하였다. 하룻밤 절식시킨 후, 3 일째에 동물에 복막내 주사에 의해 포도당 볼루스를 제공한 다음 즉시 폐 통기를 통해 대조군(공기) 또는 GLP-1/FDKP를 투여하였다. 포도당 부하(glucose challenge) 이전 및 투여하고 90 분후까지 여러 시점에서 혈액을 수집하였다. 투여하고 30 분후, 그룹 1은 투여전에 비해 포도당 수준이 47% 증가한 것으로 나타난 반면, 그룹 2(GLP-1/FDKP)는 투여전 수치에 비해 포도당 수준이 17% 증가한 것으로 나타났다. 포도당 수준은 대조군 동물에 비해 처리군 동물에서 포도당 부하 시험이후 모든 시점에 걸쳐 유의적으로 낮아졌다($p<0.05$).

[0194] GLP-1 수준을 또한 투여 3 일째에 측정하였다(도 25). 그룹 2에서 혈장 GLP-1 수준의 최대 농도는 투여하고 15 분후에 10,643 pM이었다.

[0195] 그에 더하여, 3 일째에 IP 포도당 부하 시험후 포도당 측정과 함께 여러 시점에서 인슐린 수준을 측정하였다. 대조군(공기) 그룹 1 및 그룹 2(GLP-/DKP) 모두 투여하고 15 분후까지 투여전 수준으로부터 각각 46% 및 30%의 인슐린 농도의 초기 감소를 보여주었다(도 26). 그러나, 투여하고 30 분후 그룹 2의 인슐린 수준은 기준선으로 회복된 반면, 그룹 1의 인슐린 수준은 투여전 수치의 60%로 계속 감소하였다. 처리군 동물에서 45 분, 60 분 및 90 분에서의 인슐린 수준은 투여전 수치에 가까웠으며, 편차는 1.5% 미만이다.

[0196] 인슐린 면역염색 및 인슐린 발현의 현미경적 평가를 위해 슬라이드를 준비하였다. 광학 현미경에 의한 인슐린 발현의 정량적 평가에 기초하여, 수컷 ZDF 래트의 이자내에서 처리에 따라 투여량-의존적으로 인슐린 발현이 증가하였지만, 인슐린을 발현하는 β 섬세포의 비율로 결정된 바 통계적 유의치에는 도달하지는 않았다 (($p=0.067$).

[0197] ZDF 래트의 이자 조직에 대한 세포자멸사 분석을 또한 수행하였다. 외분비 및 내분비 이자 세포를 TUNEL 측정법(Tornusciolo D. R. et al., 1995)에 의해 평가하였다. 이자(외분비 및 내분비)에서 대략 10,000 개의 세포에 점수를 매겼다. 대부분의 TUNEL-양성 세포는 외분비였다. 대조군 그룹과 비교하여 처리군 그룹에서 세포자멸사 표지 지수는 차이가 나지 않았다.

[0198] 그에 더하여, 폐 통기를 통해 대조군(공기) 또는 GLP-1/FDKP를 3 일간 매일 한번씩 투여한 쥬커 당뇨병 비만 래트의 이자에서 β 세포 증식을 평가하였다. 면역조직화학을 이용한 Ki67(증식 마커) 및 인슐린의 공국재화(co-localization)를 위해 슬라이드를 제조하였다. 총 17 마리의 ZDF 래트의 외분비 이자에서 및 인슐린-양성 섬세포내에서 세포 증식의 현미경적 평가를 수행하였다. 세포 증식의 정량적 평가에 기초하여, 수컷 ZDF 래트 이자의 베타 섬세포 또는 외분비 세포에서의 세포 증식에 대한 처리-관련 영향은 없었다.

[0199] 전반적으로, 본 연구는 폐 통기를 통해 2 ㎎ 또는 0.3 ㎎의 GLP-1로 투여된 GLP-1/FDKP가 포도당 부하 시험후 당뇨병 비만 래트(2형 당뇨병 모델)의 혈당 수준을 저하시키고 섬(islet) 당 인슐린 분비 세포의 수를 증가시켰음을 보여준다.

[0200] **실시예 11**

[0201] **GLP-1/FDKP 입자 제제의 제조**

[0202] GLP-1/FDKP 입자 제제를 제조하기 위한 대체 방법이 또한 사용되었다. 제제는 다음과 같이 제조하였다: 9 중량부의 탈이온수에 1 중량부의 GLP-1을 첨가하고 소량의 빙초산을 첨가하여 투명한 용액을 수득함으로써 10 wt%의 GLP-1 원액(stock solution)을 제조하였다. FDKP 입자의 원 현탁액(대략 10 wt% 입자)을 세 부분으로 나누었다. 적절량의 GLP-1 원액을 각각의 현탁액에 첨가하여 건조 분말로 5 및 15 wt% GLP-1의 표적 조성물을 제공하였다. 단백질 용액의 첨가후, 현탁액의 pH는 대략 3.5였다. 이어, 현탁액의 pH를 대략 4.4-4.5가 되도록 조정한 후, 현탁액을 액체 질소에 피펫으로 옮긴 다음 동결건조시키고 얼음을 제거하였다.

[0203] 충진물(fill)에 대한 호흡가능 분률(충진물에 기초한 RF), 즉 카트리지내 분말의 정량에 의해 표준화된 호흡가능 범위의 분말의 비율(%)의 관점에서 분말의 공기역학을 특징화하였으며, 다음과 같이 측정하였다; 5 ㎎의 분말을 5 개의 카트리지에 손으로 충진하고 MannKind's MedTone® 흡입기(미국 특허출원 제10/655,153호에 개시됨)를 통해 배출시켰다.

[0204] 이 방법에 의해 충진물에 대해 우수한 RF를 가진 제제를 조제하였다. 5 wt% GLP-1을 함유하는 분말은 48.8%RF/충진물로 측정된 반면, 대략 15 wt% GLP-1을 함유하는 분말은 32.2%RF/충진물로 측정되었다.

[0205] **실시예 12**

[0206] **다양한 GLP-1 농도를 가진 GLP-1/FDKP의 약물동태**

[0207] 다양한 농도의 GLP-1을 가진 GLP-1/FDKP의 약물동태학적 특성을 평가하기 위해, 체중 192.3 그램 내지 211.5 그램의 암컷 스프래그 돌리 래트 18 마리를 4 개의 처리군 그룹으로 나누었다: 대조군 GLP-1(그룹 1, n=3); GLP-1/FDKP 제제 (그룹 2-4, n=5/그룹). 하기 피험 물질 중 하나를 동물에게 제공하였다: 폐 통기를 통한 대조군(공기); 5% GLP-1을 함유하는 GLP-1/FDKP 2.42 mg(0.12 mg GLP-1); 폐 점적 주입(plumonary instillation)을 통한 10% GLP-1을 함유하는 GLP-1/FDKP 1.85 mg(0.19 mg GLP-1); 또는 폐 점적 주입을 통한 15% GLP-1을 함유하는 GLP-1/FDKP 2.46 mg(0.37 mg GLP-1). 혈액 시료를 수집하고 투여전 및 투여후 여러 시점(2, 5, 10, 20, 30, 40 및 60 분)에 혈청 FDKP 및 혈장 GLP-1 수준을 측정하였다.

[0208] GLP-1/FDKP(5% 제제) 투여후 최대 혈장 GLP-1 농도(C_{max})는 투여하고 5 분후인 T_{max}에서 2321 pM; 투여하고 10 분후인 T_{max}에서 4,887 pM(10% 제제); 및 투여하고 10 분후인 T_{max}에서 10,207 pM(15% 제제)이었다. 도 27에 도시된 바와 같이, 투여하고 30 분후에 유의적인 GLP-1 수준이 관찰되었다. 그룹 1 내지 4 각각에 대한 GLP-1의 농도 곡선하면적(AUC, area under the curve)은 10622, 57101, 92606, 227873 pM*분이었다. GLP-1의 추정 반감기는 10% 또는 15% GLP-1 로딩률의 GLP-1/FDKP에 대해 10 분이었다.

[0209] 도 28에 도시된 바와 같이, 5%, 10% 및 15% GLP-1의 GLP-1/FDKP 제제에 대한 최대 FDKP 농도는 각각 8.5 ㎍/㎖(그룹 2), 4.8 ㎍/㎖(그룹 3) 및 7.1 ㎍/㎖(그룹 4)로 결정되었다. 최대 농도에 대한 시간(T_{max})은 10 분이었다. FDKP 및 GLP-1이 유사한 흡착 동태를 보였고, 소량의 FDKP가 입자에의 GLP-1 로딩률과 관계없이 흡착되었음이 본 데이터에 의해 제시되었다.

[0210] 전반적으로, 본 연구는 스프래그 돌리 래트에서 폐 통기를 통한 GLP-1/FDKP의 단회 투여후 혈장 GLP-1 수준이 유의적인 수준으로 검출되었음을 보여주었다. 혈장 GLP-1 수준의 투여량-의존성 증가가 관찰되었으며, 최대 농도는 투여하고 대략 10 분후에 달성되었고, 주목할만한 GLP-1 수준은 투여하고 40 분후에 달성되었다. 동물 모두는 본 연구가 종료될 때까지 생존하였다.

[0211] **실시예 13**

[0212] **폐 통기를 통해 투여된 GLP-1/FDKP의 약역학적 특성**

[0213] GLP-1/FDKP의 약역학적 특성을 평가하기 위해, 암컷 스프래그 돌리 래트를 2 개의 처리군 그룹으로 나누었다. 동물에는 1일 1회 폐 통기(n=10)를 통해 연속 4 일동안 15% GLP-1을 함유하는 2 mg의 GLP-1/FDKP(0.3 mg GLP-1) 및 대조군(공기; n=5)을 제공하였다.

[0214] 연속 4 일간 투여전, 투여하고 1, 2, 4 및 6 시간후에 암주기 동안 음식물 소비량을 측정하였다(도 29). 대조군(공기) 그룹에 비해 처리군 동물에서 폐 통기를 통해 1일 1회 투여한 후 1, 2 및 3 일째에 음식물 소비량이 감소하였다($p<0.05$). 1 일째에는 1 시간 및 6 시간의 시점에, 2 일째에는 4 시간의 시점에 및 3 일째에는 6 시간 및 투여전의 시점에 대조군(공기)에 비해 처리군 그룹에서 동물의 음식물 소비량이 통계적으로 유의하게 감소하였다.

[0215] 연속 4 일동안 매일 투여전에 체중(도 30)을 측정하였다. 투여 개시시 체중의 범위는 약 180 내지 209 그램이었다. 처리군 및 대조군(공기) 동물 사이에서 통계적 유의치에는 도달하지 않았지만, 처리군 동물의 체중이 더 감소하였다. 동물 모두 예정된 희생 때까지 생존하였다.

[0216] **실시예 14 - 16**

[0217] **독성동태학적(TK) 연구**

[0218] 이하의 실시예 14 내지 16은 GLP-1/FDKP 흡입 분말의 잠재 독성 효과 및 독성동태학적 프로파일을 평가하기 위해 래트 및 원숭이에서 수행된 반복 투여 독성 연구를 설명한다. 임상 사용을 위해 제안된 것보다 몇 배 높은 투여량의 GLP-1/FDKP 흡입 분말에 의해서는 식별가능한 정도의 독성은 없다는 것이 데이터를 통해 나타났다. 추가로, 각각의 종의 암컷과 수컷 동물 사이에는 차이가 없는 것처럼 보였다.

[0219] **실시예 14**

[0220] **원숭이에서 폐 통기를 통해 5 일동안 투여된 GLP-1/FDKP의 독성동태학**

[0221] 사이노몰구스 원숭이[(cynomolgus monkey), 마카카 파시쿨라리스(*Macaca* fascicularis)]에게 하루에 한번(하루 30 분동안) 연속 5 일동안의 구비강 투여(의도된 인간의 치료학적 투여 경로)를 통한 GLP-1/FDKP의 독성 및 독성동태학적 프로파일을 결정하기 위해 본 연구를 수행하였다. 구비강 투여는 원숭이의 입과 코에 마스크를 씌우

고 30 분동안 시험 제제를 들이마시게 하여 수행하였다.

[0222] 처리 개시 14 일전, 동물을 구속 및 투여 방법에 순응시켰다. 처리 개시일(1 일째)에, 수컷 동물은 30 개월령 내지 56 개월령이었고 체중 범위는 2.3 내지 4.0 kg이었으며; 암컷은 31 개월령 내지 64 개월령이었고 체중 범위는 1.6 내지 3.4 kg이었다. 10 마리(수컷 5 마리 및 암컷 5 마리)의 실험대상(non-naive) 사이노몰구스 원숭이를 아래 표 5 및 6에 나타낸 바와 같이 5 그룹(그룹 당 2 마리)으로 할당하였다. 실험대상 원숭이는 실험 제제를 미리 제공받은 동물 집락이다. 그러나, 이들 제제의 반감기는 짧아서 이들 제제가 본원에 개시된 투여 실험동안 원숭이에 어떠한 영향을 미치거나 존재할 것으로 예상되지 않는다. 동물들은 대조군(공기), 2 ㎎/kg의 FDKP, 또는 0.3 (0.04 ㎎ GLP-1), 1.0(0.13 ㎎ GLP-1) 또는 2.0(0.26 ㎎ GLP-1) ㎎/kg의 GLP-1/FDKP를 제공받았다.

[0223] 표 5. 표적 및 추정 달성 평균 투여량 수준(중량 분석*에 의해 결정됨):

그룹 번호	그룹 표시	추정 투여량 수준 (㎎/kg/일)					
		FDKP[3]		GLP-1[3]		GLP-1/FDKP	
		표적[1]	달성[2]	표적[1]	달성[2]	표적[1]	달성[2]
1	공기 대조군	0	0	0	0	0	0
2	비히클 대조군	2.00	2.10	0	0	2.0	2.10
3	저 투여량	0.26	0.31	0.04	0.05	0.3	0.35
4	중간 투여량	0.87	0.81	0.13	0.14	1.0	0.93
5	고 투여량	1.74	1.85	0.26	0.28	2.0	2.13

* 중량 분석은 챔버내 에어로졸 농도를 산출하고 투여 기간을 결정하기 위해 투여전, 투여중 및 투여후 모두에 대하여 흡입 챔버에 있는 여과지를 칭량함으로써 수행된다.

1. 추정 체중 2.5㎏에 기초함.
2. 측정 체중(암컷 및 수컷의 평균)에 기초함.
3. 인용된 표적 및 달성 투여량 수준은 생성된 대기내 GLP-1의 비율이 13%임을 나타내는 것이다. 총 흡입 투여량의 추정치는 기도내에 100% 침착을 나타내는 것이다.

[0224]

[0225] 표 6. 표적 및 달성 평균 에어로졸 농도(중량 분석*에 의해 결정됨):

그룹 번호	그룹 표시	에어로졸 농도 (mg/ℓ)					
		FDKP[1]		GLP-1[1]		GLP-1/FDKP	
		표적	달성	표적	달성	표적	달성
1	공기 대조군	0	0	0	0	0	0
2	비히클 대조군	0.160	0.189	0	0	0.160	0.189
3	저 투여량	0.021	0.027	0.003	0.004	0.024	0.031
4	중간 투여량	0.070	0.073	0.010	0.011	0.080	0.084
5	고 투여량	0.139	0.142	0.021	0.021	0.160	0.163

* 중량 분석은 챔버내 에어로졸 농도를 산출하고 투여 기간을 결정하기 위해 투여전, 투여중 및 투여후 모두에 대하여 흡입 챔버에 있는 여과지를 칭량함으로써 수행된다.

1. 인용된 표적 및 달성 에어로졸 농도는 생성된 대기내 GLP-1의 비율이 13%임을 나타내는 것이다. 총 흡입 투여량의 추정치는 기도내에 100% 침착을 나타내는 것이다.

[0226]

[0227] 전혈 시료(1.4 ㎖/혈액 시료)는 다음의 시점에서 5 일째에 수득하였다; 투여전, 투여하고 10, 30, 45, 60, 90, 120 분후 및 4 시간 후. 혈액을 대퇴부 정맥으로부터 정맥천자를 통해 수집하였다. 혈액 시료를 2 개의 부분표본(aliquot)으로 나누었다: 하나는 혈장 GLP-1 분석을 위해(0.8 ㎖) 및 다른 하나는 혈청 FDKP 분석을 위해(0.6 ㎖). 혈장 GLP-1 분석의 경우, 각각의 시점에서, 전혈(0.8 ㎖)을 1.3 ㎖ EDTA 튜브(0.1% EDTA)내로 수집하였다. 혈액 수집하고 대략 5-10 초후 상기 투브에 DPP-IV 억제제(매사추세츠 빌레리카 소재 밀리포어(Millipore))를 첨가하였다(혈액의 10 ㎕/㎖)(100 μM의 DPP-IV 농도 획득). 튜브를 수회 역전시킨 다음 즉시 젖은 얼음위로 옮겼다. 전혈 시료를 젖은 얼음위에 유지시킨 다음 4000 rpm으로 대략 10 분동안 (2-8 ℃) 원심분리하여 혈장을 생성하였다. 혈장 시료를 적절한 바이얼에 옮기고 드라이 아이스위에 유지시킨 다음 -70(±10)℃의 냉동고에 저장하였다. GLP-1에 대한 혈장 농도(C_{max}), T_{max}, AUC 및 $T_{1/2}$을 결정하였다.

[0228] 연속 4일 동안 GLP-1/FDKP의 흡입 투여후, 5 일째 투여전 모든 시료에서 식별가능한 정도의 GLP-1 수준이 관찰되었다. 5 일째, GLP-1의 최고 혈장 농도(C_{max})는 투여후 대략 10 분이내에 달성되었다(도 31).

[0229] 투여량의 함수로서 GLP-1 C_{max} 및 AUC_{last}(시간 0에서 최후 정량화가능 농도 시간까지의 농도-시간 곡선하면적)의 투여량-의존성 증가가 5 일째에 수컷 및 암컷 원숭이 모두에서 관찰되었다. 투여량 범위 연구와 관련하여, 1 mg/kg/일 투여량 수준의 수컷을 제외하고, 수컷 및 암컷 원숭이 둘 다에서 투여량이 증가함에 따라 GLP-1 AUC_{last}는 결코 투여량에 비례하여 증가하지 않는 것으로 관찰되었다. 투여량이 0.3 mg/kg/일에서 2.0 mg/kg/일로 6.7 배 증가한 경우 겨우 수컷에서는 AUC_{last}가 2.9 배 증가하였고 암컷에서는 AUC_{last}가 1.1 배 증가하였다.

[0230] *각각 0.3, 1.0 및 2.0 mg/kg/일의 투여량 수준으로 GLP-1/FDKP를 투여했을 때, GLP-1의 최고 농도는 평균적으로 수컷에서 17.2, 93.1 및 214 pg/㎖ 및 암컷에서 19.3, 67.9 및 82.8 pg/㎖이었다. GLP-1의 혈장 수준은 4 분에서 24 분까지에 달하는 명백한 소실반감기에서 신속하게 감소하였다.

[0231] 각각 0.3, 1.0 및 2.0 mg/kg/일의 투여량 수준으로 GLP-1/FDKP를 투여했을 때, GLP-1에 대한 AUC 수치는 수컷에서 21.6, 105 및 62.3 pg*시간/㎖이었고, 암컷에서 33.4, 23.7 및 35.4 pg*시간/㎖이었다.

[0232] *최저 투여량 수준에서 관찰된 GLP-1의 TK 파라미터에 있어서는 식별가능한 성차는 없었다. 그러나, 조사된 중

간 및 고 투여량 수준에서는 수컷 원숭이의 AUC_{last} 수치가 암컷 원숭이의 것보다 일관적으로 더 높게 나타났다. 비히클 대조군 및 대조군(공기) 원숭이로부터 얻은 일부 시료는 측정가능한 수준의 GLP-1을 보여주었다. 이것은 동물이 흡입한 공기의 오염에 의해 야기되었을 수 있거나 이들 특정 원숭이에 어느 정도 내인성 GLP-1이 존재하였을 것이다. 주목해야 할 것은 대조군 동물이 GLP-1/FDKP 처리군 동물과 다른 장소에 노출되었다는 것이다.

[0233] GLP-1의 생물학적 반감기는 15 분 미만이기 때문에, GLP-1/FDKP 투여로부터의 GLP-1은 24 시간 이내에 완전히 제거되어야 한다. 따라서, GLP-1의 내인성 수준은 모든 GLP-1/FDKP 처리군 동물으로부터 5 일째 수집된 0 시간의 시료에서 일정하게 정량화가능한 GLP-1 수준에 대한 적당한 설명이다. 투여후 관찰된 GLP-1 농도로부터 0 시간의 수치를 뺀 값이 GLP-1/FDKP의 투여에 의한 GLP-1의 변화를 반영하는 것이어야 한다.

[0234] 혈청 FDKP 분석의 경우, 각 시점에서 항응고제를 함유하지 않은 튜브에 전혈(0.6 ㎖)을 수집하고 실온에서 최소 30 분동안 응고시킨 다음 원심분리에 의해 분리하여 혈청을 수득하였다. FDKP 분석 및 혈청농도(C_{max}, T_{max}, AUC 및 $T_{1/2}$)를 결정하였다. 연속 4 일동안 GLP-1/FDKP의 흡입 투여후, 검출가능한 수준의 FDKP가 모든 투여후 시료에서 5 일째 발견되었다. 5 일째, FDKP의 최고 혈장 농도(C_{max})는 투여하고 대략 10 내지 30 분후에 달성되었다.

[0235] 투여량의 함수로서 FDKP AUC∞(외삽된 시간 0에서 무한 시간까지의 농도-시간 곡선하면적)의 투여량 의존성 증가가 5 일째에 수컷 및 암컷 원숭이 모두에서 관찰되었다. 그러나, 암컷의 경우 0.3 내지 1.0 ㎎/㎏/일에서 FDKP AUC∞의 차이는 없었지만, 1 내지 2 ㎎/㎏/일에서 투여량 의존성 증가가 주목되었다. 증가가 관찰된 모든 경우에, 결코 투여량에 비례적이지 않았다. 0.3 ㎎/㎏/일에서 2.0 ㎎/㎏/일로 투여량을 6.7 배 증가시켰더니 수컷에서는 AUC_{last}가 2.7 배 증가하였고 암컷에서는 AUC∞가 3.0 배 증가하였다. 각각 0.3, 1.0 및 2.0 ㎎/㎏/일의 투여량 수준으로 GLP-1/FDKP를 투여했을 때, FDKP의 최고 농도(C_{max})는 평균적으로 수컷에서 200, 451 및 339 ng/㎖이었고 암컷에서 134, 161 및 485 ng/㎖이었다. 각각 0.3, 1.0 및 2.0 ㎎/㎏/일의 투여량 수준으로 GLP-1/FDKP를 투여했을 때, FDKP에 대한 AUC∞ 수치는 수컷에서 307, 578 및 817 ng·시간/㎖이었고 암컷에서 268, 235 및 810 ng·시간/㎖이었다. T_{max}가 투여량 투여하고 30 내지 45 분후로 다소 더 길었다는 점을 제외하고, 겨우 2.1 ㎎/㎏/일(그룹 2)의 투여량으로 FDKP가 투여된 동물에서 AUC∞ 및 C_{max} 수준은 2.13 ㎎/㎏/일의 GLP-1/FDKP를 제공받은 동물에 버금가는 수준이었다.

[0236] 전반적으로, GLP-1/FDKP는 체중, 음식물 소비량, 임상 병리학적 파라미터, 거시적 또는 현미경적 평가에 어떠한 임상 징후나 영향이 없이 내성이 우수하였다. 5 일간 매일 30 분동안 투여되는 최대 2.13 ㎎/㎏/일(0.26 ㎎/㎏/일의 GLP-1 투여량에 상당함)의 추정 달성 투여량으로 사이노몰구스 원숭이에의 GLP-1/FDKP의 흡입 투여는 어떠한 약물 제한적 독성과 관련이 없다는 것이 또한 주목된다.

[0237] **실시예 15**

[0238] **래트에서 폐 통기를 통해 14 일간 투여된 GLP-1/FDKP의 독성동태학**

[0239] 본 연구는 폐 통기를 통해 연속 14 일동안 매일 투여한 후 GLP-1/FDKP의 잠재 독성을 평가하였다. 래트에는 대조군(공기), FDKP 입자 10 ㎎/㎏, 또는 1(0.15 ㎎ GLP-1), 3(0.45 ㎎ GLP-1) 또는 10(1.5 ㎎ GLP-1) ㎎/㎏의 GLP-1/FDKP를 연속 14 일 동안 매일 폐 통기를 통해 제공하였다(n=24/성/그룹). 독성의 임상 징후에 대해 매일 동물을 관찰하였고; 체중 및 음식물 소비량을 또한 기록하였다.

[0240] 1 일째 및 14 일째에, GLP-1 C_{max}는 모든 투여량 그룹에서 투여량 투여하고 대략 10 내지 15 분이내에 달성되었다. 10 ㎎/㎏/일의 GLP-1/FDKP에서 GLP-1의 최고 농도는 평균적으로 수컷 및 암컷 각각에서 1 일째에 6714 및 6270 pg/㎖이었고, 14 일째에 2979 및 5834 pg/㎖이었다. GLP-1의 혈장 수준은 0.7 시간에서 4.4 시간에 달하는 명백한 소실반감기에서 감소하였다. 10 ㎎/㎏/일 GLP-1/FDKP의 최고 투여량에서 GLP-1의 평균 AUC 수준은 수컷에서 2187 pM*시간이었고 암컷에서 2703 pM*시간이었다. GLP-1의 축적은 최소로 관찰되었거나 전혀 관찰되지 않았고, C_{max}, 반감기 및 T_{max}에 있어서는 성차가 나지 않았다. GLP-1의 AUC 수치는 모든 투여량에 걸쳐 수컷 래트에서 보다 암컷 래트에서 약간 높았다. 폐 통기를 통해 연속 14 일동안 GLP-1/FDKP를 투여한 래트에서 최대무작용량(NOAEL, No Observable Adverse Effect Level; 관찰할 수 있는 유해영향이 나타나지 않는 최대용량)은 10 ㎎/㎏/일 GLP-1/FDKP(1.5 ㎎/㎏/일 GLP-1)이었다.

[0241] 최종 투여하고 대략 24 시간후, 동물(12/성/그룹)을 희생시키고; 임상 생리학, 거시적 및 현미경적 평가를 수행하였다. 독성동태학적(TK) 위성 동물(12/성/그룹)을 투여 14 일째 최종 혈액 수집후 희생시켰다. GLP-1/DKP와

관련된 사망 또는 임상적 관찰이 전혀 없었다. 대조군과 처리군 동물 사이에 체중 및 음식물 소비량의 차이가 없었다. 10 ㎎/kg의 GLP-1/FDKP에서, 암컷의 경우만 간 중량 및 간 중량 대 체중의 비가 대조군(공기) 그룹에 비해 유의적으로 저하되었다.

[0242] 비히클 투여 대조군 및 공기 투여 대조군 사이의 혈액학, 응고, 화학, 요검사 또는 요화학에 대한 결과로부터 주목되는 명백한 차이점은 없었다. GLP-1/FDKP 투여에 기인한 잠재 독성에 대해 결정한 조직에서 심각하거나 조직병리학적 소견은 없었다.

[0243] **실시예 16**

[0244] **원숭이에서 폐 통기를 통해 28 일간 투여된 GLP-1/FDKP의 독성동태학**

[0245] 본 연구는 폐 통기를 통해 최소 4 주간 매일 투여된 GLP-1/FDKP의 독성 및 잠재 독성을 평가하였다. 임의의 영향의 가역성, 지속성 또는 발생 지연성을 평가하기 위해, 4 주간의 회복 기간이 있었다.

[0246] 동물은 다음의 처리 중 하나를 제공받았다: 그룹 1 - 대조군(공기); 그룹 2 - 3.67 ㎎/kg/일 FDKP 입자; 그룹 3 - 0.3 ㎎/kg/일 GLP-1/FDKP(0.045㎎/kg/일 GLP-1); 그룹 4 - 1 ㎎/kg/일 GLP-1/FDKP(0.15㎎/kg/일 GLP-1); 또는 그룹 5 - 2.6 ㎎/kg/일 GLP-1/FDKP(0.39 ㎎/kg/일 GLP-1). 42 마리의 사이노몰구스 원숭이를 두 그룹으로 나누었다: 그룹 1, 2 및 5의 회복(n= 2/성/그룹) 및 주요 연구(n=3/성/그룹). 그룹 1 - 공기 대조군; 그룹 2 - FDKP (약 4 ㎎/kg/일); 그룹 3 - 0.3 ㎎/kg/일 GLP-1/FDKP(저 투여량); 그룹 4 - 0 ㎎/kg/일 GLP-1/FDKP(중간 투여량); 그룹 5 - 2.6 ㎎/kg/일 GLP-1/FDKP(고 투여량). 전형적으로, 원숭이 연구에서 고 투여량 및 대조군에서만 회복률을 평가하였다.

[0247] 사망률 및 이환률은 하루에 두 번, 그리고 독성의 징후 및 이상은 투여하고 30 분후 적어도 하루에 한 번 동물을 관찰하였다. 체중 데이터는 매주 수집하였고, 정량적 음식물 소비량은 매일 평가하였다. 독성동태학을 위해 1 일째, 28 일째 및 56 일째에 혈액을 수집하였다. 29 일째에 동물/성/그룹을 마취하여 칭량하고 방혈한 다음 괴사시켰다. 그룹 1, 2 및 5의 나머지 동물(n=2/성/그룹)은 57 일째에 마취하여 칭량하고 방혈한 다음 괴사시켰다. 괴사시, 선택 장기를 칭량하고 선택 조직을 수집하고 보관하였다. 각각의 동물로부터의 조직 모두를 현미경적으로 조사하였다.

[0248] 모든 그룹에 걸쳐 때때로 체중의 변동은 있었지만, 체중에 대한 처리 관련 영향은 없었다. 일반적으로, 모든 동물의 체중은 연구 과정 내내 유지되었거나 약간 증가하였다. 고 투여량에서 설사 또는 액체 분변의 발생 및 빈도가 더 높게 관찰되었다. 29 일째(처리 마지막날) 고 투여량 암컷에서 락트산 탈수소효소(LDH) 및 아스파라긴산 아미노전이효소(AST)의 온화한 증가를 제외하고, 처리-관련된 것으로 고려되는 임의의 임상 화학적 파라미터에서 주목되는 유의적인 변화는 없었다; 표 7를 참고할 수 있다. LDH의 수준은 또한 수컷에서 아주 약간 증가하였다. 이러한 변화는 회복 기간의 마지막까지 해소되었고, 간에서 어떠한 현미경적 소견과 상관이 없었다. 고 투여량 암컷 그룹에서의 AST 수준의 변화는 주로 동물 5 마리 중 1 마리에 기인하였다.

[0249] 표 7. ALT, AST 및 LDH의 평균 변화율(%)

	변화율 평균치(%)		
그룹	ALT (U/L)	AST (U/L)	LDH (U/L)
암컷			
1. 대조군	-2	52	-9
2. 3.67 mg/kg/일 FKDP	-13	-34	-53
3. 0.3 mg/kg/일 GLP-1/FKDP	-11	53	-14
4. 1.0 mg/kg/일 GLP-1/FKDP	-15	9	-11
5. 2.6 mg/kg/일 GLP-1/FKDP	32	422	117
수컷			
1. 대조군	-16	-42	-62
2. 3.67 mg/kg/일 FKDP	14	60	-6
3. 0.3 mg/kg/일 GLP-1/FKDP	24	168	69
4. 1.0 mg/kg/일 GLP-1/FKDP	49	32	7
5. 2.6 mg/kg/일 GLP-1/FKDP	-16	30	6

[0250]

[0251] 최대 2.6 ㎎/kg/일 GLP-1/FDKP의 투여량 수준에서 어떠한 처리-관련 거시적 또는 조직학적 변화도 입증되지 않았다. 최대 2.6 ㎎/kg/일 GLP-1/FDKP(0.39 ㎎/kg/일 GLP-1)의 투여량에서 관찰된 체중, 음식물 소비량, 혈액학, 요검사, 인슐린 분석, 검안경검사, ECG, 거시적 또는 현미경적 변화에 어떠한 임상 징후나 영향이 없어 내성이 우수하였다. 28 일간 매일 최대 30 분동안 최대 3.67 ㎎/kg/일의 추정 달성 투여량으로 FDKP를 흡입 투여한 경우 어떠한 독성과도 관련이 없었다.

[0252] 투여량의 함수로서 GLP-1 및 FDKP C_{max} 및 AUC_{last}의 투여량 의존성 증가는 1 일째 수컷 및 암컷 원숭이 모두에서 관찰되었다. 투여량 범위 연구와 관련하여, 수컷 및 암컷 원숭이 모두에서 투여량이 증가함에 따라 GLP-1 C_{max}는 결코 투여량에 비례하여 증가하지 않지만, AUC_{last}는 투여량에 비례하여 증가하였다. 2.6 ㎎/kg/일 GLP-1/FDKP에서 GLP-1의 최고 농도는 평균적으로 수컷이 259 pg/㎖, 암컷이 164 pg/㎖이었다. GLP-1의 혈장 수준은 0.6 내지 2.5 시간의 소실반감기에서 감소하였다. 고 투여량에서 GLP-1에 대한 평균 AUC 수치는 수컷에서 103 pg*시간/㎖이고 암컷에서 104 pg*시간/㎖이었다. 저 투여량에서 암컷 원숭이의 AUC 및 C_{max} 수치는 수컷에 비해 더 높게 나타났다. 2.6 ㎎/kg/일 GLP-1/FDKP에서 FDKP의 최고 농도는 평균적으로 수컷에서 1800 ng/㎖이었고 암컷에서 1900 pg/㎖이었다.

[0253] *결론적으로, 28 일간 매일 최대 30 분동안 투여되는 최대 2.6 ㎎/kg/일 GLP-1/FDKP 또는 0.39 ㎎/kg/일 GLP-1의 추정 달성 투여량으로 사이노몰구스 원숭이에의 GLP-1/FDKP의 흡입 투여는 임상적으로 내성이 우수하였다. NOAEL은 2.6 ㎎/kg/일 GLP-1/FDKP(0.39 ㎎/kg/일 GLP-1)이었다. 아래 실시예 19에 기술된 바와 같이, 상 I 연구에서 최대 인간 투여량은 일일 1.5 ㎎ GLP-1/FDKP 또는 약 0.021 ㎎/kg GLP-1(70 ㎏ 인간으로 추정됨)일 것이다. 추가의 연구에서 매일 3.0 ㎎ GLP-1/FDKP 또는 약 0.042 ㎎/kg GLP-1으로 투여될 것이다.

[0254] **실시예 17**

[0255] **엑센딘/FDKP 제제의 제조**

[0256] 산성 엑센딘-4 펩타이드(서열번호 3) 용액을 FDKP 입자 현탁액과 혼합하여 엑센딘-4/FDKP를 제조하였다. 산성 펩타이드 용액은 2% 아세트산에 용해시킨 10% (w/w)의 펩타이드였다. FDKP 현탁액은 대략 10% (w/w)의 FDKP 입자를 함유하였다. 산성 엑센딘-4 펩타이드 용액을 부드럽게 혼합되도록 FDKP 입자 현탁액에 첨가하였다. 엑센딘-4/FDKP 혼합물을 25% 암모니아 용액으로 서서히 적정하여 pH 4.50으로 만들었다. 이어, 혼합물을 액체 질소에 피펫으로 옮기로 동결건조시켰다.

[0257] 15% 엑센딘-4/FDKP 분말의 경우 충진 내용물에 대한 호흡가능 분률(%)(충진물에 기초한 RF)은 36%이었고, 카트리지 내용물 배출률은 99%이었다. 유사한 규모로 생성된 15% GLP-1/FDKP는 충진 내용물에 대한 %RF가 34%이고 카트리지 내용물 배출률은 100%인 것으로 나타났다.

[0258] **실시예 18**

[0259] **폐 통기를 통해 투여된 엑센딘/FDKP의 약물동태**

[0260] 폐 경로를 통해 복수회 투여후 다양한 농도의 엑센딘-4/FDKP 제제에서 엑센딘-4(GLP-1 유사체)의 약역학 및 약물동태학적 프로파일을 조사하기 위해 반복 투여 예비 독성 연구을 수행하였다.

[0261] 래트 및 원숭이에서 28 일간의 연구를 수행하였다. 엑센딘/FDKP는 흡입 경로를 통해 매일 투여하였다. 28 일간 투여한 동물의 연구에서, 동물의 일부는 투여 처방후 즉시 희생된 반면 나머지 동물은 희생전에 1 개월의 회복 기간이 허용되었다. 동물 모두를 독성의 임상 징후; 엑센딘-4, 포도당, 및 인슐린의 혈액 수준을 비롯한 각종 생리학적 파라미터; 장기 중량 및 각종 장기의 임상 병리학 또는 조직병리학에 대하여 평가하였다.

[0262] 초기 연구 그룹은 그룹 당 5 마리의 동물로 이루어졌고 대조군 그룹은 2 개그룹이었다: 공기 및 정맥내 투여된 엑센딘. 6 개의 폐 통기 그룹은 5%, 10%, 15%, 20%, 25% 및 30% 엑센딘 로딩(w/w)으로 대략 2.0 ㎎ 투여량의 엑센딘/FDKP를 제공받았다. 혈당 및 엑센딘 농도를 위해 시점 8 시간에 전혈을 수집하였다.

[0263] 데이터(C_{max}, $T_{1/2}$ 및 T_{max})를 수집하여 엑센딘/FDKP 제제의 약물동태가 GLP-1/FDKP에 상응하거나 그 보다 더 우수하다는 것을 입증하였다.

[0264] **실시예 19**

[0265] **래트에서 폐 통기를 통해 투여된 GLP-1/xDKP의 약물동태**

[0266] 상이한 DKPs가 GLP-1/FDKP 제제의 약물동태학적 프로파일에 영향을 미칠 수 있는 지를 결정하기 위해, 본원과 동일자로 출원되고 그의 전체 내용이 본원에 참고로 포함되는 "약물 전달제로서 사용하기 위한 비대칭 FDKP 유사체"라는 명칭의 미국 가특허출원에 개시된 바와 같이 여러 GLP-1/xDKP 제제를 제조하였다(Atty Decket No. 51300-00041).

[0267] 연구는 그룹 당 5 마리의 동물로 이루어지고 6 개의 처리군 그룹으로 나뉘어진 래트에서 수행하였다. 대조군 그룹(n=3)은 액체 점적 주입을 통해 GLP-1을 제공받았다. 폐 통기에 의해 투여된 GLP-1/FDKP(0.3mg GLP-1)이 또한 제 2 대조군으로서 사용되었다. 각각의 GLP-1/xDKP 처리군 그룹은 10% 및 15%의 GLP-1이 로딩된 약 2.0 ㎎ 투여량의 xDKP로 GLP-1/xDKP 제제를 폐 통기를 통해 제공받았다. 사용된 xDKPs는 (E)-3-(4-(3,6-디옥소피페라진-2-일)부틸카바모일)-아크릴산), (3,6-비스(4-카르복시프로필)아미도부틸-2,5-디케토피페라진) 및 ((E)-3,6-비스(4-(카르복시-2-프로페닐)아미도부틸)-2,5-디케토피페라진 이나트륨 염) 로딩이었다. GLP-1 농도의 평가를 위해 투여하고 5, 10, 20, 30, 45, 60 및 최대 90 분후에 전혈을 수집하였다.

[0268] **실시예 20**

[0269] **건강한 성인 남성 대상에서 GLP-1/FDKP 흡입 분말의 제어 안정성 및 내성 시**험, 점증 용량(Ascending Dose), 개방-표지(Open-Label), 1회 용량(single dose), 상 1a

[0270] GLP-1은 정맥내(iv) 또는 피하(sc) 주입 또는 복수회 피하 주사에 의해 제공되었을 때 인간의 혈당 상승을 조절하는 것으로 나타났다. 호르몬의 반감기는 극히 짧기 때문에, 연속 피하 주입 또는 매일 복수회 피하 주사할 필요가 있다. 이들 경로는 모두 장기간의 임상 사용용으로는 실용적이지 않다. GLP-1이 흡입에 의해 투여된 경우에 치료학적 수준이 달성될 수 있었음이 동물 실험에 의해 명백해졌다.

[0271] 위배출 감소, 포만감 증가 및 부적절한 글루카곤 분비의 억제를 비롯한 GLP-1의 몇몇 작용은 식사 개시에 따라 GLP-1의 방출로 연결되는 것처럼 보인다. 이와 같은 GLP-1의 초기 동요(surge)를 GLP-1/FDKP 흡입 분말로 보충함으로써, 당뇨병 동물의 약역학적 반응을 도출시킬 수 있다. 그에 더하여, 인슐린 분비의 증가와 연결된 천연 GLP-1의 늦은 동요는 GLP-1/FDKP 흡입 분말의 식후 투여에 의해 모방될 수 있다.

[0272] 최초로 인간 대상에서 선택 용량의 신규한 흡입성 당뇨병 억제 치료제의 안전성 및 내성을 시험하기 위해 GLP-1/FDKP 흡입 분말의 상 1a 시험이 설계되었다. 투여는 앞서 시험된 MedTone® 흡입 장치를 사용하여 이루어졌다. 이러한 임상 시험의 일차적인 취지는 효능 및 안정성의 증거를 확립하기 위해 추가의 임상 시험에서 사용될 수 있고 안정성 및 내성이 있는, 폐 통기에 의한 GLP-1/FDKP 흡입 분말의 투여량 범위를 확인하기 위한 것이다. 상 1a 임상 시험을 위해 선택된 투여량은 상기 실시예에 기술된 래트 및 영장류에서의 GLP-1/FDKP 흡입 분말의 비임상적 시험으로부터의 동물 안전성 결과에 기초한다.

[0273] 적격 기준을 충족하는 스물여섯 명(26)의 대상을 5 무리로 나누고, 무리 1 및 2 각각에는 최대 4 명의 평가가능한 대상을, 무리 3 내지 5 각각에는 최대 6 명의 평가가능한 대상을 배치한 다음 임상 시험을 종료하였다. 각각의 대상에게는 GLP-1/FDKP 흡입 분말로서 글루카곤 유사 펩타이드-1 (GLP-1)을 하기 투여량 수준으로 한번 투여하였다: 무리 1 - 0.05 ㎎의 GLP-1; 무리 2 - 0.45 ㎎의 GLP-1; 무리 3 - 0.75 ㎎의 GLP-1; 무리 4 - 1.05 ㎎의 GLP-1; 및 무리 5 - 1.5 ㎎의 GLP-1. 소실량은 대체되지 않을 것이다. 이들 투여량은 70 ㎏의 체중을 가정한 것이다. 당업자들이라면 상기 개시된 연구에 기초하여 추가적인 투여량 수준을 결정할 수 있다.

[0274] 이러한 시험의 목적은 건강한 성인 남성 대상에서 점증 용량의 GLP-1/FDKP 흡입 분말의 안전성 및 내성을 결정하기 위한 것이다. 보고된 유해 사례(AE, adverse event), 활력 징후, 신체 검사, 임상 검사실 시험(clinical laboratory test, 임상 검사) 및 심전도 (ECG)를 비롯한 변수에 대한 약리학적 또는 유해 작용을 감시함으로써 점증 용량의 GLP-1/FDKP 흡입 분말의 내성이 평가 될 것이다.

[0275] 두 번째 목적은 추가의 안전성 및 약물동태학적 파라미터를 평가하는 것이다. 이들로는 폐질환 및 다른 유해 사례의 발생 및 방문 1(선별)과 방문 3(추적 조사) 사이의 폐 기능의 변화에 의해 나타내어진 추가의 안전성 파라미터; $AUC_{0-120(분)}$ 혈장 GLP-1 및 $AUC_{0-480(분)}$ 혈청 FDKP를 통해 측정된 GLP-1/FDKP 흡입 분말의 투여후 혈장 GLP-1 및 혈청 푸마릴 디케토피페라진(FDKP)의 약물동태학적(PK) 파라미터가 포함되고; 혈장 GLP-1의 추가의 PK 파라미터로는 t_{max} 혈장 GLP-1; C_{max} 혈장 GLP-1; 및 $T_{1/2}$ 혈장 GLP-1이 포함된다. 혈청 FDKP의 추가의 PK 파라미터로

는 T_{max} 혈청 FDKP; C_{max} 혈청 FDKP; 및 $T_{1/2}$ 혈청 FDKP가 포함된다.

[0276] 시험 평가항목은 시험 대상 개체에서 결정된 다음의 약리학적 및 안전성 파라미터의 비교에 기초한다. 주요 평가항목으로 활력 징후, 임상 검사 및 신체 검사에서의 선별로부터의 변화뿐만 아니라 기침 및 호흡곤란, 구역 및/또는 구토를 비롯한 보고된 유해 사례의 발생 및 중증도에 기초하여 평가하게 될 안정성 평가항목이 포함된다. 두 번째 평가항목으로는 혈장 GLP-1 및 혈청 FDKP($AUC_{0-120분}$ 혈장 GLP-1 및 $AUC_{0-480분}$ 혈청 FDKP)의 PK 소인(dispostion); 혈장 GLP-1의 추가의 PK 파라미터(T_{max} 혈장 GLP-1, C_{max} 혈장 GLP-1 $T_{1/2}$ 혈장 GLP-1; 혈청 FDKP의 추가의 PK 파라미터(T_{max} 혈청 FDKP, C_{max} 혈청 FDKP); 및 추가의 안전성 파라미터(폐 기능 시험(PFT, pulmonary function test)) 및 ECG가 포함될 것이다.

[0277] 상 1a, 1회 투여량 시험은 시험중 의약품(IMP, investigational medicinal product)의 안전성 및 내성을 결정하기 위해, 21 CFR 312의 임상시험관리기준(Good Clinical Practice)인 통합적 임상시험기준 지침(Consolidated Guidance (ICH-E6)) 및 임상 시험에 관한 일반적 사항의 지침(Guidance on General Considerations for Clinical Trials (ICH-E8))과 일치하는 개방-표지, 점증 용량 구조 및 설계 전략을 포함한다.

[0278] 임상 시험은 3 회의 임상 방문으로 이루어질 것이다: 1) 하나의 선별 방문(방문 1); 2) 하나의 처리 방문(방문 2); 및 3) 방문 2하고 8-14 일후에 하나의 추적 조사 방문(방문 3). 1회 투여량의 GLP-1/FDKP 흡입 분말의 투여는 방문 2에 실시될 것이다.

[0279] 이와 같은 임상 시험은 각각의 무리에서 안전성 파라미터를 평가할 것이다. 최초 투여 또는 투여전 안전성 및 내성 데이터 모두에 대한 검토가 실험 감독(PI, principal investigator)에 의해 수행될 때까지는 다음으로 투여 농도를 제공받도록 계획된 무리에게 투여되지 않을 것이다. 대상의 안전성을 보증하기 위해 각 무리의 대상들 사이에 30 분의 투여 시간 지체가 이행될 것이다. 만일 무리내에 3 명 이상의 대상이 심한 구역 및/또는 구토를 경험하거나 최대 투여량에 도달하였을 때, 또는 PI의 결정이 있는 경우 투여는 중지될 수 있다.

[0280] 5 가지 용량의 GLP-1/FDKP 흡입 분말(0.05, 0.45, 0.75, 1.05 및 1.5 mg의 GLP-1)이 평가될 것이다. 모든 투여량을 수용하기 위해, 제제화된 GLP-1/FDKP는 FDKP 흡입 분말과 혼합될 것이다. GLP-1/FDKP 흡입 분말(15% (w/w) GLP-1/FDKP) 그 자체 또는 적정량의 FDKP 흡입 분말과 혼합된 것으로 이루어진 10 mg 건조 분말을 함유하는 단일투여 카트리지를 사용하여 목적하는 용량의 GLP-1(0.05 mg, 0.45 mg, 0.75 mg, 1.05 mg 및 1.5 mg)을 수득하였다: 1. 먼저 2 가지의 가장 낮은 투여량 수준은 각각 4 명의 대상으로 된 2 개의 무리에서 평가될 것이며, 3 가지의 높은 투여량은 각각 6 명의 대상으로 된 3 개의 무리에서 평가될 것이다. 각각의 대상은 평가될 5 가지 용량 수준 중 하나로 1회 용량만 제공받을 것이다. GLP-1(활성 및 합계) 및 FDKP 측정을 위한 채혈 이외에, 글루카곤, 포도당, 인슐린 및 C-펩타이드 결정을 위해 시료가 채취될 것이다.

[0281] 다수의 참고문헌은 본 명세서 전체에 걸쳐 제시된 특허 및 간행물이다. 각각의 상기 인용된 참고 문헌 및 간행물은 하나하나 그의 전체 내용이 참고로서 본원에 포함된다.

[0282] 달리 지적되어 있지 않다면, 본 명세서 및 청구범위에 사용된 성분의 양, 분자량과 같은 특성, 반응 조건 등을 나타내는 모든 수치는 모든 경우에 용어 "약"으로 변형되는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 그와 반대로 지적되어 있지 않다면, 다음의 명세서 및 첨부된 청구범위에 설명된 수치 파라미터는 본 발명에 의해 수득하고자 하는 목적하는 특성에 따라 달라질 수 있는 근사치이다. 각각의 수치 파라미터는 최소한, 청구 범위에 대한 균등론의 적용을 제한하고자 하는 것이 아니라, 적어도 보고된 유효 숫자의 수에 비추어 그리고 보편적인 라운딩 기술을 적용함으로써 해석되어야 한다. 넓은 범위의 본 발명을 설명하는 수치 범위 및 파라미터는 근사치임에도 불구하고, 특정의 실시예에서 설명된 수치는 가능한한 간략하게 보고된다. 그러나, 임의의 수치는 본래 그들 각각의 시험 측정에서 발견된 표준 편차로부터 필수적으로 발생한 특정의 에러를 포함한다.

[0283] 당업자라면 본 발명의 범위 및 정신으로부터 벗어남이 없이 본원에 개시된 발명에 대한 다양한 구체예 및 변형례를 만들어 낼 수 있음을 쉽게 알 수 있다.

[0284] 청구범위 및/또는 명세서에서 용어 "을 포함하는"과 함께 사용될 경우 단어 "a" 또는 "an"은 "하나"를 의미할 뿐만 아니라, "하나 이상" "적어도 하나" 및 "하나 또는 둘 이상"의 의미와 일치한다.

[0285] 본원에 개시된 임의의 방법 또는 조성물은 본원에 개시된 임의의 다른 방법 또는 조성물에 대하여 구현될 수 있음이 고려된다.

[0286] 청구범위에서 용어 "또는"의 사용은 대체물만(alternatives only) 또는 대체물(alternatives)이 서로 배타적이라고 명확히 지적되어 있지 않는 한, "및/또는"을 의미하기 위해 사용된다.

[0287] 본 출원 전체에서 용어 "약"은 수치가 수치를 결정하는데 사용된 장치 또는 방법에 대한 에러의 표준 편차를 포함한다는 것을 나타내기 위해 사용된다.

[0288] 본 발명의 다른 목적, 특징 및 이점은 이전의 설명 및 실시예 뿐만 아니라 청구범위로부터 명백해질 것이다. 그러나, 본 발명의 특정의 구체예를 나타내고 있지만, 당업자라면 본 발명의 상세한 설명으로부터 본 발명의 정신 및 범위내에서 다양한 변경 및 변형이 가능하다는 것이 명백할 것인 바, 상세한 설명 및 특정의 실시예는 단지 설명을 위해 제시된 것으로 이해해야 한다.

[0289] **참고문헌**

[0290] 하기 참고문헌은, 본원에 설명된 사항에 대해 보충적인 예시적 방법 또는 다른 상세 사항을 제공하는 정도로 본원에 참고로 포함된다.

[0291] Chelikani PK et al., Intravenous infusion of glucagon-like peptide-1 potently inhibits food intake, sham feeding, and gastric emptying in rats. Am J Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol, 288(6):R1695-706, 2005.

[0292] D, Alessio, et al., J. Clin. Invest., 97:133-38, 1996.

[0293] Deacon CF: Therapeutic strategies based on glucagon-like peptide 1. Diabetes. Sep;53(9):2181-9, 2004.

[0294] Eissele, et al., Life Sci., 55:629-34, 1994.

[0295] Goke, et al., J. Biol. Chem. 268:19650-55, 1993.

[0296] Johnson JD et al: RyR2 and calpain-10 delineate a novel apoptosis pathway in pancreatic islets. J Biol Chem., 279(23):24794-802, 2004.

[0297] Malhotra, R., et al., Regulatory Peptides, 41 : 149-56, 1992.

[0298] Mentlein R, et al., Dipeptidyl peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1 (7-36) amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. Eur J Biochem., 214:829-835, 1993.

[0299] Montrose-Rafizadeh, et al., Diabetes, 45(Suppl. 2):152A, 1996.

[0300] Nauck MA, et al., Normalization of fasting hyperglycemia by exogenous GLP-1 (7-36 amide) in type 2 diabetic patients. Diabetologia, 36:741 -744, 1993.

[0301] Nauck MA, et al., Effects of subcutaneous glucagon-like peptide 1 (GLP-1 [7-36 amide]) in patients with NIDDM. Diabetologia, 39:1546 -1553, 1996.

[0302] Nauck MA, et al., Effects of glucagon-like peptide-1 on counterregulatory hormone responses, cognitive functions, and insulin secretion during hyperinsulinemic, stepped hypoglycemic clamp experiments in healthy volunteers. J Clin Endocrinol Metab., 87:1239 - 1246, 2002.

[0303] Raufman, et al., J. Biol. Chem. 267:21432-37, 1992.

[0304] Raufman, et al., J. Biol. Chem. 266:2897-902, 1991

[0305] Schepp, et al., Eur. J. Pharmacol, 69:183-91, 1994.

[0306] Singh, et al., Regul. Pept. 53:47-59, 1994.

[0307] Sturis J, et al.,. British Journal of Pharmacology, 140,123 .132, 2003.

[0308] Tornusciolo D.R. et al., Biotechniques 19(5):800-805, 1995. Simultaneous detection of TDT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL)-positive cells and multiple immunohistochemical markers in single tissue sections.

[0309] Verdich C, et al., A meta-analysis of the effect of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide on ad libitum

energy intake in humans. J Clin Endocrinol Metab., 86:4382 -4389, 2001.

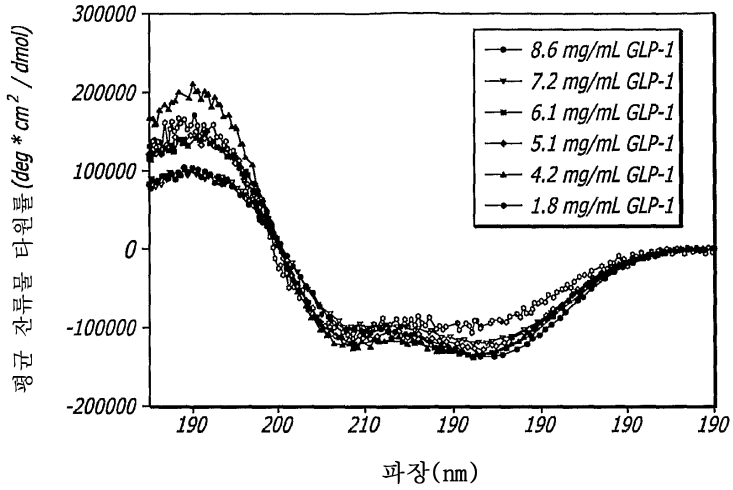
[0310] Wang Q, et al., Glucagon-like peptide-1 regulates proliferation and apoptosisi via activation of protein kinase B in pancreatic INS-I beta cells. Diabetologia, 47:478 -487, 2004.

[0311] Wang, et al., J. Clin. Invest., 95:417-21, 1995.

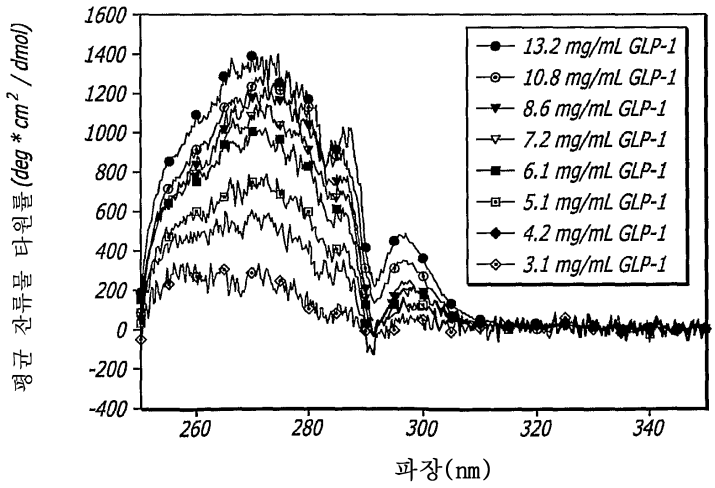
[0312] Zander M, et al., Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. Lancet, 359:824 -830, 2002.

도면

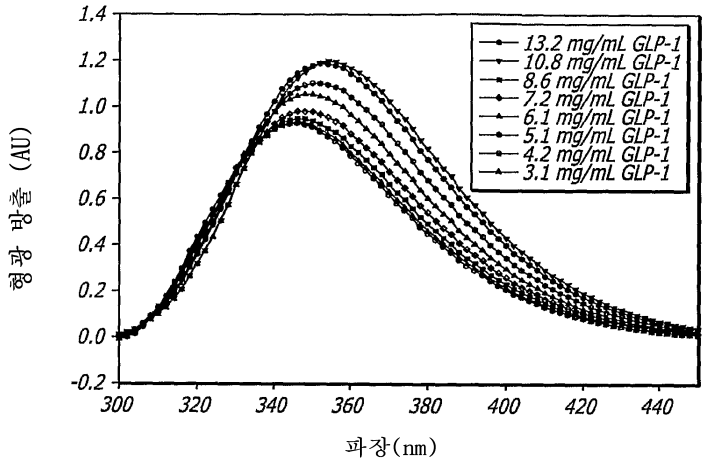
도면1a



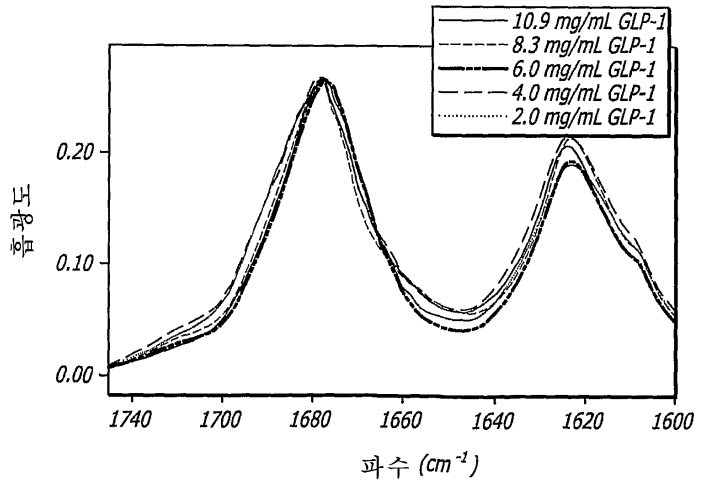
도면1b



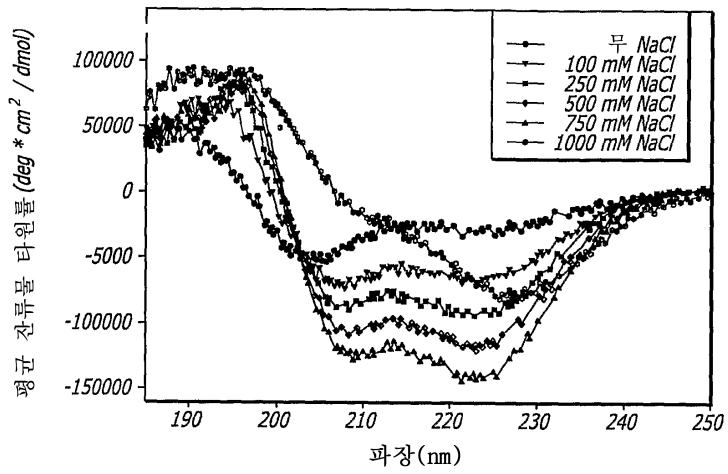
도면1c



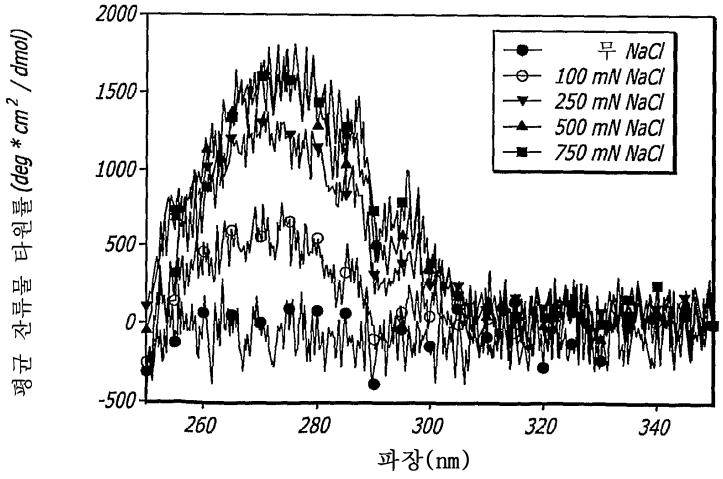
도면1d



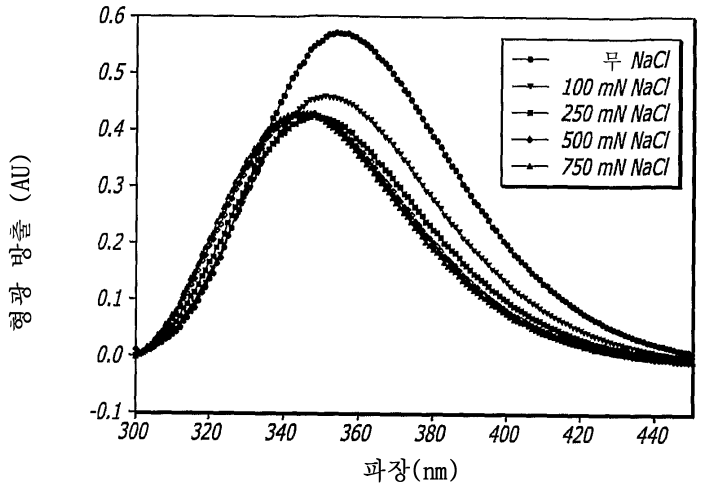
도면2a



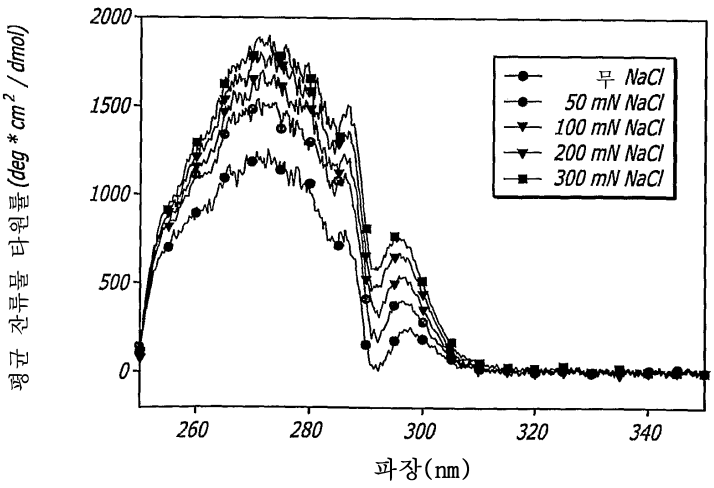
도면2b



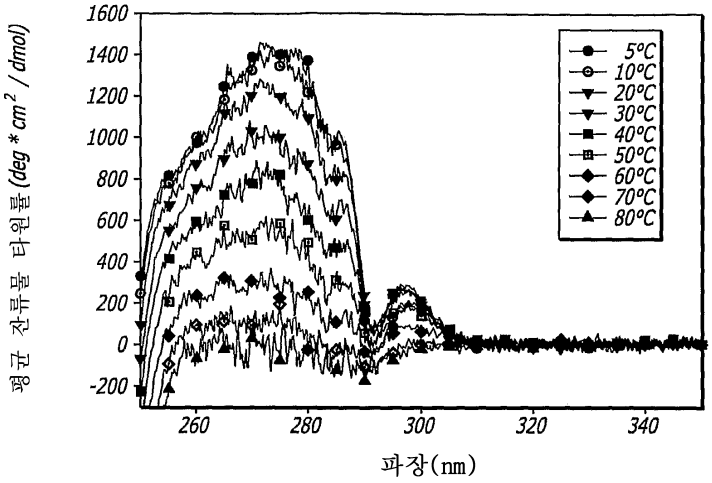
도면2c



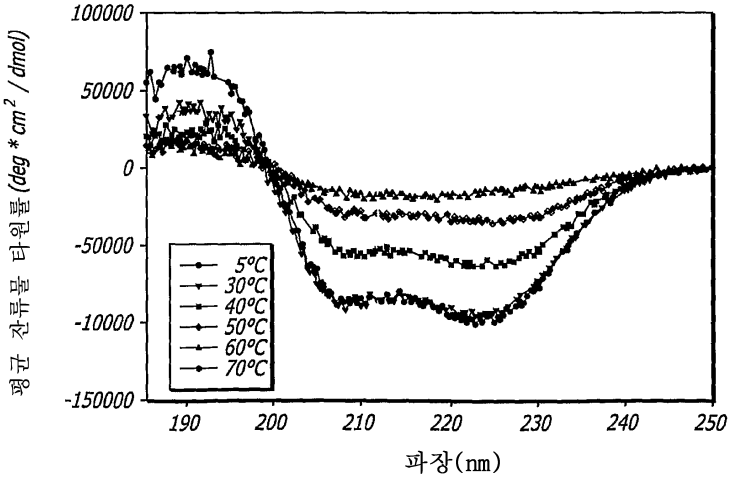
도면2d



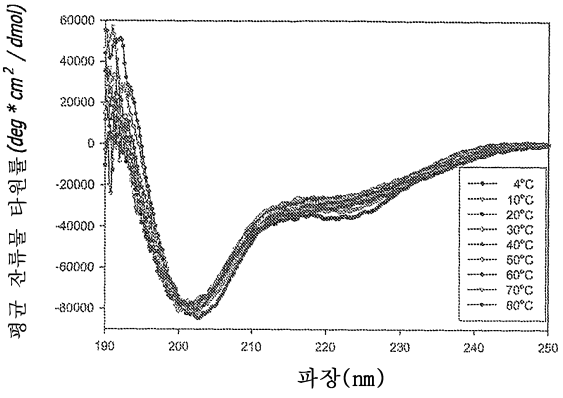
도면3a



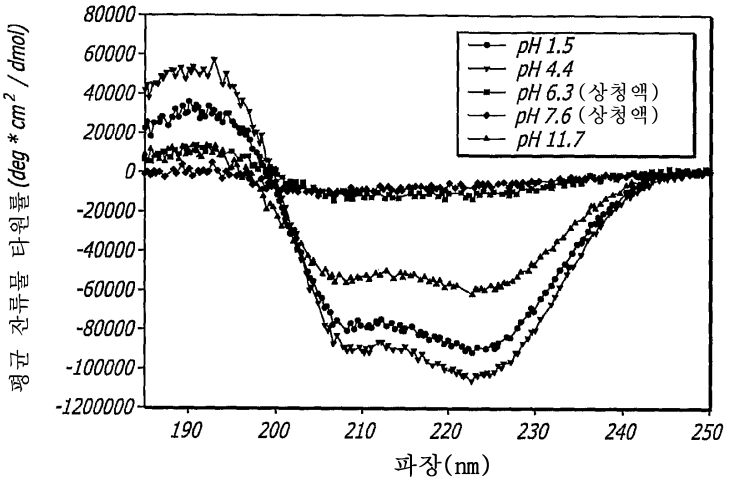
도면3b



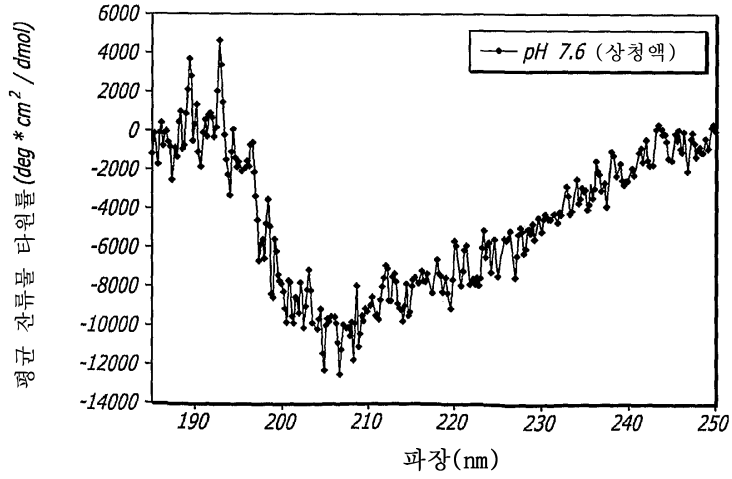
도면3c



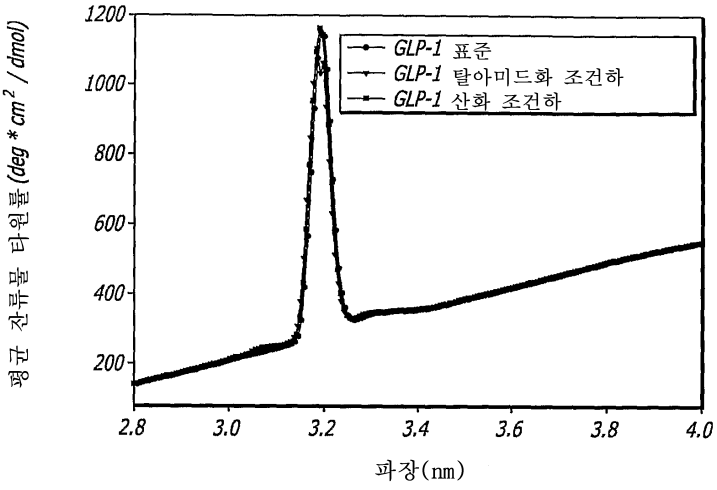
도면4a



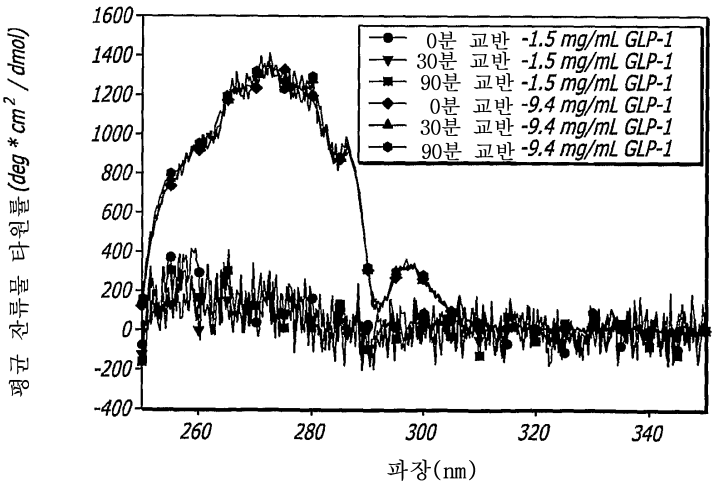
도면4b



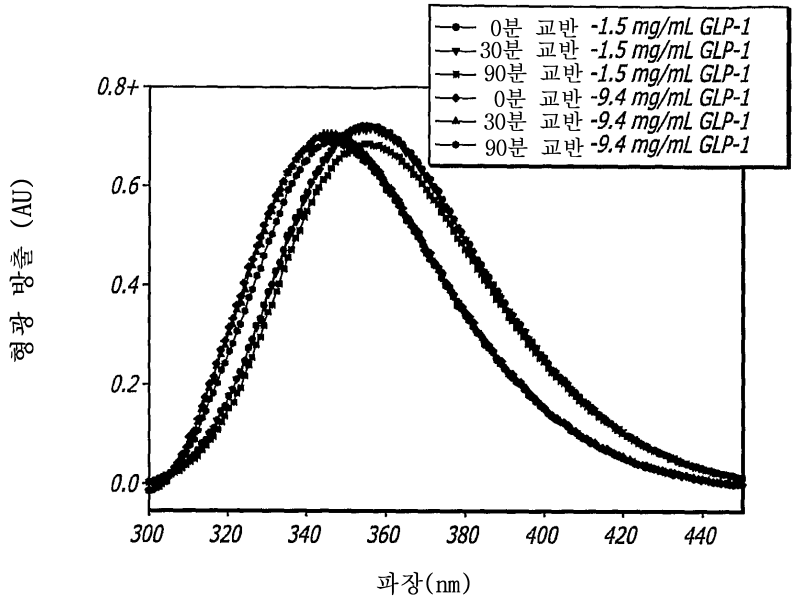
도면5



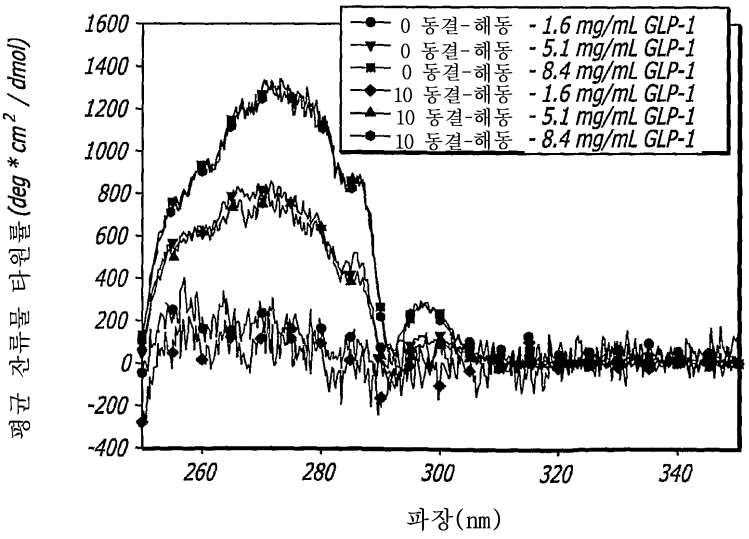
도면6a


0분 교반 -1.5 mg/mL GLP-1
30분 교반 -1.5 mg/mL GLP-1
90분 교반 -1.5 mg/mL GLP-1
0분 교반 -9.4 mg/mL GLP-1
30분 교반 -9.4 mg/mL GLP-1
90분 교반 -9.4 mg/mL GLP-1
평균 잔류물 타원률 (deg * cm2 / dmol)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
-200
-400
260
280
300
320
340
파장(nm)

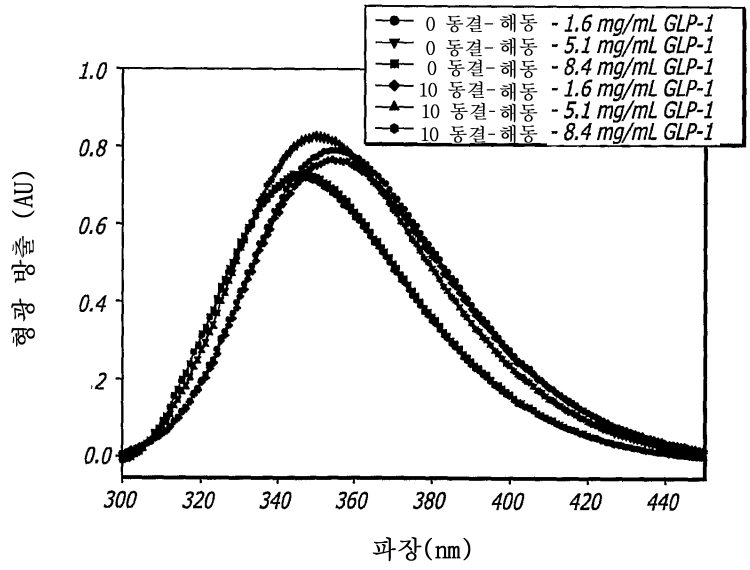
도면6b


0분 교반 -1.5 mg/mL GLP-1
30분 교반 -1.5 mg/mL GLP-1
90분 교반 -1.5 mg/mL GLP-1
0분 교반 -9.4 mg/mL GLP-1
30분 교반 -9.4 mg/mL GLP-1
90분 교반 -9.4 mg/mL GLP-1
형광 방출 (AU)
0.8+
0.6
0.4
0.2
0.0
300
320
340
360
380
400
420
440
파장(nm)

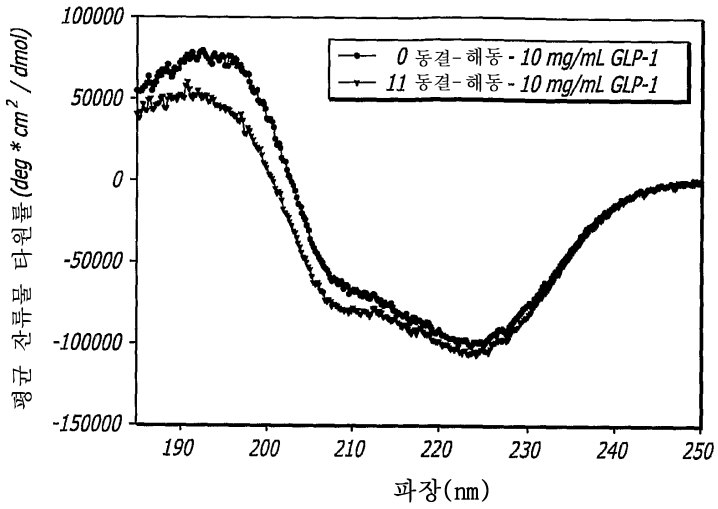
도면7a


0 동결-해동 - 1.6 mg/mL GLP-1
0 동결-해동 - 5.1 mg/mL GLP-1
0 동결-해동 - 8.4 mg/mL GLP-1
10 동결-해동 - 1.6 mg/mL GLP-1
10 동결-해동 - 5.1 mg/mL GLP-1
10 동결-해동 - 8.4 mg/mL GLP-1
평균 잔류물 타원률 (deg * cm² / dmol)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
-200
-400
260
280
300
320
340
파장(nm)

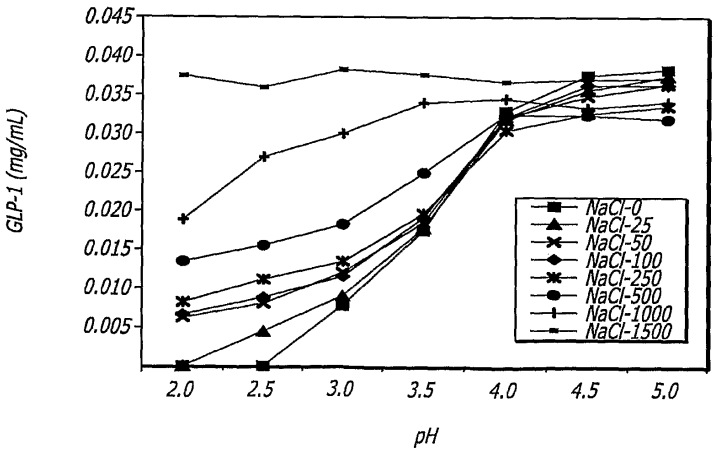
도면7b


0 동결-해동 - 1.6 mg/mL GLP-1
0 동결-해동 - 5.1 mg/mL GLP-1
0 동결-해동 - 8.4 mg/mL GLP-1
10 동결-해동 - 1.6 mg/mL GLP-1
10 동결-해동 - 5.1 mg/mL GLP-1
10 동결-해동 - 8.4 mg/mL GLP-1
형광 방출 (AU)
1.0
0.8
0.6
0.4
.2
0.0
300
320
340
360
380
400
420
440
파장(nm)

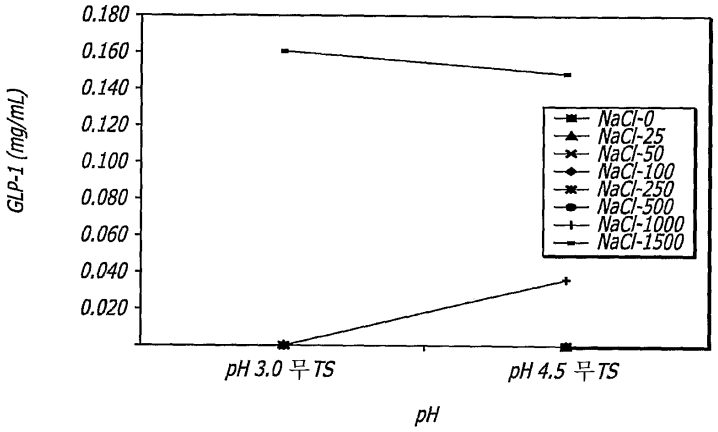
도면7c



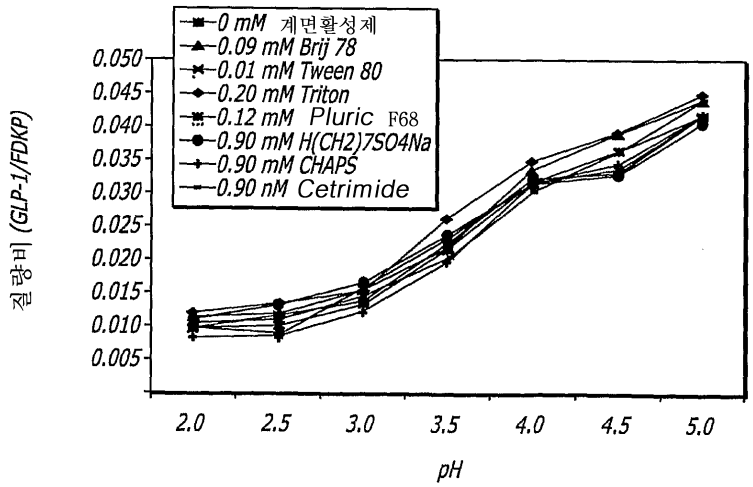
도면8a



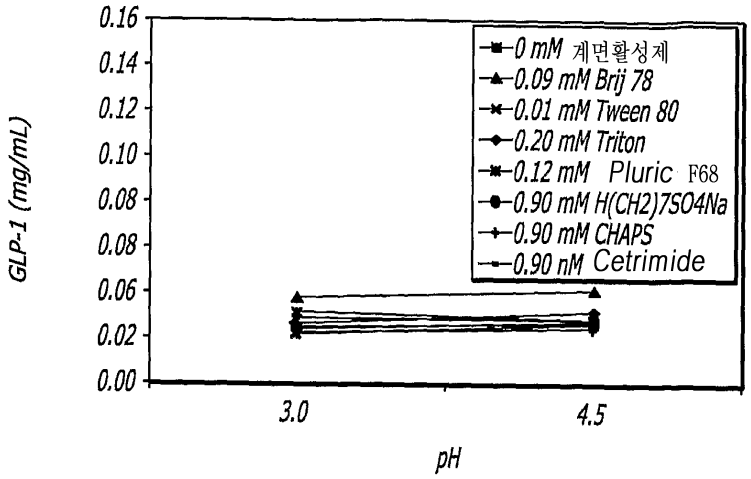
도면8b



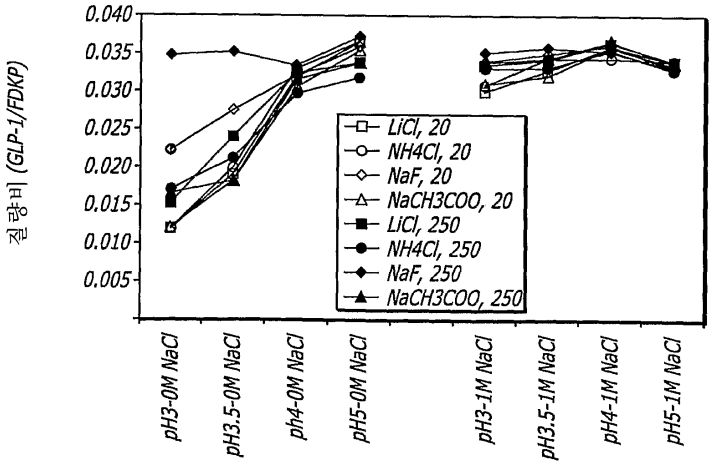
도면9a



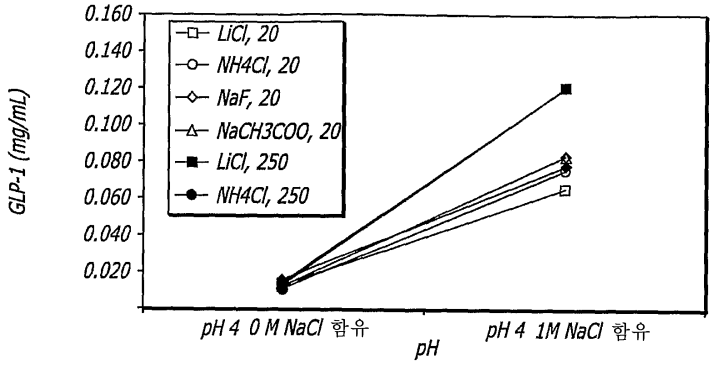
도면9b



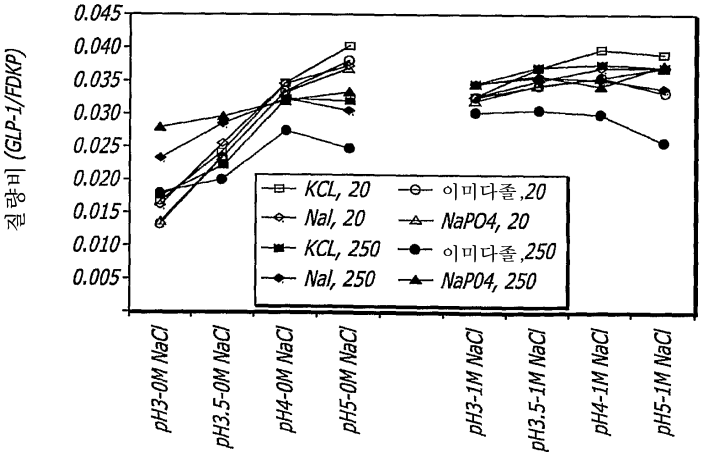
도면10a



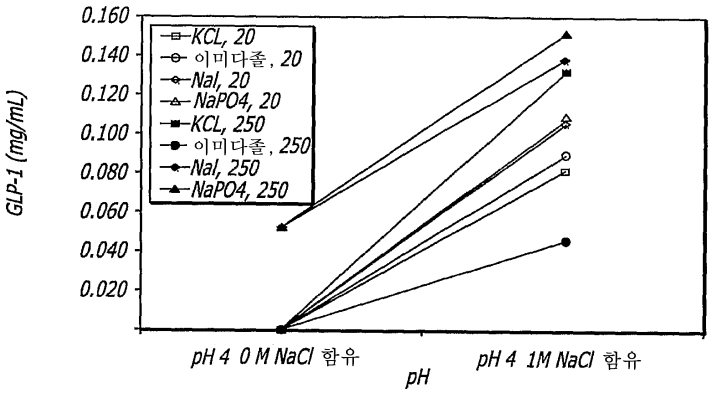
도면10b



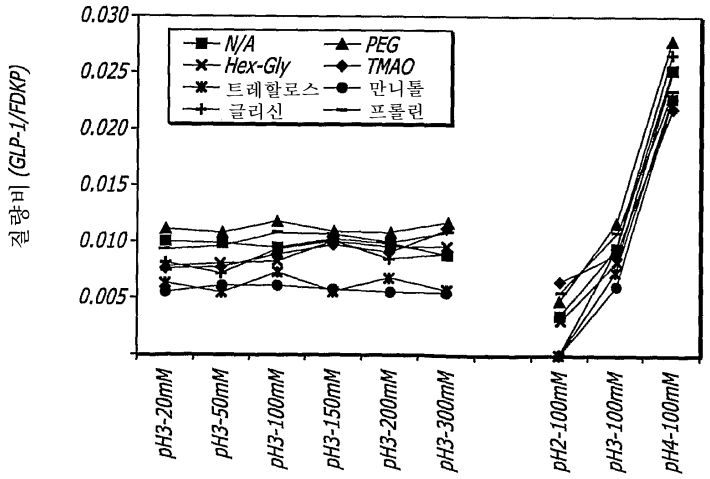
도면10c



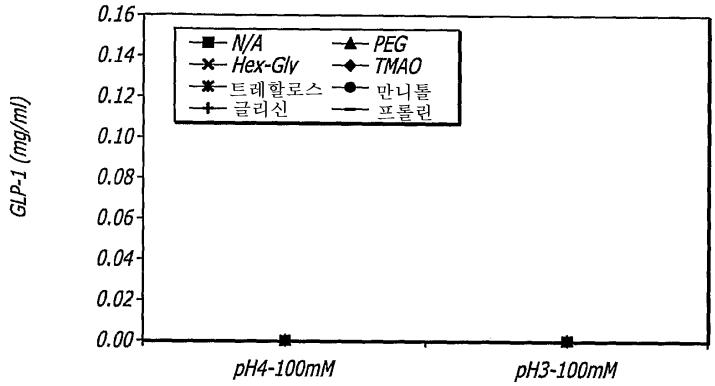
도면10d



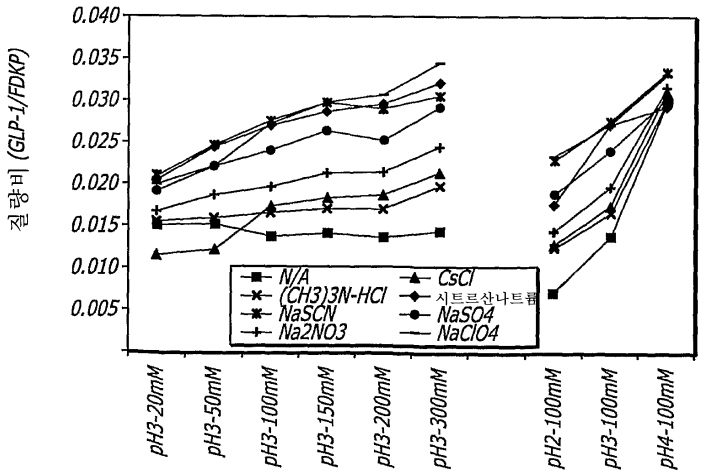
도면11a



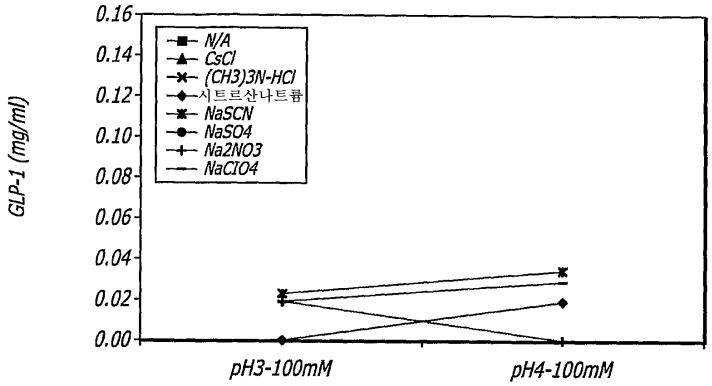
도면11b



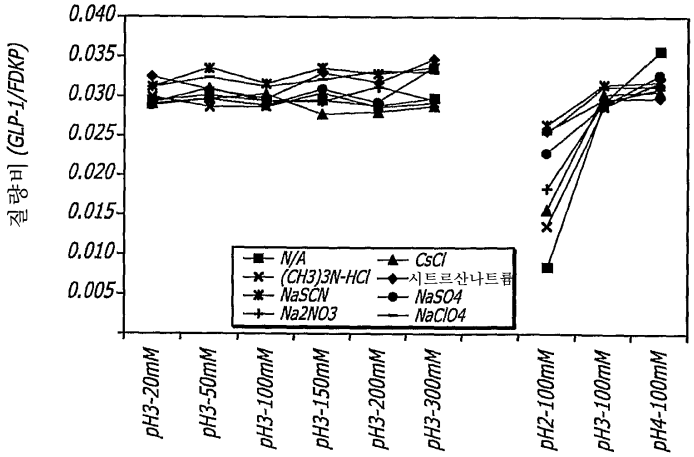
도면12a



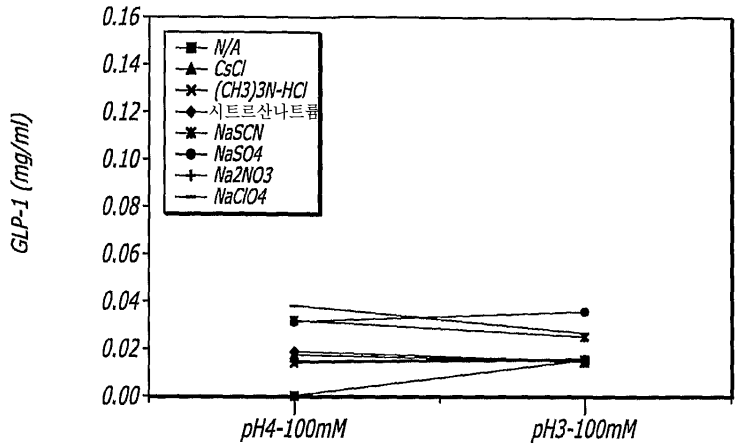
도면12b



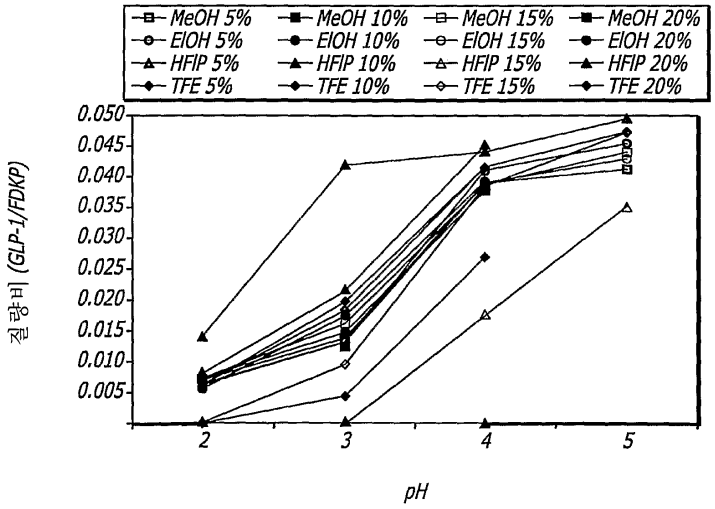
도면12c



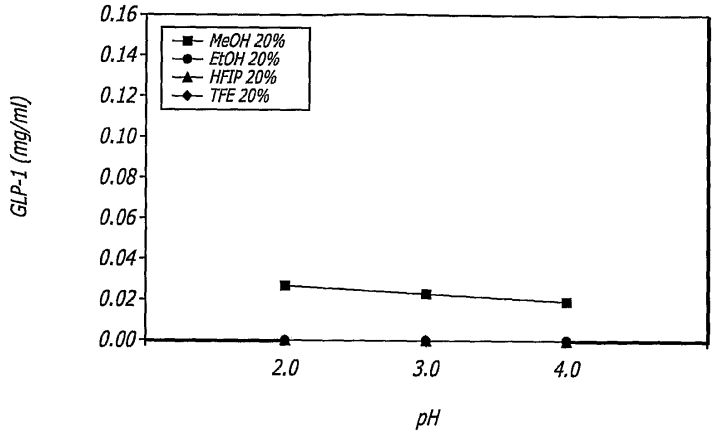
도면12d



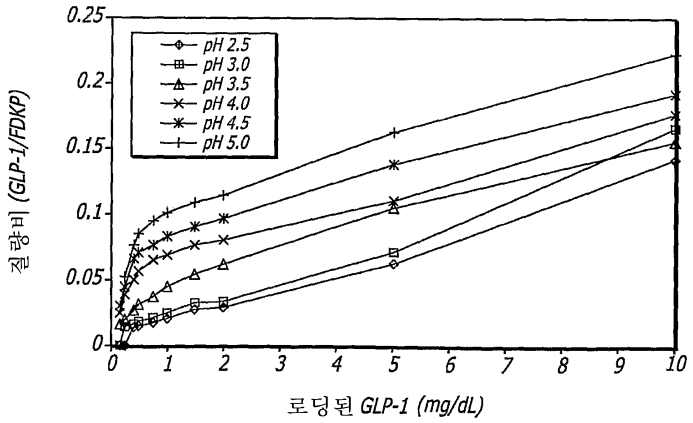
도면13a



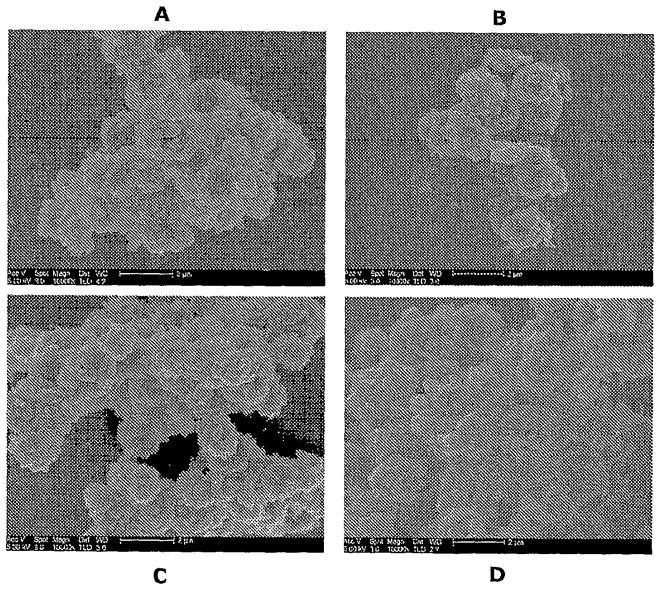
도면13b



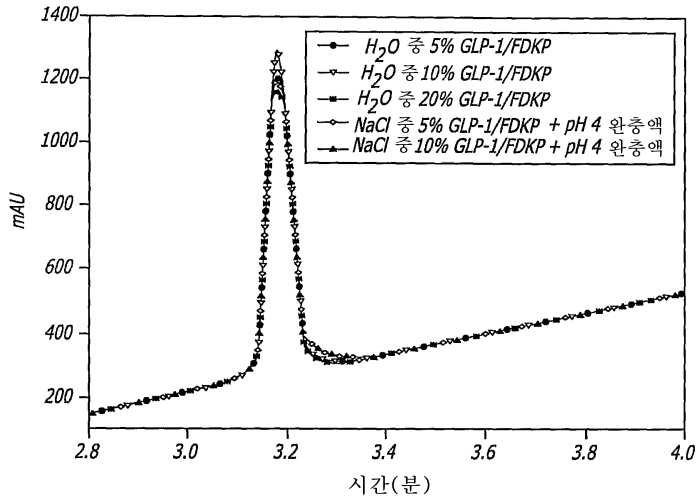
도면14a



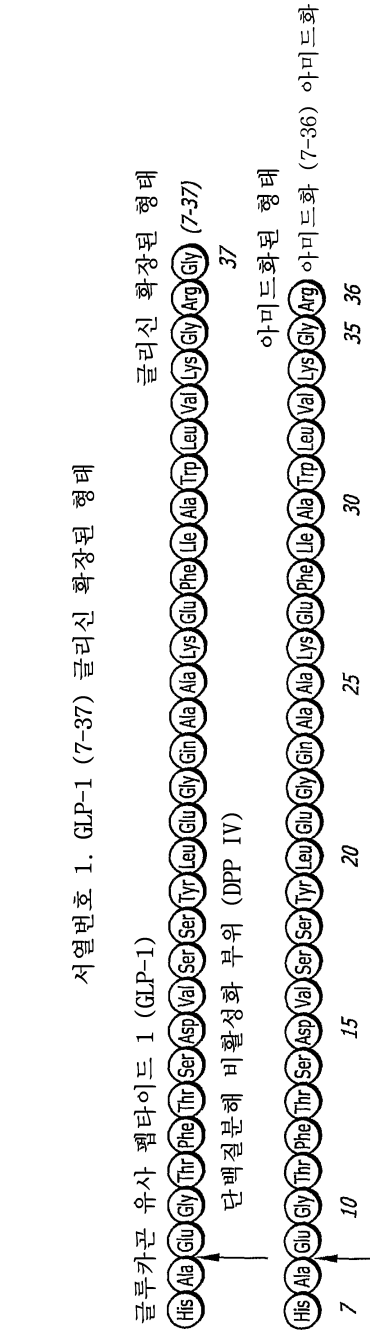
도면14b


A
B
C
D

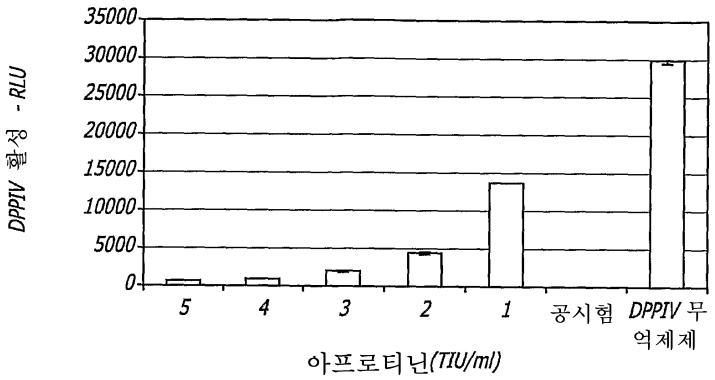
도면15


1400
1200
1000
800
600
400
200
mAU
2.8
3.0
3.2
3.4
3.6
3.8
4.0
시간(분)
H2O 중 5% GLP-1/FDKP
H2O 중 10% GLP-1/FDKP
H2O 중 20% GLP-1/FDKP
NaCl 중 5% GLP-1/FDKP + pH 4 완충액
NaCl 중 10% GLP-1/FDKP + pH 4 완충액

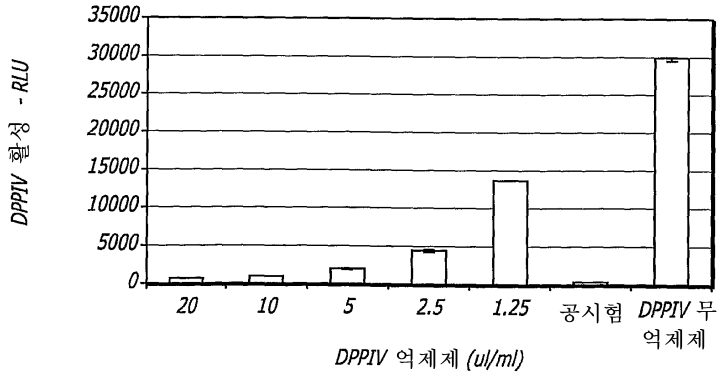
도면16a


서열번호 1. GLP-1 (7-37) 글리신 확장된 형태
글루카곤 유사 펩타이드 1 (GLP-1)
글리신 확장된 형태
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
(7-37)
단백질분해 비활성화 부위 (DPP IV)
37
아미드화된 형태
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
아미드화 (7-36)
7 10 15 20 25 30 35 36
서열번호 2. GLP-1 (7-36) 아미드화된 형태

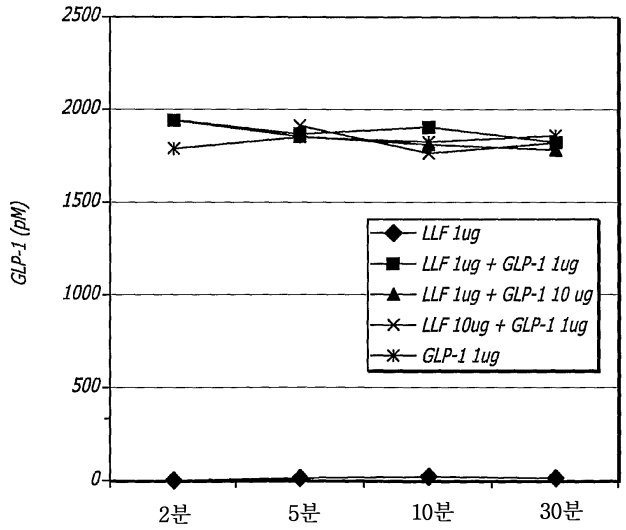
도면16b



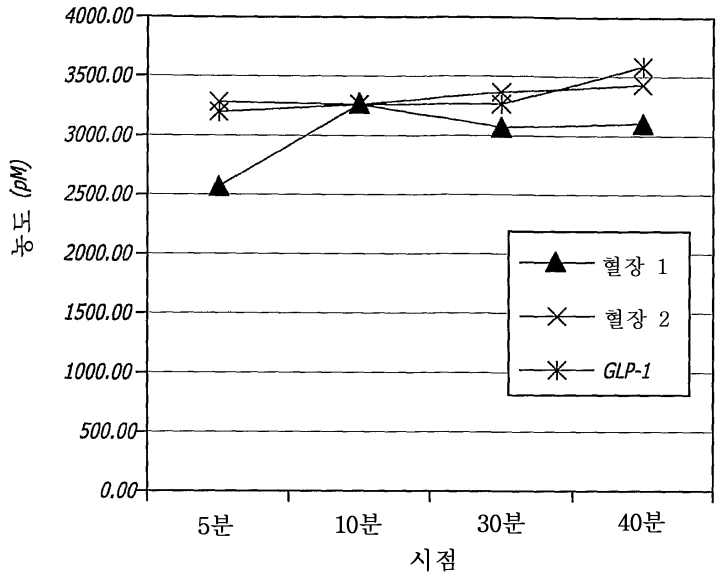
도면16c



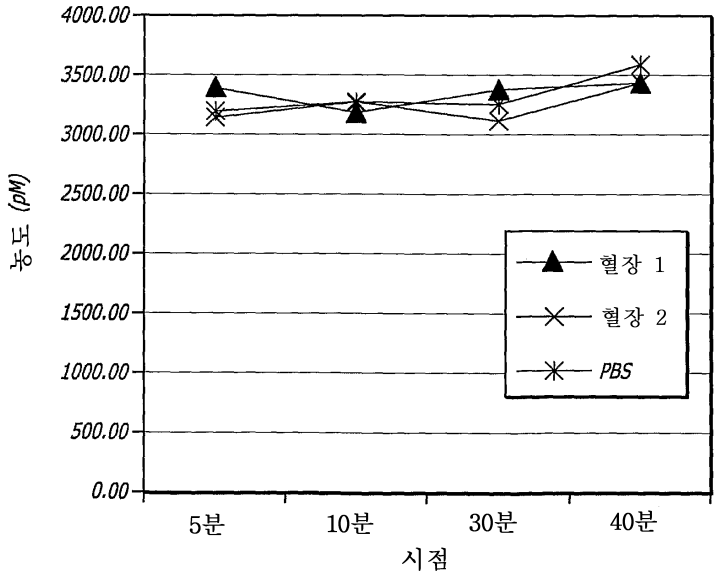
도면17



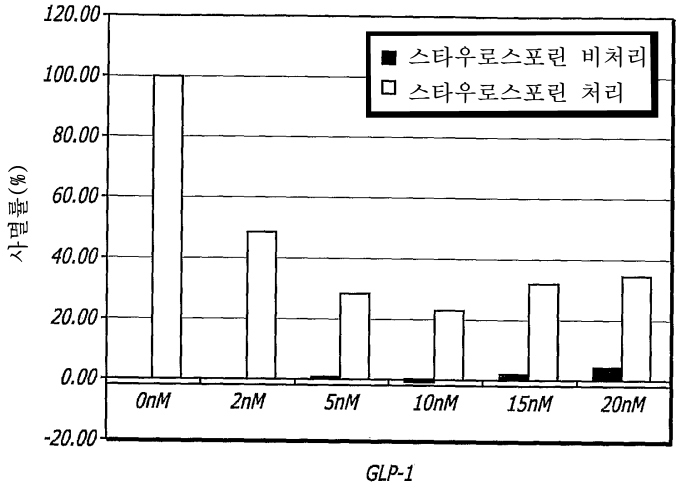
도면18a


4000.00
3500.00
3000.00
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
농도 (pM)
혈장 1
혈장 2
GLP-1
5분
10분
30분
40분
시점

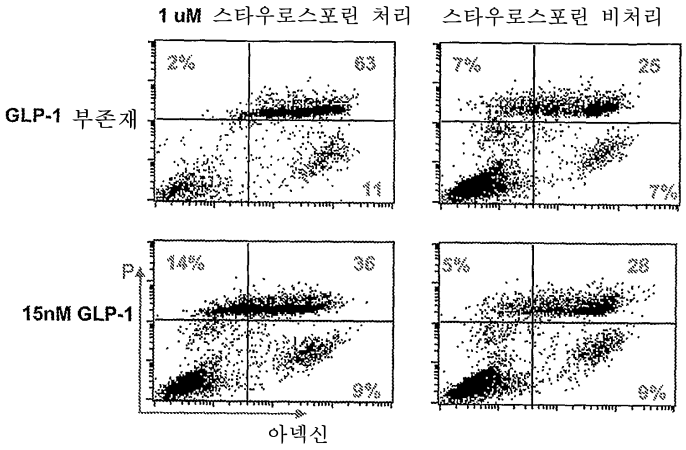
도면18b


4000.00
3500.00
3000.00
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
농도 (pM)
혈장 1
혈장 2
PBS
5분
10분
30분
40분
시점

도면19a

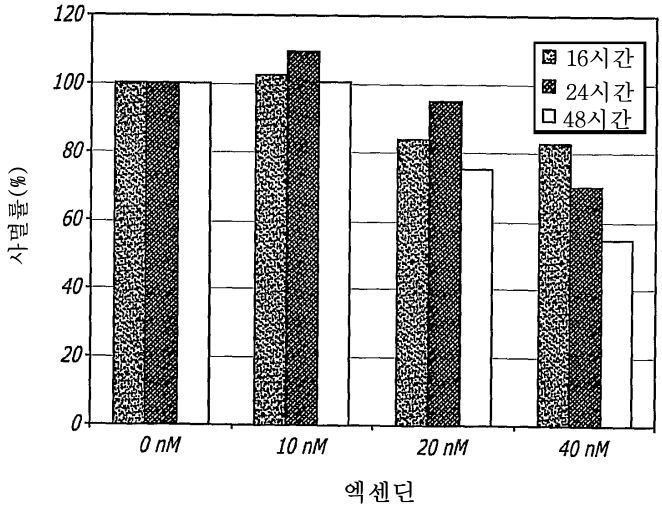


도면19b

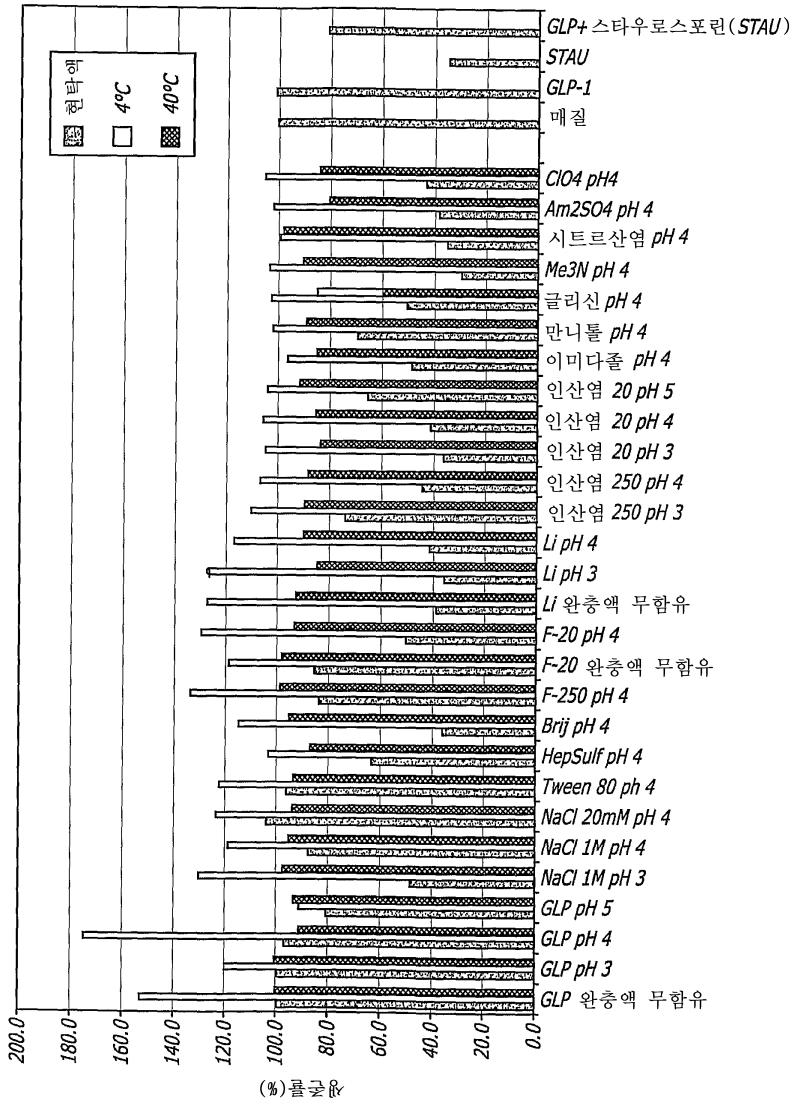


처리		세포자멸률(%)	억제율(%)
비처리	-	32	0
	+ GLP-1	38	-11
스타우로스포린	-	74	0
	+ GLP-1	45	40

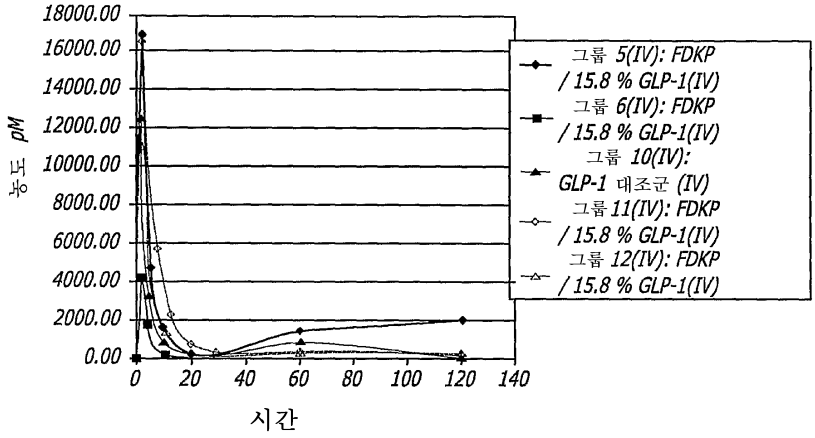
도면20


120
100
80
60
40
20
0
사멸률(%)
16시간
24시간
48시간
0 nM
10 nM
20 nM
40 nM
엑센딘

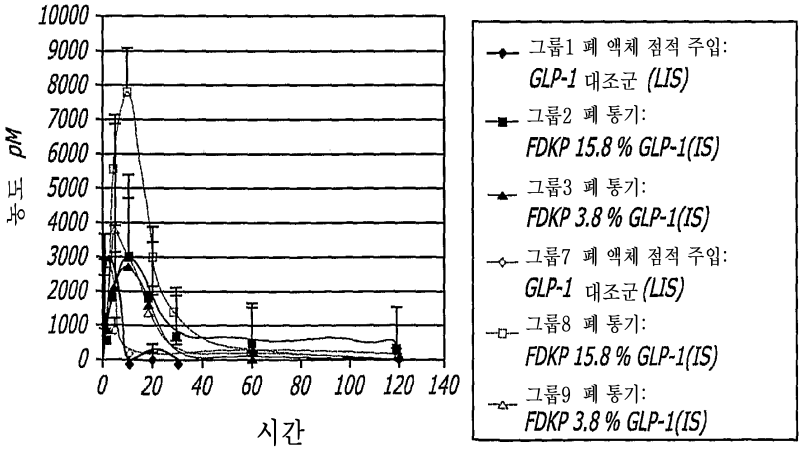
도면21


현탁액
4°C
40°C
GLP+ 스타우로스포린(STAU)
STAU
GLP-1
매질
ClO4 pH4
Am2SO4 pH 4
시트르산염 pH 4
Me3N pH 4
글리신 pH 4
만니톨 pH 4
이미다졸 pH 4
인산염 20 pH 5
인산염 20 pH 4
인산염 20 pH 3
인산염 250 pH 4
인산염 250 pH 3
Li pH 4
Li pH 3
Li 완충액 무함유
F-20 pH 4
F-20 완충액 무함유
F-250 pH 4
Brij pH 4
HepSulf pH 4
Tween 80 ph 4
NaCl 20mM pH 4
NaCl 1M pH 4
NaCl 1M pH 3
GLP pH 5
GLP pH 4
GLP pH 3
GLP 완충액 무함유
200.0
180.0
160.0
140.0
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
생존률(%)

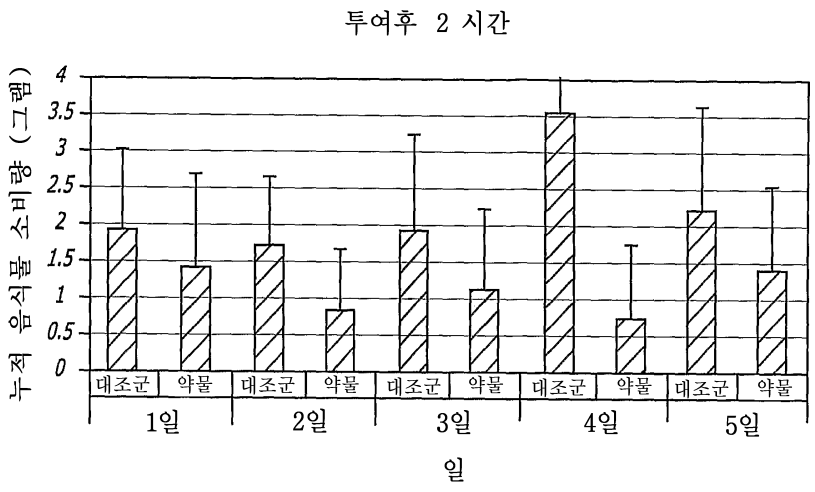
도면22a



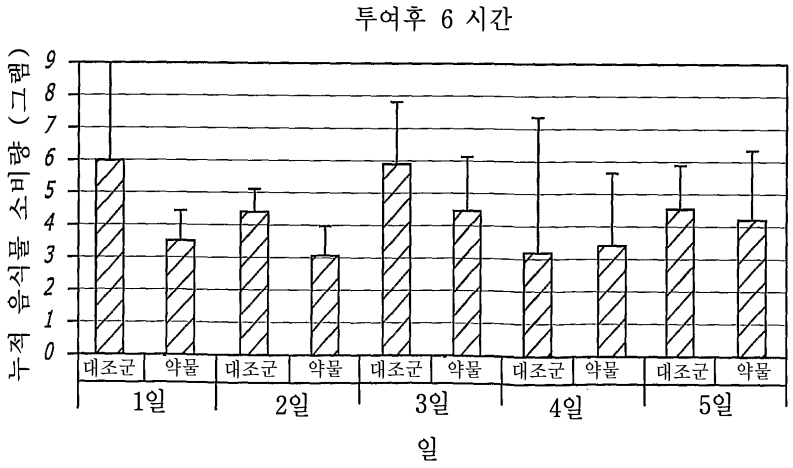
도면22b



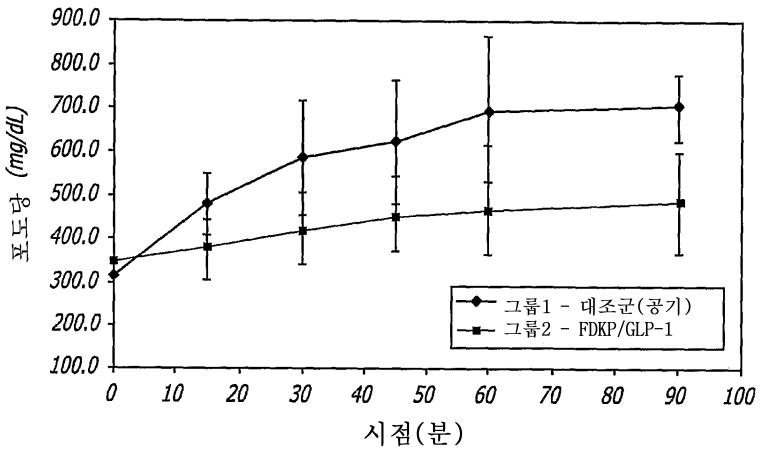
도면23a



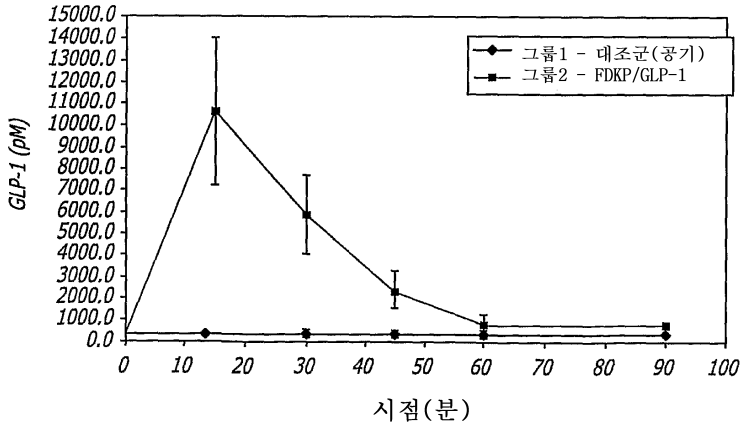
도면23b



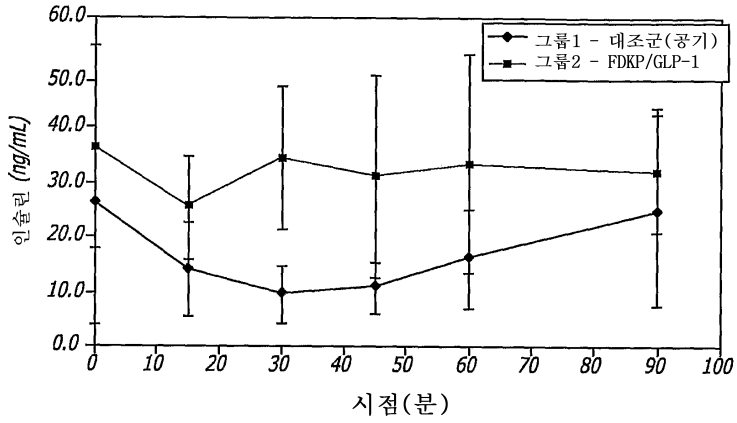
도면24



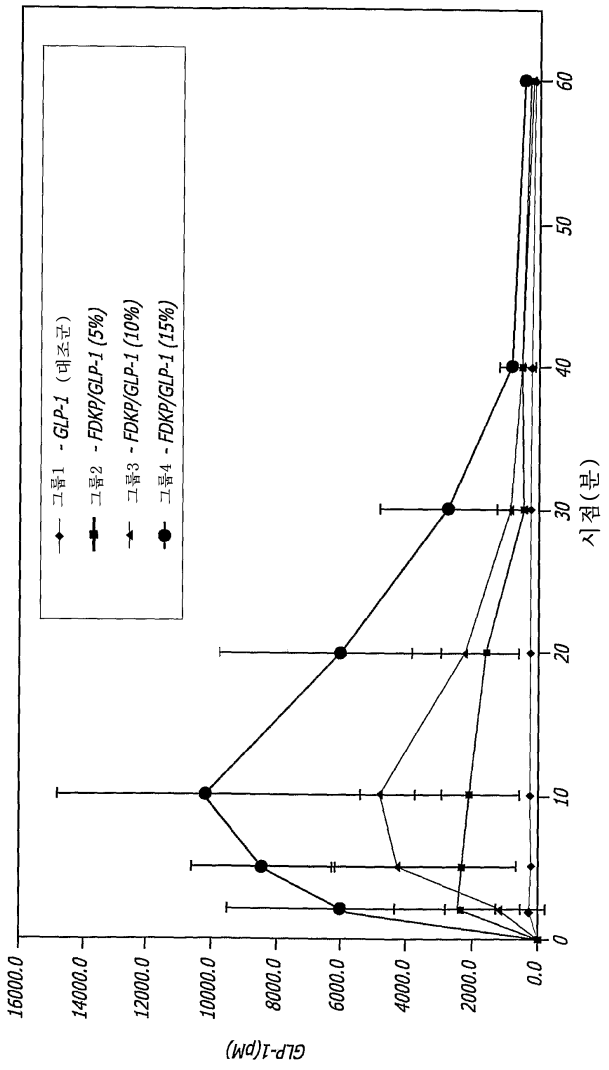
도면25



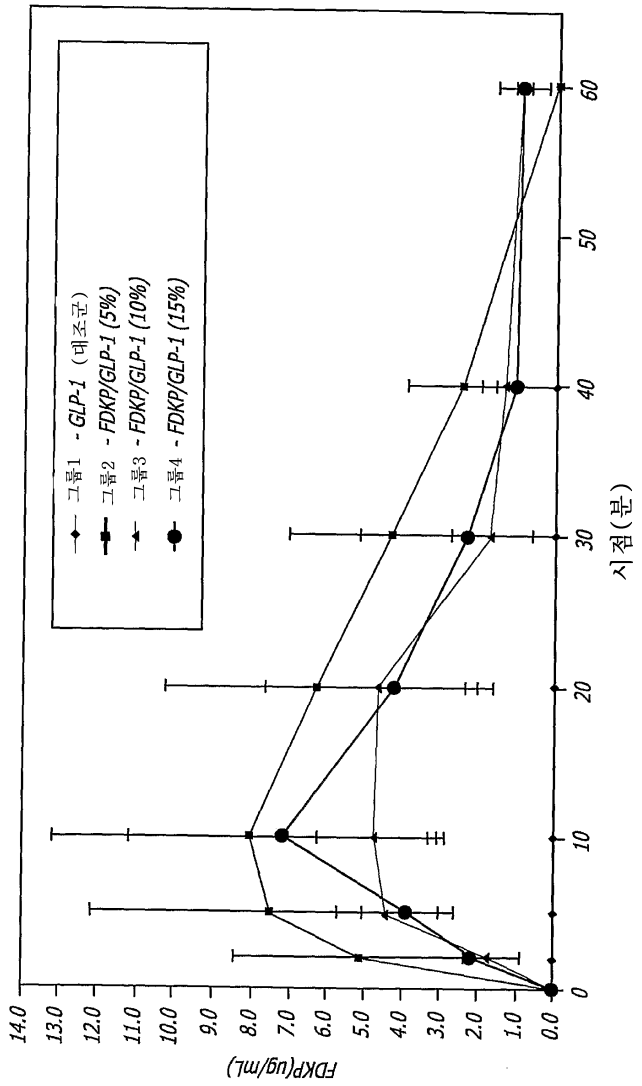
도면26


60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
인슐린 (ng/mL)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
시점(분)
그룹1 - 대조군(공기)
그룹2 - FDKP/GLP-1

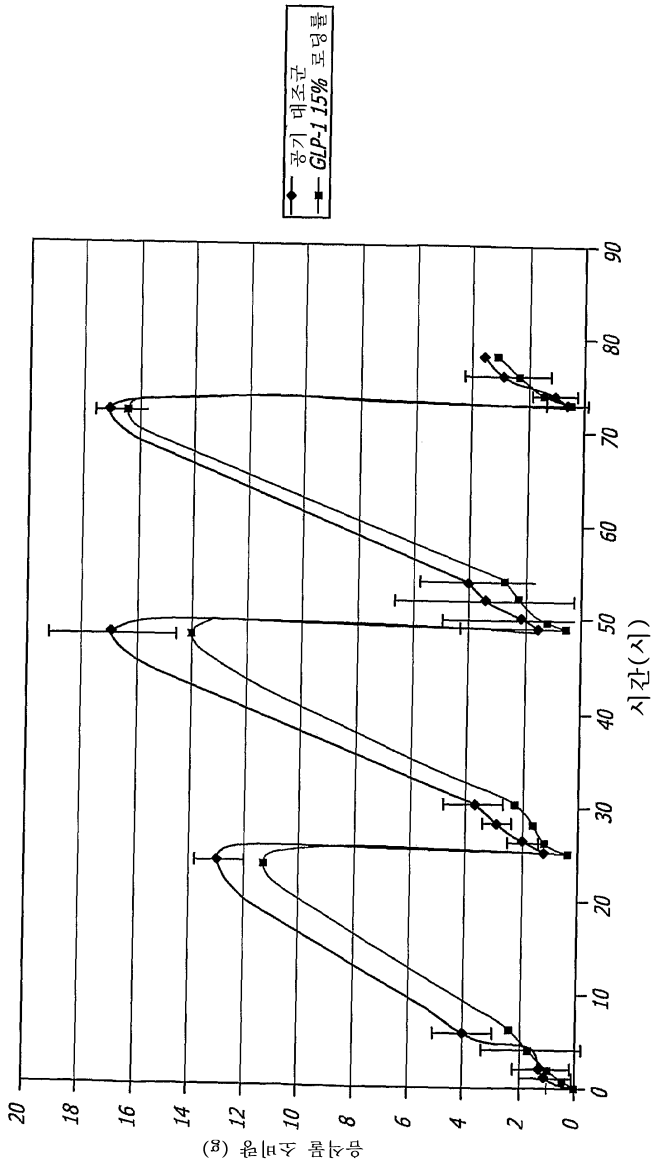
도면27


그룹1 - GLP-1 (대조군)
그룹2 - FDKP/GLP-1 (5%)
그룹3 - FDKP/GLP-1 (10%)
그룹4 - FDKP/GLP-1 (15%)
16000.0
14000.0
12000.0
10000.0
8000.0
6000.0
4000.0
2000.0
0.0
GLP-1(pM)
0
10
20
30
40
50
60
시점(분)

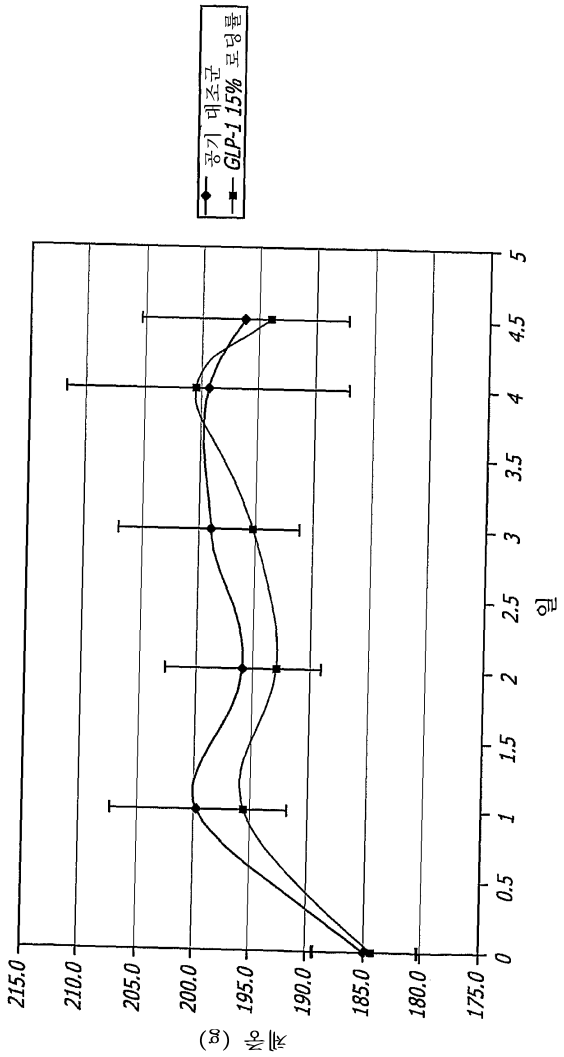
도면28


그룹1 - GLP-1 (대조군)
그룹2 - FDKP/GLP-1 (5%)
그룹3 - FDKP/GLP-1 (10%)
그룹4 - FDKP/GLP-1 (15%)
FDKP(ug/mL)
14.0
13.0
12.0
11.0
10.0
9.0
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
0
10
20
30
40
50
60
시점(분)

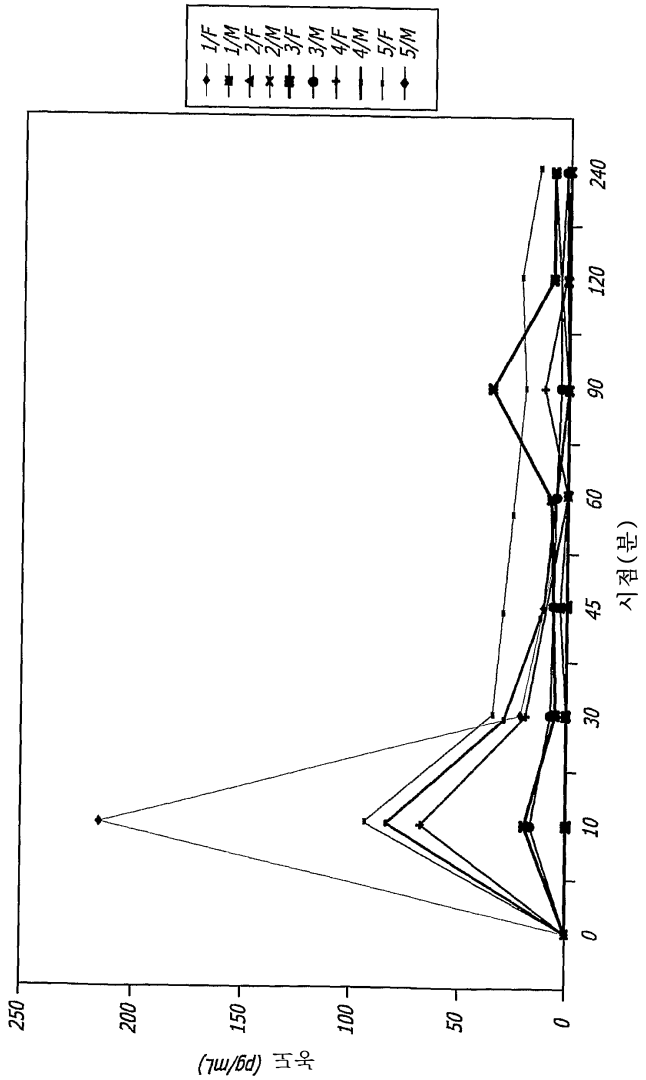
도면29


공기 대조군
GLP-1 15% 로딩률
음식물 소비량 (g)
시간(시)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90

도면30


공기 대조군
GLP-1 15% 포밍률
체중 (g)
215.0
210.0
205.0
200.0
195.0
190.0
185.0
180.0
175.0
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
4
4.5
5
일

도면31



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> MannKind Corporation

Hokenson, Mark

Brandt, David

King, Mark

Green, Stephanie

Faris, Mary

Oberg, Keith

Cheatham, Wendell

Gelber, Cohava

Leone-Bay, Andrea

<120> Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1) Pharmaceutical Formulations

<130> 51300-00028

<150> 60/744,882

<151> 2006-04-14

<150> 10/632878

<151> 2003-08-01

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

<210> 3

<211> 39

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35