

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5415938号  
(P5415938)

(45) 発行日 平成26年2月12日(2014.2.12)

(24) 登録日 平成25年11月22日(2013.11.22)

(51) Int.Cl.

F 1

A61K 38/26	(2006.01)	A61K 37/28
A61K 9/19	(2006.01)	A61K 9/19
A61K 9/16	(2006.01)	A61K 9/16
A61K 9/12	(2006.01)	A61K 9/12
A61K 47/22	(2006.01)	A61K 47/22

請求項の数 32 (全 72 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-505655 (P2009-505655)
(86) (22) 出願日	平成19年4月16日 (2007.4.16)
(65) 公表番号	特表2009-533476 (P2009-533476A)
(43) 公表日	平成21年9月17日 (2009.9.17)
(86) 國際出願番号	PCT/US2007/066728
(87) 國際公開番号	W02007/121411
(87) 國際公開日	平成19年10月25日 (2007.10.25)
審査請求日	平成22年4月8日 (2010.4.8)
(31) 優先権主張番号	60/744,882
(32) 優先日	平成18年4月14日 (2006.4.14)
(33) 優先権主張国	米国(US)

早期審査対象出願

前置審査

(73) 特許権者	503208552 マンカインド コーポレイション アメリカ合衆国 カリフォルニア 913 55 バレンシア ノース アベニュー ペイン 28903
(74) 代理人	100095407 弁理士 木村 满
(74) 代理人	100109449 弁理士 毛受 隆典
(74) 代理人	100132883 弁理士 森川 泰司
(74) 代理人	100123618 弁理士 雨宮 康仁
(74) 代理人	100148633 弁理士 桜田 圭

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】グルカゴン様ペプチド1 (GLP-1) 医薬製剤

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

ジケトピペラジン微小粒子の表面に吸着された天然のGLP-1を含み、前記GLP-1が唯一の治療剤であり、前記ジケトピペラジンは式：2，5-ジケト-3，6-ジ(4-X-アミノブチル)ピペラジンを有するジケトピペラジンであって、式中Xは、スクシニル、グルタリル、マレイルおよびフマリルからなる群から選択される。

ことを特徴とする糖尿病の治療における使用のための吸入可能な乾燥粉末組成物。

## 【請求項2】

前記ジケトピペラジンが2，5-ジケト-3，6-ジ(4-フマリル-アミノブチル)ピペラジンである、請求項1に記載の乾燥粉末組成物。

10

## 【請求項3】

天然のGLP-1を提供するステップ；

粒子形成ジケトピペラジン、ジケトピペラジン微小粒子およびそれらの組み合わせから選択される形態のジケトピペラジンを提供するステップ；および

共通の溶液の形態で前記GLP-1および前記ジケトピペラジンを混合するステップ、を含み、

ジケトピペラジン微小粒子の表面に吸着された天然のGLP-1を含む粒子が形成され、前記GLP-1が唯一の治療剤であり、前記ジケトピペラジンは式：2，5-ジケト-3，6-ジ(4-X-アミノブチル)ピペラジンを有するジケトピペラジンであって、式中Xは、スクシニル、グルタリル、マレイルおよびフマリルからなる群から選択される、

20

ことを特徴とするジケトピペラジン微小粒子の表面に吸着された天然の G L P - 1 を含む、糖尿病の治療における使用のための吸入可能な粒子を形成する方法。

【請求項 4】

凍結乾燥、濾過または噴霧乾燥によって前記共通の溶液から溶媒を除去することをさらに含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記粒子が、前記溶媒を除去する前に形成される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 G L P - 1 が、1 μ g / mL ~ 50 mg / mL の濃度の天然の G L P - 1 を含む溶液の形態で提供される、請求項 3 に記載の方法。 10

【請求項 7】

前記 G L P - 1 が、0.1 mg / mL ~ 10 mg / mL の濃度の天然の G L P - 1 を含む溶液の形態で提供される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 G L P - 1 が、0.25 mg / mL の濃度の天然の G L P - 1 を含む溶液の形態で提供される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 9】

前記ジケトピペラジンが、ジケトピペラジン微小粒子の懸濁液の形態で提供される、請求項 3 に記載の方法。 20

【請求項 10】

前記ジケトピペラジンが、粒子形成ジケトピペラジンを含む溶液の形態で提供され、ジケトピペラジン微小粒子を形成するために前記溶液の pH を調整することを更に含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 11】

前記溶液または懸濁液に作用剤を添加することをさらに含み、該作用剤が、塩化ナトリウム、界面活性剤、ヘキシレングリコール、トレハロース、グリシン、ポリエチレングリコール、トリメチルアミン N - オキシド、マンニトール、プロリン、塩化セシウム、クエン酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、メタノール、エタノール、トリフルオロエタノールまたはヘキサフルオロイソプロパノールである、請求項 9 または請求項 10 に記載の方法。 30

【請求項 12】

前記作用剤が前記 G L P - 1 と前記ジケトピペラジン微小粒子または前記粒子形成ジケトピペラジンとの間の会合を促進する、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記作用剤が前記 G L P - 1 の安定性または薬効を改善する、請求項 11 に記載の方法。 40

【請求項 14】

前記作用剤が塩化ナトリウムである、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 15】

前記懸濁液または溶液の pH を調整することをさらに含む、請求項 9 または請求項 10 に記載の方法。 40

【請求項 16】

pH を 4 以上に調整する、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記ジケトピペラジン微小粒子の表面に吸着された天然の G L P - 1 がより大きな安定性を有する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 18】

前記共通の溶液が、1 μ g / mL ~ 50 mg / mL の濃度の天然の G L P - 1 を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 19】

前記共通の溶液が、0.1 mg / mL ~ 10 mg / mL の濃度の天然の G L P - 1 を含 50

む、請求項3に記載の方法。

【請求項 20】

前記共通の溶液が、0.25 mg / mL の濃度の天然のGLP-1を含む、請求項3に記載の方法。

【請求項 21】

前記共通の溶液に作用剤を添加することをさらに含み、該作用剤が、塩化ナトリウム、界面活性剤、ヘキシレングリコール、トレハロース、グリシン、ポリエチレングリコール、トリメチルアミンN-オキシド、マンニトール、プロリン、塩化セシウム、クエン酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、メタノール、エタノール、トリフルオロエタノールまたはヘキサフルオロイソプロパノールである、請求項3に記載の方法。

10

【請求項 22】

前記作用剤が前記GLP-1と前記ジケトピペラジン微小粒子または前記粒子形成ジケトピペラジンとの間の会合を促進する、請求項21に記載の方法。

【請求項 23】

前記作用剤が該GLP-1の安定性または薬効を改善する、請求項21に記載の方法。

【請求項 24】

前記作用剤が塩化ナトリウムである、請求項21に記載の方法。

【請求項 25】

前記共通の溶液のpHを調整することを更に含む、請求項3に記載の方法。

【請求項 26】

pHを4以上に調整する、請求項25に記載の方法。

20

【請求項 27】

ジケトピペラジン微小粒子の表面に吸着された天然のGLP-1を含む微小粒子を含み、前記GLP-1が唯一の治療剤であり、前記ジケトピペラジンは式：2,5-ジケト-3,6-ジ(4-X-アミノブチル)ピペラジンを有するジケトピペラジンであって、式中Xは、スクシニル、グルタリル、マレイルおよびフマリルからなる群から選択される、

ことを特徴とする有効量の天然のGLP-1を糖尿病の治療のために被験体に肺内投与するための医薬組成物の製造における、天然のGLP-1の使用。

【請求項 28】

前記粒子の投与が、天然のGLP-1を含みジケトピペラジンを含まない医薬組成物よりも天然のGLP-1の薬物動力学的半減期および生物学的利用能の改善をもたらす、請求項27に記載の使用。

30

【請求項 29】

天然のGLP-1を提供するステップ；

粒子形成ジケトピペラジンを溶液の形態で提供するステップ；

ジケトピペラジン微小粒子を形成するステップ；

共通の溶液を形成するために該GLP-1と該溶液とを混合するステップ；および

ジケトピペラジン微小粒子の表面に吸着された天然のGLP-1を含む微小粒子を含み、粉末組成物において前記GLP-1が唯一の治療剤であり、前記ジケトピペラジンは式：2,5-ジケト-3,6-ジ(4-X-アミノブチル)ピペラジンを有するジケトピペラジンであって、式中Xは、スクシニル、グルタリル、マレイルおよびフマリルからなる群から選択される、天然のGLP-1薬物動態プロファイルが改善した粉剤を形成するために、噴霧乾燥により該共通の溶液から溶媒を除去するステップ、を含む、天然のGLP-1薬物動態プロファイルが改善した糖尿病の治療における使用のための吸入可能な粉末組成物を形成する方法。

40

【請求項 30】

前記改善された天然のGLP-1薬物動態プロファイルがより高い天然のGLP-1半減期を含む、請求項29に記載の方法。

【請求項 31】

前記より高い天然のGLP-1半減期が7.5分以上である、請求項30に記載の方法

50

。

## 【請求項 3 2】

前記改善された天然の G L P - 1 薬物動態プロファイルが、天然の G L P - 1 を含みジケトピペラジンを含まない粉末組成物よりも改善された天然の G L P - 1 の生物学的利用能を含む、請求項 2 9 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【発明の詳細な説明】

## 【0 0 0 1】

## 関連出願との相互参照

10

本出願は、2003年7月22日に出願の米国特許出願第10/632,878号の一部継続出願であり、米国特許法第119条(e)項の規定により、2006年4月14日に出願の米国仮特許出願第60/744,882号に対する利益を請求するものである。上述の各優先権出願は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

## 【0 0 0 2】

## 技術分野

本発明は医薬製剤の分野に関する。本発明は、グルカゴン様ペプチド1 (G L P - 1) と組み合わせたジケトピペラジン (DKP) 粒子を含む乾燥粉末製剤を開示するものである。本発明は、糖尿病や、癌、肥満等の疾患を治療するための医薬製剤として有用であるが、そのような疾患に限定されない。更に詳しくは、本発明は、肺内送達のための医薬製剤として有用である。

20

## 【0 0 0 3】

## 背景技術

文献にて開示されているように、グルカゴン様ペプチド1 (G L P - 1) は、30個または31個のアミノ酸からなるインクレチンであり、食事由来の脂肪、炭水化物摂取およびタンパク質に応答して腸内分泌L細胞から放出されるものである。このペプチドホルモンの分泌は2型糖尿病の個体において低下することが見出され、2型糖尿病においては、このペプチドホルモンは、その疾患や他の関連疾患の治療のための候補物質となり得る。

## 【0 0 0 4】

無病状態において、G L P - 1 は、経口的に摂取された栄養（特に糖）に応答して腸L細胞から分泌されるものであって、それにより食事で誘発されるインスリンの膵臓からの放出が刺激され、肝臓からのグルカゴン放出ならびに胃腸管および脳への他の作用が抑制される。膵臓におけるG L P - 1 の作用はグルコース依存性であり、それにより外因性のペプチド投与中の低血糖症のリスクが最小化される。G L P - 1 はまた、インスリン生合成におけるすべてのステップを促進し、直接的に、細胞の成長、生存ならびに分化を刺激する。これらの作用が組み合わされることにより、細胞集団が増殖する。さらに、G L P - 1 受容体のシグナル伝達は 細胞のアポトーシスを減少させ、それはさらに 細胞集団の増殖に寄与する。

30

## 【0 0 0 5】

胃腸管において、G L P - 1 は、胃腸運動を抑制し、グルコースに応答してインスリンの分泌を増加させ、グルカゴンの分泌を減少させ、これによりグルコース可動域 (glucose excursion) の低下に寄与するものである。G L P - 1 の中枢投与により齧歯類の食物摂取が抑制されることが示されており、このことは、末梢で放出されたG L P - 1 が脳に直接影響し得ることを示唆している。循環するG L P - 1 が特定の脳領域（すなわち、脳弓下器官および最後野）内のG L P - 1 受容体に接近し得ることが示されているので、このことはもっともらしい。脳のこれらの領域は、食欲調節およびエネルギー恒常性に関与することが知られている。興味深いことには、胃膨満は、孤束の尾状核内のG L P - 1 を含むニューロンを活性化するが、このことから、食欲抑制剤として中枢で発現するG L P - 1 の役割が予測される。これらの仮説は、G L P - 1 受容体拮抗薬（逆効果が認められたエキセンジン（9-39））を使用した研究により支持されている。ヒトにおいては、

40

50

投与された G L P - 1 には満腹効果があり (Verdichら、2001) 、6 週間の投与計画にわたって連続皮下注入による投与を行った際に糖尿病患者は食欲減退を示し、これにより体重は有意に減少した (Zanderら、2002)。

#### 【 0 0 0 6 】

G L P - 1 はまた、2 型糖尿病患者に効果があることも示されており、連続静脈内注入として投与された際に、インスリン分泌を増加させ、空腹時血糖および食後血糖の両方を正常化した (Nauckら、1993)。さらに、G L P - 1 の注入は、すでに非インスリン経口薬が投与された患者や、スルフォニル尿素薬による治療が無効だった後にインスリン治療を必要とする患者において、グルコース濃度を低下させた (Nauckら、1993)。しかしながら、当技術分野で示され、かつ本明細書において下記にて考察されているように、G L P - 1 の単回皮下注射の効果が提供した結果は期待外れのものだった。高い血漿中免疫反応性 G L P - 1 濃度が達成されたにもかかわらず、インスリン分泌はすぐに投与前値に戻り、血糖濃度は正常化されなかった (Nauckら、1996)。空腹時血糖に対する効果は、反復皮下投与を実施した場合のみ静脈内投与と同等だった (Nauckら、1996)。6 週間の連続皮下投与で、空腹時グルコース濃度および食後グルコース濃度が低下し、H b A 1 c 濃度が低下することが明らかとなった (Zanderら、2002)。G L P - 1 の単回皮下注射の有効性が短かったのは、その循環の不安定性と関連があった。G L P - 1 はインビトロにおいて血漿によって代謝し、ジペプチジルペプチダーゼ I V (D P P - I V) という酵素がこの分解の原因だったことがわかった (Mentleinら、1993)。

#### 【 0 0 0 7 】

糖尿病における G L P - 1 の生理学的な重要性や、外因性の G L P - 1 が健康な被験者および 2 型糖尿病の被験者の両方において速やかにアミノ末端で分解することが示されたことに伴って、多くの研究において、糖尿病の治療のための抗糖尿病薬に対する新しい取り組みとして、インビボにおける G L P - 1 の安定性を操作する可能性について注力されてきた (Deaconら、2004)。2 つの別々の取り組みとして 1 ) 酵素的分解に感受性がない G L P - 1 の類似体の開発と、2 ) インビボにおける分解を阻止し、かつ完全な状態にある生物学的に活性なペプチドの濃度を高めるための選択的酵素阻害剤の使用が進められてきた。長時間作用型 G L P - 1 類似体 (例えば Liraglutide (Novo Nordisk、デンマーク、コペンハーゲン) ; 分解に抵抗性を有し、「インクレチン模倣体」と呼ばれるエクセナチド (エキセンジン - 4 ; Byetta (登録商標)) (Amylin Inc.、米国カリフォルニア州サンディエゴ) および (エクセナチド - L A R、Eli Lilly、米国インディアナ州インディアナポリス) は、臨床試験で研究してきた。インクレチンの分解の原因となる酵素を阻害するジペプチジルペプチダーゼ I V 阻害剤 (例えば、Novartis (スイス、バーゼル) により開発された Vildagliptin (Galvus) や Merck (米国ニュージャージー州ホワイトハウスステーション) により開発された Januvia (シタグリブチン) ) もまた、研究中である (Deaconら、2004)。したがって、G L P - 1 の複数の作用機序 (例えば、インスリン放出増大や、胃排出遅延、満腹感増大) は、低血糖症のその低傾向と共に、現在利用可能な治療よりも優れた特徴を与えるものと思われる。

#### 【 0 0 0 8 】

しかしながら、G L P - 1 による治療におけるこれらの取り組み / 進歩にもかかわらず、すべての患者における治療標的 (H b A 1 c、空腹時血糖、グルコース可動域) に達することができる、糖尿病に現在利用し得る薬物は存在せず、また、毒性や、低血糖症、体重増加、恶心、嘔吐によるストレス等の副作用のない薬物も存在しない。それ故、医薬品として投与される場合に長期有効性と最適な吸収性とを有する安定した G L P - 1 製剤が当技術分野で必要とされている。

#### 【 0 0 0 9 】

##### 発明の要旨

医薬品として使用するための安定した、吸入可能なグルカゴン様ペプチド 1 (G L P - 1) 製剤が当技術分野には不足している。当技術分野における不足を解決するために、本発明は、医薬品としてジケトピペラジン (D K P) 粒子と組み合わせた G L P - 1 の製剤

10

20

30

40

50

を提供するものである。

【0010】

それ故、本発明の特定の態様においては、GLP-1分子およびジケトピペラジンまたはその医薬的に許容し得る塩を含む乾燥粉末組成物が提供される。さらなる態様においては、本発明の乾燥粉末組成物は、天然のGLP-1、GLP-1代謝産物、GLP-1類似体、GLP-1誘導体、ジペプチジルペプチダーゼIV(DPP-IV)保護GLP-1、GLP-1模倣体、エキセンジン、GLP-1ペプチド類似体または生合成GLP-1類似体からなる群から選択されるGLP-1分子を含む。本発明のさらなる一態様においては、乾燥粉末組成物は、化学式：2,5-ジケト-3,6-ジ(4-X-アミノブチル)ピペラジンを有するジケトピペラジンを含み、式中Xは、スクシニル、グルタリル、マレイルおよびフマリルからなる群から選択される。別の一態様においては、乾燥粉末組成物はジケトピペラジン塩を含む。本発明のさらなる別の態様においては、ジケトピペラジンが2,5-ジケト-3,6-ジ(4-フマリル-アミノブチル)ピペラジンである乾燥粉末組成物が提供される。

【0011】

本発明は、GLP-1分子が天然のGLP-1またはアミド化されたGLP-1分子であり、ここでアミド化されたGLP-1分子がGLP-1(7-36)アミドである、乾燥粉末組成物をさらに意図するものである。

【0012】

本発明のさらなる別の特定の一態様においては、GLP-1分子を含むGLP-1溶液を提供するステップ；粒子形成ジケトピペラジンの溶液またはジケトピペラジンの粒子の懸濁液を提供するステップ；および該GLP-1溶液を該ジケトピペラジンの溶液または懸濁液と混合するステップ、を含む、GLP-1分子およびジケトピペラジンを含む粒子を調製する方法が提供される。本発明の他の特定の一態様においては、凍結乾燥、濾過または噴霧乾燥によって溶液または懸濁液から溶媒を除去することをさらに含む、GLP-1分子およびジケトピペラジンを含む粒子を調製する方法が提供される。さらなる一態様において、本発明の粒子は、溶媒を除去することによって形成されるか、もしくは溶媒を除去する前に形成される。

【0013】

本発明の一態様においては、GLP-1分子およびジケトピペラジンを有する粒子を調製する方法において、天然のGLP-1、GLP-1類似体、GLP-1誘導体、ジペプチジルペプチダーゼIV(DPP-IV)保護GLP-1、GLP-1模倣体、エキセンジン、GLP-1ペプチド類似体または生合成GLP-1類似体からなる群から選択されるGLP-1分子が提供される。別の一態様においては、GLP-1分子およびジケトピペラジンを有する粒子を調製する方法は、粒子の懸濁液として提供されるジケトピペラジンを含む。さらなる一態様においては、該ジケトピペラジンは溶液の形態で提供され、かつ該方法は、該ジケトピペラジンを析出して粒子を形成するために、該溶液のpHを調整することを含む。

【0014】

本発明の他の特定の態様においては、GLP-1溶液は、約1μg/mL～50mg/mL、より好ましくは約0.1mg/mL～10mg/mLの濃度を有する。本発明のさらに別の特定の一態様においては、GLP-1溶液は、約0.25mg/mLの濃度を有する。

【0015】

GLP-1分子およびジケトピペラジンを含む粒子を調製する別 の方法においては、該方法は該溶液に作用剤を添加することをさらに含み、ここで該作用剤は、塩、界面活性剤、イオン、オスモライト、カオトロープおよびリオトロープ(Iyotrope)、酸、塩基ならびに有機溶媒から選択される。該作用剤は、GLP-1とジケトピペラジン粒子との間の会合を促進し、かつGLP-1分子の安定性および/または薬効も改善する。本発明のいくつかの態様においては、該作用剤は、限定されるものではないが、塩化ナトリウム等の

塩である。また、該作用剤は、限定されるものではないが、Tweenや、Triton、プルロニック酸(pluronic acid)、CHAPS、セトリミド、Brij、H(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>SO<sub>4</sub>Na等の界面活性剤であり得ると考えられる。該作用剤は、イオン(例えばカチオンやアニオン)であり得る。該作用剤は、限定されるものではないが、ヘキシレンギリコール(Hex-Gly)や、トレハロース、グリシン、ポリエチレンギリコール(PEG)、トリメチルアミンN-オキシド(TMAO)、マンニトール、プロリン等のオスモライト(安定剤)であり得る。該作用剤は、限定されるものではないが、塩化セシウムや、クエン酸ナトリウム、硫酸ナトリウム等のカオトロープまたはリオトロープであり得る。該作用剤は、有機溶媒、例えば、メタノール(MeOH)、エタノール(EtOH)、トリフルオロエタノール(TFE)およびヘキサフルオロイソプロパノール(HFIP)から選択されるアルコールであり得る。  
10

【0016】

本発明の別の特定の一態様においては、GLP-1分子およびジケトピペラジンを含む粒子を調製する方法が意図され、ここで該方法は、粒子懸濁液のpHを約4以上に調整することを含む。本発明のさらなる態様においては、粒子を調製する方法はGLP-1分子およびジケトピペラジンを含み、ここで粒子内のGLP-1分子は、より大きな安定性を有する。

【0017】

さらに、本発明が意図するものは、GLP-1/ジケトピペラジン粒子を被験体に提供することを含む、有効量のGLP-1分子を、それを必要とする被験体に投与する方法である。該投与方法は、静脈内、皮下、経口、経鼻、口腔内、直腸内によるか、または肺内送達によるものであってもよいが、これらに限定されるものではない。一態様においては、投与方法は、肺内送達によるものである。本発明のさらに別のー態様においては、該投与方法は、糖尿病、虚血、再灌流組織損傷、異脂肪血症、糖尿病性心筋症、心筋梗塞、急性冠動脈症候群、肥満、術後の異化的变化、高血糖、過敏性腸症候群、卒中発作、神経変性障害、記憶障害および学習障害からなる群から選択される症状または疾患の治療、膵島細胞移植および再生治療を含む。  
20

【0018】

本発明の別のー態様においては、GLP-1/ジケトピペラジン粒子組成物の投与方法は、GLP-1の薬物動力学的半減期および生物学的利用能の改善をもたらす。  
30

【0019】

本発明のさらなる特定の一態様においては、GLP-1分子の溶液を提供するステップ；粒子形成ジケトピペラジンを提供するステップ；粒子を形成するステップ；およびGLP-1とジケトピペラジンとを混合するステップ；およびその後、乾燥粉末を得るために乾燥によって溶媒を除去するステップ、を含む薬物動態プロファイルが改善した乾燥粉末組成物を調製する方法が提供され、ここで該乾燥粉末は、改善された薬物動態プロファイルを有する。該改善された薬物動態プロファイルは、GLP-1のより高い半減期および/またはGLP-1の改善された生物学的利用能を含む。該GLP-1のより高い半減期は、7.5分以上である。  
40

【0020】

本発明の一態様においては、GLP-1分子およびジケトピペラジンまたはその医薬的に許容し得る塩を含む乾燥粉末組成物が提供される。別のー態様においては、GLP-1分子は、天然のGLP-1、GLP-1代謝産物、GLP-1類似体、GLP-1誘導体、ジペプチジルペプチダーゼIV(DPP-IV)保護GLP-1、GLP-1模倣体、GLP-1ペプチド類似体または合成GLP-1類似体からなる群から選択される。

【0021】

本発明の一態様においては、該ジケトピペラジンは、式：2,5-ジケト-3,6-ジ(4-X-アミノブチル)ピペラジンを有するジケトピペラジンであって、式中Xは、スクシニル、グルタリル、マレイルおよびフマリルからなる群から選択される。別のー態様においては、該ジケトピペラジンはジケトピペラジン塩である。別のー態様においては、  
50

該ジケトピペラジンは、2,5-ジケト-3,6-ジ(4-フマリルアミノブチル)ピペラジンである。

【0022】

本発明の一態様においては、該GLP-1分子は、天然のGLP-1である。別の一態様においては、該GLP-1分子は、アミド化されたGLP-1分子である。別の一態様においては、該アミド化されたGLP-1分子は、GLP-1(7-36)アミドである。

【0023】

本発明の一態様においては、GLP-1分子を提供するステップ；粒子形成ジケトピペラジン、ジケトピペラジン粒子およびそれらの組み合わせから選択される形態のジケトピペラジンを提供するステップ；および共通の溶液の形態で該GLP-1分子および該ジケトピペラジンを混合するステップ、を含み、該GLP-1分子および該ジケトピペラジンを含む粒子が形成される、GLP-1分子およびジケトピペラジンを含む粒子を形成する方法が提供される。

【0024】

本発明の一態様においては、該方法は、凍結乾燥、濾過または噴霧乾燥によって前記共通の溶液から溶媒を除去することをさらに含む。別の一態様においては、GLP-1分子およびジケトピペラジンを含む該粒子は、該溶媒を除去することによって形成される。別の一態様においては、該GLP-1分子および該ジケトピペラジンを含む該粒子は、該溶媒を除去する前に形成される。

【0025】

別の一態様においては、該GLP-1分子は、天然のGLP-1、GLP-1類似体、GLP-1誘導体、ジペプチジルペプチダーゼIV(DPP-IV)保護GLP-1、GLP-1模倣体、GLP-1ペプチド類似体または合成GLP-1類似体からなる群から選択される。別の一態様においては、該GLP-1分子は、約1μg/mL～50mg/mLの濃度のGLP-1を含む溶液の形態で提供される。別の一態様においては、該GLP-1分子は、約0.1mg/mL～10mg/mLの濃度のGLP-1を含む溶液の形態で提供される。別の一態様においては、該GLP-1分子は、約0.25mg/mLの濃度のGLP-1を含む溶液の形態で提供される。

【0026】

本発明の別の一態様においては、該ジケトピペラジンは、ジケトピペラジン粒子の懸濁液の形態で提供される。別の一態様においては、該ジケトピペラジンは、粒子形成ジケトピペラジンを含む溶液の形態で提供され、該方法は、ジケトピペラジン粒子を形成するために該溶液のpHを調整することを更に含む。別の一態様においては、該方法は、前記溶液または懸濁液に作用剤を添加することを更に含み、ここで該作用剤は、塩、界面活性剤、イオン、オスモライト、カオトロープおよびリオトロープ、酸、塩基ならびに有機溶媒からなる群から選択される。別の一態様においては、該作用剤は、該GLP-1分子と該ジケトピペラジン粒子または該粒子形成ジケトピペラジンとの間の会合を促進する。別の一態様においては、該作用剤は、該GLP-1分子の安定性または薬効を改善する。別の一態様においては、該作用剤は塩化ナトリウムである。

【0027】

本発明の別の一態様においては、該方法は、該懸濁液または溶液のpHを調整することを更に含む。別の一態様においては、該pHは約4.0以上に調整される。さらに別の一態様においては、該粒子内の該GLP-1分子は、天然のGLP-1より大きな安定性を有する。

【0028】

別の一態様においては、該共通の溶液は、約1μg/mL～50mg/mLの濃度のGLP-1を含む。別の一態様においては、該共通の溶液は、約0.1mg/mL～10mg/mLの濃度のGLP-1を含む。別の一態様においては、該共通の溶液は、約0.25mg/mLの濃度のGLP-1を含む。

10

20

30

40

50

## 【0029】

本発明のさらなる別の一態様においては、該方法は、該共通の溶液に作用剤を添加することを更に含み、ここで該作用剤は、塩、界面活性剤、イオン、オスモライト、カオトロープおよびリオトロープ、酸、塩基ならびに有機溶媒からなる群から選択される。別の一態様においては、該作用剤は、該G L P - 1分子と該ジケトピペラジン粒子または該粒子形成ジケトピペラジンとの間の会合を促進する。別の一態様においては、該作用剤は、該G L P - 1分子の安定性または薬効を改善する。別の一態様においては、該作用剤は塩化ナトリウムである。

## 【0030】

別の一態様においては、該方法は、該共通の溶液のp Hを調整することを更に含む。別の一態様においては、該p Hは約4.0以上に調整される。

10

## 【0031】

本発明の別の一態様においては、有効量のG L P - 1分子を、それを必要とする被験体に投与する方法であって、G L P - 1およびジケトピペラジンを含む粒子を該被験体に提供することを含む方法が提供される。別の一態様においては、該提供は、静脈内、皮下、経口、経鼻、口腔内、直腸内によるか、または肺内送達により行われる。別の一態様においては、該提供は肺内送達により行われる。

## 【0032】

別の一態様においては、該必要の対象は、糖尿病、虚血、再灌流組織損傷、異脂肪血症、糖尿病性心筋症、心筋梗塞、急性冠動脈症候群、肥満、術後の異化的変化、高血糖、過敏性大腸症候群、卒中発作、神経変性障害、記憶障害および学習障害からなる群から選択される症状または疾患の治療、臍島細胞移植および再生治療を含む。

20

## 【0033】

別の一態様においては、該粒子の該提供は、天然のG L P - 1よりもG L P - 1の薬物動力学的半減期および生物学的利用能の改善をもたらす。

## 【0034】

本発明の一態様においては、G L P - 1分子を提供するステップ；粒子形成ジケトピペラジンを溶液の形態で提供するステップ；ジケトピペラジン粒子を形成するステップ；共通の溶液を形成するために該G L P - 1分子と該溶液とを混合するステップ；およびG L P - 1薬物動態プロファイルが改善した粉剤を形成するために、噴霧乾燥により該共通の溶液から溶媒を除去するステップ、を含む、G L P - 1薬物動態プロファイルが改善した粉末組成物を形成する方法が提供される。

30

## 【0035】

別の一態様においては、該改善されたG L P - 1薬物動態プロファイルは、より高いG L P - 1半減期を含む。別の一態様においては、該より高いG L P - 1半減期は7.5分以上である。別の一態様においては、該改善されたG L P - 1薬物動態プロファイルは、天然のG L P - 1よりも改善されたG L P - 1の生物学的利用能を含む。

## 【0036】

## 図面の簡単な説明

添付の図面は本明細書の一部を構成するものであり、本発明の特定の側面をさらに示すために含まれるものである。本発明は、本明細書において示される特定の態様の詳細な説明と共に、これらの図面の1つ以上を参照することで、よりよく理解することができる。

40

## 【0037】

図1A～1D。各種濃度(p H 4、20)におけるG L P - 1の構造解析。図1A：G L P - 1の遠紫外円偏光二色性(CD)は、濃度が増加するにつれて、ペプチドの2次構造が、大部分が構造化されていない立体配座からヘリカル構造に変化することを示す。図1B：近紫外CDは、ペプチドの濃度の増加と共に3次構造が増大することを示し、それはG L P - 1が自己会合することを示唆している。図1C：280 nmでのトリプトファンの励起により生じる各種濃度(p H 4、20)のG L P - 1の蛍光放射。図1D：各種濃度(p H 4、20)におけるG L P - 1の透過型FTIR。1656 cm<sup>-1</sup>に

50

おけるアミド I バンドは、 G L P - 1 が、 2 m g / m L 以上の濃度で - ヘリックス構造を有することを示す。

【 0 0 3 8 】

図 2 A ~ 2 D。各種イオン強度 (p H 4, 2 0 ) における低濃度 G L P - 1 の構造解析。図 2 A : 1 . 0 m g / m L の G L P - 1 の遠紫外 C D は、塩の濃度が増加すると、 G L P - 1 の不規則構造がより規則的な - ヘリックス構造に変わることを示している。図 2 B : 1 . 0 m g / m L のペプチドの近紫外 C D は、 N a C 1 濃度の増大によっても G L P - 1 の 3 次構造が増大することを示す。図 2 C : 2 8 0 n m でのトリプトファンの励起後の各種の N a C 1 濃度 (p H 4, 2 0 ) における 1 . 0 m g / m L の G L P - 1 の内部蛍光放射。高ペプチド濃度で、強度の極大値が減少し、より短い波長へとシフトしており、このことは明確な 3 次構造を示す。図 2 D : 各種イオン強度 (p H 4, 2 0 ) での 1 0 m g / m L の G L P - 1 の 3 次構造解析。近紫外 C D スペクトルは、イオン強度の増大により、自己会合した G L P - 1 の 3 次構造が増大することを示す。

【 0 0 3 9 】

図 3 A ~ 3 B。各種温度 (p H 4) における 1 0 m g / m L の G L P - 1 の構造解析。図 3 A : 近紫外 C D は、温度の上昇と共に G L P - 1 オリゴマーが分離することを示している。図 3 B : 各種温度 (p H 4) における 1 0 m g / m L の G L P - 1 の構造解析。図 3 C : 各種温度 (p H 4) における 0 . 0 5 m g / m L の G L P - 1 の構造解析。遠紫外 C D は、ペプチドが温度に非感受性であることを示している。

【 0 0 4 0 】

図 4 A ~ 4 B。各種 p H (2 0 ) での G L P - 1 の構造解析。図 4 A : 各種 p H (2 0 ) での 1 0 m g / m L の G L P - 1 の遠紫外 C D。p H が増加するにつれて、自己会合した G L P - 1 が p H 6 . 3 ~ 7 . 6 の間で析出するが、 p H 1 . 5 および 1 1 . 7 においては、ヘリックス構造が維持される。図 4 B : p H 7 . 6 におけるスペクトルの増大により、濃度の低下の結果として G L P - 1 の 2 次構造が不規則になることが明らかにされる。

【 0 0 4 1 】

図 5。H P L C によって示されるアミド分解および酸化に対する 1 m g / m L の G L P - 1 の耐性。アミド分解の条件は、 4 0 で 5 日間の p H 1 0 . 5 で G L P - 1 をインキュベートすることによって達成された。酸化の条件は、室温で 2 時間、 0 . 1 % H 2 O 2 中で G L P - 1 をインキュベートすることによって達成された。

【 0 0 4 2 】

図 6 A ~ 6 B。1 . 5 および 9 . 4 m g / m L の G L P - 1 (p H 4) の 3 次構造における攪拌の効果。近紫外 C D (図 6 A) および G L P - 1 の蛍光放射 (図 6 B) は、両方とも、 G L P - 1 ペプチドの 3 次構造が、攪拌のためには有意に変化しないことを示している。室温で 3 0 分間および 9 0 分間試料を攪拌し、 2 8 0 n m でのトリプトファンの励起後に蛍光放射スペクトルを収集した。

【 0 0 4 3 】

図 7 A ~ 7 C。1 . 6 、 5 . 1 および 8 . 4 m g / m L の G L P - 1 (p H 4) の 3 次構造に対する 1 0 回の凍結融解サイクルの効果。近紫外 C D (図 7 A) および G L P - 1 の蛍光放射 (図 7 B) は、両方とも、ペプチドの 3 次構造が、複数の凍結融解サイクルにより顕著に変化しないことを示す。試料を - 2 0 で凍結し、室温で解凍した。 2 8 0 n m でのトリプトファンの励起後に蛍光放射スペクトルを収集した。遠紫外 C D による 1 0 m g / m L の G L P - 1 (p H 4) の 2 次構造に対する 1 1 回の凍結融解サイクルの効果を示す同様の実験を実施した (図 7 C)。

【 0 0 4 4 】

図 8 A ~ 8 B。塩の試験。p H および N a C 1 濃度の関数としての G L P - 1 / F D K P についての負荷曲線 (図 8 A)。負荷は、 5 m g / m L の F D K P および 0 . 2 5 m g / m L の G L P - 1 で行った。 N a C 1 濃度は、 m M で表した。図 8 B : p H および N a C 1 濃度の関数としての、再組成された、 F D K P を含まない対照試料において検出され

10

20

30

40

50

た G L P - 1 の量を表す。

【 0 0 4 5 】

図 9 A ~ 9 B。界面活性剤の試験。p H および界面活性剤の関数としての G L P - 1 / F D K P についての負荷曲線（図 9 A）。負荷は、5 mg / mL の F D K P および 0.25 mg / mL の G L P - 1 で行った。図 9 B : p H および添加された界面活性剤の関数としての、再組成された F D K P を含まない対照試料において検出された G L P - 1 の量を表す。

【 0 0 4 6 】

図 10 A ~ 10 D。イオンの試験。p H およびイオンの関数としての G L P - 1 / F D K P についての負荷曲線。負荷は、5 mg / mL の F D K P および 0.25 mg / mL の G L P - 1 で行った（図 10 A および 11 C）。イオン濃度は、凡例にて示す（m M）。右側の曲線は、1 M の NaCl についての結果を表す。図 10 B および 10 D : p H 、イオンおよび 1 M の NaCl の関数としての、再組成された、F D K P を含まない対照試料において検出された G L P - 1 の量を表す。

【 0 0 4 7 】

図 11 ~ 11 B。オスモライトの試験。一般の安定剤の存在下での p H の関数としての G L P - 1 / F D K P についての負荷曲線（オスモライト；図 11 A）。負荷は、5 mg / mL の F D K P および 0.25 mg / mL の G L P - 1 で行った。図 11 B : p H およびオスモライトの関数としての、再組成された、F D K P を含まない対照試料において検出された G L P - 1 の量を表す。「N / A」は、オスモライトが試料中に存在しなかったことを示す。

【 0 0 4 8 】

図 12 A ~ 12 B。カオトロープ / リオトロープの試験。p H 3.0（図 12 A）および p H 4.0（図 12 C）でのカオトロープまたはリオトロープの濃度の関数としての G L P - 1 / F D K P についての負荷曲線。負荷は、5 mg / mL の F D K P および 0.25 mg / mL の G L P - 1 で行った。図 12 B および 12 D : 各種のカオトロープまたはリオトロープの存在下における、p H の関数としての、再組成された、F D K P を含まない対照試料において検出された G L P - 1 の量を表す。「N / A」は、カオトロープまたはリオトロープが試料中に存在しなかったことを示す。

【 0 0 4 9 】

図 13 A ~ 13 B。アルコールの試験。p H およびアルコールの関数としての G L P - 1 / F D K P についての負荷曲線。負荷は、5 mg / mL の F D K P および 0.25 mg / mL の G L P - 1 で行った。4 種のアルコール濃度（各 5% v / v、10% v / v、15% v / v および 20% v / v のアルコール）について評価した（図 13 A）。T F E = トリフルオロエタノール；H F I P = ヘキサフルオロイソプロパノール。図 13 B : p H およびアルコール（20%）の関数としての、再組成された、F D K P を含まない対照試料について検出された G L P - 1 の量を表す。

【 0 0 5 0 】

図 14 A ~ 14 B。G L P - 1 / F D K P 濃度試験からの負荷（図 14 A）。負荷は 5 mg / mL の F D K P で行われ、解析された G L P - 1 濃度は X 軸に示される。図 14 B : 複数の G L P - 1 / F D K P 製剤の走査型電子顕微鏡（S E M）画像（10000 × の拡大倍率）は、球状および棒状の G L P - 1 / F D K P 粒子製剤のクラスターを表す。（パネル A）0.5 mg / mL の G L P - 1 および 2.5 mg / mL の F D K P；（パネル B）0.5 mg / mL の G L P - 1 および 10 mg / mL の F D K P；（パネル C）、p H 4.0 における 20 mM 塩化ナトリウム、20 mM 酢酸カリウムおよび 20 mM リン酸カリウム中の 0.5 mg / mL の G L P - 1 および 10 mg / mL の F D K P；および（パネル D）p H 4.0 における 20 mM 塩化ナトリウム、20 mM 酢酸カリウムおよび 20 mM リン酸カリウム中の 10 mg / mL の G L P - 1 および 50 mg / mL の F D K P。

【 0 0 5 1 】

10

20

30

40

50

図15。複数のG L P - 1 / F D K P 製剤に対するストレスの効果を表す。凡例は、凍結乾燥前の、F D K P 粒子に対するG L P - 1 の質量対質量のパーセンテージおよび溶液中に存在した他の成分を示す。試料は、40 で10日間インキュベートした。

【0052】

図16A～16C。G L P - 1 の構造。図16A：G L P - 1 のグリシル化形態（配列番号1）およびアミド化形態（配列番号2）を表す。図16B：アプロチニンによるD P P I V 活性の阻害。図16C：D P P I V 阻害剤によるD P P I V 活性の阻害。

【0053】

図17。肺洗浄液におけるインキュベーション後のG L P - 1 の検出。

【0054】

図18A～18B。血漿中のG L P - 1 の定量を表す。図18Aは、血漿の1：2の希釈率における定量を示す。図18Bは、血漿の1：10の希釈率における定量を示す。

【0055】

図19A～19B。細胞の生存に対するG L P - 1 およびG L P - 1 類似体の作用。ラット肺上皮（A R I P）の細胞死に対するG L P - 1 の作用（図19A）。単剤として、および併用でのG L P - 1 およびスタウロスボリン（S t a u）の存在下におけるアポトーシスの阻害を表すアネキシンV染色（図19B）。G L P - 1 の濃度は15nMであり、スタウロスボリンの濃度は1μMである。

【0056】

図20。細胞生存度に対する、G L P - 1 類似体であるエキセンジン-4の作用。A R I P 細胞には、16、24および48時間、0、10、20および40nMのエキセンジン4を投与した。

【0057】

図21。スタウロスボリン誘発性細胞死に対する複数のG L P - 1 / F D K P 製剤の作用。G L P - 1 試料が前もって投与されたA R I P 細胞を5μMのスタウロスボリンに4時間曝露し、Cell Titer-Glo（登録商標）により解析して細胞生存度を測定した。試料には、4 および40 で4週間ストレスを加えた。右側（培地、G L P - 1 、S T A U、G L P + S T A U）に示される対照試料は、培地中（G L P - 1 もスタウロスボリンも有さない）、G L P - 1 、スタウロスボリン、およびG L P - 1 とスタウロスボリンにおける細胞の生存度を示す（注：グラフの凡例は対照試料に適用しない）。示される結果のすべては、3組の反復試験の平均である。

【0058】

図22A～22B。各種濃度のG L P - 1 / F D K P 製剤を使用するラットにおける単回静脈内注射（I V；図22A）および肺内吸入（I S；図22B）を示す薬物動態学的試験。凡例は、解析される製剤についてのF D K P 粒子に対するG L P - 1 の質量対質量のパーセンテージを示す。

【0059】

図23A～23B。投与後2時間（図23A）および6時間（図23B）におけるG L P - 1 / F D K P 製剤を投与したラットの累積的摂食量の減少。

【0060】

図24。雄性肥満ズッカーラットにおける肺内吸入により投与されたG L P - 1 / F D K P の薬力学的試験。データは、対照（空気；群1）およびG L P - 1 / F D K P 投与（群2）について0、15、30、45、60および90分目のグルコース測定値を表す。

【0061】

図25。雄性肥満ズッカーラットにおける肺内吸入により投与されたG L P - 1 / F D K P の薬力学的試験。データは、対照（空気；群1）およびG L P - 1 / F D K P 投与（群2）についての0、15、30、45、60および90分目のG L P - 1 測定値を表す。

【0062】

図26。雄性肥満ズッカーラットにおける肺内吸入により投与されたG L P - 1 / F D

10

20

30

40

50

KPの薬力学的試験。データは、対照（空気；群1）およびGLP-1/FDKP投与（群2）についての0、15、30、45、60および90分目のインスリン測定値を表す。

【0063】

図27。雌性ラットにおける肺内吸入により投与された各種GLP-1濃度のGLP-1/FDKPの薬物動態学的試験。データは、対照（空気；群1）およびそれぞれ5%、10%および15%のGLP-1が投与されたGLP-1/FDKP投与群2、3および4についての0、2、5、10、20、30、40および60分目のGLP-1測定値を表す。

【0064】

図28。雌性ラットにおける肺内吸入により投与された各種GLP-1濃度のGLP-1/FDKPの薬物動態学的試験。データは、対照（空気；群1）およびそれぞれ5%、10%および15%のGLP-1が投与されたGLP-1/FDKP投与群2、3および4についての0、2、5、10、20、30、40および60分目のFDKP測定値を表す。

【0065】

図29。4日間連続で1日1回の肺内吸入により15%GLP-1（0.3mgのGLP-1）を含有するGLP-1/FDKPが投与された雌性ラット（n=10）におけるGLP-1/FDKPの薬力学的試験。データは、4日間連続で、投与前、投与の1時間後、2時間後、4時間後および6時間後に測定された平均摂食量を表す。

【0066】

図30。4日間連続で1日1回の肺内吸入により15%GLP-1（0.3mgのGLP-1）を含有するGLP-1/FDKPが投与された雌性ラット（n=10）におけるGLP-1/FDKPの薬力学的試験。データは、4日間連続で、投与前、投与の1時間後、2時間後、4時間後および6時間後に測定された平均体重を表す。

【0067】

図31。5日間連続で1日1回（1日につき30分間）経鼻・経口投与によりGLP-1/FDKPが投与されたサルにおけるGLP-1/FDKPの毒物動態学的試験。データは、雄および雌の血漿中GLP-1濃度のピーク値（C<sub>max</sub>）を表す。動物は、対照（空気；群1）、2mg/kgのFDKP（群2）あるいは0.3、1.0または2.0mg/kgのGLP-1/FDKP（それぞれ、群3、4および5）の投与を受けた。

【0068】

好ましい態様の詳細な説明

当技術分野において、医薬品に使用するための安定した吸入可能なグルカゴン様ペプチド1（GLP-1）製剤が不足している。これは、インビボにおけるGLP-1ペプチドの不安定性に起因する。GLP-1化合物は、多くの条件下で溶液中に残存する傾向があり、溶液製剤として投与される場合、比較的短いインビボ半減期を有する。さらに、各種体液（例えば肺液や血液）中に存在することが分かっているジペプチジルペプチダーゼIV（DPP-IV）は、GLP-1分子の生物学的半減期を大きく減少させる。例えば、GLP-1（7-37）の生物学的半減期は、3~5分であることが示されている（米国特許第5,118,666号を参照のこと）。GLP-1はまた、非経口投与後にインビボにおいて迅速に吸収されることが示されている。同様に、アミドGLP-1（7-36）は、皮下投与される場合、約50分の半減期を有する（やはり米国特許第5,118,666号を参照のこと）。

【0069】

当技術分野におけるGLP-1組成物の迅速な体内からの脱離および短い半減期といった欠点は、本発明により解決される。本発明は、特に肺内送達に適した、最適化された天然のGLP-1/FDKP（スマリルジケトペラジン）製剤を提供することによって、当技術分野における欠点を解決する。他の特定の態様においては、本発明は、インビボにおけるGLP-1応答を誘発し得る天然のGLP-1分子の製剤を提供するものである。

10

20

30

40

50

また、そのような製剤における天然の G L P - 1 の変異体の使用も意図される。

【 0 0 7 0 】

当技術分野における欠陥を解決するために、本発明は、ジケトピペラジン ( D K P ) 粒子と組み合わせた G L P - 1 の製剤を提供するものである。本発明の特定の一態様においては、 G L P - 1 / D K P 製剤は、被験体に対する投与のために提供される。さらなる特定の側面においては、 G L P - 1 / D K P 製剤は、フマリルジケトピペラジン ( F D K P ) を含むが、それに限定されず、他の D K P ( 非対称 D K P 、  $\times$  D K P ) ( 例えば、 2 , 5 - ジケト - 3 , 6 - ジ ( 4 - スクシニル - アミノブチル ) ピペラジン ( S D K P ) 、 D K P 環上の 1 つの位置のみが置換されたもの等の非対称ジケトピペラジン ( 例えば、 F D K P の「片腕」類似体 ) および D K P 塩を含むことができる。本発明の他の特定の態様においては、 G L P - 1 / F D K P 製剤の投与は、肺内送達により行われる。 10

【 0 0 7 1 】

G L P - 1 分子の治療用製剤の開発の際、溶液中の G L P - 1 の構造的特性は、遠紫外円偏光二色性 ( 遠紫外 C D ) や、近紫外円偏光二色性 ( 近紫外 C D ) 、内部蛍光、フーリエ変換赤外分光法 ( F T I R ) 、高速液体クロマトグラフィ ( H P L C ) 、質量分析 ( M S ) 等の各種の生物物理学的および解析的な手法を使用することによって評価された。円偏光二色性 ( C D ) の手法は、様々な実験条件下でタンパク質の構造変化を解析するためには、濃度、イオン強度、温度、 pH 、酸化ストレス、攪拌、および G L P - 1 ペプチドにおける複数の凍結融解サイクルの効果が含まれる。これらの解析は、望ましい薬物動態学的 ( P K ) 特性および薬力学的 ( P D ) 特性を有する好ましい G L P - 1 / D K P 製剤を達成するために、分解の主要な経路を明らかにするように、また G L P - 1 ペプチドの構造を操作する条件を確立するように設計した。 20

【 0 0 7 2 】

G L P - 1 の濃度が増加するにつれて、ペプチドの 2 次構造が、大部分が構造化されていない立体配座から、よりらせん状の立体配座にまで変化したことが認められた。溶液中のイオン強度の増加によって、 G L P - 1 の構造は、それが可逆的に沈殿するまで増大した。 N a C l の存在は、図 2 D に示すような近 C D バンドの強度の増大により明らかとなり、 G L P - 1 の 3 次構造を増大させる。このことは、自己会合の証拠がない低濃度のペプチドについても生じる。イオン強度の増大により、構造化されていない G L P - 1 は、 208 nm および 222 nm ( 図 2 A ) への遠 C D の極小値の移動によって表されるような  $\alpha$  - ヘリックスの形態と、図 2 B および 2 D における塩の増大および近 C D パターンを伴うより低波長へのトリプトファン発光の移動によって表されるような自己会合した立体配座とに容易に変わる。 G L P - 1 の不規則構造がこれらのパラメーターのどちらによつても変化しなかったという点では、温度および pH が G L P - 1 の立体配座に及ぼす影響は異なるものだった。一方で、 G L P - 1 の自己会合した立体配座は熱変性に対する感受性を有することが見出され、またその溶解度は、 10 mg / mL のペプチド濃度で pH 6 . 3 ~ 7 . 6 の間で G L P - 1 ペプチドが可逆的に析出することを示す図 4 A および 4 B において示されるように、 pH に対する感受性を有することが見出された。 G L P - 1 の各種立体配座は、攪拌および複数の凍結融解サイクルに対して一般的に安定していることが見出された。アミド分解も酸化も、 G L P - 1 については認められなかった。 40

【 0 0 7 3 】

また、 F D K P 粒子への G L P - 1 の吸着も種々の条件下で認められたが、その条件には、 pH の変化、 G L P - 1 濃度の変化、ならびに各種の界面活性剤、塩、イオン、カオトロープおよびリオトロープ、安定剤およびアルコールの濃度の変化が含まれていた。 F D K P 粒子への G L P - 1 の吸収は、 pH に強い影響を受けることが見出され、具体的には、 pH 4 . 0 以上で生じる結合に強い影響を受けることが見出された。他の賦形剤による F D K P 粒子への G L P - 1 の吸収に与える影響は、限定的であることが見出された。

【 0 0 7 4 】

本発明の G L P - 1 / D K P 製剤の開発の際、インビボにおけるその送達性および吸収

性に作用および影響を及ぼすと考えられた多くのパラメーターが評価された。そのようなパラメーターとしては、例えば、G L P - 1ペプチドの構造、特定の製剤条件下における分子の表面電荷、製剤としての溶解度および安定性、ならびにセリンプロテアーゼ分解に対する感受性、インビボでの安定性が含まれていたが、それらのすべては、容易に吸収され得る製剤の調製に重要な役割を担うものであり、その製剤は、生物学的半減期の延長を示す。

【 0 0 7 5 】

得られたG L P - 1 / F D K P 製剤の安定性は、インビトロおよびインビボの両方における種々の条件下でテストされた。G L P - 1 の安定性は、H P L C 解析および細胞に基づくアッセイによって解析された。さらに、G L P - 1 の安定性は、肺洗浄液 (D P P - I V を含む) で試験された。また、天然のG L P - 1 の安定性は、溶液中の濃度に依存する10ことが見出された。

【 0 0 7 6 】

また、インビトロにおけるG L P - 1 の生物学的活性の試験は、G L P - 1 / F D K P 負荷の試験に用いられ、インビボにおける影響の測定にも用いられた。この戦略は、主要なG L P - 1 / F D K P 製剤方法のさらなる同定に寄与するものだった。さらに、G L P - 1 が、アポトーシスの阻害 ( 細胞増殖および臍島新生の刺激 ) により 細胞集団の増殖に役割を果たすことが示されたという事実に基づき、本発明のG L P - 1 / F D K P 製剤の増殖可能性および抗アポトーシスの可能性が、細胞に基づくアッセイにより検討された。20

【 0 0 7 7 】

従って、本発明は、分解に対して安定的で且つ抵抗性があるフマリルジケトピペラジン ( F D K P ) と組み合わせた天然のヒトG L P - 1 を含む最適化された製剤を提供するものである。

【 0 0 7 8 】

I I . G L P - 1 分子

本発明の特定の態様においては、フマリルジケトピペラジン ( F D K P ) 等のジケトピペラジンと組み合わせた天然のヒトグルカゴン様ペプチド 1 ( G L P - 1 ) を含む最適化された製剤が提供される。本発明のそのようなG L P - 1 / F D K P 製剤は、分解に対して安定的で且つ抵抗性がある。30

【 0 0 7 9 】

ヒトG L P - 1 は、当技術分野でよく知られており、回腸末端部、臍臓および脳において、L 細胞内で合成されるプレプログルカゴンポリペプチドから生じるものである。G L P - 1 は、2 つの分子形態、7 - 3 6 および7 - 3 7 ( 7 - 3 6 形態が主要 ) 、で存在する3 0 ~ 3 1 個のアミノ酸からなるペプチドである。G L P - 1 ( 7 - 3 6 ) アミドおよびG L P - 1 ( 7 - 3 7 ) 伸長形態へのプレプログルカゴンのプロセッシングは、主にL 細胞内で生じる。空腹時の血漿中G L P - 1 濃度は約4 0 p g / m L であることが当技術分野において示されている。食事後、血漿中G L P - 1 濃度は、約5 0 ~ 1 6 5 p g / m L に急激に増加する。

【 0 0 8 0 】

本明細書で使用される「G L P - 1 分子」という用語は、G L P - 1 タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、類似体、模倣体、誘導体、アイソフォーム、断片等を意味する。そのようなG L P - 1 分子としては、天然に生じるG L P - 1 ポリペプチド ( G L P - 1 ( 7 - 3 7 ) O H 、 G L P - 1 ( 7 - 3 6 ) N H <sub>2</sub> ) やG L P - 1 代謝産物 ( 例えばG L P - 1 ( 9 - 3 7 ) ) を挙げることができる。従って、本発明の特定の態様においては、G L P - 1 分子としては：天然のG L P - 1 、G L P - 1 類似体、G L P - 1 誘導体、ジペプチジルペプチダーゼ I V ( D P P - I V ) 保護G L P - 1 、G L P - 1 模倣体、G L P - 1 ペプチド類似体または合成G L P - 1 類似体が挙げられる。

【 0 0 8 1 】

本明細書で使用される「類似体」は、別の化合物と構造的類似性を有する化合物を含む

10

20

30

40

50

。例えば、抗ウィルス性化合物であるアシクロビルは、ヌクレオシド類似体であって、塩基であるグアニンから誘導されるヌクレオシドであるグアノシンに構造的に類似している。従って、アシクロビルは、グアノシンに類似（生物学的に類似）しており、ウィルス核酸内のグアノシン残基を置換（またはそれと競合）することによってDNA合成に干渉し、翻訳／転写を阻止する。従って、親化合物の生物学的または化学的な活性に類似する別のもの（親化合物）に対する構造的類似性を有する化合物が類似体である。類似体が、親化合物の生物学的または化学的な性質と、何らかの関連した様式で、同一的、相補的または競合的のいずれかで類似し得るならば、化合物を類似体とみなすために必要とされる元素または官能基の置換の数の最小値および最大値は存在しない。類似体は、多くの場合、親化合物の誘導体であり得る（下記の「誘導体」を参照のこと）。本明細書において開示される化合物の類似体の活性は、それらの親化合物と等しいか、それより小さいか、もしくはより大きいものであり得る。

【0082】

本明細書で使用される「誘導体」は、親化合物から天然または合成的のいずれかで作られた（または誘導された）化合物である。誘導体は、類似体であり得（前述の「類似体」を参照のこと）、従って化学的または生物学的に類似した活性を有することができる。しかしながら、類似体とは異なり、誘導体は、必ずしも親化合物の生物学的または化学的な活性に類似する必要があるというわけではない。化合物を誘導体とみなすために必要とされる元素または官能基の置換の数の最小値および最大値は存在しない。例えば、抗ウィルス性化合物であるガンシクロビルがアシクロビルの誘導体であるが、ガンシクロビルは、アシクロビルとは異なる範囲の抗ウィルス活性および異なる毒性学的性質を有する。本明細書において開示される化合物の誘導体の活性は、それらの親化合物と比較した場合、等しくても、より小さくても、より大きくても、もしくは似かよってもいなくてもよい。

【0083】

本明細書で使用される「代謝産物」は、代謝の任意の中間体または産物であり、大分子および小分子の両方を含む。本明細書で使用され、且つ適切な場合、その定義は、1次代謝産物および2次代謝産物の両方に適用される。1次代謝産物は、生体系の正常な成長、発育および再生に直接関与する。2次代謝産物は、それらのプロセスに直接の関与はしないが、通常は重要な生態学的機能（例えば抗生物質）を有する。

【0084】

本明細書で使用される「生合成的（biosynthetic）」という用語は、生体系による化学化合物のいずれの産生をも意味する。

【0085】

本明細書で使用される「粒子形成（particle-forming）」は、通常は液状媒体中で、固体粒子を形成することが可能な化学的、生合成的または生物学的な構成要素または化合物を指す。粒子形成構成要素が特定の条件（例えば、pH、温度、水分および／または容量オスモル濃度／重量オスモル濃度の変化）に曝露される場合、粒子の形成が通常は生じる。その条件への曝露によって、粒子が形成されるように、例えば、結合、融合、凝固および／または脱水が生じ得る。析出反応は、粒子形成事象の一例である。

【0086】

本明細書で使用される「共通の溶液（co-solution）」は、少なくとも2種の化学的、生物学的および／または生合成的な構成要素を含む任意の培地である。例えば、共通の溶液は、少なくとも1種の化学的、生物学的および／または生合成的な構成要素を含む液体を、化学的、生物学的および／または生合成的な構成要素を含む固体と組み合わせることによって生成することができる。別の一例においては、共通の溶液は、少なくとも1種の化学的、生物学的および／または生合成的な構成要素を含む液体を、化学的、生物学的および／または生合成的な構成要素を含む別の液体と組み合わせることによって形成することができる。さらなる一例においては、共通の溶液は、それぞれ少なくとも1種の化学的、生物学的および／または生合成的な構成要素を含む少なくとも2種の固体を单一の溶液に添加することによって生成することができる。

10

20

30

40

50

## 【0087】

本発明において意図される天然のG L P - 1は、配列番号1または配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。天然のG L P - 1ペプチドは、インビボで数分以内に急激に切断および不活化される。

## 【0088】

本発明のG L P - 1類似体としては、エキセンジンを挙げることができる。エキセンジンはG L P - 1受容体アゴニストであることが見出されたペプチドであり、そのような類似体としては、さらにエキセンジン1～4を挙げることができる。エキセンジンは、アメリカドクトカゲの毒液中に見出され、哺乳類のG L P - 1と約53%のアミノ酸相同性を有する。エキセンジンはまた、G L P - 1受容体に同様の結合親和性を有する。エキセンジン-3およびエキセンジン-4は、膵腺房細胞内におけるcAMP産生および膵腺房細胞からのアミラーゼ放出を刺激することが報告されている (Malhotraら、1992; Raufmanら、1992; Singhら、1994)。糖尿病治療および高血糖予防のためのインスリン分泌促進剤としてエキセンジン-3およびエキセンジン-4を使用することが提案されている (米国特許第5,424,286号)。

## 【0089】

エキセンジン (例えばエキセンジン[9-39]) のカルボキシ末端断片、カルボキシアミド化された分子、および断片3-39～9-39が、効力のある選択的なG L P - 1拮抗体であることが報告されている (Gokeら、1993; Raufmanら、1991; Scheppら、1994; Montrose-Rafizadehら、1996)。文献はまた、エキセンジン[9-39]がインビボで内在性G L P - 1を遮断し、それによりインスリン分泌が低減することを示している (Wangら、1995; D'Alessioら、1996)。エキセンジン-4は、インスリン分泌-T C 1細胞上のG L P - 1受容体に、膵臓由来の分散した腺房細胞に、そして胃由来の壁細胞に強力に結合する。また、エキセンジン-4ペプチドは、摘出された胃におけるソマトスタチン放出を刺激し、且つガストリン放出を抑制する役割を果たす (Gokeら、1993; Scheppら、1994; Eisseleら、1994)。クローン化されたG L P - 1受容体によりトランスフェクトされた細胞において、エキセンジン-4は、報告によるとアゴニストであり、すなわち、それはcAMPを増加させるものであるが、一方でエキセンジン[9-39]は拮抗体として同定され、すなわち、それは、エキセンジン-4およびG L P - 1の刺激作用を遮断するものである。また、エキセンジンは、分解に対して抵抗性を有することが見出されている。

## 【0090】

別の一態様においては、本発明は、ペプチド模倣体の使用を意図するものである。ペプチド模倣体は、当業者に知られているように、ホルモン、サイトカイン、酵素基質、ウィルスまたは他の生体分子における活性決定因子を生物学的に模倣するペプチドであり、天然リガンドの生理活性を拮抗するか、刺激するか、さもなければ調節することが可能なものである。ペプチド模倣体は、特に薬物開発において有用である。例えば、Johnsonら、"Peptide Turn Mimetics" in BIOTECHNOLOGY AND PHARMACY, Pezzutoら、Eds., Chapman and Hall, New York (1993)を参照のこと。ペプチド模倣体の使用の背後で基礎をなす理論的根拠は、タンパク質のペプチド主鎖が、アミノ酸側鎖を、主に分子相互作用を容易にするように位置づけて存在するというものである。ペプチド模倣体は、天然の分子に類似した分子相互作用を可能にするものと考えられる。

## 【0091】

さらなる態様においては、本発明のG L P - 1分子は、天然のG L P - 1の少なくとも1つの生物学的活性 (例えば、G L P - 1受容体に結合する能力) を有し、インスリン分泌促進活性を生じさせるシグナル伝達経路を開始すると考えられる。本発明の別の態様においては、G L P - 1分子は、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、類似体、模倣体、誘導体、アイソフォーム、断片等であってもよく、天然由来のG L P - 1の少なくとも1つの生物学的活性を保持する。G L P - 1分子はまた、天然由来のヒトG L P - 1の医薬的に許容し得る塩、プロドラッグ、プロドラッグの塩、多形体、水和物、溶媒和物、生物

10

20

30

40

50

学的に活性な断片、生物学的に活性な変異体および立体異性体、ならびに天然由来のヒト G L P - 1 のアゴニスト、模倣体および拮抗体変異体、エキセンジン 1 ~ 4 等のエキセンジンのファミリー、およびそのポリペプチド融合物を含むことができる。本発明の G L P - 1 分子はまた、G L P - 1 の分解を阻止または抑制するジペプチジルペプチダーゼ I V (D P P - I V ) 保護 G L P - 1 を含むことができる。

【 0 0 9 2 】

本発明の G L P - 1 分子は、アミノ酸置換を含み、溶解度を改善し、抗酸化性を付与し、生物学的効力を増大させ、あるいは循環血液中の半減期を増加させるペプチド、ポリペプチド、タンパク質およびその誘導体を含む。したがって、本発明において検討される G L P - 1 分子は、アミノ酸置換、欠失または付加を含み、ここでアミノ酸は当技術分野でよく知られているものから選択される。分子の N 末端または C 末端は、例えばアシル化や、アセチル化、アミド化により修飾され得るが、それらに限定されるものではない。従つて、本発明においては、「アミノ酸」という用語は、天然のアミノ酸および非天然のアミノ酸ならびに天然のアミノ酸と同様の機能を果たすアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体を指す。天然にコードされたアミノ酸は、20種の一般的なアミノ酸（アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシンおよびバリン）、ピロリシンおよびセレノシステインである。アミノ酸類似体とは、天然のアミノ酸と同じ基本的化学構造（すなわち、水素、カルボキシル基、アミノ基および R 基に結合する - 炭素）を有する化合物（例えば、ホモセリン、ノルロイシン、ノルバリン、メチオニンスルホキシド、メチオニン・メチルスルホニウム、シトルリン、ヒドロキシグルタミン酸、ヒドロキシプロリン、プラリーヌ）を指す。そのような類似体は修飾された R 基（例えばノルロイシン）を有するが、天然のアミノ酸と同じ基本的化学構造を保持する。また、本発明において意図されるアミノ酸としては、アミノ末端とカルボキシル末端とを含むという点で - アミノ酸と類似している - アミノ酸が挙げられる。しかしながら、 - アミノ酸内においては、2個の炭素原子により、これらの官能基末端は分離される。特異的な側鎖を有する - アミノ酸は、（C2）炭素または（C3）炭素のいずれかにおいて R 異性体または S 異性体として存在することができる。これにより、いずれの所与の側鎖についても合計で4種のジアステレオ異性体が可能となる。

【 0 0 9 3 】

本発明の G L P - 1 分子はまた、ハイブリッド G L P - 1 タンパク質、融合タンパク質、オリゴマーおよびマルティマー、相同体、グリコシル化パターン変異体、およびその突然変異タンパク質を含むことができるが、ここで G L P - 1 分子は、天然の分子の少なくとも1種の生物学的活性を保持し、そしてさらには、それを合成または作製する方法（組換え方法（cDNA、ゲノムDNA、合成DNAまたは核酸の他の形態から作製されるにかかわらず）、合成方法および遺伝子活性化方法が挙げられるが、それらに限定されない）にかかわるものではない。組換えDNA技術は当業者によく知られている（Russell, D.W.ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001 参照）。

【 0 0 9 4 】

I I I . ジケトピペラジン

ジケトピペラジンは、薬物送達および安定化に有用な微小粒子を形成するその能力のためによく知られている。本発明において、ジケトピペラジンは、G L P - 1 分子の吸収を容易にし、それによって、分解に抵抗性のある安定した製剤を提供するために使用される。

【 0 0 9 5 】

各種方法を使用することができるが、ジケトピペラジンは、G L P - 1 分子を組み込む粒子、または G L P - 1 分子が吸着され得る粒子に形成することができる。これは、ジケトピペラジン溶液を G L P - 1 分子の溶液または懸濁液と混合し、その後ジケトピペラジ

10

20

30

40

50

ンおよびG L P - 1を含む粒子を析出し、次いで形成することを含む。或いは、ジケトピペラジンを析出させて粒子を形成し、その後G L P - 1分子の溶液と混合することもできる。ジケトピペラジン粒子とG L P - 1分子との間の会合は、溶剤除去により促進されるか、あるいは、その会合を促進するために、特定のステップ（例えばp H調整）を乾燥前に含めることもできる。

【0096】

好ましい一態様においては、本発明のジケトピペラジンとしては、3, 6-ジ(フマリル-4-アミノブチル)-2, 5-ジケトピペラジン、別名(E)-3, 6-ビス[4-(N-カルボキシル-2-プロペニル)アミドブチル]-2, 5-ジケトピペラジン（フマリルジケトピペラジンまたはFDKPとも呼ばれ得る）が挙げられるが、これに限定されるものではない。 10

【0097】

本発明において意図される他のジケトピペラジンとしては、3, 6-ジ(4-アミノブチル)-2, 5-ジケトピペラジンの誘導体（例えば、3, 6-ジ(スクシニル-4-アミノブチル)-2, 5-ジケトピペラジン（本明細書において3, 6-ビス(4-カルボキシプロピル)アミドブチル-2, 5-ジケトピペラジン；スクシニルジケトピペラジンまたはSDKPと呼ばれる）；3, 6-ジ(マレイル-4-アミノブチル)-2, 5-ジケトピペラジン；3, 6-ジ(シトラコニル-4-アミノブチル)-2, 5-ジケトピペラジン；3, 6-ジ(グルタリル-4-アミノブチル)-2, 5-ジケトピペラジン；3, 6-ジ(マロニル-4-アミノブチル)-2, 5-ジケトピペラジンおよびそれらの誘導体）が挙げられるが、これらに限定されるものではない。 20

【0098】

他の態様においては、本発明は、ジケトピペラジン塩の使用を意図するものである。そのような塩としては、例えば、任意の医薬的に許容し得る塩（例えば、ジケトピペラジンのNa塩、K塩、Li塩、Mg塩、Ca塩、アンモニウム塩、あるいはモノアルキルアンモニウム、ジアルキルアンモニウム、トリアルキルアンモニウム（トリエチルアミン、ブチルアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミンまたはピリジン類等から誘導されるもの）の塩）を挙げることができる。その塩は、モノ塩、ジ塩または混合塩であり得る。また、より高位の塩は、R基が2個以上の酸性基を含むジケトピペラジンについて意図される。本発明の他の側面においては、ジケトピペラジンの薬物塩を形成するために、剤の基本形態はジケトピペラジンと混合し得るものであり、その結果、薬物はジケトピペラジンの対カチオンとなる。本明細書において検討される塩の一例としては、それに限定されないが、FDKPジNaが挙げられる。DKP塩を使用する薬物送達は、米国特許出願第11/210,710号において教示され、その開示内容は、DKP塩に関してそれが含むすべてについて参照により本明細書に組み込まれる。 30

【0099】

本明細書の他の箇所で開示されるように、本発明はまた、FDKPの新規な非対称類似体((E)-3-(4-(3, 6-ジオキソピペラジン-2-イル)ブチルカルバモイル)-アクリル酸；(E)-3-(3-(3, 6-ジオキソピペラジン-2-イル)ブロピル-カルバモイル)アクリル酸；及び(E)-3-(4-(5-イソプロピル-3, 6-ジオキソピペラジン-2-イル)-ブチルカルバモイル)アクリル酸等のxDKP）を使用し、これは、本明細書と同じ日付で出願された" Asymmetrical FDKP Analogs for Use as Drug Delivery Agents"という名称の米国仮特許出願で開示されたものであり、その開示内容は、その全体が本明細書において組み込まれる（Atty Docket No. 51300-00041）。

。

【0100】

ジケトピペラジンは、Katchalskiら、(J. Amer. Chem. Soc. 68:879-80; 1946)に記載されるアミノ酸エステル誘導体の環状二量化、ジペプチドエステル誘導体の環化、またはKoppleら、(J. Org. Chem. 33:862-64; 1968)に記載される高沸点溶剤中のアミノ酸誘導 50

体の熱脱水反応によって形成することが可能であり、それらの教示内容は本明細書に組み込まれる。

#### 【0101】

ジケトピペラジンの合成および調製の方法は当業者によく知られており、米国特許第5,352,461号；同第5,503,852号；同第6,071,497号；同第6,331,318号；同第6,428,771号および米国特許出願第20060040953号に開示されている。米国特許第6,444,226号および同第6,652,885号には、活性薬剤を粒子に結合するために活性薬剤の溶液が添加される水性懸濁液の形態でのジケトピペラジンの微小粒子の調製および提供が記載されている。これらの特許には、活性薬剤を含む微小粒子を生じるための凍結乾燥により液体培地を除去する方法がさらに記載されており、粒子への活性薬剤の結合を促進するためのそのような懸濁液の溶媒条件を変更することは、両方とも"Method of Drug Formulation Based on Increasing the Affinity of Active Agents for Crystalline Microparticle Surfaces"という名称の米国特許出願第60/717,524号および同第11/532,063号、および"Method of Drug Formulation Based on Increasing the Affinity of Active Agents for Crystalline Microparticle Surfaces."という名称の同第11/532,065号に教示されている。また、米国特許第6,440,463号および2005年8月23日に出願の米国特許出願第11/210,709号および米国特許出願第11/208,087号を参照のこと。場合によっては、本発明の負荷されたジケトピペラジン粒子を、例えば、2006年2月22日に出願の"A Method For Improving the Pharmaceutic Properties of Microparticles Comprising Diketopiperazine and an Active Agent"という名称の米国特許出願第11/678,046号に開示される噴霧乾燥方法によって乾燥することが意図される。これらの特許および特許出願の各々は、ジケトピペラジンに関してそれらが含むすべてについて参照により本明細書に組み込まれている。

#### 【0102】

##### I V . G L P - 1 / D K P 粒子の治療用製剤

本発明は、治療を必要とする被験体に投与するためのG L P - 1 / F D K P 製剤をさらに提供するものである。本発明で検討される被験体とは、家庭のペットまたはヒトであり得る。特定の態様においては、その治療は、I I型糖尿病、肥満、癌またはそれらから生じるあらゆる関連疾患および/または関連症状に対してなされる。ヒトは、特に好ましい被験体である。

#### 【0103】

本発明において意図される他の疾患または症状としては、過敏性腸症候群、心筋梗塞、虚血、再灌流組織損傷、異脂肪血症、糖尿病性心筋症、急性冠動脈症候群、代謝症候群、術後の異化的变化、神経変性障害、記憶障害および学習障害、膵島細胞移植および再生治療または卒中発作が挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明において意図される他の疾患および/または症状は、G L P - 1 / F D K P 乾燥粉末製剤を、それを必要とする被験体に投与することによって治療することができる上記のものに関連したあらゆる疾患および/または症状を包含する。また、本発明のG L P - 1 / F D K P 乾燥粉末製剤は、I I型糖尿病および高血糖のヒト細胞における 細胞の分化誘導治療で使用することができる。

#### 【0104】

本発明のさらなる一態様においては、被験体は、ラット、ウサギ、ハムスター、モルモット、アレチネズミ、ウッドチャック、ネコ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、サルおよび類人猿（チンパンジー、テナガザルおよびヒヒを包含する）を包含する家庭のペットまたは動物であり得ると考えられる。

#### 【0105】

さらに、本発明のG L P - 1 / F D K P 粒子製剤は、当業者に知られている、臨床的または非臨床的な目的の各種投与経路により投与され得ると考えられる。本発明のG L P - 1 / F D K P 組成物は、あらゆる標的とされる生体膜（好ましくは被験体の粘膜）にも投

10

20

30

40

50

与することができる。投与はいずれの経路によっても行うことが可能であり、その経路としては、直接罹患した部位に対して、または局所的手段による、経口、経鼻、口腔内、全身静脈内注射、皮下、血液供給またはリンパ液供給による局所投与が挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明の好ましい態様においては、GLP-1/FDKP組成物の投与は、肺内送達によってなされる。

【0106】

本発明において使用することができる他の代替的投与経路としては：カテーテル、洗浄液、クリーム、脂質組成物（例えばリポソーム）、あるいは当業者に知られている他の方法または上記のあらゆる併用による、エアゾール、注射、注入、連続注入、直接標的細胞を浸漬する局所灌流を使用した、皮内、動脈内、腹腔内、病巣内、頭蓋内、関節、前立腺内、胸内、気管内、硝子体内、膣内、直腸、腫瘍内、筋肉内、膀胱内、粘膜、心膜内、気管支投与局所を挙げることができる（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 1990参照、投与方法に関してそれが含むすべてについて参照により本明細書に組み込まれる）。

10

【0107】

乾燥粉末製剤として、本発明のGLP-1/FDKP粒子は、粒径に応じて、呼吸系の特定の領域に吸入により送達することができる。さらに、GLP-1/FDKP粒子は、静脈内懸濁剤形に組みのために十分に小さくすることができる。経口送達のために、粒子は、懸濁剤、錠剤またはカプセル剤に組み込むことができる。GLP-1/FDKP組成物は、ネブライザーや、定量吸入器、乾燥粉末吸入器、噴霧器等の吸入装置から送達することができる。

20

【0108】

さらなる態様においては、「有効量」のGLP-1/FDKP製剤を、それを必要とする患者に投与することが意図される。本発明で意図されるGLP-1/FDKP乾燥粉末製剤の「有効量」は、治療される疾患、症状または障害の症候の内の1つ以上をある程度軽減するGLP-1化合物、類似体またはペプチド模倣体等の量を意味する。一態様においては、GLP-1/FDKP乾燥粉末製剤の「有効量」は、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50%以上まで血漿中インスリン濃度を上昇させ、空腹時血糖濃度を減少または低下させ、臍臍細胞集団を増殖させることによって糖尿病を治療するためのGLP-1分子の量であるが、そのようなものに限定されるものではない。別の好ましい一態様においては、本発明は、そのような治療を必要とする被験体に医薬的に有効な量のGLP-1分子を投与することによって、肥満を治療することを意図するものである。そのような例においては、GLP-1/FDKP乾燥粉末製剤の「有効量」は、少なくとも約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50%以上体重を減少または低下させることにより肥満を治療するためのGLP-1分子の量であるが、そのようなものに限定されるものではない。本発明はまた、そのような治療を必要とする被験体に医薬的に有効な量のGLP-1分子を投与することにより満腹感を制御するための「有効量」のGLP-1/FDKP乾燥粉末製剤を投与することを意図するものである。それらに限定されないが、GLP-1分子は、エキセンジン-1やエキセンジン-4等のエキセンジン分子であり得る。そのような例においては、GLP-1/FDKP乾燥粉末製剤の「有効量」は、少なくとも約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%以上まで空腹感および食物摂取（例えば、質量またはカロリー含有量で測定される）を減少させるGLP-1分子の量であるが、そのようなものに限定されるものではない。GLP-1/FDKP乾燥粉末製剤の「有効量」は、その疾患または症状または症候の程度を、検出可能かつ反復して軽減、減少、最小化または限定するために十分な量であるとさらに定義することが可能である。また、疾患または症状の除去、消失または治癒は、「有効量」の本発明の製剤を利用することにより可能となり得る。

30

【0109】

40

50

本発明のG L P - 1 / F D K P組成物を、それを必要とする被験体に投与する際、その組成物の実際の投与量は、体重、症状の重症度、治療される疾患の種類、以前または現在の治療的介入、患者の特発症、投与経路等の身体的または生理的な因子に基づいて決定することができる。当業者は、1つ以上のこれらの因子に基づいて実際の投与量を決定することができる。

#### 【0110】

本発明のG L P - 1 / D K P製剤は、治療される疾患または症状に応じて1回または2回以上投与することができる。G L P - 1 / D K P製剤の投与は、分、時間、日、週または月の間隔で被験体に提供することができる。場合によっては、その治療法を行うタイミングは、投与時にG L P - 1分子の半減期と関連させることができる。さらなる態様においては、特定の、または複合した疾患または症状（例えば癌等）を治療する際、医薬賦形剤または作用剤を有する本発明のG L P - 1 / D K P製剤を投与することは望ましい場合もある。そのような場合、投与法は、医薬賦形剤または作用剤によって決定することができる。

10

#### 【0111】

##### V. 実施例

以下の実施例は、本発明の特定の態様を示すためのものである。実施例において開示される手法は、本発明を実施する際に十分な機能を果たす代表的手法を説明するものであることは、当業者に認められるはずである。しかしながら、当業者は、本発明の開示に鑑みて、多くの変更は、開示される特定の態様においてなすことが可能であり、本発明の精神と範囲から逸脱することなく、類似または同様の結果をさらに得ることが可能であることを認める。

20

#### 【0112】

##### 実施例1

###### G L P - 1 の構造の生物物理学的および解析的な分析

G L P - 1 の構造および作用を解析するために、多くの生物物理学的および解析的な手法を使用した。これらの手法には、遠紫外円偏光二色性（遠紫外CD）、近紫外円偏光二色性（近紫外CD）、内部蛍光、フーリエ変換赤外分光法（FTIR）、高速液体クロマトグラフィ（HPLC）および質量分析（MS）が含まれ、それらのすべてが当業者によく知られている。G L P - 1ペプチドに対する濃度、イオン強度、温度、pH、酸化ストレス、攪拌および複数の凍結融解サイクルの作用を調べるために広範囲にわたる条件が使用され、それらのすべては、さらに下記で詳述されている。また、特定のG L P - 1 / D K P製剤を実現するために、これらの解析を用いて分解の主要な経路を明らかにし、G L P - 1 のペプチド構造を操作する条件を確立した。

30

#### 【0113】

##### 実験手順

G L P - 1 は、American Peptide（米国カリフォルニア州サニーベール）またはAnaspec（米国カリフォルニア州サンノゼ）のいずれかから購入するか、あるいは社内（MannKind Corporation、米国カリフォルニア州バレンシア）で調製した。各種濃度の水性G L P - 1試料は、特に明記しない限りpH 4.0および20°で解析した。試料は、各実験前に、一般に新しく調製し、適切な添加剤（あるとすれば、例えば、塩、pH緩衝液、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>等）と混合した。さらに、各種条件下のG L P - 1の2次構造測定値を、遠紫外CDおよび透過フーリエ変換赤外分光法（FTIR）により収集した。さらに、近紫外CDおよび内部蛍光を用いて、G L P - 1の3次構造を、その芳香族残基（すなわちトリプトファン）を囲む環境をモニターすることによって解析した。

40

#### 【0114】

##### G L P - 1 の濃度依存的な構造

円偏光二色性（CD）スペクトルを用いて、タンパク質やペプチド等の分子で表わされる-ヘリックス、ランダムコイル、-ブリーツシート、-ターンおよびランダムコイルを解析した。特に、遠紫外CDは、タンパク質およびペプチドの2次構造の種類、例

50

えば純粋な - ヘリックスや - シート等を決定するために用いた。一方で、近紫外 CD は、分子の 3 次構造を解析するために用いた。従って、GLP-1 構造に対する濃度の作用を調べるために、遠紫外 CD および近紫外 CD の手法を用いた。

【0115】

図 1 A の遠紫外 CD により、GLP-1 は、広範囲の濃度（例えば：1.8、4.2、5.1、6.1、7.2 および 8.6 mg / mL）にわたって - ヘリックスおよびランダムコイルを含む 2 つの異なる構造を形成することが明らかになった。低濃度（2 mg / mL 以下）では、GLP-1 は、205 nm で大きな単一の極小値によって決定される通り、1 次的には構造化されていない。濃度が増加するにつれて、ペプチドは、208 nm および 224 nm における 2 つの極小値によって決定される通りの - ヘリックス構造をとる（図 1 A）。 10

【0116】

3 次構造解析により、GLP-1 の高濃度構造は、自己会合した立体配座（すなわちオリゴマー）であることが示唆される。近紫外 CD および蛍光放射の両方のデータにより、この仮説が支持される。近紫外 CD（図 1 B）における 250 ~ 300 nm の正のバンドにより、GLP-1 は、濃度の上昇と共に増大する明確な 3 次構造を有することが明らかとなる。さらに具体的には、これらのバンドによって、ペプチドの芳香族残基がほとんど固定され、明確な環境の中に存在することが分かる。

【0117】

同様に、各種濃度（pH 4.0、20）の GLP-1 の蛍光放射により、芳香族残基であるトリプトファン（それは、また、近紫外 CD スペクトルの強いバンドを示した）が明確な 3 次構造の中に存在することが明らかとなり、示されるデータは、280 nm でのトリプトファン励起から得られた（図 1 C）。低濃度の GLP-1 についての 355 nm での最大蛍光により、トリプトファンは溶媒に曝露されていて、重大な 3 次構造は存在しないことが分かった。高ペプチド濃度で、強度の最大値は低下し、より低波長にシフトするが、このことは、より明確な 3 次構造を示すものである。 20

【0118】

GLP-1 の自己会合した立体配座の基礎をなす 2 次構造をさらに決定するために、FTIR 解析を各種濃度（pH 4.0、20）で行った。1656 cm<sup>-1</sup> でのアミド I バンドにより、GLP-1 は、2 mg / mL 以上の濃度で - ヘリックス構造を有することが明確に示される（図 1 D）。それ故、GLP-1 は - シート構造を形成せず、その代わりに、ペプチドは高濃度でヘリックス束を生じさせると考えられる。 30

【0119】

さらに、GLP-1 のこれらの各種構造は、試料操作によっては形成されないことが実験的に明らかになった。緩衝液中にペプチドを直接溶解することによって調製された GLP-1 と比較した濃縮原液からの希釈により、同様の遠紫外 CD、近紫外 CD および蛍光放射スペクトルが得られた。

【0120】

GLP-1 に対するイオン強度の作用

また、GLP-1 ペプチドに対するイオン強度の作用を決定するために試験を行った。図 2 A（遠紫外 CD）は、208 nm および 224 nm での極小値により明らかとなる通り、塩の濃度（100 mM ~ 1000 mM）を増加させることによって、GLP-1 の不規則構造が - ヘリカル構造に変化することが示される。NaCl 濃度を 1 M まで上げると、ペプチドの多く（1.0 mg / mL）が溶液から析出する（図 2 A）。しかし、この種の析出物は、水で希釈すると溶解することが明らかとなったため、高イオン強度で GLP-1 は可逆的に析出する可能性があることが立証された。 40

【0121】

塩はまた、GLP-1 の 3 次構造を生じ、且つ改善することが明らかになった。このことは図 2 B（近紫外 CD）において例証されており、そこでは、塩がない場合、1.0 mg / mL の GLP-1 はシグナルを示さないが、イオン強度の増大と共に増大する明確な 50

3次構造を示す。これらの結果は、280 nmでのトリプトファン励起後の各種NaCL濃度(pH 4.0、20)における1.0 mg/mLのGLP-1の蛍光放射(図2C)によって確認された。イオン強度の増加によって、最大蛍光はより低波長へとシフトしたが、このことから、1.0 mg/mLのGLP-1の3次構造が生じ且つ強化されることが明らかとなった。

#### 【0122】

さらに、近紫外CDスペクトルを使用した、各種イオン強度(pH 4.0、20)での10 mg/mLのGLP-1の3次構造解析によって、GLP-1が自己会合する立体配座は、イオン強度の増加と共に増大することも明らかになった(図2D)。

#### 【0123】

それ故、そのデータは、イオン強度はGLP-1の構造に大きく作用し、それにより、タンパク質が-ヘリックス構造をとり且つオリゴマーに会合することを示唆している。さらに、溶液中のイオン強度が増加することにより、GLP-1のオリゴマー化は、可逆的にそれが析出するまで増加する。このことは、初期には3次構造は存在しない低濃度のペプチドで、及び実質的な2次構造および3次構造をすでに示す高濃度のペプチドではつきりと現れる。従って、イオン強度の増加によって、構造化されていないGLP-1は、-ヘリックス立体配座および自己会合立体配座に容易に変化する。さらに、観察された分光法の結果は、すでに示されたペプチド濃度の増加の影響と同等だった。

#### 【0124】

##### GLP-1に対する温度およびpHの作用

また、GLP-1の自己会合した立体配座が温度またはpHのいずれかの変化に対する感受性を有するかどうかを決定するために、試験を行った。図3A(近紫外CD)により、温度が上昇するにつれて、10 mg/mLのGLP-1の3次構造が有意に解離することが明らかにされる。一方では、温度は、各種温度およびpH 4.0での低濃度(0.05 mg/mL)GLP-1に影響を及ぼさない(図3Bおよび3C(遠紫外CD)を参照)。遠紫外CDにより、ペプチドが温度に非感受性であることが示される。それ故、分子運動の増加は、GLP-1の自己会合を有意に妨げる。

#### 【0125】

反対に、図4A(遠紫外CD)は、-ヘリックスのGLP-1の立体配座の溶解度はpH感受性を有することを示している。10 mg/mLのGLP-1の構造がpH 4.4以下で比較的均一である(すなわち、GLP-1がヘリックスを保っている)にもかかわらず、pHが中性またはその近くにまで上昇すると(pH 6.3と7.6との間)、多少の析出が生じ、不規則なスペクトルが生成する。析出が生じた試料は、可溶でないGLP-1が溶液中に存在することの結果として、強度がより小さくなる。この不規則構造は、図4A(遠紫外CD)の208 nmで認められる1つの極小値によって決定され、このことは、図4B(近紫外CD)でさらに示され、析出後の溶液中のGLP-1の減少により生じたものと考えられる。この析出は、pHが、GLP-1についてのpI 5.5よりも高く上昇する場合に生じる可能性がある。しかしながら、pHが中性近くから11.7まで上昇するにつれて、析出物のほとんどは再溶解したが、このことにより、その析出は可逆的であることが示された。図4Aで認められるように、pH 11.7でGLP-1の未溶解の析出物が残留したことにより、溶液中のペプチドの量が減少し、それ故に遠紫外CDスペクトルの強度が低下したと考えられる。また、凍結乾燥されたGLP-1粉剤をpH 9の緩衝液と混合して高濃度のGLP-1とする場合、GLP-1が極めて不溶性であることが認められた。

#### 【0126】

##### GLP-1の安定性

攪拌および凍結融解サイクルの作用に加えて、アミド分解および酸化に対するその耐性を決定することによってGLP-1ペプチドの安定性を調べた。

#### 【0127】

pH 10.5のGLP-1(1 mg/mL)を40度5日間インキュベートし、その

10

20

30

40

50

後アミド分解および酸化の解析のために逆相HPLCとエレクトロスプレー質量分析法(MS)を行った。また、酸化の試験は、HPLCおよびMSを使用して0.1%のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の存在下で2時間インキュベートされたGLP-1試料(1mg/mL)に対しても実施した。

#### 【0128】

図5は、アミド分解および酸化の条件下でのGLP-1の安定性を示す。HPLCクロマトグラムによって、GLP-1が同じ保持時間で溶出し、解析される不安定条件について分解ピークが生じないことが示されている。さらに、MS解析により、すべての試料について同様の質量(3297g/mol)が生成され、このことから、質量は不变であることが示された。また、そのデータによって、各種条件下でインキュベートされた場合にペプチドが純粋で未変化の状態に留まることが示される。従って、GLP-1のアミド分解は認められなかった。また、GLP-1は、0.1%のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の存在下で観察されたように酸化ストレスに対して安定していることが示されたが、ここでGLP-1の純度および質量は、それぞれHPLCおよびMSによって決定されたように未変化の状態に留まっていた。全体として、保持時間や質量値に変化はなく、分解ピークは生じなかったが、このことにより、GLP-1ペプチドは、アミド分解および酸化に対して耐性があることが明らかになった。

#### 【0129】

各種濃度のGLP-1に対する搅拌および連続的凍結融解サイクルの作用を、近紫外CDおよび内部蛍光によって解析した。9.4mg/mLおよび1.5mg/mLでのGLP-1の搅拌は、近紫外CD(図6A)および蛍光放射(図6B)により観察されるように、ペプチドにおける有意な変化を生じなかった。試料を室温で30分間および90分間搅拌し、次いで蛍光放射スペクトルを、280nmでのトリプトファン励起後に収集した。独立した凍結融解の試験において、1.6、5.1および8.4mg/mLのGLP-1(pH4.0)を含有する溶液を-20で凍結し、室温で解凍した。GLP-1に対する10回の凍結融解サイクルの作用を、近紫外CD(図7A)および蛍光放射(図7B)によって実施および解析した。蛍光放射スペクトルを、280nmでのトリプトファン励起後に収集した。両方の解析により、ペプチドの3次構造は、複数の凍結融解サイクルによっては特に変化しないことが分かった。類似実験において、10mg/mLのGLP-1(pH4.0)の2次構造に対する11回の凍結融解サイクルの作用を解析した(図7C)。遠紫外CDにより、ペプチドの2次構造は、複数の凍結融解サイクルの結果として有意に変化しないことが示される。

#### 【0130】

全体として、上記の実験から得られる生物物理学的な解析により、GLP-1ペプチドの構造は、溶液中のその濃度によって強く影響されることが示された。GLP-1濃度の増加につれて、-ヘリックスの構造はより顕著になった。さらに、イオン強度の増加により、3次GLP-1構造は強化され、場合によっては生成された。

#### 【0131】

##### 実施例2

##### GLP-1/FDKPの吸着試験

吸着試験を実施することによって、GLP-1と懸濁液中のジケトピペラジン(DKP)粒子との相互作用を評価した。吸着試験の変数は、GLP-1/FDKP相互作用に対する静電気、水素結合、水構造、タンパク質の柔軟性の作用、および特定の塩結合相互作用について調べるものであった。さらに、いくつかの一般的なタンパク質安定剤を、DKP表面へのGLP-1吸着に対する干渉についてテストした。

#### 【0132】

予め形成されたDKP懸濁粒子(すなわちFDKP)を使用して、予め形成されたDKP粒子の表面にGLP-1が吸着する条件を検討した。FDKP粒子が予め形成されるFDKP粒子懸濁液を、添加剤または賦形剤の3倍の溶液および3倍のpH緩衝液と組み合わせた。最終溶液は、5mg/mLの濃度のFDKPおよび0.25mg/mL(5%w

10

20

30

30

40

50

/ w ) の濃度の G L P - 1 を含有した。上澄液中の非結合の G L P - 1 を、懸濁液から濾過した。会合した G L P - 1 タンパク質を有する F D K P 粒子を、1 0 0 m M の炭酸水素アンモニウムと共に溶解(再組成)し、濾過して集合 G L P - 1 タンパク質を分離した。上澄液および再組成された分画物の両方における G L P - 1 の量は、H P L C により定量した。一連の実験を実施したが、その実験で使用した条件には、塩、界面活性剤、イオン、オスモライト、カオトロープ、有機物および各種濃度の G L P - 1 等の添加剤の使用が含まれた。これらの試験の結果について下記に記載する。

### 【 0 1 3 3 】

#### 塩の試験

F D K P 粒子への G L P - 1 の結合に対する塩の作用を、H P L C 解析によって観察した。G L P - 1 / F D K P 粒子の負荷を、0、2 5、5 0、1 0 0、2 5 0、5 0 0、1 0 0 0 および 1 5 0 0 m M の N a C l の存在下で、5 m g / m L の F D K P および 0 . 2 5 m g / m L の G L P - 1 で実施した(図 8 A)。また、p H および N a C l 濃度の関数としての、再組成された、F D K P を含まない対照試料中に検出される G L P - 1 の量を評価した(図 8 B)。両方のデータセットの p H を、2 0 m M リン酸塩 / 2 0 m M 酢酸塩混合物により制御した。

### 【 0 1 3 4 】

図 8 A において観察される通り、F D K P 粒子への G L P - 1 の最適な結合(吸着)は、懸濁液の p H に強く影響された。4 以上の p H で、溶液中の G L P - 1 / F D K P 比が 5 % w / w であった場合、F D K P 粒子への G L P - 1 の約 3 . 2 % ~ 約 4 % の結合が認められた。0 および 2 5 m M の N a C l の存在下で、F D K P 粒子への G L P - 1 の吸着は、p H 2 . 0 では本質的に明らかではなかったが、イオン強度の増加と共になんらかの見かけの負荷が認められた。G L P - 1 析出は、1 M 以上の N a C l を有する F D K P を含まない対照中に認められた(図 8 B)。1 M 以上の N a C l におけるこの見かけの負荷は、高イオン強度の G L P - 1 ペプチドの可逆的析出(塩析)の結果である。また、F D K P 粒子を含まない G L P - 1 の高塩分対照は、再組成された試料において高い G L P - 1 濃度を示したが、このことにより、上澄液が収集された場合に G L P - 1 がフィルター内に捕集されることが示された。1 M を下回る N a C l においては、F D K P 粒子の非存在下における G L P - 1 の析出の証拠はなかった。

### 【 0 1 3 5 】

#### 界面活性剤の試験

F D K P 粒子への G L P - 1 の結合に対する界面活性剤の作用は、H P L C 解析によって観察した。負荷は、界面活性剤の存在下で 5 m g / m L の F D K P および 0 . 2 5 m g / m L の G L P - 1 で行った(図 9 A)。また、p H および界面活性剤濃度の関数としての、再組成された、F D K P を含まない対照試料において検出された G L P - 1 の量を評価した(図 9 B)。p H および対照試料の条件は、上記のイオン強度試験について記載した通りであった。本試験で使用した界面活性剤としては: 0 . 0 9 m M の B r i j 7 8 、0 . 0 1 m M の T w e e n 8 0 、0 . 2 m M の T r i t o n X 、0 . 1 2 m M の P l u r o n i c ( ブルロニック ) F 6 8 、0 . 9 m M の H ( C H 2 ) 7 S O 4 N a 、0 . 9 m M の C H A P S 、0 . 9 m M の C e t r i m i d e ( セトリミド ) が含まれた。各界面活性剤の存在下の G L P - 1 についての負荷曲線は、p H の関数として G L P - 1 / F D K P について示した。

### 【 0 1 3 6 】

そのデータにより、G L P - 1 / F D K P 粒子についての p H - 吸着曲線が、それらの臨界ミセル濃度( C M C )の付近、すなわち、下回った場合は凝集体 / ミセルが事実上検出されない限界値、および上回った場合は事実上すべてのさらなる界面活性剤分子が凝集体を形成する限界値を分けるわずかな範囲の濃度の付近の界面活性剤の存在によって影響されなかつたことが分かる。それ故、後述するように安定性および / または薬物動態( P K )を最適化するために、これらの界面活性剤のいずれをも用いることができるることをさらに示唆する。塩の試験について上記に示したように、G L P - 1 と F D K P 粒子との相

10

20

30

40

50

互作用は懸濁液の pH に影響された。

【0137】

イオンの試験

この実験のために、2種の異なるイオンの試験を行って FDKP 粒子への GLP-1 の結合に対するイオンの作用を決定した。両試験において、Cl<sup>-</sup> はカチオンの対イオンであり、Na<sup>+</sup> はアニオンの対イオンであった。GLP-1 / FDKP 粒子の負荷を、前の実験について記載した通りに実施した。前述の通りに pH を制御した。試料は、NaCl (高イオン強度の場合のより優れた評価のために用いた) の存在下および非存在下における pH 3.0、3.5、4.0 または 5.0 のいずれかの pH 緩衝液により調製した。さらなるイオンは、以下の通り、個々の試料中に含まれた: 20 mM または 250 mM の LiCl、20 mM または 250 mM の NH<sub>4</sub>Cl、20 mM または 250 mM の NaF、および 20 mM または 250 mM の NaCH<sub>3</sub>COO。 10

【0138】

図 10 A に示すように、第 1 のイオン試験からのデータは、pH およびイオンの関数としての GLP-1 / FDKP の負荷曲線を示す。NaCl の非存在下においては、20 mM または 250 mM のいずれかの濃度のフッ化物は、低 pH で吸着に強く影響を与える (吸着を高めた)、250 mM の濃度の NaF は pH に関係なく最大の結合を示した。このパターンは、炭酸水素ナトリウムの作用が 20 mM と 250 mM とで同じではなかったことから、ナトリウム塩ではなく、溶液中のフッ化物のために観察されたものであった。さらにこれらの作用は、同様の濃度の塩が、図 8 に示すようにこの作用を示さなかったことから、試料中のナトリウム塩の結果ではなかった。1 M の NaCl の存在下では、すべてのイオンにより、高い「見かけの」負荷が付与された。1 M の NaCl 試料についての「見かけの」負荷は、高イオン強度の場合、溶液の GLP-1 ペプチド塩析から生じた。このことは図 10 B でさらに示されており、その図 10 B によって、GLP-1 は、1 M の NaCl を含有する、再組成された、FDKP を含まない対照試料中に存在することが示される。これらの対照試料について検出された GLP-1 の量は、イオン濃度が大きくなると増大したが、その理由は、そのイオン濃度によって試料中の全イオン強度が増大したからである。 20

【0139】

第 2 のイオン実験 (図 10 C) において、GLP-1 / FDKP 試料を、20 mM または 250 mM の KCl、20 mM または 250 mM のイミダゾール、20 mM または 250 mM の NaI、あるいは 20 mM または 250 mM の NaPO<sub>4</sub> の存在下で調製した。そのデータにより、250 mM でイミダゾールが 1 M の NaCl の存在下で負荷を減少させ、250 mM のリン酸塩および 250 mM により、高い「見かけの」負荷が生じたことが示される (図 10 C)。0 M および 1 M の NaCl 濃度の、再組成された、FDKP を含まない対照試料において検出された GLP-1 の量から (図 10 D)、これらの作用は、ペプチドと FDKP 粒子との相互作用に対してではなく、GLP-1 ペプチド自体に対してのイオンの影響から生じたものであった。リン酸ナトリウムおよびヨウ化ナトリウムは、NaCl の非存在下における GLP-1 にいくらかの塩析をもたらした。さらに、イミダゾールは、1 M の NaCl 試料中の GLP-1 の可溶化を促進し、それにより「見かけの」負荷を低下させた。析出はまた、250 mM のリン酸塩およびヨウ化物を有する 0 M の NaCl 対照中にも認められた。 40

【0140】

オスモライトの試験

また、FDKP 粒子への GLP-1 の結合に対するオスモライトの作用を、HPLC 解析により観察した。図 11 A は、一般の安定剤 (オスモライト) の存在下における pH の関数としての GLP-1 / FDKP についての負荷曲線を示す。GLP-1 / FDKP 粒子の負荷を、前の実験について記載した通りに実施した。同様に、前述で記載した通りに pH を制御した。試料を、pH 3.0、且つ 20、50、100、150、200 または 300 mM のオスモライト (安定剤) の存在下で調製した。オスモライトは、ヘキシレン

10

20

30

40

50

グリコール( H e x - G l y )、トレハロース、グリシン、P E G、T M A O、マンニトールまたはプロリンであり、「N / A」は、オスモライトが存在しないことを示す。同様の実験においては、試料中のオスモライト(安定剤)の濃度を100mMで一定に維持し、pHを2.0から4.0に変化させた。

#### 【0141】

pHをpH3.0で維持し、且つオスモライトの濃度を変化させた場合(図11A；左側の曲線)、あるいはオスモライト濃度を100mMで一定に維持し、且つpHを変化させた場合(図11A；右側の曲線)のいずれにおいても、検討したオスモライト(安定剤)は、F D K P面へのG L P - 1の吸着に劇的な影響を与えたなかった。G L P - 1の析出は、再組成された、F D K Pを含まない対照試料中には検出されなかった(図11B)。これらのオスモライトを用いて安定性および/または薬物動態を最適化することができる。

#### 【0142】

##### カオトロープおよびリオトロープの試験

水およびタンパク質の構造に影響を及ぼすイオン種を(カオトロープおよびリオトロープ)、これらの因子がF D K PへのG L P - 1吸着に果たす役割を決定するために検討した。G L P - 1 / F D K P粒子の負荷を、前の実験について記載した通りに実施した。同様に、前述の通りにpHを制御した。試料を、pH3.0、且つ0、20、50、100、150、200または300mMの以下のカオトロープまたはリオトロープ:NaSCN、CsCl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>N-HCl、Na<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>、クエン酸ナトリウムおよびNaClO<sub>4</sub>の存在下で調製した。同様の実験においては、試料中のカオトロープまたはリオトロープの濃度を、100mMで一定に維持し、pHを2.0から4.0に変化させた。

#### 【0143】

図12Aは、pHとカオトロープおよび/またはリオトロープとの関数としてのG L P - 1 / F D K Pについての負荷曲線を示すものである。低pH(3以下)において負荷の有意な変化が、解析される異なるカオトロープについて、特により高いカオトロープ濃度で生じた。しかしながら、pH4では、この変化が認められなかった(図12C)。従って、これらの作用剤によって、好ましくない低pHでF D K P粒子へのG L P - 1の結合を促進するが、結合に有利なより高いpH条件では、あまり効果がないと思われる。再組成された、F D K Pを含まない対照試料からのデータにより、pH3.0で認められた負荷の変化は、様々な程度でG L P - 1ペプチドの塩析(析出)に影響を及ぼす特定のカオトロープに部分的に起因するものであることが示唆される(図12Bおよび12D)。このことは、NaSCNやNaClO<sub>4</sub>等の強力なカオトロープについて認められた。

#### 【0144】

##### 有機物の試験

水素結合の強度を増加させることによって構造化されていないペプチドのヘリカル構造を誘導することが知られているアルコールを、ヘリカル構造がF D K PへのG L P - 1吸着において果たす役割を決定するために評価した。G L P - 1 / F D K P粒子の負荷を、前の実験について記載された通りに実施した。同様に、前述で記載された通りにpHを制御した。各アルコールの作用を、pH2.0、3.0、4.0および5.0で観察した。使用したアルコールは、メタノール(MeOH)、エタノール(EtOH)、トリフルオロエタノール(TFE)またはヘキサフルオロイソプロパノール(HFIP)であった。各アルコールを、5%、10%、15%および20%v/vの濃度で評価した。

#### 【0145】

図13Aは、各濃度におけるアルコールごとのpHの関数としてのG L P - 1 / F D K Pについての負荷曲線を示すものである。pH3.0では、低濃度のHFIP(5%)は、F D K P粒子に対するG L P - 1の質量比により示されるように、高い吸着が生じる。最も強いH結合を増強する(ヘリックスを形成する)アルコール(HFIP)だけは、緩衝化した懸濁液における吸着に影響を与えた。HFIPのより高い濃度(20%)で、G

10

20

30

40

50

L P - 1 / F D K P 吸着は抑制された。図 13 B により、20% のアルコール濃度では、G L P - 1 の有意な析出は、再組成された、F D K P を含まない対照試料において特に認められなかつたことが分かる。

【 0 1 4 6 】

これにより、薬物の構造柔軟性（すなわち形成され得るF D K P 接触のエントロピーおよび数）は、吸着において役割を果たし得ることが示唆される。そのデータにより、H 結合は、上記の条件下でのG L P - 1 のF D K P 表面との相互作用において役割を果たし得ることが示唆される。そのデータに基づいて、H 結合が、主要なものとして、且つF D K P - G L P - 1 の相互作用における一般的な力として機能したならば、より多くの、またより強い作用が期待されたであろうということがさらに推測される。

10

【 0 1 4 7 】

濃度の試験

各種濃度におけるG L P - 1 のF D K P 粒子表面への吸着を調べた。図 14 A は、各種p H でのG L P - 1 濃度の関数としてのG L P - 1 / F D K P からの負荷曲線を示すものである。G L P - 1 濃度は、0.15、0.25、0.4、0.5、0.75、1.0、1.5、2.0、5.0 または 10 mg / mL であった。試料のp H は、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 または 5.0 であった。

【 0 1 4 8 】

F D K P 粒子に対するG L P - 1 負荷の増大は、F D K P 濃度が 5 mg / mL で一定に維持され、且つG L P - 1 の濃度が増加した際に認められた。G L P - 1 の濃度がp H 4 で 10 mg / mL だった場合は、F D K P 粒子に対する約 20% のG L P - 1 の吸着が認められた。意外にも、F D K P 粒子に対するG L P - 1 負荷の吸着の飽和は、高濃度のG L P - 1 では確認されなかつた。この確認結果は、おそらく多層へのG L P - 1 の自己会合によるものと考えられる。

20

【 0 1 4 9 】

走査型電子顕微鏡 (S E M) によるG L P - 1 / F D K P 製剤の形態の解析により、G L P - 1 / F D K P 粒子は、2 個以上のG L P - 1 / F D K P 粒子で構成される凝集体を形成し得る結晶性または平板状の構造として存在することが明らかになる（図 14 B）。これらの製剤は、（パネルA）0.5 mg / mL のG L P - 1 および 2.5 mg / mL のF D K P ; (パネルB) 0.5 mg / mL のG L P - 1 および 10 mg / mL 中のF D K P ; (パネルC) p H 4.0 における 20 mM 塩化ナトリウム、20 mM 酢酸カリウムおよび 20 mM リン酸カリウムの、0.5 mg / mL のG L P - 1 および 10 mg / mL のF D K P ; および (パネルD) p H 4.0 における 20 mM 塩化ナトリウム、20 mM 酢酸カリウムおよび 20 mM リン酸カリウムの、10 mg / mL のG L P - 1 および 50 mg / mL のF D K P 、を含有する溶液を凍結乾燥することにより調製した。

30

【 0 1 5 0 】

結果の要旨

全体的に、G L P - 1 のF D K P 粒子との相互作用についての吸着試験によって、G L P - 1 が、p H 4 以上で、高吸着で、p H に依存する様式でD K P 粒子表面に結合することが示された。D K P 粒子表面へのG L P - 1 の吸着はp H に最も強く影響を受けることが明らかになったが、p H 2.0 では本質的な吸着は生じず、p H 4.0 以上で実質的な相互作用が生じた。観察の際、ナトリウムイオンおよびフッ化物イオンによって、低p H で吸着が高まつた。界面活性剤等の他の添加剤、および一般的の安定剤の、F D K P 粒子表面へのG L P - 1 の吸着に対する作用は、ほんのわずかだった。

40

【 0 1 5 1 】

さらに、G L P - 1 自体の性質もこれらの実験の結果に影響を及ぼした。G L P - 1 の作用は、吸着の飽和が認められなかつたという点で、特殊で、驚くべきことであることが明らかになったが、それは、高濃度でのG L P - 1 の自己会合によるものであった。高濃度でのG L P - 1 の自己会合によって、G L P - 1 ペプチドの複数層によるD K P 粒子のコーティングが可能となり、このことによりG L P - 1 ペプチドの負荷率がより高いもの

50

となる。この驚異的な自己会合の特質は、安定した G L P - 1 の投与形態の調製に有益であることが分かる。さらに、G L P - 1 の自己会合した立体配座によって、血液中のその分解を減少させるか、もしくは遅延させることが可能になる。しかしながら、会合した G L P - 1 は、温度や高 pH に感受性を有することから、それを使用する際には注意が必要であることに留意すべきである。

## 【0152】

## 実施例 3

## G L P - 1 / F D K P 製剤の完全性解析

実施例 1 および 2 の実験からの結果に基づいて、表 1 に記載した特性を有する一連の G L P - 1 製剤を、本明細書で考察される通りの細胞生存率アッセイのために選択した。大部分の製剤は、G R A S の（「一般に安全と認められる」）賦形剤を含有していたが、いくつかは、安定性および吸着の関係を調べることができるよう選択した。

## 【0153】

## 【表 1】

表1:完全性の状態を解析するために選択されたGLP-1/FDKP製剤

調節剤	量(mM)	緩衝液なし	pH3. 0	pH4. 0	pH5. 0
なし		×	×	×	×
NaCl	1000		×	×	
NaCl	20			×	
Tween 80	0.01%			×	
HepSulf	0.90%			×	
Brij78	0.09%			×	
F-	250			×	
F-	20	×		×	
Li+	20	×	×	×	
リン酸塩	250		×	×	
リン酸塩	20		×	×	×
イミダゾール	250			×	
マンニトール	20			×	
グリシン	20			×	
Me <sub>3</sub> N·HCl	50			×	
クエン酸塩	50			×	
Am <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	50			×	
ClO <sub>4</sub>	50			×	
EtOH	20%			×	
TFE	20%			×	

さらに、実施例 1 および 2 で得られた結果に基づいて、一連の製剤はまた、G L P - 1 / F D K P の第 I I 相完全性試験のために選択した。下記の表 2 には、第 I I 相完全性のために選択された 6 種の G L P - 1 製剤を示す。粉剤の調製後、それらをブランクの F D K P と混合して、各製剤中に同等の質量の G L P - 1 ペプチドおよび F D K P の両方を生成した。

10

20

30

40

50

【0154】

【表2】

表2: 第II相完全性のために選択されたGLP-1/FDKP製剤。20mMのNaClおよびpH4.0の緩衝液中の10mg/mLのGLP-1から調製された製剤は、塩に関連した製剤として記載される。

GLP-1濃度	質量比 (GLP/FDKP)	水 (緩衝液なし)	20mM NaCl + pH 4.0 緩衝液
0.5 mg/mL	0.05	×	×
3.0 mg/mL	0.10	×	×
10 mg/mL	0.20	×	×

表2におけるGLP-1/FDKP製剤に対するストレスの作用は、HPLCにより解析した(図15)。H<sub>2</sub>O中で負荷された5%、10%または20%のGLP-1/FDKPを含有する試料、またはNaCl+pH4.0緩衝液中で負荷された5%または10%のGLP-1/FDKPを含有する試料を、40で10日間インキュベートした。HPLCクロマトグラムにより、GLP-1ペプチドが同じ保持時間で溶出し、分解ピークがないことが明らかにされる。さらに、MS解析によって、すべての試料について同等の質量(3297g/mol)が生じ、それにより、質量は、解析されるすべての試料について一様であることが明らかになる。そのデータにより、凍結乾燥前の、溶液中に存在したFDKP粒子および他の成分に対するGLP-1の質量対質量の比が示される。全体として、GLP-1/FDKP製剤は、ストレスに対して安定的であることが示された。

【0155】

#### 実施例4

##### 肺洗浄液中でインキュベートしたGLP-1の安定性

体液中に見出されるジペプチジルペプチダーゼIV(DPP-IV)がGLP-1を切断および不活性化することから、肺液や血液等の体液中でのGLP-1の安定性を解析した。

【0156】

ジペプチジルペプチダーゼIV(DPP-IV)は、いくつかの細胞型、特にCD4<sup>+</sup>T細胞、の表面上に発現する、細胞外膜結合型セリンプロテアーゼである。DPP-IVはまた、血液および肺液中にも認められる。DPP-IVは糖代謝の制御に関わるが、それは、その基質が、その2個のN末端アミノ酸の除去によって不活性化されるインスリン分泌性ホルモンGLP-1を含むためである(図16A参照)。DPP-IVは、N末端の2個の残基を放出するヒトGLP-1(GLP-1(7-36))の主要な循環形態のAla-Glu結合を切断する。DPP-IVは、GLP-1を分解し、それにより臍臍の細胞へのインクレチン作用を低下させることによって、糖処理の負の調節を行う。

【0157】

アプロチニンまたはDPP-IV阻害剤の存在下でラットの血液中および肺液中のGLP-1分解の抑制を決定するために試験を行った。タンパク質分解を抑制することが当技術分野で知られているアプロチニン(天然のセリンプロテアーゼインヒビター)を、1、2、3、4および5TGU/mLで、採取後の試料に添加した。次いで、DPP-IV活性を、DPP-IVにより認識されるGly-Pro配列を含む発光基質の切断を検出することにより測定した。気管支肺洗浄液を発光促進基質(proluminescent substrate)と共に30分間インキュベートし、次いで切断産物を発光により検出した。

【0158】

そのデータにより、アプロチニン濃度の増加と共に各種体液(本明細書で考察されるもの)中のペプチド分解の抑制によって検出されるように、DPP-IV活性の抑制の増大

10

20

30

40

50

が示された(図16B)。1.25、2.5、5、10および20μL/mLの採集後の試料に添加されたDPP-IV阻害剤により同様の結果が観察された(図16C)。試料採集後の阻害剤の添加により、試料の評価をより正確なものとすることことができた。

#### 【0159】

また、GLP-1の安定性は、GLP-1アミノ酸7-9を認識する捕捉ELISAのmAbを使用して肺洗浄液において検討した。GLP-1を、2、5、20および30分間肺洗浄液(LLF)中でインキュベートした。インキュベーション条件は以下の通りであった:図17に示す通り、1μgまたは10μg(w/w)のLLFおよび1μgまたは10μg(w/w)のGLP-1。GLP-1は、LLF単独においては検出されなかつた。各種濃度のLLFとGLP-1との併用においては、GLP-1単独の場合と同等のGLP-1の高検出が認められ、これにより、GLP-1が肺洗浄液中で、時間にわたって、安定であること明らかになる(図17)。希釈されていない肺洗浄液中のGLP-1の安定性は同様の試験において確認され、20分目に70~72%のGLP-1完全性が示された(データは示されない)。

#### 【0160】

さらに、ラット血漿中のGLP-1の安定性を検討した。血漿は、各種ラットから得られ(図の凡例中の血漿1および血漿2で示される)、1:2または1:10(v/v)で希釈した。1μLのGLP-1を10μLの血漿またはPBSに添加した。試料を、5、10、30または40分間、37でインキュベートした。反応を氷上で停止させ、0.1Uのアプロチニンを添加した。そのデータにより、テストしたすべての時点にわたって1:2および1:10の血漿希釈液中のGLP-1が高濃度であったことが示される(図18Aおよび18B)。全体として、そのデータにより、GLP-1は、セリンプロテアーゼDPP-IVが認められる肺洗浄液および血漿の双方の中で意外にも安定していることが明らかになる。

#### 【0161】

##### 実施例5

###### アポトーシスおよび細胞増殖に対するGLP-1分子の作用

GLP-1がアポトーシスを抑制するかどうかを検討するために、スクリーニングアッセイを行って細胞死の抑制に対するGLP-1の作用を決定した。ラット臍上皮(ARIP)細胞(臍臓細胞モデルとして使用; ATCC(米国バージニア州マナッサス)から購入)に、10分間、0、2、5、10、15または20nMの濃度でGLP-1を前もって処理した。次いで、細胞に何も投与しないか、または4.5時間、5μMのスタウロスボリン(アポトーシス誘導物質)を投与した。細胞生存度を、Cell Titer-Glo(登録商標)(プロメガ、米国ウィスコンシン州マディソン)を用いて評価した。細胞死の低下率は、スタウロスボリンが投与された細胞における最高10nMまでのGLP-1濃度の増加によって示した(図19A)。

#### 【0162】

アポトーシスに対するGLP-1の作用のさらなる考察は、アネキシンV染色を使用してFACS解析によって行った。アネキシンV染色は、アポトーシス細胞を検出する際の有用なツールであって、当業者によく知られている。細胞膜へのアネキシンVの結合により、アポトーシスに関連した形態学的变化が生じる前、および膜完全性が失われる前のリン脂質(PS)非対称性の变化の解析が可能になる。従って、アポトーシスに対するGLP-1の作用は、15nMのGLP-1、1μMスタウロスボリンを4時間、または1μMスタウロスボリン+15nMのGLP-1を投与した細胞か、あるいはスタウロスボリンもGLP-1も投与しない細胞(実験的対照)において決定された。そのデータにより、GLP-1は、スタウロスボリンにより誘導されるアポトーシスを約40%抑制したことが分かる(図19B)。

#### 【0163】

GLP-1に対するのと同様の様式でGLP-1受容体と結合するGLP-1類似体(エキセンジン-4)を使用して、アポトーシスの抑制についての同様の結果が認められた

10

20

30

40

50

。5 μMのスタウロスボリンを、0、10、20または40 nMのエキセンジンの存在下でそれぞれ16、24または48時間A R I P細胞に投与した。そのデータ(図20)により、10 nMでは、100%の細胞死が生じたため、エキセンジンがアポトーシスの抑制に完全に無効であったことが分かる。20および40 nMでは、エキセンジンはアポトーシスをある程度抑制し、40 nMのエキセンジン-4の存在下、48時間で約50%が抑制された。

#### 【0164】

##### 実施例6

###### 細胞死に対する候補物質G L P - 1 / F D K P 製剤の作用

細胞に基づくアッセイを行って、G L P - 1 / F D K P 製剤(上記実施例3の表1に開示した通り)が細胞死を抑制する能力を評価した。これらのG L P - 1 / F D K P 粒子製剤は、懸濁液の形態であるか凍結乾燥されている。製剤は、A R I P細胞におけるスタウロスボリンに誘導される細胞死を抑制する能力について解析した。G L P - 1 試料を前もって投与したA R I P細胞を、5 μMスタウロスボリンに4時間曝露し、Cell Titer-Glo(登録商標)(プロメガ、米国ウィスコンシン州マディソン)で解析して細胞生存度を決定した。

10

#### 【0165】

各種G L P - 1 / F D K P 製剤の試料は、ストレスを加えない状態にしておくか、もしくは4または40で4週間ストレスを加えるかのいずれかとした。各G L P - 1 / F D K P 試料を、45 nMで、細胞に基づくアッセイで使用して、スタウロスボリンに誘導される細胞死を抑制する能力を決定した。右側に示した対照試料は、培地単独の場合、G L P - 1 単独の場合、スタウロスボリン単独の場合、あるいはG L P - 1 およびスタウロスボリンの両方が存在する場合における細胞の生存度を示している(注:グラフの凡例は、対照試料には適用されない。各棒は別々の3組を表す)。示された結果はすべて、3組の反復試験の平均である。

20

#### 【0166】

そのデータは、ストレスが加えられたG L P - 1 / F D K P 凍結乾燥製剤のすべてにより、スタウロスボリンにより誘導される細胞死が抑制されたことを示している(図21)。しかしながら、G L P - 1 / F D K P 懸濁製剤の多くは、細胞死を抑制しなかった。

30

#### 【0167】

##### 実施例7

###### G L P - 1 / D K P 粒子の肺吸入

G L P - 1 / F D K P の薬物動態を検討するために、静脈内注射または肺内吸入によりG L P - 1 / F D K P の各種製剤が投与された雌性Sprague Dawleyラットにおいて血漿中G L P - 1 濃度を評価した。予備試験において、G L P - 1 / F D K P 粒子製剤の約4%および16%(w/w)のG L P - 1 を使用した。ラットは、肺内液体滴下注入またはI V注射により投与されたG L P - 1 溶液の投与を受けた群1、4、7および10を含む12の群に無作為割付けした。群2、5、8、および11は、肺内吸入またはI V注射により投与されたG L P - 1 / F D K P 塩と関連した製剤(表2にて開示)の投与を受けた。群3、6、9、12は、肺内吸入またはI V注射により投与されたG L P - 1 / F D K P 塩と関連した混合製剤の投与を受けた。G L P - 1 / D K P 製剤は、約16%の負荷の塩関連製剤だった。約4%の負荷を達成するために、16%の製剤をD K P粒子と3:1の混合物の形態で混合した。肺内吸入または静脈内注射は、0.08 mgのG L P - 1 総投与量のために0.5 mgまたは2.0 mgの粒子(それぞれ16%または4%のG L P - 1 負荷)で行った。

40

#### 【0168】

動物の個々の群(群7~12)においては、Day 2に投与を反復した。群1、4、7および10には、80 μgのG L P - 1 溶液を投与した。群2、5、8、および11には、G L P - 1 / D K P 塩関連製剤(約16%G L P - 1 負荷)を投与した。群3、6、9、12は、G L P - 1 / D K P 塩関連混合製剤(約4%G L P - 1 負荷)の投与を受けた

50

。

## 【0169】

実験は、同じ製剤を使用して、2日間連続で投与および血液採取を行って2回実施した。血液試料を、投与前(時間0)ならびに投与後2、5、10、20、30、60および120分後に、各群についての投与日に採取した。各時点で、約150μLの全血を、外側尾静脈から、約3U/mLのアプロチニンおよび0.3%EDTAを含むクライオバイアルチューブ内に採集し、上下を逆にして氷上で保存した。血液試料を4000rpmで遠心分離し、40μLの血漿を96ウエルプレート内にピペットで移し、それらの96ウエルプレートを、製造業者の推奨(Linco Research、米国ミズーリ州セントチャーリズ)に従って、ELISAによってGLP-1濃度について解析されるまで-80で保存した。アッセイ緩衝液が、血清(5%FBS)のみが存在し、且つマトリックスが存在しないGLP-1の場合に最適条件であると決定された。10

## 【0170】

静脈内投与：群5、6、10、11および12は、静脈内に(IV)、各種GLP-1/FDKP製剤およびGLP-1溶液の投与を受けた(図22A)。群5および6には15.8%GLP-1/FDKPを投与し、群11および12は、連続日に別の15.8%GLP-1/FDKPの投与を受け、群10には、対照としてGLP-1溶液が投与された。GLP-1/FDKPの濃度を、0、2、5、10、20、40、60、80、100および120分目の時点で検出した。すべての群は、静脈内投与後に血漿中GLP-1濃度の検出可能な上昇を示し、投与の2分後に最大濃度が認められた。血漿中の活性GLP-1濃度は、すべての群において、投与の20分後までに背景濃度に戻った。静脈内注射による投与の場合、GLP-1/FDKPおよびGLP-1溶液のこれらの各種製剤の動態に有意差は確認されなかった。静脈内注射により投与されたラットにおいて、血漿中GLP-1濃度は投与の10～20分後にベースライン濃度にまで戻り、これにより生理学的動態が示唆された(すなわち、約95%のGLP-1が10分以内に排出された)。20

## 【0171】

単回吸入投与：群1、2、3、7、8、9および12は、肺内吸入により各種GLP-1/FDKP製剤またはGLP-1溶液の投与を受けた(図22B)。群1には、肺内液体滴下注入(LIS)により80μgのGLP-1対照が投与され、群2には、肺内吸入(INS)により15.8%のGLP-1/FDKPが投与され、群3には、肺内吸入(INS)により3.8%のGLP-1/FDKPが投与され、群7には、肺内液体滴下注入(LIS)により80μgのGLP-1対照が投与され、群8には、肺内吸入(INS)により15.8%のGLP-1/FDKPが投与され、そして群9には、肺内吸入(INS)により3.8%のGLP-1/FDKPが投与された。GLP-1/FDKPの濃度を、0、2、5、10、20、40、60、80、100および120分目の時点で測定した。30

## 【0172】

すべての群は、肺内投与後に血漿中GLP-1濃度の検出可能な増加を示した。最大血漿中GLP-1濃度は、使用する製剤/組成物によって異なった。群2および8は、AUCによって示されるように、投与の10～20分後に最大GLP-1血漿中濃度を示したが、一方で群3および9は、5～10分後に有意レベルの活性GLP-1を示し、そして群1および7は、血漿中活性GLP-1濃度の急激且つ一時的な増加を示した。群2、3、7および8において、血漿中活性GLP-1濃度は、投与後60分までに背景濃度に戻ったが、一方で群1および7は、投与後20分までに背景濃度に達した。40

## 【0173】

8ナノモルのGLP-1が糖尿病ラットモデルにおいて有効であると思われ、GLP-1投与量は80μg(報告された有効投与量より3000倍大きい)であり、血漿中GLP-1濃度は、投与後の30分で、3時間の注入(Chelikaniら、2005)よりも肺内送達の方が10倍高く、肺内吸入によって送達されたGLP-1/FDKPの生物学的利用能は71%だった。これらの結果は、下記の表4でさらに報告する。肺内送達により投与された大部分のラットにおいて、血漿中GLP-1濃度は、投与の30～60分後にベース50

ライン濃度にまで戻った。群2の1体のラットを除いて、すべてのラットは、各種GLP-1/FDKP製剤の静脈内投与または肺内吸入の後、血漿中GLP-1濃度の上昇を示した。

【0174】

結論：GLP-1溶液よりもGLP-1/FDKP製剤の薬物動態プロファイルにおいて差が認められた。血漿中GLP-1濃度は、GLP-1溶液が投与されたラットよりも、肺内吸入によってGLP-1/FDKP製剤が投与されたラットにおいて、より維持された。すべての動物は、投与後20～60分の間に血漿中GLP-1濃度の漸進的低下を示した。これらの結果により、2日連続で実施された2回の実験において比較的整合性が認められた。

10

【0175】

【表3】

表4:GLP-1/FDKP製剤の生物学的利用能

群	製剤	GLP-1用量 ( $\mu$ g)/ $\mu$ M	経路	$T_{1/2}$ (分)	$T_{max}$ (分)	$C_{max}$ (pM)	投与 30分後 (~pM)	AUC (pM <sup>2</sup> 分/mL)
1	GLP-1	80/24	IIS	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

\*FDKP粒子と3:1で混合。

20

実施例8

GLP-1/FDKPはラットの食物摂取を減少させる

GLP-1はまた、満腹感の誘発や食物摂取の減少の機能を脳内で果たすことが当技術分野で知られている。満腹感や食物摂取の減少におけるGLP-1のこの役割に基づいて、本発明のGLP-1/FDKP製剤が摂食を減少させ、それにより肥満を制御することが可能になるための作用剤として効果的であったかどうかを決定するために実験を行った。

30

【0176】

雌性Sprague Dawleyラットの2つの群に、肺内吸入により、対照(空気)または2mg/日(0.32mg/投与のGLP-1)の投与量での15.8%GLP-1/FDKP製剤のいずれかを投与した。対照群は5体のラットからなり、試験群は10体のラットからなった。各ラットには5日間連続の単回投与が行われ、食物摂取は各投与の2時間後および6時間後であった。各ラットの体重を毎日測定した。

40

【0177】

予備データにより、投与の2時間後および6時間後に、GLP-1/FDKP製剤が投与されたラットの累積的な摂食量は、全体的に減少したことが示される(図23Aおよび23B)。その減少は、Day4の投与の2時間後により顕著になった( $p = 0.01$ )。Day1およびDay2の6時間目の減少がより顕著だった( $p < 0.02$ )。投与24時間後の摂食量に対する作用はなかった。

【0178】

実施例9

毒性試験

複数投与が行われた後、GLP-1/FDKPの毒性作用および毒物動態学プロファイルの可能性を評価するために、反復投与毒性試験を行った。ラットの14日間の試験、およ

50

びサルの28日間の試験を実施した。GLP-1/FDKPを、吸入経路により毎日投与する。動物に28日間投与した試験においては、一部の動物を投与計画直後に屠殺するが、一方で他の動物には、屠殺前に1カ月間の回復期間を与える。すべての動物は、臨床徵候、各種生理学的パラメーター（GLP-1、グルコース、インスリン、臓器重量、臨床病理学等）および各種臓器の組織病理について評価する。

#### 【0179】

一連のGLPの変異原性試験を、ジケトピペラジン粒子の変異原性の可能性を評価するために行った。これらの試験には、インビトロのエームス試験および染色体異常試験が含まれ、この両方とも当業者によく知られている。さらに、当業者に知られているようなインビボマウス小核試験も実施した。遺伝毒性データから、ジケトピペラジン粒子による変異原性の可能性も、遺伝毒性の可能性も、その証拠は認められなかった。

10

#### 【0180】

また、繁殖毒性に対するジケトピペラジン粒子の作用を評価するために試験を行った。これらの試験には、ラットおよびウサギの繁殖試験、胚・胎児の発育試験および生後発育試験が含まれた。皮下注射によって投与されるジケトピペラジン粒子は、ラットにおける受胎能も着床も損なわず、ラットやウサギにおける催奇形性の兆候はない。ジケトピペラジン粒子は、受胎能および初期胚発育、胎児の発育あるいは出生前または出生後の発育に悪影響を与えたなかった。

#### 【0181】

QT延長（LQT）症候群を引き起こす傾向があるために多くの医薬品が臨床的な市場から取り除かれたことから（後天性LQTsまたはQT延長症候群は、他の点では健康な人々に起こり得る心臓の電気的リズムのまれな遺伝性疾患である）、hERGアッセイを、ジケトピペラジン粒子の薬効を検討するために使用した。後天性LQTsを引き起こす大多数の医薬品は、心室活動電位の再分極の原因となるhuman ether-a-go-go関連遺伝子（hERG：ハーグ）のカリウムチャネルを遮断することによってそれを引き起こすことから、hERGアッセイを利用した。hERGアッセイからの結果は、ジケトピペラジン粒子について100μM超のIC<sub>50</sub>を示した。さらに、ジケトピペラジン粒子を使用した非臨床試験からの結果により、延長がイヌにおいて認められなかつたため（9カ月または安全性薬理の心血管系試験）、QTc間隔（心拍数補正QT時間間隔）に対する作用は示されなかつた。静脈内投与の場合は、安全性薬理コアパッテリーにおいて評価されたCNSまたは心血管系に対するジケトピペラジン粒子の作用はなかつた。

20

#### 【0182】

##### 実施例10

###### - 細胞集団に対するGLP-1の作用

GLP-1は、インスリン生合成におけるすべてのステップを促進し、細胞の成長および生存ならびに細胞の分化を直接刺激ことが知られている。これらの作用の組み合わせにより、細胞集団の増大が生じる。さらに、GLP-1受容体シグナル伝達により、細胞アポトーシスの減少が生じ、それにより、細胞集団の増大がさらにもたらされる。GLP-1は、3種の可能な経路（細胞の細胞増殖の増大、アポトーシスの抑制、導管上皮の推定上の幹細胞（putative stem cell）の分化）により細胞集団を調節することが知られている。

30

#### 【0183】

細胞集団に対するGLP-1の作用を示すために、Day 1、3および5にGLP-1/FDKPを細胞に投与し、未投与の細胞と比較した。文献（Sturisら、2003）に示唆される通り、活性GLP-1の投与によって、細胞集団が最大で2倍に増大した。さらに、糖尿病に対する各種GLP-1受容体（GLP-1R）アゴニストの作用の考察により、GLP-1Rアゴニストが糖尿病の発現または進行を予防するかまたは遅延させることが明らかになった。

40

#### 【0184】

細胞増殖、インスリンおよびグルコースに対するGLP-1/FDKPの作用を、雄

50

性ズッカーラット (ZDF) において評価した。動物は、毎日、3日間連続で、対照 (空気) か、15% (0.3mg) のGLP-1を含有する2mgのGLP-1/FDCKPかのいずれかの投与を受けた。腹腔内 (IP) 耐糖試験を実施し、血漿GLP-1およびグルコース解析のために、投与前、ならびに投与の15、30、45、60および90分後に血液試料を採取した。免疫組織化学によるインスリン分泌、細胞集団およびアポトーシスの解析のために臍組織を採取した。

#### 【0185】

IP耐糖試験 (IPGTT、図24) を、投与のDay4に実施した。動物は、夜間絶食後であるDay3に、腹腔内注射によりグルコースのボーラス投与を受け、その後すぐに肺内吸入により対照 (空気) またはGLP-1/FDCKPの投与を受けた。血液は、グルコース投与前および投与の90分後までの各種時点で採取した。投与の30分後において、群1では、投与前よりもグルコース濃度が47%増加したことが示されたが、群2 (GLP-1/FDCKP) では、投与前値よりもグルコース濃度が17%増加したことが示された。グルコース濃度は、対照動物よりも投与動物において、耐糖試験の後のすべての時点にわたって有意に低かった ( $p < 0.05$ )。

#### 【0186】

GLP-1濃度はまた、投与のDay3に測定した (図25)。群2の血漿内GLP-1濃度の最大濃度は、投与の15分後で10643pMだった。

#### 【0187】

さらに、インスリン濃度を、IP耐糖試験後のグルコース測定と共にDay3の各時点で測定した。対照 (空気) 群1および群2 (GLP-1/FDCKP) のどちらも、投与後15分目までに、それぞれ46%および30%の投与前値からのインスリン濃度の初期低下を示した (図26)。しかしながら、投与の30分後に、群1のインスリン濃度が投与前値の64%に低下し続けたのに対して、群2のインスリン濃度はベースラインに戻った。投与された動物において、45分、60分および90分でのインスリン濃度は、1.5%未満の偏差で、投与前の値に近かった。

#### 【0188】

インスリン免疫染色およびインスリン発現の顕微鏡評価のためにスライドを調製した。光学顕微鏡法によるインスリン発現の定量的評価に基づいて、インスリンを発現する臍島細胞の割合によって決定される通り、統計学的有意性は達成されなかったものの ( $p = 0.067$ )、用量関連の、雄性ZDFラットの臍臓内のインスリン発現に投与関連の増加が認められた。

#### 【0189】

また、ZDFラットの臍組織でアポトーシス解析を実施した。臍臓外分泌細胞および臍臓内分泌細胞を、TUNELアッセイ (Tornusciolo D.R.ら、1995) によって評価した。臍臓内の約10,000の細胞 (外分泌および内分泌) のスコアを記録した。大部分のTUNEL陽性細胞は外分泌だった。対照群に対する投与群のアポトーシス標識率に差はなかった。

#### 【0190】

さらに、細胞の増殖を、対照 (空気) またはGLP-1/FDCKPが、肺内吸入により3日間1日1回投与された糖尿病性肥満ズッカーラットの臍臓において評価した。免疫組織化学を用いたインスリンの共局在性およびKi67 (増殖マーカー) のためにスライドを調製した。細胞増殖の顕微鏡評価を、合計17体のZDFラットにおけるインスリン陽性臍島内および臍臓外分泌部において実施した。細胞増殖の定量的評価に基づいて、雄性ZDFラットにおける臍臓の臍島細胞または外分泌細胞内の細胞増殖に対する投与関連の作用は認められなかった。

#### 【0191】

全体として、本試験により、肺内吸入による2mgまたは0.3mgのGLP-1で投与されたGLP-1/FDCKPは、耐糖試験後に糖尿病性脂肪過多ラット (2型糖尿病のモデル) の血糖値を低下させ、臍島1個あたりのインスリン分泌細胞の数を増加させた。

10

20

30

40

50

## 【0192】

実施例11GLP-1/FDKP粒子製剤の調製

GLP-1/FDKP粒子製剤を調製するための代替方法も使用した。製剤は、以下の通りに調製した：1（重量）部のGLP-1を9部の脱イオン水に添加し、次いで少量の氷酢酸を添加して透明な溶液を得ることによって、10重量%のGLP-1原液を調製した。FDKP粒子（約10重量%の粒子）の懸濁原液を三つに分割した。適切な量のGLP-1原液を各懸濁液に添加して、乾燥粉剤中に5重量%および15重量%のGLP-1を有する目的の組成物が得られた。タンパク質溶液の添加後、懸濁液のpHは約3.5だった。次いで懸濁液を約pH4.4～4.5に調節し、その後、懸濁液を液体窒素中で小球形にして、次いで凍結乾燥して氷を除去した。 10

## 【0193】

粉剤の空気力学は、充填に基づく呼吸可能分画物（充填に基づくRF）、すなわちカートリッジ中の粉剤の量によって正規化された呼吸可能な範囲の粉剤の割合（%）を特徴としており、それは以下の通りに決定された：5つのカートリッジに手動で5mgの粉剤を充填し、MannKindのMedTone（登録商標）吸入器（米国特許出願第10/655,153号に記載）により排出した。

## 【0194】

この方法により、充填に基づく良好なRFを有する製剤を調製した。5重量%のGLP-1を有する粉剤は48.8%RF/充填であったが約15重量%のGLP-1を含有する粉剤は32.2%RF/充填だった。 20

## 【0195】

実施例12各種GLP-1濃度のGLP-1/FDKPの薬物動態

各種GLP-1濃度のGLP-1/FDKPの薬物動態学的特性を評価するために、体重が192.3グラム～211.5グラムの18体の雌性SDラットを対照群GLP-1（群1、n=3）およびGLP-1/FDKP製剤群（群2～4、n=5/群）の4つの投与群に分割した。動物は、以下の被験物質の内の1つの投与を受けた。肺内滴下注入による対照（空気）、肺内吸入による、5%のGLP-1（0.12mgのGLP-1）を含有する2.42mgのGLP-1/FDKP、10%のGLP-1（0.19mgのGLP-1）を含有する1.85mgのGLP-1/FDKP、または15%のGLP-1（0.37mgのGLP-1）を含有する2.46mgのGLP-1/FDKP。血液試料は、投与前および投与後の各時点（2、5、10、20、30、40および60分）に、血清FDKPおよび血漿GLP-1濃度のために採集および試験した。 30

## 【0196】

GLP-1/FDKP（5%製剤）の投与後の最大血漿中GLP-1濃度（C<sub>max</sub>）は、投与5分後のT<sub>max</sub>での2,321pM、投与（10%製剤）の10分後のT<sub>max</sub>での4,887pM、および投与（15%製剤）の10分後のT<sub>max</sub>での10,207pMだった。図27に示す通り、投与後30分まで有意なGLP-1濃度が認められた。GLP-1の曲線下面積（AUC）の値は、群1～4についてそれぞれ10622、57101、92606、227873pM<sup>\*</sup>分であった。GLP-1の推定半減期は、10%または15%のGLP-1負荷でのGLP-1/FDKPについて10分であった。 40

## 【0197】

図28に示す通り、最大FDKP濃度の測定値は、それぞれ5%、10%および15%のGLP-1でのGLP-1/FDKP製剤について、8.5μg/mL（群2）、4.8μg/mL（群3）および7.1μg/mL（群4）であった。最大濃度（T<sub>max</sub>）に至るまでの時間は10分だった。このデータにより、FDKPおよびGLP-1が同様の吸収動態を示し、粒子に対するGLP-1負荷とは無関係に同等量のFDKPが吸収されたことが分かる。

## 【0198】

全体的に、本試験によって、血漿中 G L P - 1 濃度は、S D ラットにおける肺内吸入による G L P - 1 / F D K P の単回投与後に有意水準で検出されたことが明らかになった。血漿中 G L P - 1 濃度の用量関連の増加は、投与約 10 分後に達成される最大濃度および投与 40 分後の観察可能 G L P - 1 濃度で認められた。すべての動物は、試験完了まで生存した。

【 0 1 9 9 】

実施例 1 3

肺内吸入により投与された G L P - 1 / F D K P の薬力学的特性

G L P - 1 / F D K P の薬力学的性質を評価するために、雌性 S p r a g u e D a w 1 e y ラットを 2 つの投与群に分割した。動物は、1 日 1 回の肺内吸入により、対照（空気； n = 5 ）または 15 % G L P - 1 ( 0 . 3 m g の G L P - 1 ) を含有する 2 m g の G L P - 1 / F D K P ( n = 1 0 ) のいずれかの投与を 4 日間連続で受けた。 10

【 0 2 0 0 】

摂食量を、4 日間連続で、投与前、投与の 1 、 2 、 4 および 6 時間後に、暗サイクル中で測定した（図 29）。摂食量は、D a y 1 、 2 および 3 において、肺内吸入による G L P - 1 / F D K P の 1 日 1 回の投与後に、対照（空気）群よりも投与動物において減少した（ p < 0 . 0 5 ）。D a y 1 の 1 時間目および 6 時間目の時点、および D a y 2 の 4 時間目および 6 時間目、および D a y 3 の投与前で、対照群（空気）よりも投与群の動物において摂食量の統計学的に有意な減少が認められた。 20

【 0 2 0 1 】

体重（図 30）を 4 日間連続で投与前に毎日測定した。投与開始時の体重は、約 180 ~ 209 グラムの範囲に及んだ。投与動物と対照（空気）動物との間の統計学的有意性に達しなかったが、体重は投与動物においてより小さかった。すべての動物は、予定の屠殺まで生存した。 20

【 0 2 0 2 】

実施例 1 4 ~ 1 6

毒物動態学（ T K ）試験

下記の実施例 1 4 ~ 1 6 は、G L P - 1 / F D K P 吸入粉剤の毒性作用の可能性および毒物動態学プロファイルを評価するためにラットおよびサルにおいて実施された反復投与毒性試験を示すものである。そのデータによって、臨床用に提案されるものより数倍大きな投与量の G L P - 1 / F D K P 吸入粉剤で明らかな毒性はないことが分かる。さらに、各々の種の中の雄性動物と雌性動物との間に差はないと思われる。 30

【 0 2 0 3 】

実施例 1 4

肺内吸入により 5 日間投与されたサルにおける G L P - 1 / F D K P の毒物動態学

1 日 1 回（1 日につき 30 分間）、5 日間連続のカニクイザル（ Macaca fascicularis ）への経鼻・経口投与（目的のヒト治療用投与経路）による G L P - 1 / F D K P の毒性および毒物動態学プロファイルを決定するために試験を実施した。経鼻・経口投与では、サルの口および鼻をマスクで覆い、30 分間試験製剤を吸い込ませた。 40

【 0 2 0 4 】

投与開始前の 14 日間は、動物を、拘束および投与方法に慣れさせた。投与開始時（ D a y 1 ）、雄性動物は、30 月齢 ~ 56 月齢、および体重が 2 . 3 ~ 4 . 0 k g であり、雌性動物は、31 月齢 ~ 64 月齢、および体重が 1 . 6 ~ 3 . 4 k g であった。10 体（雄性 5 体および雌性 5 体）の被投与（ non-naive ）カニクイザルを、下記の表 5 および 6 で示すように、5 つの群（1 群につき 2 体の動物）に割り当てた。被投与サルとは、テストする製剤が以前に投与された群体動物である。しかしながら、これらの製剤は、半減期が短く、本明細書で開示される投与実験中には存在しないか、サルに対するいかなる影響もないものと考えられる。動物は、対照（空気）、2 m g / k g の F D K P 、あるいは 0 . 3 ( 0 . 0 4 m g の G L P - 1 ) 、 1 . 0 ( 0 . 1 3 m g の G L P - 1 ) または 2 . 0 ( 0 . 2 6 m g の G L P - 1 ) m g / k g G L P - 1 / F D K P の投与を受けた。 50

【0205】

【表4】

表5:目標平均用量レベルおよび推定達成平均用量レベル(重量分析<sup>\*</sup>による決定)

群番号	群名称	推定用量レベル(mg/kg/日)					
		FDKP <sup>3</sup>		GLP-1 <sup>3</sup>		GLP-1/FDKP	
		目標 <sup>1</sup>	達成 <sup>2</sup>	目標 <sup>1</sup>	達成 <sup>2</sup>	目標 <sup>1</sup>	達成 <sup>2</sup>
1	空気対照	0	0	0	0	0	0
2	ピヒクル 対照	2.00	2.10	0	0	2.0	2.10
3	低用量	0.26	0.31	0.04	0.05	0.3	0.35
4	中用量	0.87	0.81	0.13	0.14	1.0	0.93
5	高用量	1.74	1.85	0.26	0.28	2.0	2.13

\*投与前、投与中および投与後において吸入チャンバー内の濾紙の重量を測定することにより重量分析を行い、チャンバー内のエアゾール濃度を算出し、投与期間を決定する。

<sup>1</sup>2.5kgの推定体重に基づく。

<sup>2</sup>測定体重(雄性および雌性の平均)に基づく。

<sup>3</sup>提示された目標用量レベルおよび達成用量レベルは、発生霧囲気中のGLP-1の割合が13%であると仮定する。全体の吸入投与量の推定は、気道内の沈着が100%であることを仮定した。

【0206】

【表5】

表6:目標平均エアゾール濃度および達成平均エアゾール濃度(重量分析\*による決定)

群番号	群名称	エアゾール濃度(mg/L)					
		FDKP <sup>1</sup>		GLP-1 <sup>1</sup>		GLP-1/FDKP	
		目標	達成	目標	達成	目標	達成
1	空気対照	0	0	0	0	0	0
2	ビヒクル対照	0.160	0.189	0	0	0.160	0.189
3	低用量	0.021	0.027	0.003	0.004	0.024	0.031
4	中用量	0.070	0.073	0.010	0.011	0.080	0.084
5	高用量	0.139	0.142	0.021	0.021	0.160	0.163

\*投与前、投与中および投与後において吸入チャンバー内の濾紙の重量を測定することにより重量分析を行い、チャンバー内のエアゾール濃度を算出し、投与期間を決定する。

<sup>1</sup>提示された目標エアゾール濃度および達成エアゾール濃度は、発生霧団気中のGLP-1の割合が13%であると仮定する。全体の吸入投与量の推定は、気道内の沈着が100%であることを仮定した。

全血試料(1.4mL/血液試料)をDay 5の以下の時点を得た：投与前、ならびに投与の10、30、45、60、90、120分後および4時間後。血液は、大腿静脈から静脈穿刺により採取した。血液試料を2つのアリコート(1つは血漿GLP-1解析(0.8mL)のため、もう1つ(0.6mL)は血清FDKP解析のため)に分割した。血漿GLP-1解析のために、各時点で全血(0.8mL)を1.3mLのEDTAチューブ(0.1%EDTA)に採取した。血液採取の約5~10秒後にDPP-IV阻害剤(Millipore、米国マサチューセッツ州ビルリカ)をチューブに添加した(10μL/mLの血液)(100μMのDPP-IVの濃度が得られる)。チューブを数回上下逆にし、水を含んだ氷上に直ちに置いた。全血試料を、遠心分離(約10分間、4000rpm(2~8))を行うまで水を含んだ氷上に保持し、血漿を得た。血漿試料を適切なバイアル内に移し、ドライアイス上に保持し、その後-70(±10)の冷凍庫中に保存した。血漿中濃度(C<sub>max</sub>)、T<sub>max</sub>、AUCおよびT<sub>1/2</sub>を、GLP-1について決定した。

## 【0207】

4日間連続のGLP-1/FDKPの吸入投与の後、GLP-1の検出可能な濃度がDay 5のすべての投与前試料において検出された。Day 5に、GLP-1の最高血漿中濃度(C<sub>max</sub>)は、用量の投与後約10分以内に達成された(図31)。

## 【0208】

用量の関数としての、GLP-1のC<sub>max</sub>およびAUC<sub>last</sub>(ゼロ時から最終の定量化可能な濃度時への濃度曲線下面積)の用量関連の増加は、Day 5に雄性および雌性の両方のサルに認められた。1mg/kg/日の用量濃度の雄性サルを除き、調査する用量範囲にわたり、雄性および雌性の両方のサルにおいて用量を増加させるにつれて、GLP-1のAUC<sub>last</sub>は、用量に比例した増加が認められなかった。0.3mg/kg/日から2.0mg/kg/日への6.7倍の用量の増加により、雄性のAUC<sub>last</sub>の2.9倍の増加、および雌性のAUC<sub>last</sub>の1.1倍の増加が生じただけであつ

10

20

30

40

50

た。

【0209】

それぞれ0.3、1.0、2.0mg/kg/日の用量濃度でGLP-1/FDKPを投与した場合、GLP-1の最高濃度の平均値は、雄性では17.2、93.1、214pg/mL、雌性では19.3、67.9、82.8pg/mLだった。4分～24分の明らかな排出半減期で、血漿中GLP-1濃度は急激に低下した。

【0210】

それぞれ0.3、1.0、2.0mg/kg/日の投与濃度でGLP-1/FDKPが投与された場合、GLP-1についてのAUC値は、雄性は21.6、105、62.3pg\*h/mLであり、雌性は33.4、23.7、35.4pg\*h/mLであった。

10

【0211】

最低用量濃度で観測されたGLP-1のTKパラメーターに、明らかな性別の差はなかった。しかしながら、雄性サルは、検討する中用量濃度および高用量濃度で、雌性サルより絶えず高いAUC<sub>1 ast</sub>値を示した。媒体対照および対照（空気）サルからのいくつかの試料は、GLP-1の測定可能な濃度を示した。これは、動物が吸入した空気の混入によって引き起こされたか、もしくはそれらの特定のサルの内在的なGLP-1濃度の量であったかもしれない。なお、対照動物は、GLP-1/FDKPが投与された動物とは異なる部屋の中で曝露を受けたという点に留意する必要がある。

【0212】

GLP-1の生物学的半減期は15分未満であることから、GLP-1/FDKPの投与からのGLP-1は、24時間以内に完全に排出されるはずである。それ故、GLP-1の内在性濃度は、すべてのGLP-1/FDKP投与動物においてDay5に採取されたゼロ時の試料中のGLP-1の濃度が一貫して定量可能であったことのもっともらしい説明であった。投与後のGLP-1の観察された濃度からゼロ時の値を減算することにより、GLP-1/FDKPの投与によるGLP-1の変化が反映される。

20

【0213】

血清FDKP解析のために、各時点で全血（0.6mL）を、抗凝固剤を含有しないチューブに採集し、少なくとも30分間室温で凝固させ、遠心分離によって分離して血清を得た。FDKP解析および血清中濃度（C<sub>max</sub>）、T<sub>max</sub>、AUC、T<sub>1/2</sub>を決定した。4日間連続のGLP-1/FDKPの吸入投与の後、Day5のすべての投与後の試料において検出可能な濃度のFDKPが認められた。Day5に、FDKPの最高血漿中濃度（C<sub>max</sub>）は、投与の約10～30分後に達成された。

30

【0214】

用量の関数としての、FDKPのAUC（外挿されたゼロ時から無限時までの濃度曲線下面積）の用量関連の増加は、Day5に雄性および雌性の両方のサルに認められた。しかしながら、雌性において、0.3mg/kg/日と1.0mg/kg/日との間にFDKPのAUCに差はなかったが、用量関連の増加は、1mg/kg/日と2mg/kg/日の間に示された。増加が認められたすべての例において、増加は用量に比例していなかった。0.3mg/kg/日から2.0mg/kg/日への6.7倍の用量の増加により、雄性のAUC<sub>1 ast</sub>の2.7倍の増加、および雌性のAUCの3.0倍の増加が生じた。それぞれ0.3、1.0、2.0mg/kg/日の用量濃度でGLP-1/FDKPを投与した場合、FDKPの最高濃度（C<sub>max</sub>）の平均値は、雄性では200、451、339ng/mL、雌性では134、161、485ng/mLであった。それぞれ0.3、1.0、2.0mg/kg/日の用量濃度でGLP-1/FDKPを投与した場合、FDKPのAUC値は、雄性では307、578、817ng·h/mL、雌性では268、235、810ng·h/mLであった。2.1mg/kg/日（群2）の用量でFDKPだけが投与された動物のAUCおよびC<sub>max</sub>の濃度は、T<sub>max</sub>が用量の投与の30～45分後に僅かに長かった例外はあるが、2.13mg/kg/日でGLP-1/FDKPが投与された動物と同じ桁位置であった。

40

【0215】

50

全体として、G L P - 1 / F D K P は、臨床徵候がなく、また体重、摂食量、臨床病理学パラメーター、肉眼評価または顕微鏡評価に対する影響もなく、忍容性は良好だった。また、1日30分間で5日間投与された最高2.13mg/kg/日(0.26mg/kg/日のG L P - 1の用量に相当)の推定達成用量でのカニクイザルへのG L P - 1 / F D K P の吸入投与は、いずれの用量制限毒性とも関連していなかったことも認められる。

#### 【0216】

##### 実施例15

###### 肺内吸入により14日間投与されたラットにおけるG L P - 1 / F D K P の毒物動態学

この試験は、14日間連続の肺内吸入による毎日の投与後のG L P - 1 / F D K P の毒性の可能性を評価したものである。ラットは、対照(空気)、10mg/kgのF D K P 粒子、1mg/kgのG L P - 1 / F D K P (0.15mgのG L P - 1)、3mg/kgのG L P - 1 / F D K P (0.45mgのG L P - 1)または10mg/kgのG L P - 1 / F D K P (1.5mgのG L P - 1)を、14日間連続で毎日の肺内吸入としてラットに投与した(n = 24/性別/群)。動物は、毒性の臨床徵候について毎日観察し、体重および摂食量も記録した。

#### 【0217】

Day 1 および 14 に、G L P - 1 の  $C_{max}$  は、すべての用量群における用量の投与後約 10 ~ 15 分以内に達成された。10mg/kg/日のG L P - 1 / F D K P でのG L P - 1 の最高濃度の平均は、雄性と雌性においてそれぞれ、Day 1 では 6714 pg/mL および 6270 pg/mL であり、Day 14 では 2979 pg/mL および 5834 pg/m だった。血漿中 G L P - 1 濃度は、0.7 時間から 4.4 時間の明らかな排出半減期で低下した。G L P - 1 の平均 AUC 濃度は、最高用量の 10mg/kg/日の G L P - 1 / F D K P において、雄性は 2187 pM<sup>\*</sup>h、雌性は 2703 pM<sup>\*</sup>h だった。G L P - 1 は、最小限の蓄積が認められたか、もしくはその蓄積が認められず、 $C_{max}$ 、半減期および  $T_{max}$  に性別による差はなかった。G L P - 1 の AUC 値は、すべての用量にわたって雄性ラットよりも雌性ラットでやや高かった。肺内吸入により 14 日間連続で G L P - 1 / F D K P が投与されたラットにおける無毒性量 (NOAEL) は、10mg/kg/日のG L P - 1 / F D K P (1.5mg/kg/日のG L P - 1) だった。

#### 【0218】

最終投与の約 24 時間後に動物(12/性別/群)を屠殺し、臨床病理検査、肉眼評価および顕微鏡評価を実施した。毒物動態(TK)付隨動物(12/性別/群)を、最終的な血液採取後の投与の Day 14 に屠殺した。G L P - 1 / D K P に関連した死亡および臨床的所見はなかった。対照動物と投与動物との間に体重および摂食量の差はなかった。雌性の 10mg/kg の G L P - 1 / F D K P のみで、肝重量および体重に対する肝臓の比は、対照(空気)群よりも有意に低かった。

#### 【0219】

媒体を投与されたラットと空気対照を投与されたラットとの間に、血液学的検査、凝固系検査、化学的検査、尿分析または尿化学検査についての結果から示される明確な差はなかった。G L P - 1 / F D K P の投与による潜在毒性を有することを測定した組織に、肉眼的所見や組織病理学的所見はなかった。

#### 【0220】

##### 実施例16

###### サルの肺内吸入により28日間投与されたG L P - 1 / F D K P の毒物動態学

この試験は、少なくとも 4 週間、吸入により毎日投与された G L P - 1 / F D K P の毒性および毒物動態学を評価したものである。作用の可逆性、持続性または遅延性の発現を評価するために、4 週間の回復期間を設けた。

#### 【0221】

動物は、以下投与の内の 1 つの投与を受けた：群 1：対照(空気)、群 2：3.67mg/kg/日のF D K P 粒子、群 3：0.3mg/kg/日のG L P - 1 / F D K P (0

10

20

30

40

50

. 0 4 5 mg / kg / 日の G L P - 1 )、群 4 : 1 mg / kg / 日の G L P - 1 / F D K P ( 0 . 1 5 mg / kg / 日の G L P - 1 )、または群 5 : 2 . 6 mg / kg / 日の G L P - 1 / F D K P ( 0 . 3 9 mg / kg / 日の G L P - 1 )。4 2 体のカニクイザルを 2 群に分けた：主要試験 ( n = 3 / 性別 / 群 ) および群 1 、 2 および 5 の回復 ( n = 2 / 性別 / 群 ) 。群 1 : 空気対照、群 2 : F D K P ( 約 4 mg / kg / 日 ) 、群 3 : 0 . 3 mg / kg / 日の G L P - 1 / F D K P ( 低用量 ) 、群 4 : . 0 mg / kg / 日の G L P - 1 / F D K P ( 中用量 ) 、群 5 : 2 . 6 mg / kg / 日の G L P - 1 / F D K P ( 高用量 ) 。通常通り、サル試験においては、高用量および対照のみを回復期に評価した。

#### 【 0 2 2 2 】

動物を、死亡率および羅病率について 1 日 2 回観察し、そして少なくとも 1 日 1 回、異常および毒性の徵候について投与の 30 分後に観察した。体重データを毎週収集し、質的な摂食状態について毎日評価した。血液を、 Day 1 、 28 、 56 に毒物動態学について採集した。3 体の動物 / 性別 / 群については、 Day 29 に麻酔をかけ、体重を測定し、全血を採取し、次いで剖検を行った。群 1 、 2 、 5 ( n = 2 / 性別 / 群 ) の残りの動物については、 Day 57 に麻酔をかけ、重量を測定し、全血を採取し、次いで剖検を行った。剖検において、選択した臓器の重量を測定し、選択した組織を集めて保存した。各動物からのすべての組織は、顕微鏡による検査を行った。

#### 【 0 2 2 3 】

すべての群にわたって体重の変化が認められる場合があったが、体重に対する投与関連の作用は認められなかった。一般に、すべての動物は、試験期間を通して体重を維持したか、もしくは軽微な体重増加が生じた。軟らかい糞便または液状の糞便の発現率および頻度は、高用量でより高くなることが認められた。 Day 29 ( 投与最終日 ) の高用量の雌の乳酸脱水素酵素 ( L D H ) およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ ( A S T ) の中程度の増加を除いて、投与に関連すると考えられる臨床化学パラメーターで示される有意な変化はなかった ( 表 7 参照 ) 。また、 L D H の濃度は、雄性においてはほとんど上昇しなかった。これらの変化は、回復期間終了時までに消失し、肝臓におけるいずれの顕微鏡的所見とも相關していなかった。高用量雌性群の A S T 濃度の変化は、主に 5 体の動物の内の 1 匹によるものであった。

#### 【 0 2 2 4 】

10

20

【表6】

表7:ALT、ASTおよびLDHの平均変化率(%)

群	平均値の変化率(%)		
	ALT (U/L)	AST (U/L)	LDH (U/L)
雌性			
1. 対照	-2	52	-9
2. 3.67 mg/kg/日 FKDP	-13	-34	-53
3. 0.3 mg/kg/日 GLP-1/FKDP	-11	53	-14
4. 1.0 mg/kg/日 GLP-1/FKDP	-15	9	-11
5. 2.6 mg/kg/日 GLP-1/FKDP	32	422	117
雄性			
1. 対照	-16	-42	-62
2. 3.67 mg/kg/日 FKDP	14	60	-6
3. 0.3 mg/kg/日 GLP-1/FKDP	24	168	69
4. 1.0 mg/kg/日 GLP-1/FKDP	49	32	7
5. 2.6 mg/kg/日 GLP-1/FKDP	-16	30	6

2.6 mg/kg/日のGLP-1/FDKPまでの用量濃度において、いずれの投与関連の肉眼的变化や組織学的变化の形跡も認められなかった。GLP-1/FDKPは、著しい臨床徵候や、体重、摂食量、血液学的検査、尿分析、インスリン解析、検眼鏡検査、ECG、2.6 mg/kg/日までのGLP-1/FDKP(0.39 mg/kg/日のGLP-1)の用量で認められる肉眼的变化や顕微鏡的变化に対する作用が認められず、忍容性は良好だった。また、1日最高30分間の28日間の最高3.67 mg/kg/日の推定達成用量でのFDKPの吸入投与は、いかなる毒性とも関連していなかった。

## 【0225】

用量の関数としてのGLP-1およびFDKPのC<sub>max</sub>およびAUC<sub>last</sub>の用量関連の増加が、Day1の雄性および雌性のサルにおいて認められた。検討された用量範囲にわたり、AUC<sub>last</sub>ではなくGLP-1のC<sub>max</sub>において、Day28に雄性および雌性の両方のサルの用量を増加させるにつれて、用量に比例した増加が認められなかった。2.6 mg/kg/日のGLP-1/FDKPのGLP-1の最高血中濃度の平均値は、雄性で259 pg/mLおよび雌性で164 pg/mLだった。血漿中GLP-1濃度は、0.6時間から2.5時間の排出半減期で、低下した。高用量の場合、GLP-1についての平均AUC値は、雄性で103 pg\*hr/mLおよび雌性で104 pg\*hr/mLだった。低用量の場合、AUC値およびC<sub>max</sub>値については、雌性サルの方が雄性サルよりも高い値を示した。2.6 mg/kg/日のGLP-1/FDKPでのFDKPの最高濃度の平均値は、雄性で1800 ng/mLおよび雌性で1900 pg/mLだった。

## 【0226】

結論として、1日最高30分間で28日間投与された最高2.6 mg/kg/日のGLP-1/FDKPまたは0.39 mg/kg/日のGLP-1の推定達成用量でのカニクイザルへのGLP-1/FDKPの吸入投与は、臨床的に忍容性は良好だった。NOAELは、2.6 mg/kg/日のGLP-1/FDKP(0.39 mg/kg/日のGLP-1)だった。下記の実施例19にて説明するように、第I相試験の最大ヒト用量は、1日につき1.5 mgのGLP-1/FDKPまたは約0.021 mg/kgのGLP-1

10

20

30

40

50

(70Kgのヒトを仮定する)となる。さらなる試験の用量は、1日につき3.0mgのGLP-1/FDKPまたは約0.042mg/kgのGLP-1となる。

【0227】

実施例17

エキセンジン/FDKP製剤の調製

エキセンジン-4/FDKPを、酸性エキセンジン-4ペプチド(配列番号3)溶液をFDKP粒子懸濁液と混合することにより調製した。酸性ペプチド溶液は、2%酢酸に10%(w/w)のペプチドが溶解していた。FDKP懸濁液は、約10%(w/w)のFDKP粒子を含有していた。酸性エキセンジン-4ペプチド溶液を、徐々に混合するようFDKP粒子懸濁液に添加した。エキセンジン-4/FDKP混合物を25%のアンモニア溶液でpH4.50に徐々に滴定した。次いで混合物を液体窒素中で小球形にして、凍結乾燥した。

【0228】

15%エキセンジン-4/FDKP粉剤についての充填に基づくパーセント呼吸可能分画物(充填に基づくパーセントRF)の含有率は36%であり、カートリッジの排出率が99%だった。同様の比率で調製した15%GLP-1/FDKP粉剤は、34%の充填に基づくパーセントRFを示し、カートリッジの排出率が100%だった。

【0229】

実施例18

肺内吸入により投与されたエキセンジン/FDKPの薬物動態

20

各種濃度のエキセンジン-4/FDKP製剤における、肺内経路を経た複数回投与後のエキセンジン-4(GLP-1類似体)の薬力学的および薬物動態プロファイルを検討するための反復投与予備的毒性試験が進行中である。

【0230】

ラットおよびサルの28日間の試験を実施する。エキセンジン/FDKPは、吸入経路により毎日投与する。動物に28日間の投与を行う試験において、一部の動物は投与計画の直後に屠殺するが、他の動物には、屠殺前に最高1ヵ月間の回復期間を設ける。すべての動物は、毒性の臨床徴候や、エキセンジン-4、グルコース、インスリンの血液濃度を含む各種生理学的パラメーターや、臓器重量、各種臓器の臨床病理検査および組織検査について評価する。

30

【0231】

最初の試験群は、2つの対照群を有する1群につき5体の動物からなり、空気およびエキセンジンが静脈内投与される。肺内吸入群が6群あり、5%、10%、15%、20%、25%および30%のエキセンジン負荷(w/w)でエキセンジン/FDKPの約2.0mgの用量を投与した。8時間目の時点まで血糖濃度およびエキセンジン濃度について全血を採集した。

【0232】

データ( $C_{max}$ 、 $T_{1/2}$ 、 $T_{max}$ )を収集し、それにより、エキセンジン/FDKP製剤がGLP-1/FDKPと同等かもしくは良好な薬物動態を有することを実証する。

40

【0233】

実施例19

肺内吸入により投与されたラットにおけるGLP-1/xDKPの薬物動態

異なるDKPがGLP-1/FDKP製剤の薬物動態プロファイルに影響を及ぼし得るのかどうかを決定するために、各種GLP-1/xDKP製剤を、本明細書と同日付で出願された" Asymmetrical FDKP Analogs for Use as Drug Delivery Agents"という名称の米国仮特許出願(その全体が本明細書に組み込まれる(米国代理人側整理番号51300-00041))に開示されたように調製した。

【0234】

試験は、1群につき5体の動物からなる6投与群に分割されたラットで実施した。対照

50

群 (n = 3) には、液体滴下注入により G L P - 1 を投与した。また、G L P - 1 / F D K P (0.3 mg の G L P - 1) を肺内吸入により投与し、第 2 対照として使用した。G L P - 1 / x D K P 投与群の各群には、10% および 15% の G L P - 1 を負荷した約 2.0 mg 用量の x D K P で、肺内吸入により G L P - 1 / x D K P 製剤を投与した。使用した x D K P は、((E)-3-(4-(3,6-ジオキソピペラジン-2-イル)ブチルカルバモイル)アクリル酸)、(3,6-ビス(4-カルボキシプロピル)アミドブチル-2,5-ジケトピペラジン) および ((E)-3,6-ビス(4-(カルボキシ-2-プロペニル)アミドブチル)-2,5-ジケトピペラジンジナトリウム塩) の負荷物であった。全血を、投与の 5、10、20、30、45、60 分後および最高 90 分後に G L P - 1 濃度の評価のために採集した。

10

### 【0235】

#### 実施例 20

##### 健康な成人男性被験者における G L P - 1 / F D K P 吸入粉剤の第 1 a 相、単回、非盲検、漸増用量、比較対照安全性および忍容性試験

G L P - 1 は、静脈内 (i.v.) または皮下 (s.c.) 注入によって、あるいは複数の皮下注射によって投与される場合、ヒトの高血糖を制御することが示されている。ホルモンの半減期が極めて短いため、連続皮下注入または複数の毎日の皮下注射が必要とされる。これらの経路のいずれも、長期にわたる臨床用途としては実際的ではない。動物の実験により、G L P - 1 が吸入により投与される場合は治療レベルが達成され得ることが明らかになった。

20

### 【0236】

G L P - 1 の作用のいくつかには、胃排出の減少や、満腹感の上昇、不適切なグルカゴン分泌の抑制が含まれ、食事の開始時に放出される G L P - 1 の群発と関連があると思われる。G L P - 1 のこの早期の急増を G L P - 1 / F D K P 吸入粉剤で補うことにより、糖尿病動物の薬力学的反応を誘発することができる。さらに、インスリン分泌の増加に関連する天然の G L P - 1 の後期の急増は、G L P - 1 / F D K P 吸入粉剤の食後投与によって模倣することができる。

### 【0237】

G L P - 1 / F D K P 吸入粉剤の第 1 a 相臨床試験は、ヒト被験者で初めての新規な吸入血糖コントロール治療用産物の選択用量の安全性および忍容性をテストするように設計される。投与には、以前にテストされた MedTone (登録商標) 吸入器を使用する。この臨床試験の主要な目的は、安全で、忍容性があり、且つ有効性および安全性の証拠を確立するためのさらなる臨床試験に使用可能な肺内吸入によって、G L P - 1 / F D K P 吸入粉剤の用量の範囲を同定することである。第 1 a 相臨床試験のために選択する用量は、ラットおよび靈長類の、上記の実施例に記載された G L P - 1 / F D K P 吸入粉剤の非臨床試験からの動物での安全性の結果に基づく。

30

### 【0238】

26 人の被験者は 5 つのコホートに組み入れられ、その内で、コホート 1 および 2 の各群の最高で 4 人の評価可能な被験者、ならびにコホート 3 ~ 5 の各群の最高で 6 人の評価可能な被験者が、適格基準を満たし、臨床試験を完了した。各被験者には、以下の投与濃度で、G L P - 1 / F D K P 吸入粉剤としてグルカゴン様ペプチド 1 (G L P - 1) が 1 回投与された：コホート 1 : 0.05 mg、コホート 2 : 0.45 mg、コホート 3 : 0.75 mg、コホート 4 : 1.05 mg、およびコホート 5 : 1.5 mg の G L P - 1。脱落の補充は行わなかった。これらの投与量では、体重を 70 kg と仮定する。当業者は、上記で開示された試験に基づいて、さらなる投与量濃度を決定することができる。

40

### 【0239】

この試験の目的は、健康な成体男性被験者の G L P - 1 / F D K P 吸入粉剤の漸増投与の安全性および忍容性を決定することである。変数に対する薬理学的作用または有害作用をモニターすることによって決定される G L P - 1 / F D K P 吸入粉剤の漸増投与の忍容性が評価され、その変数としては、報告された有害事象 (A E) や、バイタルサイン (vital signs) が評価される。

50

tal signs)、理学的検査、臨床検査、心電図( E C G )が挙げられる。

【 0 2 4 0 】

第2の目的は、さらなる安全性および薬物動態パラメーターを評価することである。これらにはさらなる安全性パラメーターが含まれ、それには、肺および他のA Eの発現率や、1回目の来院(スクリーニング)と3回目の来院(フォローアップ)との間の肺機能の変化; A U C <sub>0 - 1 2 0 ( m i n )</sub> の血漿G L P - 1 および A U C <sub>0 - 4 8 0 m i n</sub> の血清F D K P により測定される、G L P - 1 / F D K P 吸入粉剤の投与後の血漿G L P - 1 および血清フマリルジケトピペラジン( F D K P )の薬物動態学的( P K )パラメーターが含まれ、血漿G L P - 1 のさらなる P K パラメーターとしては  $t_{m a x}$  血漿G L P - 1 、  $C_{m a x}$  血漿G L P - 1 および  $T_{1 / 2}$  血漿G L P - 1 等が挙げられる。血清F D K P のさらなる P K パラメーターとしては、 $T_{m a x}$  血清F D K P 、  $C_{m a x}$  血清F D K P および  $T_{1 / 2}$  血清F D K P が挙げられる。  
10

【 0 2 4 1 】

試験の評価項目は、試験の被験者集団において決定される以下の薬理学的パラメーターおよび安全性パラメーターの比較に基づく。主要評価項目としては、以下のものが挙げられる。安全性評価項目は、報告されたA Eの発現率および重症度に基づいて評価され、その項目としては、咳嗽および呼吸困難、恶心および/または嘔吐、ならびにスクリーニング時からのバイタルサイン、臨床検査値、理学検査値の変化が挙げられる。2次の評価項目としては、血漿G L P - 1 および血清F D K P ( A U C <sub>0 - 1 2 0 ( m i n )</sub> の血漿G L P - 1 および A U C <sub>0 - 4 8 0 m i n</sub> の血清F D K P ) の P K 素因; 血漿G L P - 1 のさらなる P K パラメーター(  $T_{m a x}$  血漿G L P - 1 、  $C_{m a x}$  血漿G L P - 1 、  $T_{1 / 2}$  血漿G L P - 1 ) ; 血清F D K P のさらなる P K パラメーター(  $T_{m a x}$  血清F D K P 、  $C_{m a x}$  血清F D K P ) ;さらなる安全性パラメーター( 肺機能検査( P F T ) ) や E C G が挙げられる。  
20

【 0 2 4 2 】

第1a相単回投与試験は、非盲検の漸増投与構造および設計戦略を組み込むものであって、それは、治験薬( I M P )の安全性および忍容性を決定するための 2 1 C F R 3 1 2 、医薬品の臨床試験の実施に関する基準( Good Clinical Practice ) : 統合されたガイドンス( Consolidated Guidance ) ( I C H - E 6 ) および臨床試験の一般指針( Guidance on General Considerations for Clinical Trials ) ( I C H - E 8 )についてのガイドンスに合致している。  
30

【 0 2 4 3 】

臨床試験は、3回の病院来院からなる：1) 1回のスクリーニング来院(1回目の来院)、2) 1回の投与来院(2回目の来院)、および3)来院2の8~14日後の1回のフォローアップ来院(3回目の来院)。G L P - 1 / F D K P 吸入粉剤の単回投与は、2回目の来院時に行われる。

【 0 2 4 4 】

この臨床試験は、各コホートの安全性パラメーターを評価する。次の用量濃度が投与される予定のコホートは、1回目または前の用量についてのすべての安全性および忍容性データの検討が治験総括医師( P I )によって実施されるまでは、投与されない。被験者の安全性を確保するために、半時間の投与遅延時間が各コホートの被験者間で設けられる。コホートの中の3人以上の被験者が重度の恶心および/または嘔吐を発現するか、もしくは最大投与量に達した場合、あるいは P I の判断で、投与を中止することができる。  
40

【 0 2 4 5 】

G L P - 1 / F D K P 吸入粉剤の5種の用量( 0 . 0 5 、 0 . 4 5 、 0 . 7 5 、 1 . 0 5 および 1 . 5 m g の G L P - 1 )を評価する。すべての用量に対応するために、調製した G L P - 1 / F D K P は、F D K P 吸入粉剤と混合する。そのまままたは適切な量の F D K P 吸入粉剤と混合し、G L P - 1 / F D K P 吸入粉剤( G L P - 1 / F D K P の重量に対して 1 5 % の重量)からなる 1 0 m g の乾燥粉末を含有する単回投与カートリッジを用いて、G L P - 1 の所望の用量( 0 . 0 5 m g 、 0 . 4 5 m g 、 0 . 7 5 m g 、 1 . 0 50

5 mg、1.5 mg)を得る。1.最初の2つの最低投与濃度を各4人の被験者の2つのコホートで評価し、3つの高用量濃度を各6人の被験者の3つのコホートで評価する。各被験者は、評価すべき5種の投与濃度の内の1種で、1回のみの投与を受ける。GLP-1(活性および全体)およびFDKPの測定値のための採血に加えて、試料を、グルカゴン、グルコース、インスリンおよびC-ペプチドの決定のために採取する。

【0246】

特許および印刷刊行物への数多くの参照が本明細書の全体にわたってなされている。上記の引用文献および印刷刊行物は、その全体が個別に参照により本明細書に組み込まれる。

【0247】

特に明記しない限り、明細書および特許請求の範囲で使用される、成分の量、分子量等の性質、反応条件、その他を表すすべての数は、「約」という用語によりすべての事例において変更されるものと理解される。従って、そうでないと明記されない限り、以下の明細書および添付の請求の範囲に記載される数値的パラメーターは、本発明により得られる筈の所望の特性に応じて変化し得る近似値である。最低限でも、均等論の適用を特許請求の範囲に制限しようとするものとしてではなく、各数値的パラメーターは、少なくとも報告された有効数字の数に鑑み、そして通常の丸めの手法を適用することによって解釈されなければならない。本発明の幅広い範囲を記載する数値の範囲およびパラメーターは近似値であるにも関わらず、具体例に記載される数値はできるだけ正確に報告している。しかしながら、いかなる数値も、本質的に、それぞれの試験測定値に認められる標準偏差から必然的に生じる特定の誤差を含むものである。

【0248】

本発明の範囲および精神を逸脱することなく、本明細書に開示される本発明に対して様々な態様および変更をなすことができるということは、当業者には容易に明らかである。

【0249】

本明細書で使用される場合、「1つの」(「a」または「an」)という語の使用が、請求の範囲および/または明細書で「含む (comprising)」という用語と共に使用される場合、「1つ」を意味し得るが、それはまた、「1つ以上」、「少なくとも1つ」および「1つまたは2つ以上」の意味にも一致する。

【0250】

本願明細書に記載されるいかなる方法または組成物も、本明細書に記載される他の方法または組成物に関して実施し得るものと考えられる。

【0251】

請求項における「または」という用語の使用は、明示的に代替物だけを意味することを示していない限り、あるいは代替物が互いに矛盾しない限り「および/または」を意味するために用いられる。

【0252】

本出願の全体にわたって、「約」という用語は、値が、その値を決定するために使用される装置または方法の誤差の標準偏差を含むことを示すために用いられる。

【0253】

他の本発明の目的、特徴および利点は、上記記述および実施例ならびに特許請求の範囲から明らかとなるであろう。しかしながら、本発明の精神および範囲の中の様々な改変と変更がこの詳細な説明から当業者に明らかとなるので、詳細な説明および具体例は、本発明の特定の態様を示すと共に、例示目的として提供されているということを理解すべきである。

【0254】

参考文献

以下の参考文献は、本明細書に記載されるものに対する例示的な手順または他の詳細の補足となる程度まで、本明細書に参照により具体的に組み込まれる。

【0255】

10

20

30

40

50

- Chelikani PKら、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
- D'Alessioら、*J. Clin. Invest.*, 97:133-38, 1996
- Deacon CF: Therapeutic strategies based on glucagon-like peptide 1. *Diabetes.* Sep;53(9):2181-9, 2004
- Eisseleら、*Life Sci.*, 55:629-34, 1994
- Gokeら、*J. Biol. Chem.* 268:19650-55, 1993
- Johnson JDら、RyR2 and calpain-10 delineate a novel apoptosis pathway in pancreatic islets. *J Biol Chem.*, 279(23):24794-802, 2004 10
- Malhotra, R.ら、*Regulatory Peptides*, 41:149-56, 1992
- Mentlein Rら、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
- Montrose-Rafizadehら、*Diabetes*, 45(Suppl. 2):152A, 1996
- Nauck MAら、Normalization of fasting hyperglycemia by exogenous GLP-1 (7-36 amide) in type 2 diabetic patients. *Diabetologia*, 36:741 -744, 1993
- Nauck MAら、Effects of subcutaneous glucagon-like peptide 1 (GLP-1 [7-36 amide]) in patients with NIDDM. *Diabetologia*, 39:1546 -1553, 1996 20
- Nauck MAら、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
- Raufmanら、*J. Biol. Chem.* 267:21432-37, 1992
- Raufmanら、*J. Biol. Chem.* 266:2897-902, 1991
- Scheppら、*Eur. J. Pharmacol.*, 69:183-91, 1994
- Singhら、*Regul. Pept.* 53:47-59, 1994
- Sturis Jら、*British Journal of Pharmacology*, 140,123 .132, 2003
- Tornusciolo D.R.ら、*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 30
- Verdich Cら、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
- Wang Qら、Glucagon-like peptide-1 regulates proliferation and apoptosis via activation of protein kinase B in pancreatic INS-1 beta cells. *Diabetologia*, 47:478 -487, 2004
- Wangら、*J. Clin. Invest.*, 95:417-21, 1995
- Zander Mら、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 40
- 【図面の簡単な説明】
- 【0 2 5 6】
- 【図1 - 1】図1 A : G L P - 1 の遠紫外円偏光二色性 ( C D ) は、濃度が増加するにつれて、ペプチドの2次構造が、大部分が構造化されていない立体配座からヘリカル構造に変化することを示す。図1 B : 近紫外 C D は、ペプチドの濃度の増加と共に3次構造が増大することを示し、それは G L P - 1 が自己会合することを示唆している。
- 【図1 - 2】図1 C : 2 8 0 nmでのトリプトファンの励起により生じる各種濃度 ( pH 4、2 0 ) の G L P - 1 の蛍光放射。図1 D : 各種濃度 ( pH 4、2 0 ) における G 50

L P - 1 の透過型 F T I R 。

【図 2 - 1】図 2 A : 1 . 0 m g / m L の G L P - 1 の遠紫外 C D は、塩の濃度が増加すると、 G L P - 1 の不規則構造がより規則的な - ヘリックス構造に変わることを示している。図 2 B : 1 . 0 m g / m L のペプチドの近紫外 C D は、 N a C 1 濃度の増大によっても G L P - 1 の 3 次構造が増大することを示す。

【図 2 - 2】図 2 C : 2 8 0 n m でのトリプトファンの励起後の各種の N a C 1 濃度 ( p H 4 、 2 0 ) における 1 . 0 m g / m L の G L P - 1 の内部蛍光放射。図 2 D : 各種イオン強度 ( p H 4 、 2 0 ) での 1 0 m g / m L の G L P - 1 の 3 次構造解析。

【図 3 - 1】図 3 A : 近紫外 C D は、温度の上昇と共に G L P - 1 オリゴマーが分離することを示している。図 3 B : 各種温度 ( p H 4 ) における 1 0 m g / m L の G L P - 1 の構造解析。 10

【図 3 - 2】図 3 C : 各種温度 ( p H 4 ) における 0 . 0 5 m g / m L の G L P - 1 の構造解析。

【図 4】図 4 A : 各種 p H ( 2 0 ) での 1 0 m g / m L の G L P - 1 の遠紫外 C D 。図 4 B : p H 7 . 6 におけるスペクトルの増大により、濃度の低下の結果として G L P - 1 の 2 次構造が不規則になることが明らかにされる。

【図 5】図 5 。 H P L C によって示されるアミド分解および酸化に対する 1 m g / m L の G L P - 1 の耐性。

【図 6】図 6 A ~ 6 B 。 1 . 5 および 9 . 4 m g / m L の G L P - 1 ( p H 4 ) の 3 次構造における攪拌の効果。近紫外 C D ( 図 6 A ) および G L P - 1 の蛍光放射 ( 図 6 B ) は、両方とも、 G L P - 1 ペプチドの 3 次構造が、攪拌のためには有意に変化しないことを示している。 20

【図 7 - 1】 1 . 6 、 5 . 1 および 8 . 4 m g / m L の G L P - 1 ( p H 4 ) の 3 次構造に対する 1 0 回の凍結融解サイクルの効果。近紫外 C D ( 図 7 A ) および G L P - 1 の蛍光放射 ( 図 7 B ) は、両方とも、ペプチドの 3 次構造が、複数の凍結融解サイクルにより顕著に変化しないことを示す。

【図 7 - 2】遠紫外 C D による 1 0 m g / m L の G L P - 1 ( p H 4 ) の 2 次構造に対する 1 1 回の凍結融解サイクルの効果を示す同様の実験を実施した ( 図 7 C ) 。

【図 8】塩の試験。 p H および N a C 1 濃度の関数としての G L P - 1 / F D K P についての負荷曲線 ( 図 8 A ) 。図 8 B : p H および N a C 1 濃度の関数としての、再組成された、 F D K P を含まない対照試料において検出された G L P - 1 の量を表す。 30

【図 9】界面活性剤の試験。 p H および界面活性剤の関数としての G L P - 1 / F D K P についての負荷曲線 ( 図 9 A ) 。図 9 B : p H および添加された界面活性剤の関数としての、再組成された F D K P を含まない対照試料において検出された G L P - 1 の量を表す。

【図 10 - 1】イオンの試験。 p H およびイオンの関数としての G L P - 1 / F D K P についての負荷曲線。負荷は、 5 m g / m L の F D K P および 0 . 2 5 m g / m L の G L P - 1 で行った ( 図 10 A および 10 C ) 。

【図 10 - 2】図 10 B および 10 D : p H 、イオンおよび 1 M の N a C 1 の関数としての、再組成された、 F D K P を含まない対照試料において検出された G L P - 1 の量を表す。 40

【図 11】オスモライトの試験。一般の安定剤の存在下での p H の関数としての G L P - 1 / F D K P についての負荷曲線 ( オスモライト ; 図 11 A ) 。図 11 B : p H およびオスモライトの関数としての、再組成された、 F D K P を含まない対照試料において検出された G L P - 1 の量を表す。

【図 12 - 1】カオトロープ / リオトロープの試験。 p H 3 . 0 ( 図 12 A ) および p H 4 . 0 ( 図 12 C ) でのカオトロープまたはリオトロープの濃度の関数としての G L P - 1 / F D K P についての負荷曲線。

【図 12 - 2】図 12 B および 12 D : 各種のカオトロープまたはリオトロープの存在下における、 p H の関数としての、再組成された、 F D K P を含まない対照試料において検 50

出されたG L P - 1の量を表す。

【図13】アルコールの試験。pHおよびアルコールの関数としてのG L P - 1 / F D K Pについての負荷曲線。4種のアルコール濃度(各5%v/v、10%v/v、15%v/vおよび20%v/vのアルコール)について評価した(図13A)。図13B:pHおよびアルコール(20%)の関数としての、再組成された、F D K Pを含まない対照試料について検出されたG L P - 1の量を表す。

【図14-1】図14A。G L P - 1 / F D K P濃度試験からの負荷。

【図14-2】図14B。複数のG L P - 1 / F D K P製剤の走査型電子顕微鏡(SEM)画像(10000×の拡大倍率)。

【図15】図15。複数のG L P - 1 / F D K P製剤に対するストレスの効果を表す。

10

【図16-1】図16A。G L P - 1のグリシル化形態(配列番号1)およびアミド化形態(配列番号2)を表す。

【図16-2】図16B:アプロチニンによるD P P I V活性の阻害。図16C:D P P I V阻害剤によるD P P I V活性の阻害。

【図17】図17。肺洗浄液におけるインキュベーション後のG L P - 1の検出。

【図18】血漿中のG L P - 1の定量化を表す。図18Aは、血漿の1:2の希釈率における定量化を示す。図18Bは、血漿の1:10の希釈率における定量化を示す。

【図19-1】図19A。細胞の生存に対するG L P - 1およびG L P - 1類似体の作用。ラット肺上皮(ARIP)の細胞死に対するG L P - 1の作用。

【図19-2】図19B。単剤として、および併用でのG L P - 1およびスタウロスボリン(Stau)の存在下におけるアポトーシスの阻害を表すアネキシンV染色。

20

【図20】図20。細胞生存度に対する、G L P - 1類似体であるエキセンジン-4の作用。

【図21】図21。スタウロスボリン誘発性細胞死に対する複数のG L P - 1 / F D K P製剤の作用。

【図22】各種濃度のG L P - 1 / F D K P製剤を使用するラットにおける単回静脈内注射(IV;図22A)および肺内吸入(INS;図22B)を示す薬物動態学的試験。

【図23】投与後2時間(図23A)および6時間(図23B)におけるG L P - 1 / F D K P製剤を投与したラットの累積的摂食量の減少。

【図24】図24。雄性肥満ズッカーラットにおける肺内吸入により投与されたG L P - 1 / F D K Pの薬力学的試験。

30

【図25】図25。雄性肥満ズッカーラットにおける肺内吸入により投与されたG L P - 1 / F D K Pの薬力学的試験。

【図26】図26。雄性肥満ズッカーラットにおける肺内吸入により投与されたG L P - 1 / F D K Pの薬力学的試験。

【図27】図27。雌性ラットにおける肺内吸入により投与された各種G L P - 1濃度のG L P - 1 / F D K Pの薬物動態学的試験。

【図28】図28。雌性ラットにおける肺内吸入により投与された各種G L P - 1濃度のG L P - 1 / F D K Pの薬物動態学的試験。

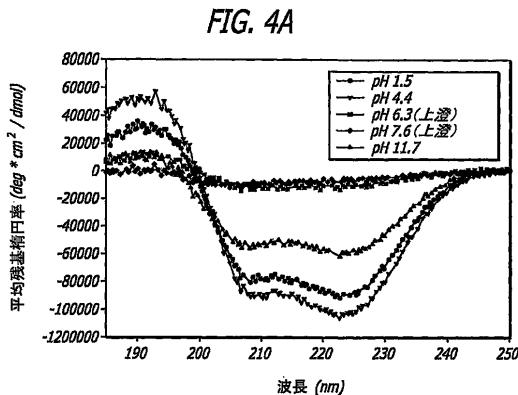
【図29】図29。4日間連続で1日1回の肺内吸入により15%G L P - 1(0.3mgのG L P - 1)を含有するG L P - 1 / F D K Pが投与された雌性ラット(n=10)におけるG L P - 1 / F D K Pの薬力学的試験。

40

【図30】図30。4日間連続で1日1回の肺内吸入により15%G L P - 1(0.3mgのG L P - 1)を含有するG L P - 1 / F D K Pが投与された雌性ラット(n=10)におけるG L P - 1 / F D K Pの薬力学的試験。

【図31】図31。5日間連続で1日1回(1日につき30分間)経鼻・経口投与によりG L P - 1 / F D K Pが投与されたサルにおけるG L P - 1 / F D K Pの毒物動態学的試験。

【図4】



【図5】

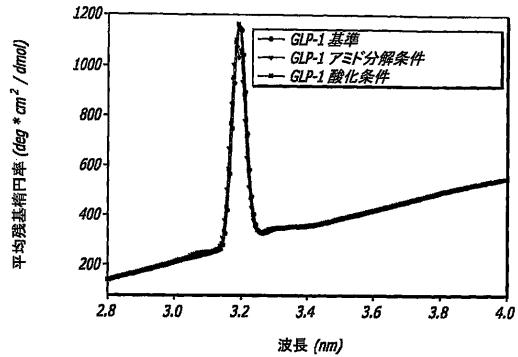
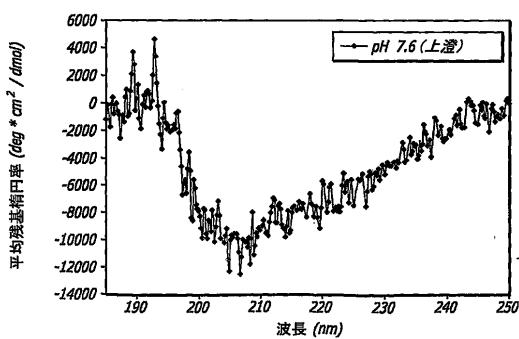
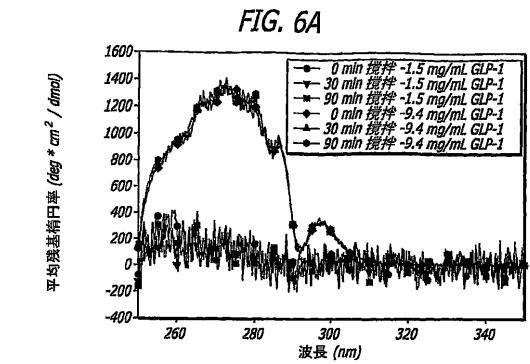


FIG. 4B



【図6】



【図7-1】

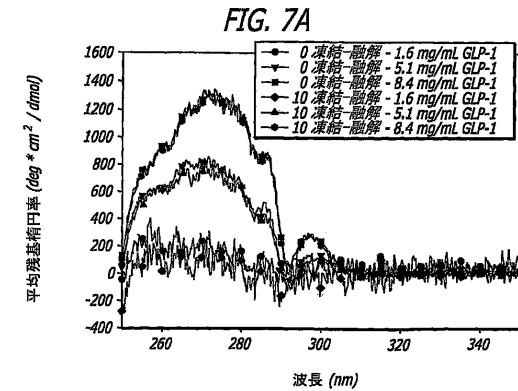


FIG. 6B

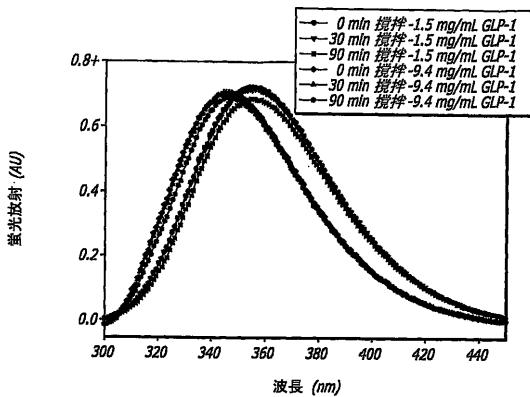
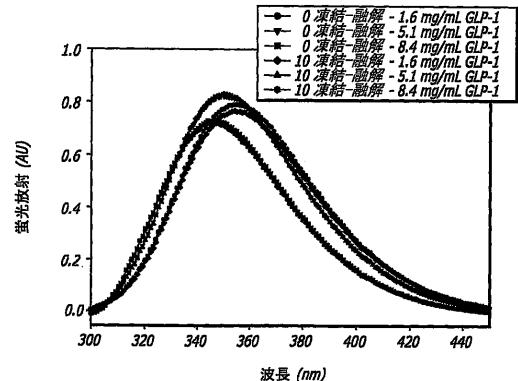
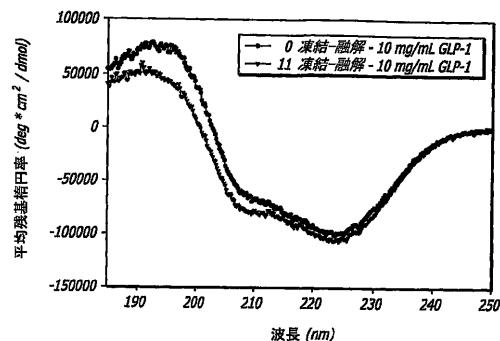


FIG. 7B



【図 7-2】

FIG. 7C



【図 8】

FIG. 8A

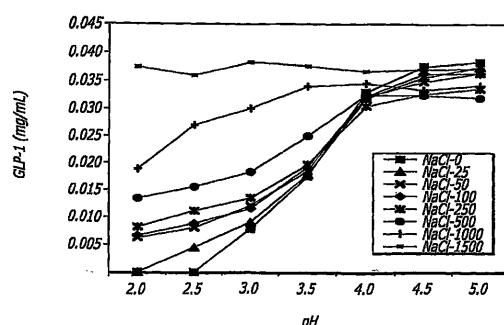
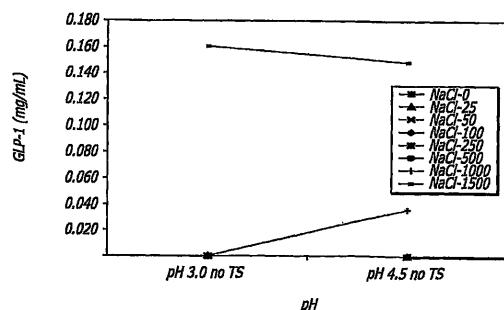
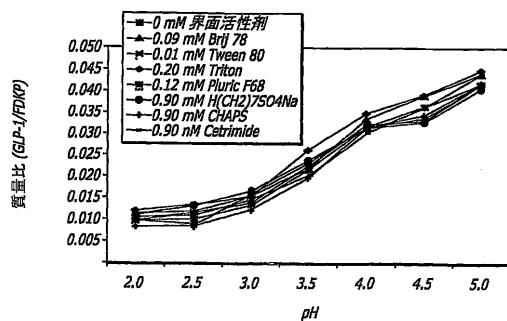


FIG. 8B



【図 9】

FIG. 9A



【図 10-1】

FIG. 10A

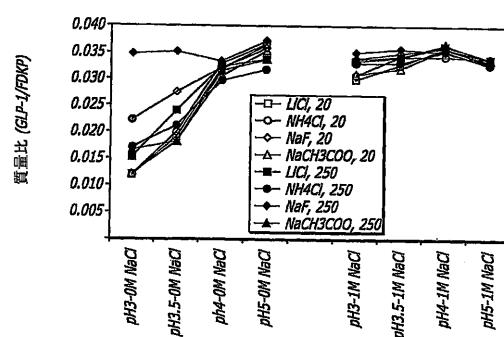


FIG. 9B

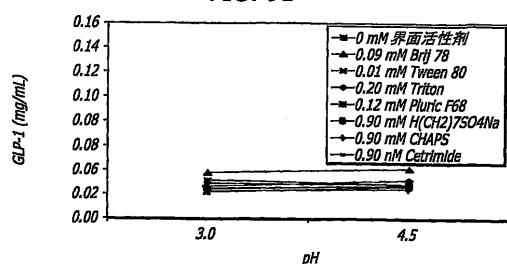
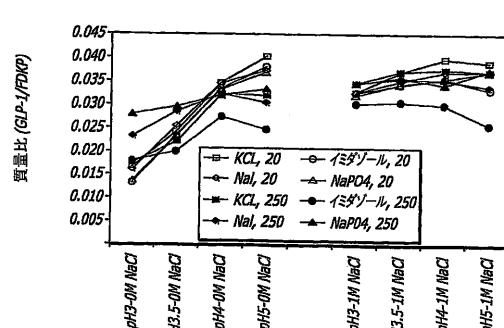


FIG. 10C



【図 10-2】

FIG. 10B

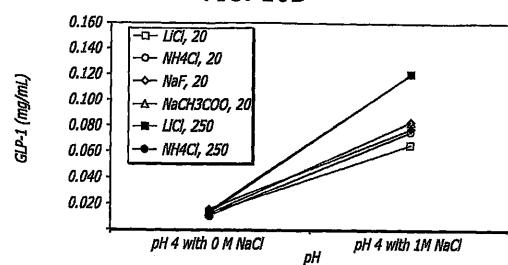
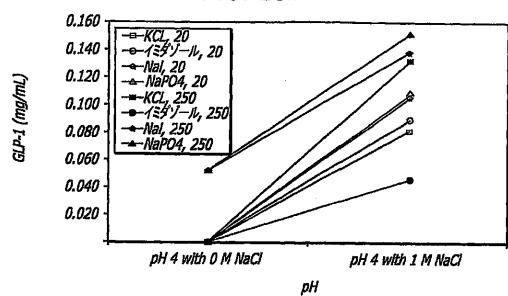


FIG. 10D



【図 11】

FIG. 11A

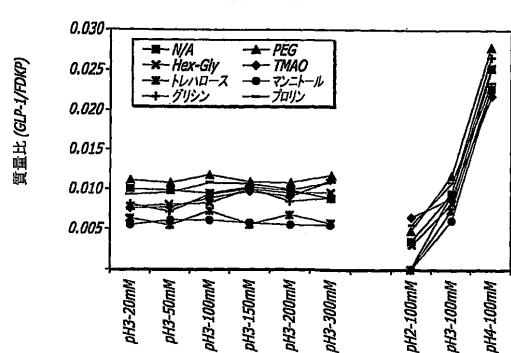
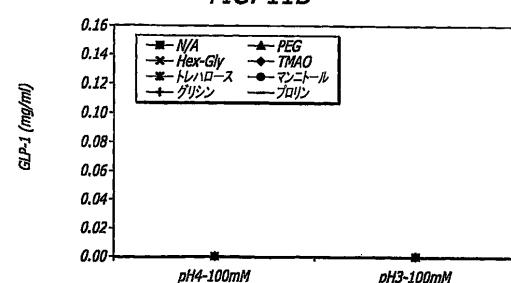
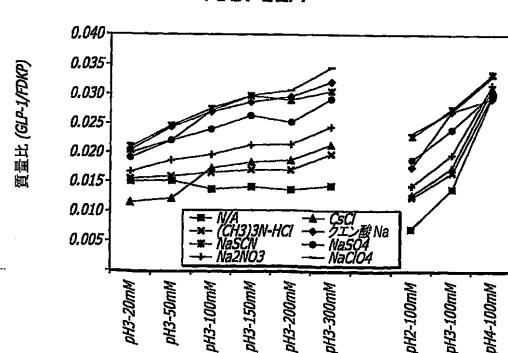


FIG. 11B



【図 12-1】

FIG. 12A



【図 12-2】

FIG. 12B

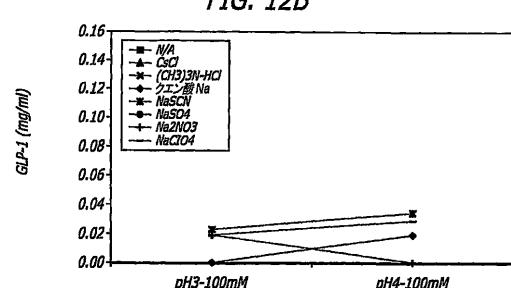


FIG. 12C

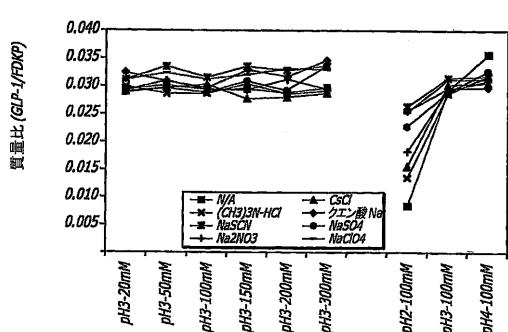
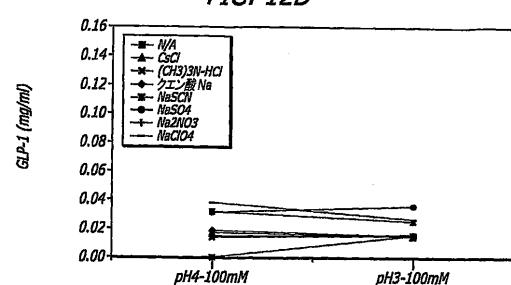


FIG. 12D



【図13】

FIG. 13A

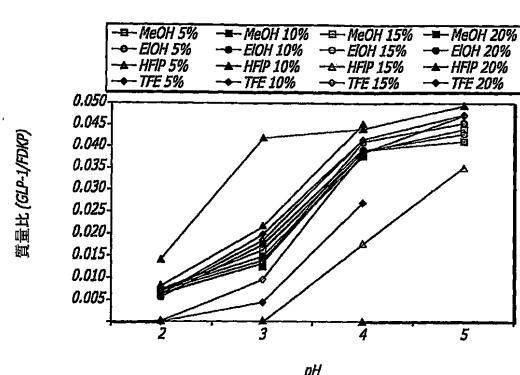
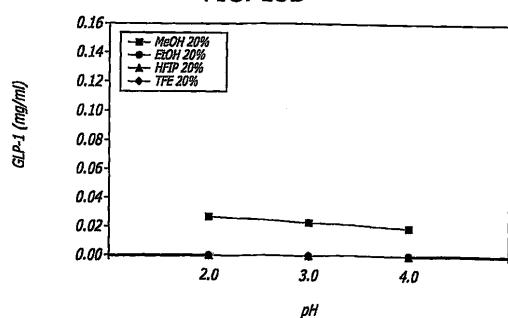
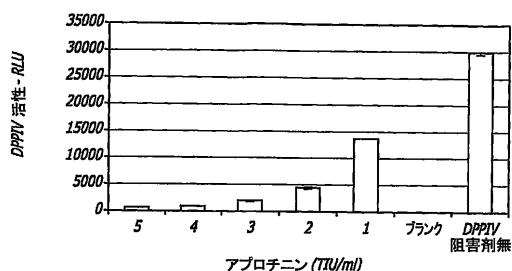


FIG. 13B



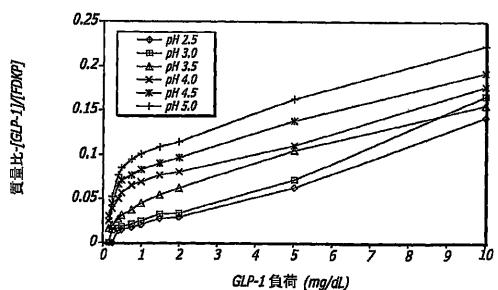
【図16-2】

FIG. 16B



【図14-1】

FIG. 14A



【図17】

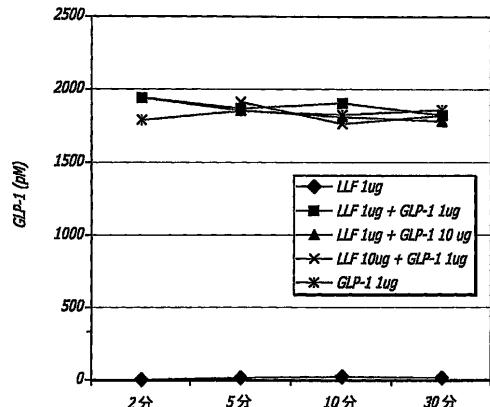
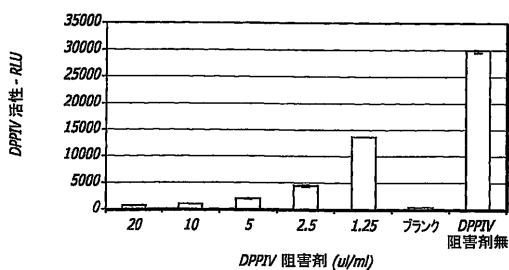


FIG. 16C



【図18】

FIG. 18A

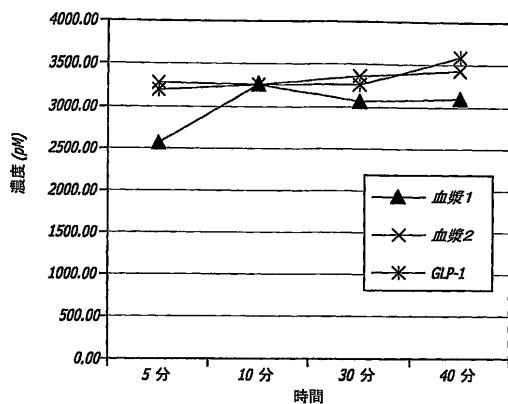
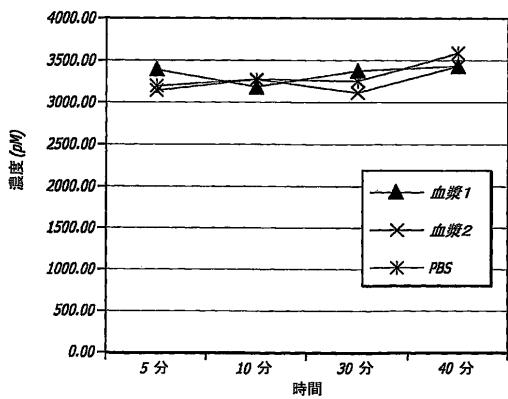


FIG. 18B



【図22】

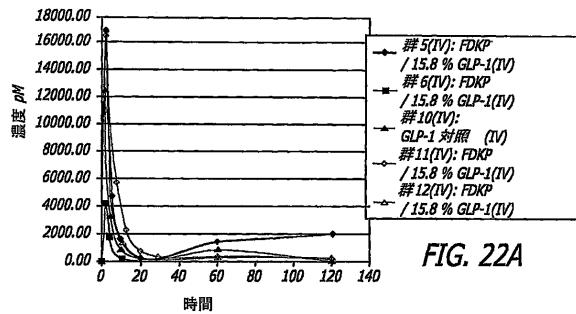


FIG. 22A

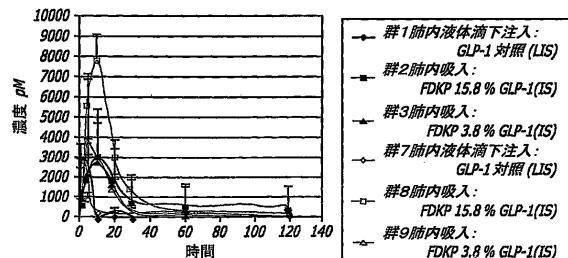
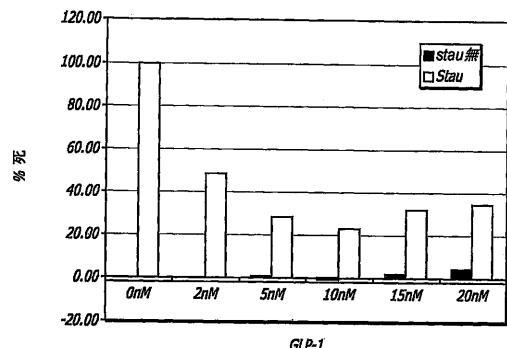


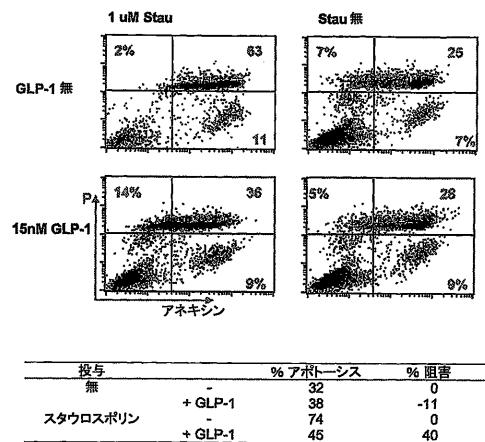
FIG. 22B

【図19-1】

FIG. 19A



【図19-2】



【図23】

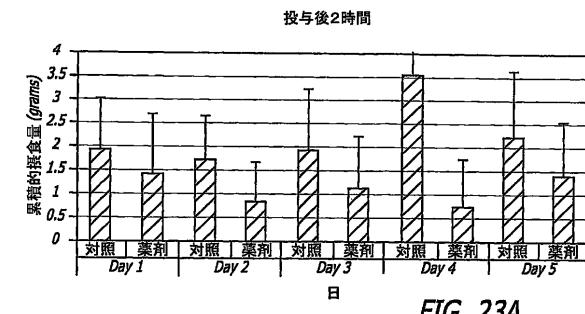


FIG. 23A

投与後6時間

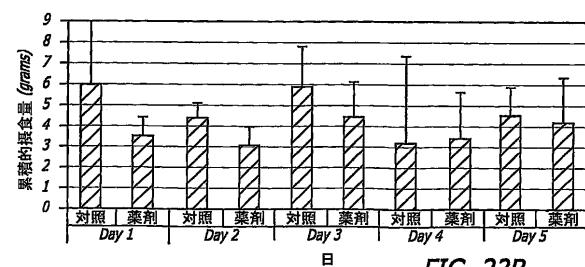
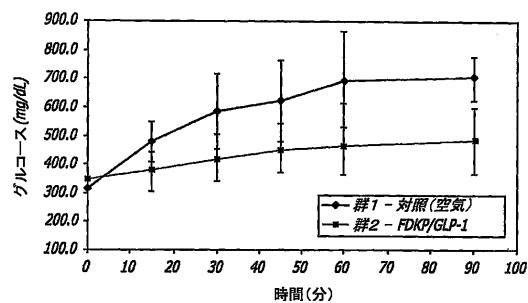
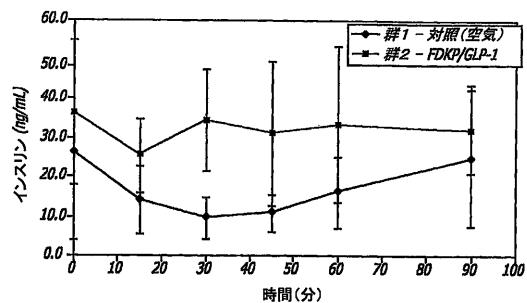


FIG. 23B

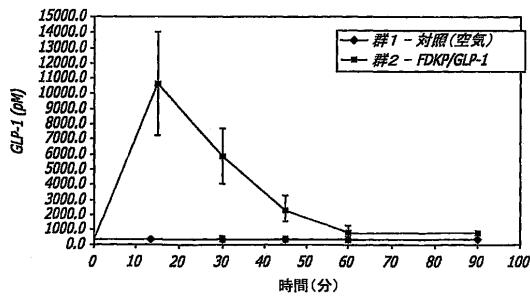
【図24】



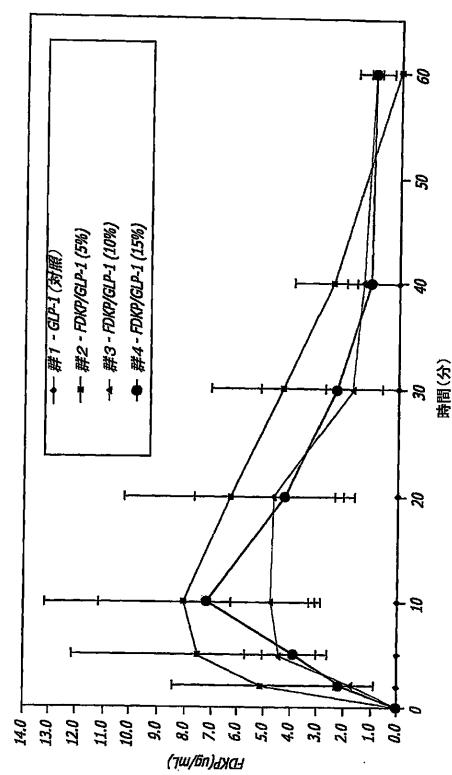
【図26】



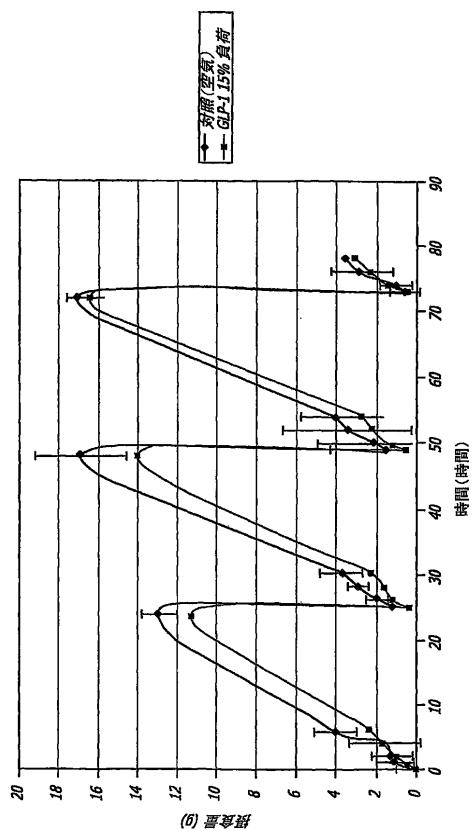
【図25】



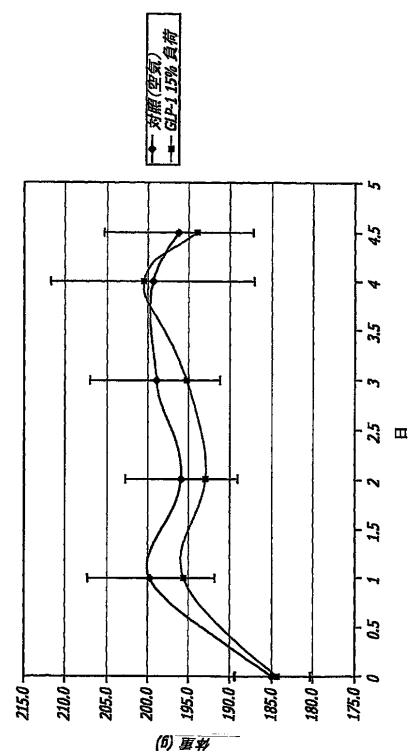
【図28】



【図29】



【図30】



【図 1 - 1】

FIG. 1A

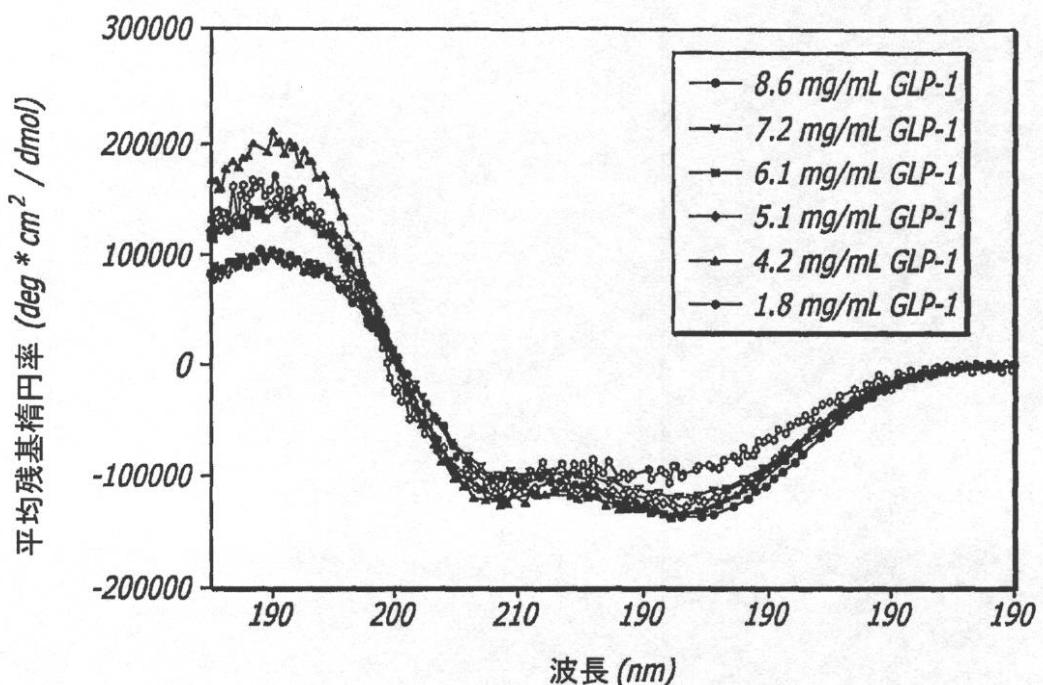
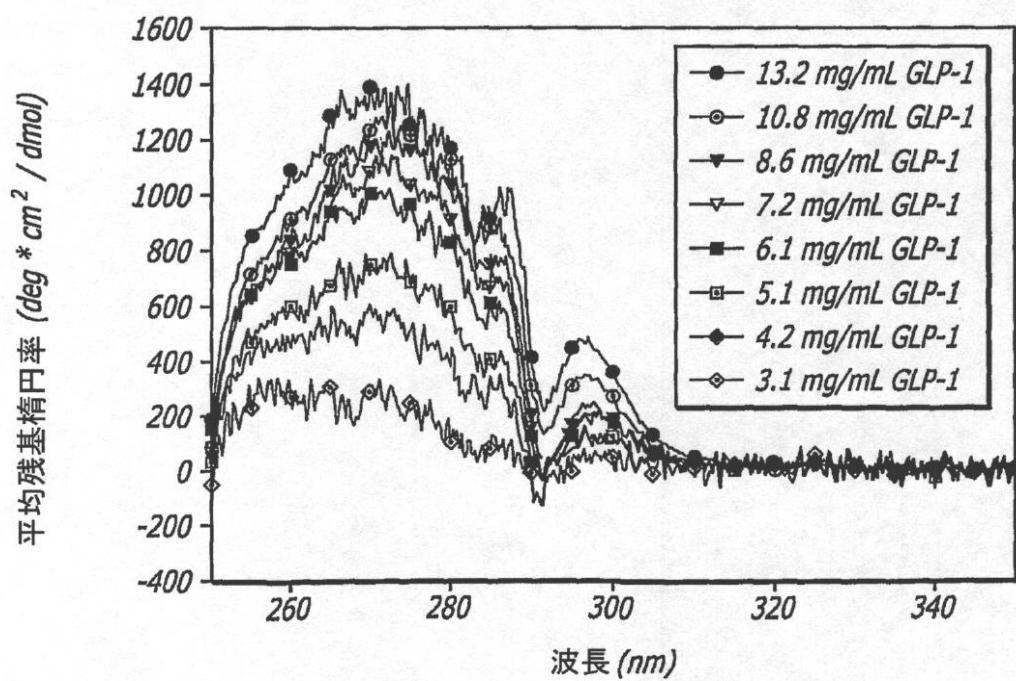


FIG. 1B



【図 1 - 2】

FIG. 1C

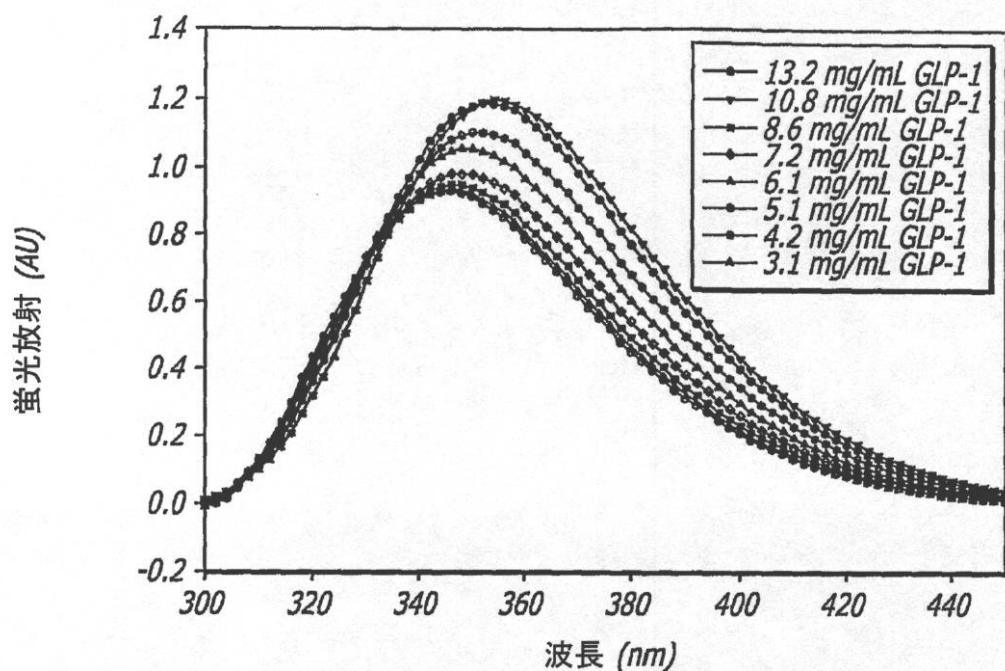
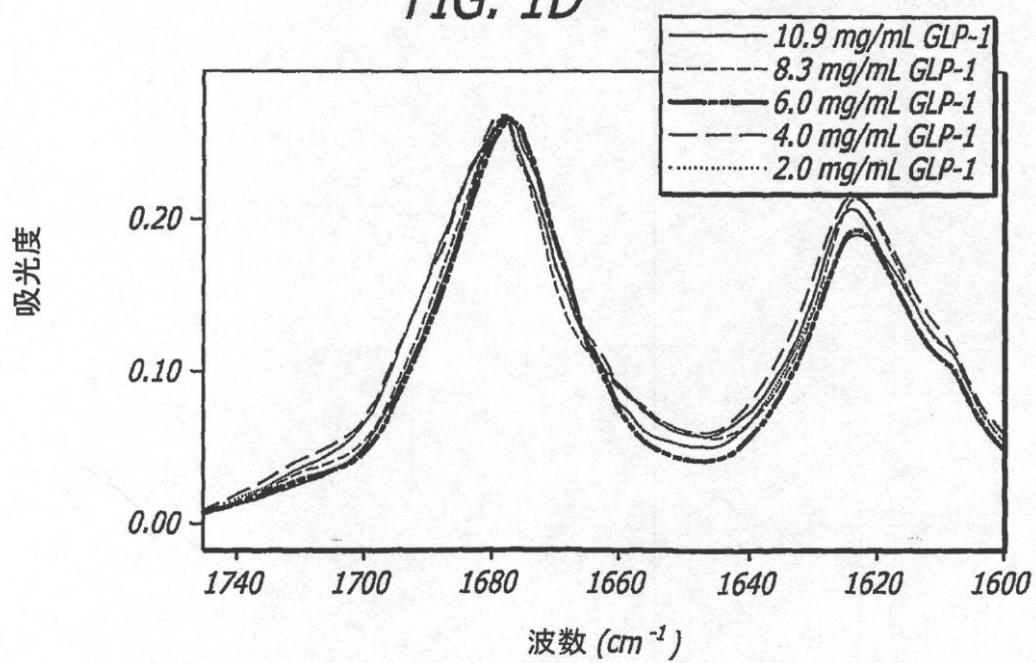


FIG. 1D



【図 2 - 1】

FIG. 2A

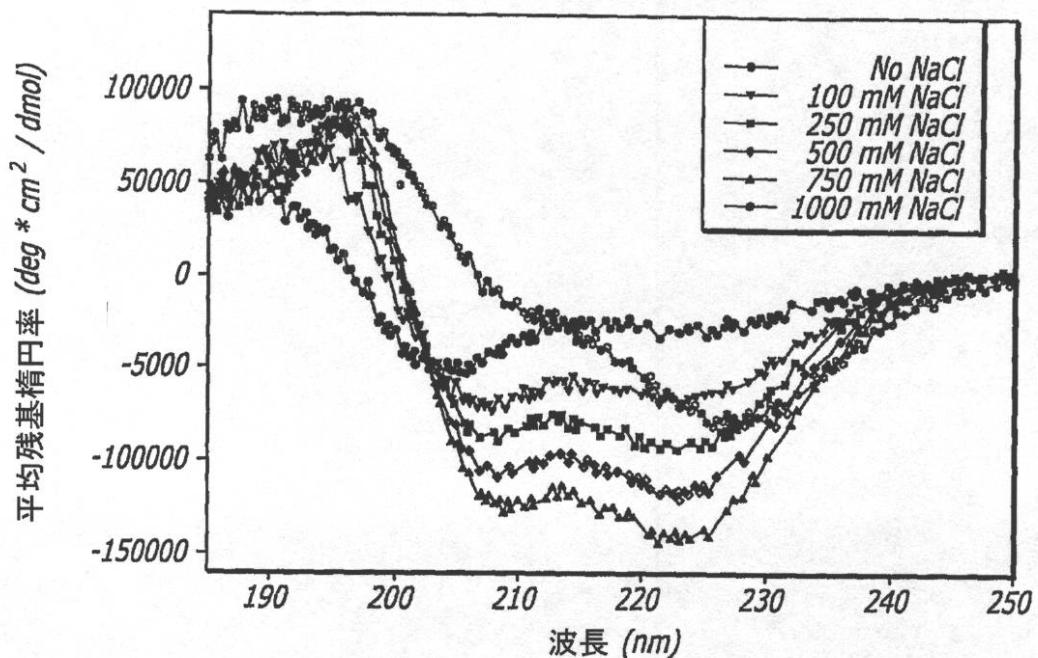
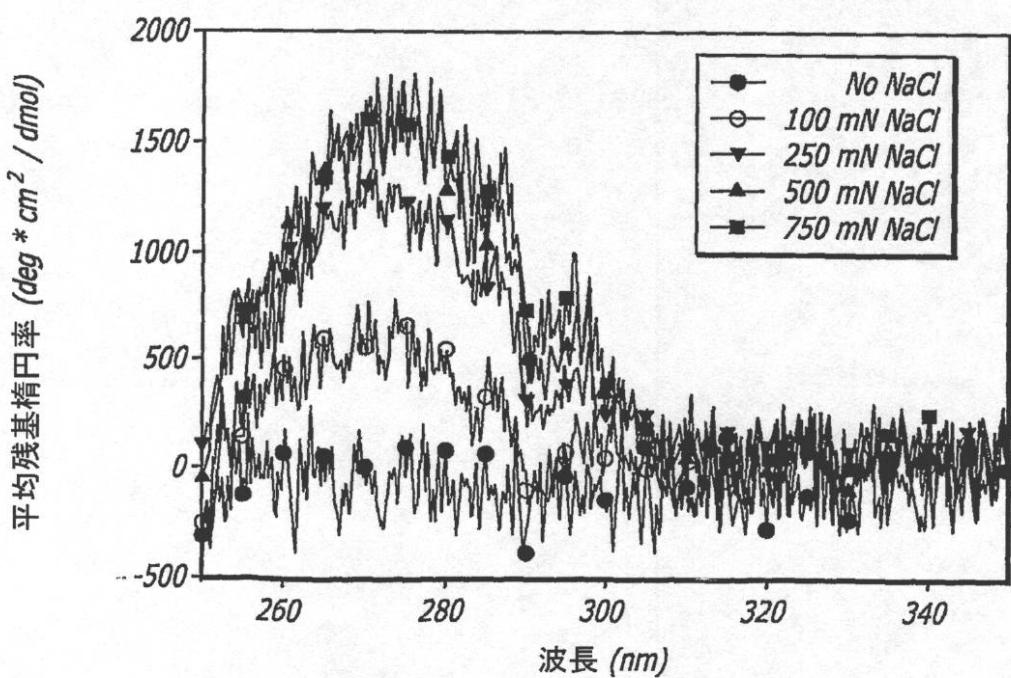


FIG. 2B



【図 2 - 2】

FIG. 2C

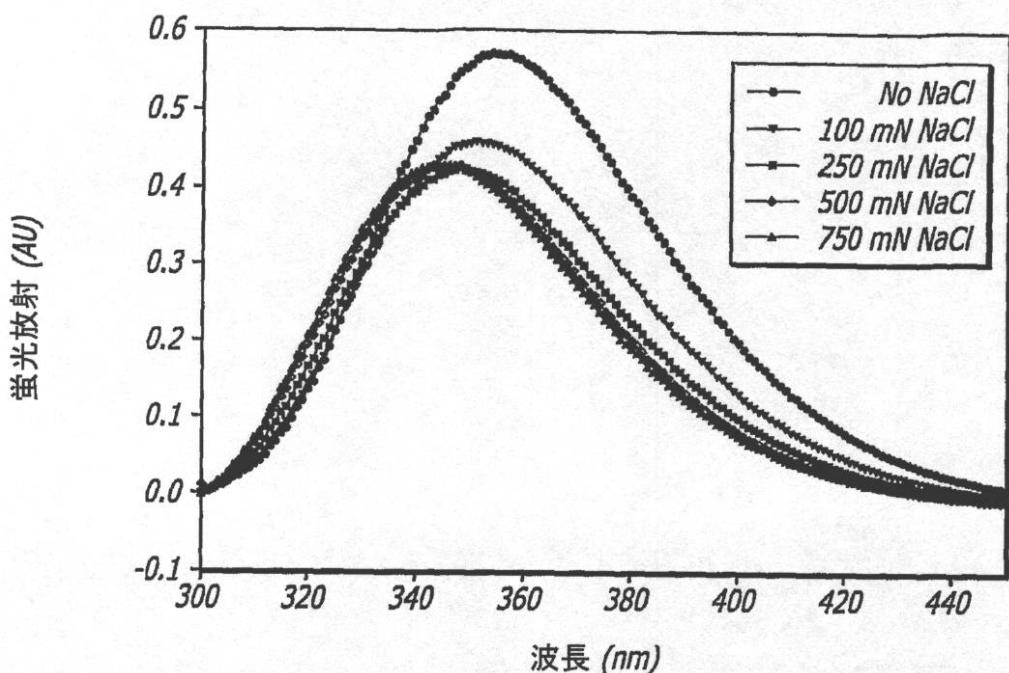
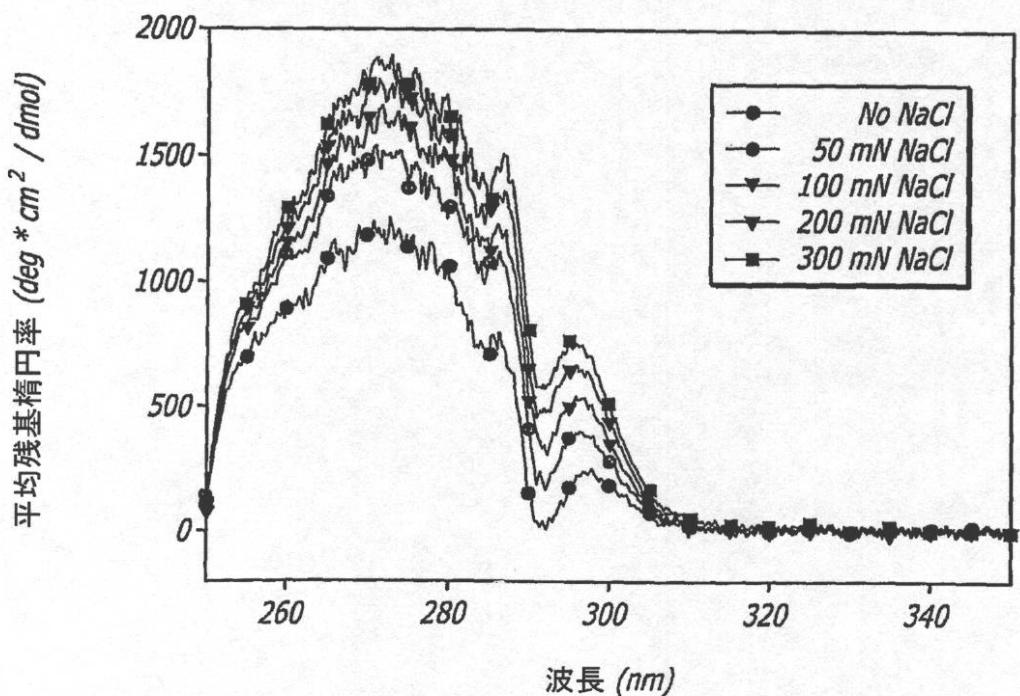


FIG. 2D



【図3-1】

FIG. 3A

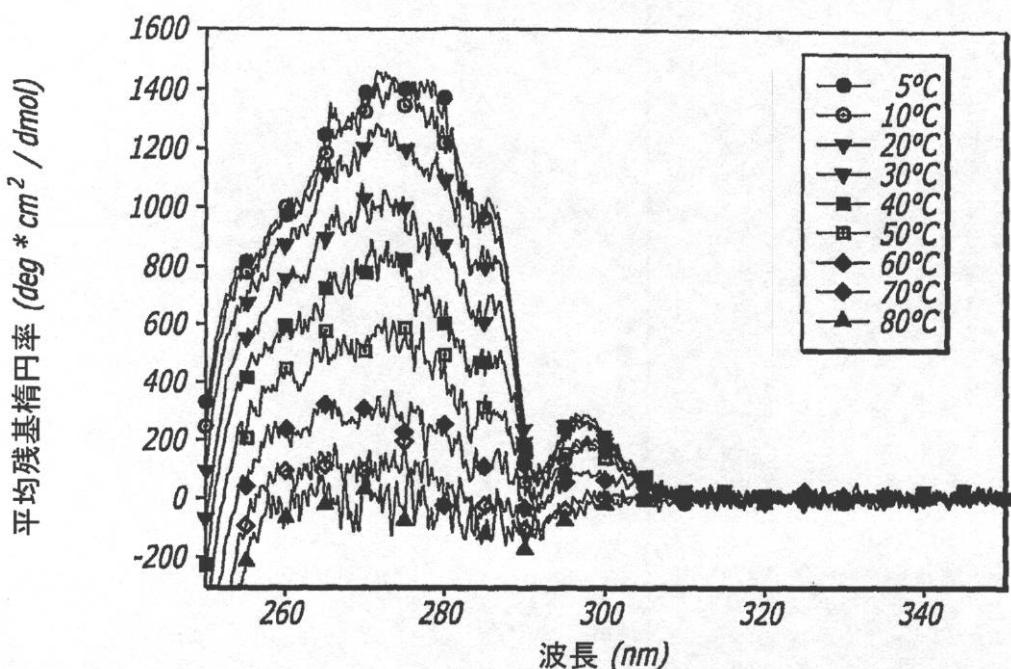
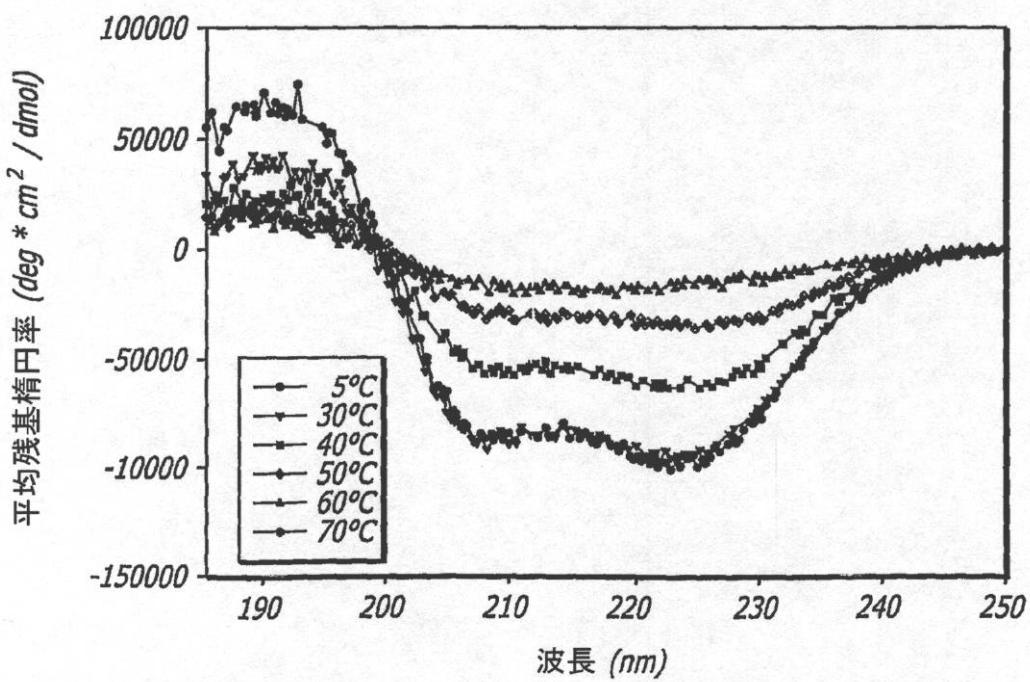
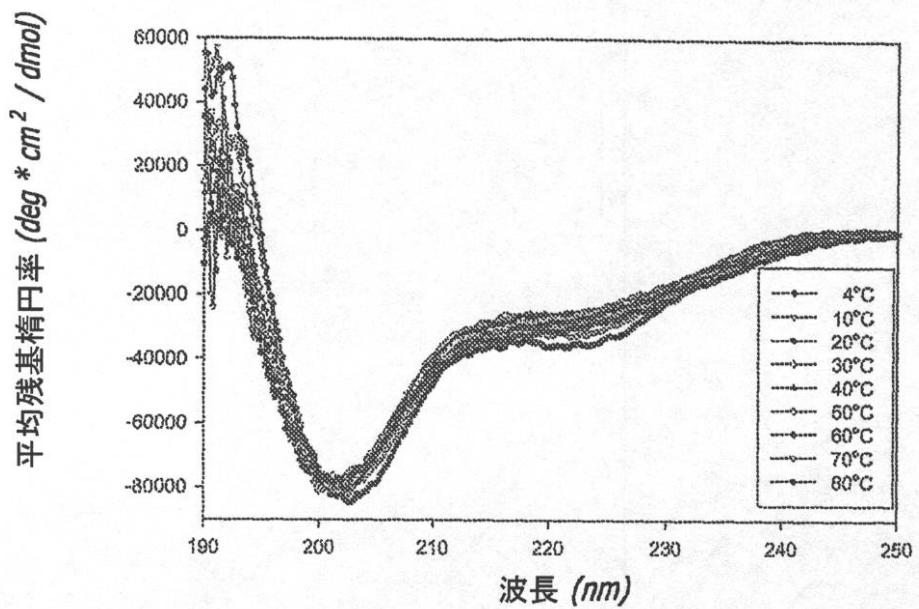


FIG. 3B



【図 3 - 2】



【図 14 - 2】

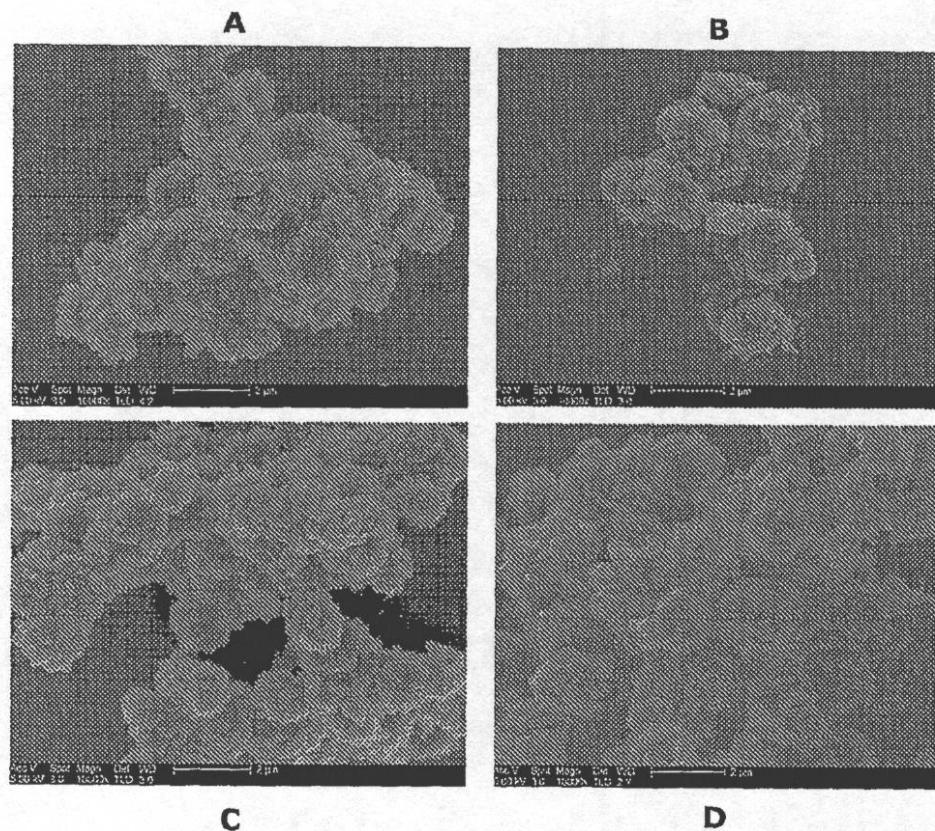
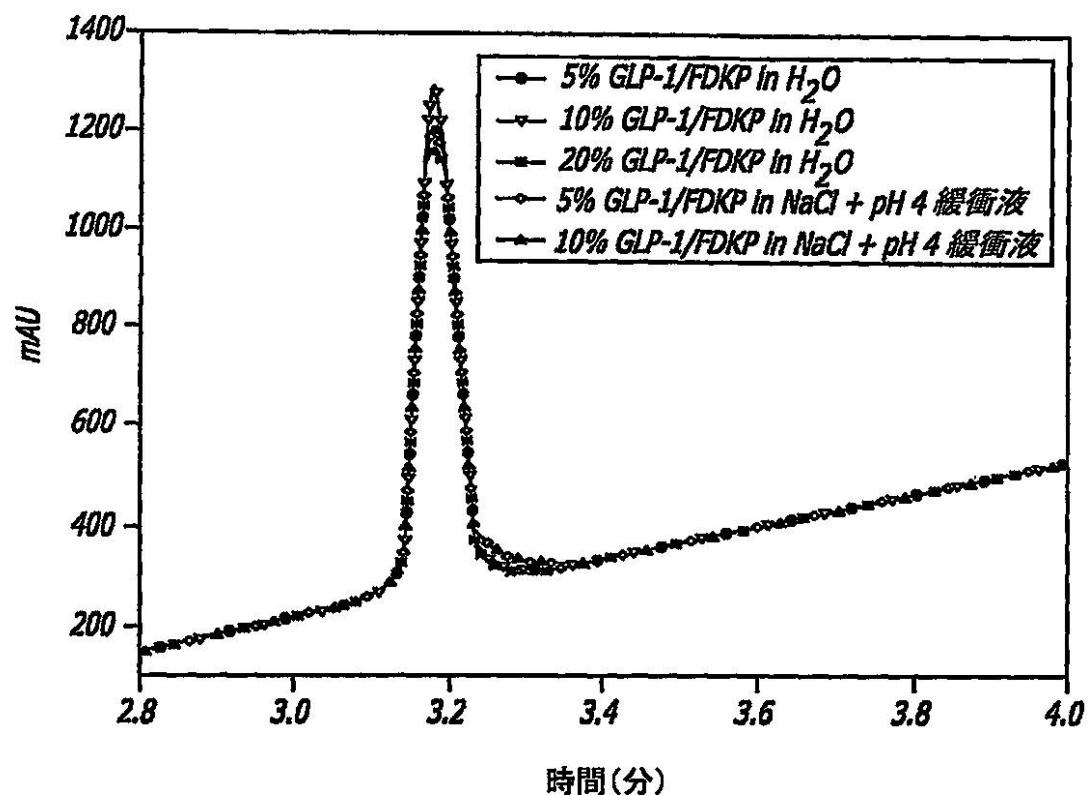


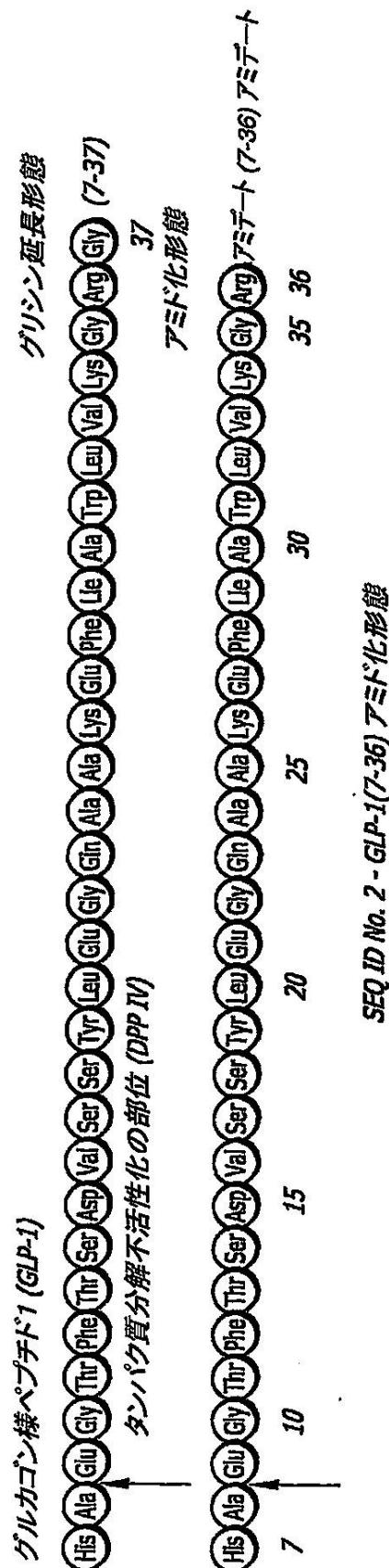
FIG. 14B

【図15】



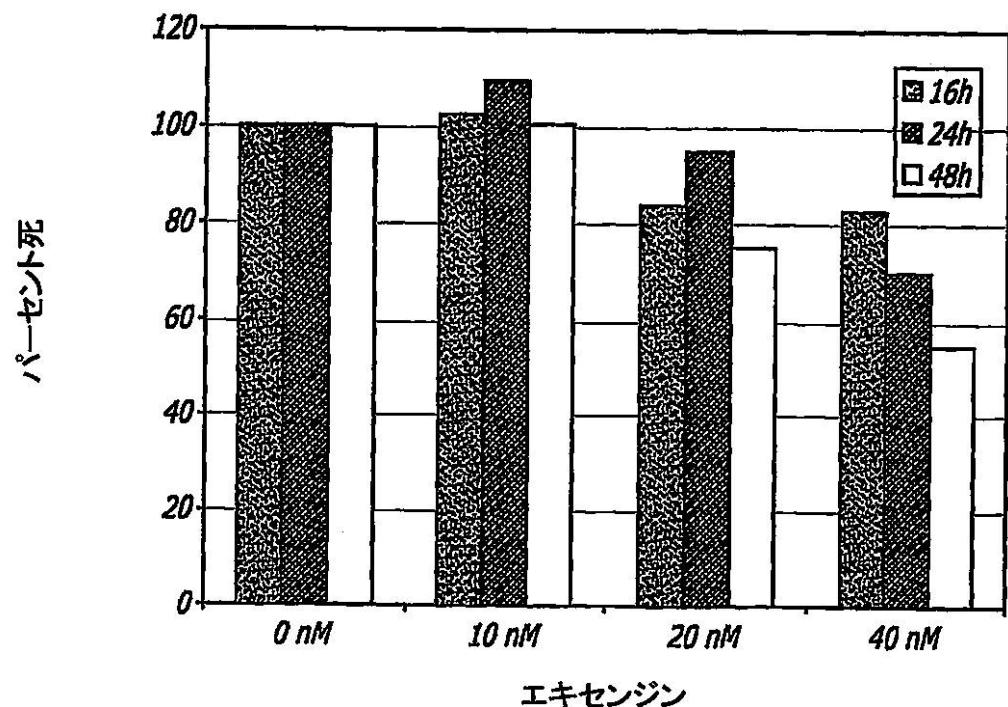
【図 16-1】

SEQ ID No. 1 - GLP-1(7-37) グリシン延長形態

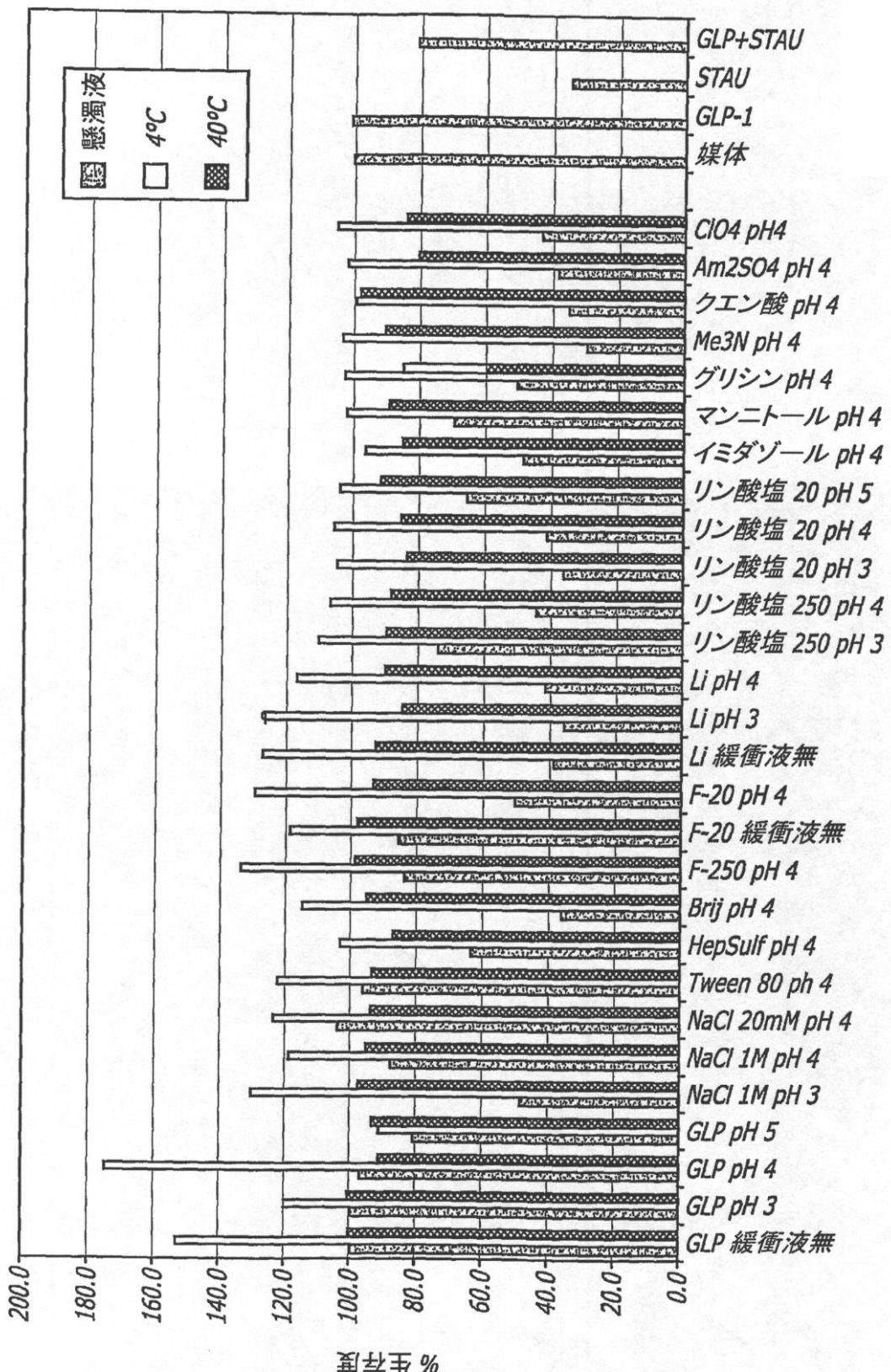


SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

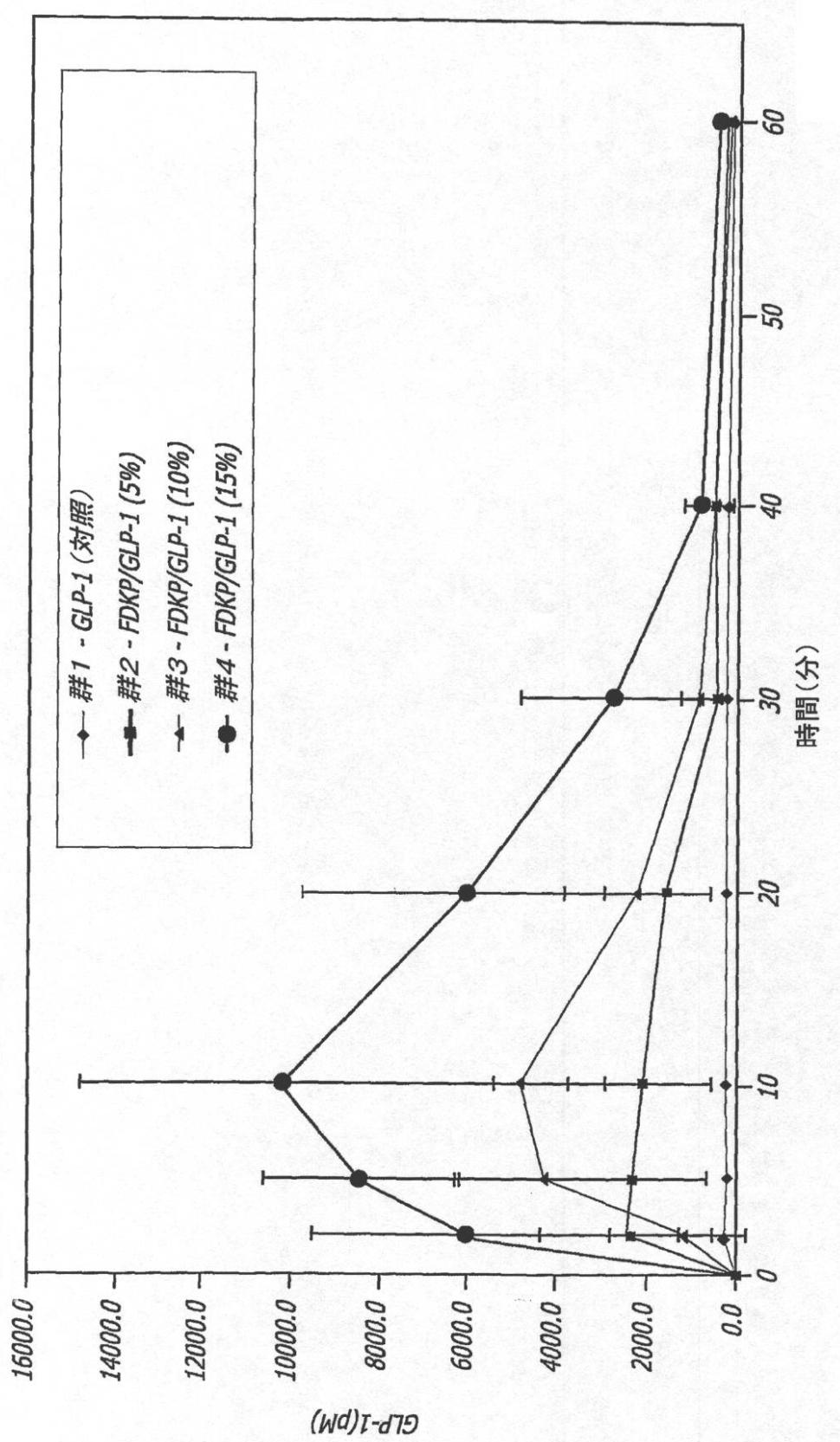
【図20】



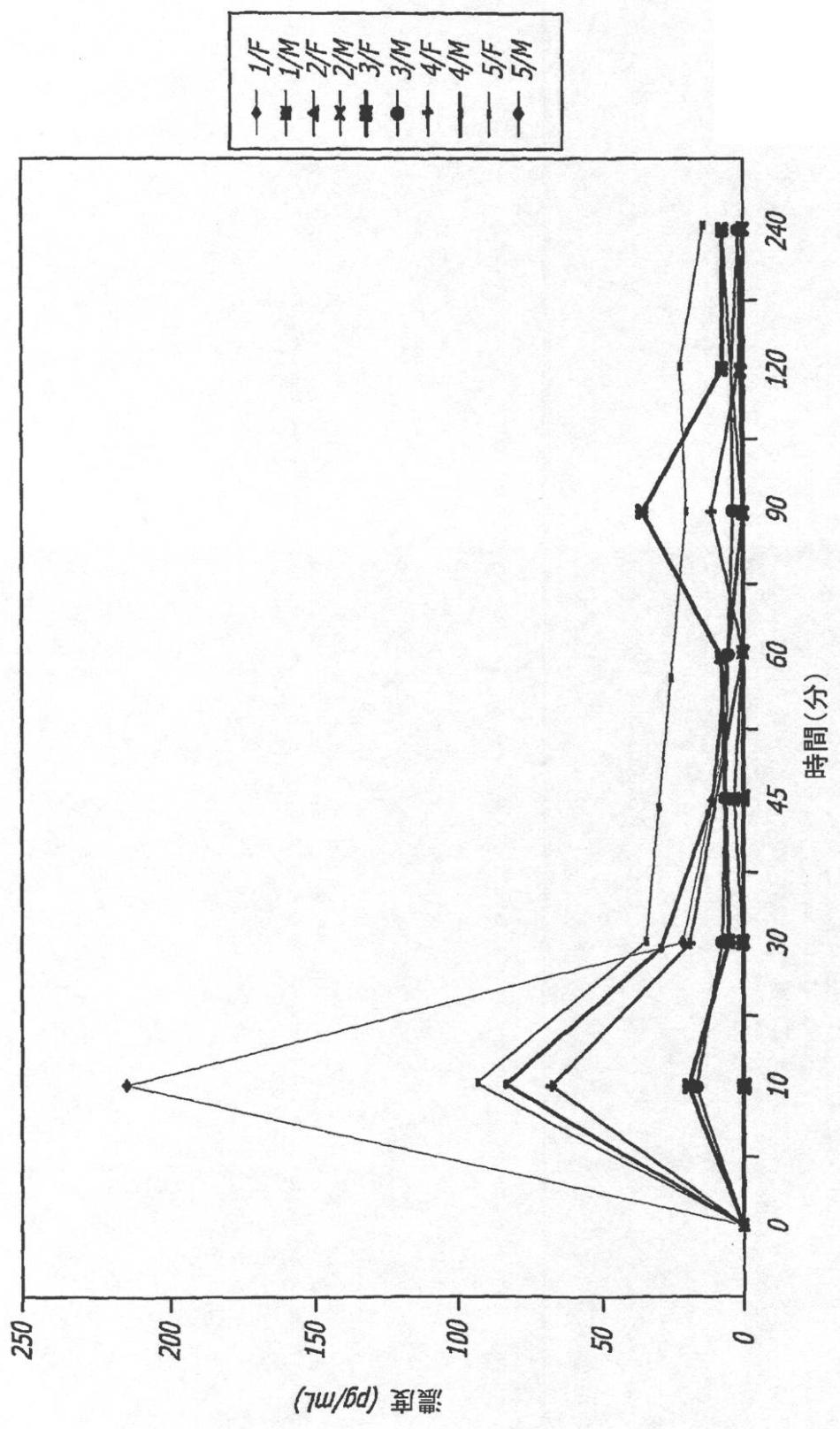
【図21】



【図27】



【図31】



【配列表】

0005415938000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
 A 6 1 K 47/02 (2006.01) A 6 1 K 47/02  
 A 6 1 P 3/10 (2006.01) A 6 1 P 3/10

(74)代理人 100147924  
 弁理士 美恵 英樹  
 (72)発明者 グリーン, ステファニー  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州 93004, ベントウーラ, ハーモサ・ストリート 7940  
 (72)発明者 ブラント, ディヴィッド  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州, バレンシア, ハーモサ・ストリート 7940  
 (72)発明者 ゲルバー, コハバ  
 アメリカ合衆国ヴァージニア州 20109, マナサス, ラウンチ・サークル 10330 ナンバ  
 - 303  
 (72)発明者 キング, マーク  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州 91106, パサデナ, ノース・ミシガン・アベニュー 626  
 (72)発明者 チーサム, ウェイマン・ウェンデル  
 アメリカ合衆国メリーランド州 21045, コロンビア, ブラック・チェリー・サークル 621  
 8  
 (72)発明者 オバーグ, キース  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州 91355, バレンシア, エル・ガト・プレイス 25850  
 (72)発明者 レオーネ - ベイ, アンドレア  
 アメリカ合衆国コネチカット州 06977, リッジフィールド, フロリダ・ヒル・ロード 297  
 (72)発明者 ホーケンソン, マーク・ジェイ  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州 91354, バレンシア, メイフェア・ドライブ 28337  
 (72)発明者 ファリス, メアリー  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州 90077, ロサンゼルス, アルマデン・コート 2538

審査官 濱下 浩一

(56)参考文献 特表平07-506818 (JP, A)  
 特表2001-516765 (JP, A)  
 国際公開第2006/023943 (WO, A1)  
 特表2005-528351 (JP, A)  
 国際公開第2005/020964 (WO, A1)  
 特表平08-504784 (JP, A)  
 特表2009-527583 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 38 / 26  
 A 6 1 K 38 / 00  
 A 6 1 K 9 / 12  
 A 6 1 K 9 / 16  
 A 6 1 K 9 / 19  
 A 6 1 K 47 / 02  
 A 6 1 K 47 / 22  
 A 6 1 P 3 / 10  
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )