

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5628026号  
(P5628026)

(45) 発行日 平成26年11月19日 (2014.11.19)

(24) 登録日 平成26年10月10日 (2014.10.10)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 38/28 (2006.01)	A 6 1 K 37/26 Z N A
A 6 1 K 47/10 (2006.01)	A 6 1 K 47/10
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47
C O 7 K 14/62 (2006.01)	C O 7 K 14/62

請求項の数 10 (全 37 頁)

(21) 出願番号	特願2010-509834 (P2010-509834)	(73) 特許権者	596113096
(86) (22) 出願日	平成20年5月30日 (2008.5.30)		ノボ・ノルディスク・エー／エス
(65) 公表番号	特表2010-529956 (P2010-529956A)		デンマーク国、バグスヴァエルト ディー
(43) 公表日	平成22年9月2日 (2010.9.2)		ケー— 2880、ノボ アレー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2008/056689	(74) 代理人	100109726
(87) 国際公開番号	W02008/145730		弁理士 園田 吉隆
(87) 国際公開日	平成20年12月4日 (2008.12.4)	(74) 代理人	100101199
審査請求日	平成23年5月17日 (2011.5.17)		弁理士 小林 義教
(31) 優先権主張番号	07109435.3	(72) 発明者	ビエレガード イェンセン、 シモン
(32) 優先日	平成19年6月1日 (2007.6.1)		デンマーク国 ディーケー— 3400 ヒ
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		レロズ、 ヴェド スケルバッケン 7
(31) 優先権主張番号	07114524.7	(72) 発明者	ハヴェルンド、 スヴェンド
(32) 優先日	平成19年8月17日 (2007.8.17)		デンマーク国 ディーケー— 2880 バ
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		グスヴァエルト、 クーヴェイ 24

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 安定した非水性薬学的組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) 10 - 100 のアミノ酸を含む脱水された治療的に活性なポリペプチドと、  
 b) プロピレングリコール及びグリセロールからなる群から選択される少なくとも一の半極性プロトン性有機溶媒  
 の混合物を含有し、

該ポリペプチドが、水溶液中のポリペプチドの p I から少なくとも 1 p H 単位高いか、又は少なくとも 1 p H 単位低い標的 p H で脱水されている インスリンペプチドである、非水性薬学的組成物。

【請求項 2】

インスリンペプチドがインスリングルリジン、L y s <sup>B 2 8</sup> P r o <sup>B 2 9</sup> ヒトインスリン、A s p <sup>B 2 8</sup> ヒトインスリン及び d e s (B 3 0) ヒトインスリンからなる群から選択される請求項 1 に記載の薬学的組成物。

【請求項 3】

脱水された インスリンペプチド の有機溶媒中での溶解度が少なくとも 20 m g / m l である請求項 1 又は 2 に記載の薬学的組成物。

【請求項 4】

標的 p H が 6 . 0 ~ 9 . 0 の範囲にある請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項 5】

10

20

有機溶媒が少なくとも 20 % w / w の量で存在している請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項 6】

10 % w / w 未満の水分を含有する請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項 7】

組成物が、肺処置、経口処置、鼻処置又は口腔処置に対して適合化されている請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項 8】

インスリンペプチドが、インスリンアスパルトである請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

10

【請求項 9】

インスリンペプチドが、インスリンにおいて一又は複数のアミノ酸残基の置換、欠失及び/又は付加を有するインスリンアナログである請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項 10】

高血糖症、2 型糖尿病、耐糖能異常、及び 1 型糖尿病の処置又は予防のための医薬としての使用のための、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、非水性薬学的組成物、及び糖尿病及び高血糖症を処置する方法におけるそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

ポリペプチドは、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ジメチルアセトアミド及びジメチルホルムアミドのようなある種の非プロトン性溶媒を除く、ほとんどの非水性溶媒において、典型的には低い溶解度を有する。しかしながら、これらの非プロトン性溶媒は毒性のため、かなりの度合いで薬学的製剤に使用するには不適切である。

【0003】

30

Klibanovら(J. T. Chin, S. L. Wheeler, 及びA. M. Klibanov. Communication to the editor: On protein solubility in organic solvents. BIOTECHNOL.BIOENG. 44 (1):140-145, 1994)には、プロトン性で非常に親水性の極性溶媒が、10 mg / ml 以上のリゾチーム(pH 6.0 の水溶液から凍結乾燥させたもの)を溶解させることが記載されている。個々の溶媒(1,5 ペンタンジオール)における溶解度は、リボゾームが水溶液からペンタンジオールに溶解される前に凍結乾燥され、pH 値がリボゾームの等電点以下に動いた場合、際だって増加した。溶媒の特徴とリボゾームの溶解度との間に、強い相関関係を確認させることはできなかった。

【0004】

国際公開第 00 / 42993 号には、高分子のデリバリーのための製剤が開示されており、ここで高分子は、吸入により患者の肺に送達させるためにエアロゾル化可能な低毒性の有機溶媒に溶解又は分散される。

40

【0005】

多くの極性プロトン性有機溶媒は、ポリペプチドの部分的なアンフォールディングのために、ポリペプチドを不安定にさせ、これが高次構造の柔軟性のために、凝集及び化学的分解プロセスをしばしば高める傾向にある。エタノール等のある種の極性プロトン性有機溶媒はポリペプチドに対して変性剤としてすら作用するかもしれない。さらに、極性プロトン性有機溶媒は、多くの場合、ポリペプチドの安定性を損なう高度に反応性の不純物、例えばアルデヒド類及びケトン類を少量含有する。よって、適切な有効期間安定性を有するポリペプチドの非水溶液を調製することは困難である。

50

## 【 0 0 0 6 】

ポリペプチドの非水溶液は、さらに溶液加圧定量吸入器(pMDI)にプロセシング可能であり、そこではポリペプチドをヒドロフルオロアルカンに溶解せしめるために極性の非水溶液が共溶媒として作用するため、それらは有利には肺投与に使用されうる。

また、ポリペプチドの非水溶液は、洗浄剤及び無極性の疎水性溶媒、例えば油を添加することにより、経口投与用のマイクロエマルジョンにプロセシング可能である。マイクロエマルジョンは、タンパク質分解からタンパク質を保護し、消化管からのポリペプチドの全身的吸収を高める。さらに、ポリペプチドの加水分解は、水分活性が低いために、非水性製剤においては最小化されることが予測される。

## 【 0 0 0 7 】

10

種々の処理及び賦形剤の添加を、それらの溶解度及びそれらの安定性を改善するために、治療用ペプチドの非水性薬学的組成物にしばしば適用しなければならない。

ペプチドの液状非経口製剤の保存期間は、少なくとも1年、好ましくはそれ以上でなくてはならない。製品が輸送され、周囲温度で毎日振揺されうる使用中の期間は、好ましくは数週間であるべきである。

よって、安定性が改善された、治療用ペプチドの非水性薬学的組成物が必要とされている。

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 0 8 】

【図1】水中で再構成されるインスリンアスパルトのpH(標的pH)の関数としての、周囲温度におけるプロピレングリコールへのインスリンアスパルトの溶解度の関係を示す。

20

【図2】周囲温度での、種々の半極性プロトン性溶媒におけるインスリンアスパルト(標的pH: 7.5)の溶解度を示す。

【図3】37℃、生理的培養培地(pH 7.4)での2時間のインキュベーション後に、新たに摘出されたラットの腸囊を通した10%(v/v)のプロピレングリコール(PG)の存在下又は不在下における浸透ヒトインスリンを示す。

【図4】2つのバッファーコントロールサンプル(S3及びS6)と、2つのプロピレングリコール含有サンプル(SPG5とSPG6)のそれぞれにおける浸透非分解インスリンアスパルト(ピーク~5828)とその分解産物(ピーク~5218)の、MALDI分析を示す。プロピレングリコール(PG)の存在下では、より多くの非分解インスリンアスパルトが腸粘膜を通過して浸透していることが分かる。

30

【図5】プロピレングリコールと共に又はプロピレングリコールなしで、インスリンA14GluB25HisDesB30ヒトインスリン(8mM)を経口投与した後の血糖(mmol/l)の減少を示す。経管栄養を使用することにより、1.2ml/kgの投与量をSPRDラットに投与した。

【図6】0.2mMのインスリンアスパルト、pH 7.4(実線)、100%プロピレングリコール(PG)中の0.2mMのインスリンアスパルト(点線)、100%プロピレングリコール(PG)を希釈した後の2%PG中の0.2mMのインスリンアスパルト(破線)のFUVCDを示す。

【図7】0.2mMのインスリンアスパルト、pH 7.4(実線)、100%プロピレングリコール(PG)中の0.2mMのインスリンアスパルト(点線)、100%プロピレングリコール(PG)を希釈した後の2%プロピレングリコール中の0.2mMのインスリンアスパルト(破線)のNUVCDを示す。

40

【図8】25及び40℃で4週間インキュベートした後の、プロピレングリコール又は0.1Mのトリスバッファー、pH 7.5に溶解したインスリンアスパルト(IA)の純度を示す。純度は逆相クロマトグラフィーにより測定した。

【図9】25及び40℃で4週間インキュベートした後の、プロピレングリコール又は0.1Mのトリスバッファー、pH 7.5に溶解したインスリンアスパルト(IA)の高分子量タンパク質(HMWP)の形成を示す。インスリンアスパルトパウダーの標的pHは7.5であった。HMWPの量はサイズ排除クロマトグラフィーにより測定した。

50

【図10】40 で4週間インキュベートした後の、プロピレングリコール又は0.1Mのトリスバッファー、pH7.5に溶解したインスリンアスパルト(IA)のチオフラビンTポジティブの線維形成を示す。インスリンアスパルトパウダーの標的pHは7.5であった。

【発明の概要】

【0009】

本発明の一態様では、脱水ポリペプチドと、少なくとも一の半極性プロトン性有機溶媒を含有し、該ポリペプチドが、水溶液中のポリペプチドのpIから少なくとも1pH単位である標的pHで脱水されている非水性薬学的組成物が提供される。

本発明の一態様では、脱水ポリペプチドと、少なくとも一の半極性プロトン性有機溶媒を含有し、該ポリペプチドが、水溶液中のポリペプチドのpIから少なくとも1pH単位である標的pHで脱水されており、標的pHが約6.0～約9.0の範囲にある非水性薬学的組成物が提供される。

【発明を実施するための形態】

【0010】

我々は、ポリペプチド、例えば固体状態(脱水された)のインスリンペプチドが、脱水前に水溶液における該ポリペプチドのpHを最適にすることで、半極性かつプロトン性の非水性媒体に非常に高度に溶解するようになり、保存安定性のある製薬用製剤の製剤化が可能になることを見出した。例えば、経口、肺及び鼻に使用されるこのような薬学的組成物は、高い化学的/物理的安定性を示す。本発明の組成物、例えば半極性プロトン性有機溶媒としてプロピレングリコールを使用する経口用の薬学的組成物は、さらに有意に改善された生物学的利用能をもまた示しうる。

【0011】

本発明の一態様では、脱水されたポリペプチドと、少なくとも一の半極性プロトン性有機溶媒を含有し、該ポリペプチドが、水溶液中のポリペプチドのpIから少なくとも1pH単位である標的pHで脱水されている非水性薬学的組成物が提供される。

【0012】

本発明の一態様では、脱水されたポリペプチドと、少なくとも一の半極性プロトン性有機溶媒を含有し、該ポリペプチドが、水溶液中のポリペプチドのpIから少なくとも1pH単位である標的pHで脱水されており、但し、ポリペプチドが、インスリン分泌性ペプチド、GLP-1(7-37)又はそのアナログもしくは誘導体、又はエキセンディン又はそのアナログもしくは誘導体ではない、非水性薬学的組成物が提供される。

【0013】

本発明のさらなる態様では、

a)脱水され、治療的に活性なポリペプチドと、

b)少なくとも一の半極性プロトン性有機溶媒、

を含有し、該ポリペプチドが、水溶液中のポリペプチドのpIから少なくとも1pH単位である標的pHで脱水されており、該標的pHが約6.0～約9.0の範囲にある非水性薬学的組成物が提供される。

【0014】

本発明のまたさらなる態様では、

a)脱水され、治療的に活性なポリペプチドと、

b)少なくとも一の半極性プロトン性有機溶媒、

を含有し、該ポリペプチドが、水溶液中のポリペプチドのpIから少なくとも1pH単位である標的pHで脱水されており、該標的pHが約6.0～約9.0の範囲にあり、但し、ポリペプチドが、インスリン分泌性ペプチド、GLP-1(7-37)又はそのアナログもしくは誘導体、又はエキセンディン又はそのアナログもしくは誘導体ではない、非水性薬学的組成物が提供される。

【0015】

本発明の他の実施態様では、

a) 10-100のアミノ酸を含有する、脱水された治療的に活性なポリペプチドと、  
b) 少なくとも一の半極性プロトン性有機溶媒、  
の混合物を含有し、該ポリペプチドが、水溶液中のポリペプチドのpIから少なくとも1  
pH単位である標的pHで脱水されている非水性薬学的組成物が提供される。好ましい実  
施態様では、標的pHは約6.0～約9.0の範囲にある。

【0016】

本発明のさらなる他の実施態様では、

a) 10-100のアミノ酸を含有する、脱水された治療的に活性なポリペプチドと、  
b) 少なくとも一の半極性プロトン性有機溶媒、  
の混合物を含有し、該ポリペプチドが、水溶液中のポリペプチドのpIから少なくとも1  
pH単位である標的pHで脱水されている非水性薬学的組成物が提供される。好ましい実  
施態様では、標的pHは約6.0～約9.0の範囲にあり、但し、ポリペプチドは、イン  
スリン分泌性ペプチド、GLP-1(7-37)又はそのアナログもしくは誘導体、又はエキ  
センディン又はそのアナログもしくは誘導体ではない。

【0017】

ここで使用される「非水性」なる用語は、10%w/w未満の水分を含有する組成物を  
意味する。本発明の組成物は、より好ましい実施態様においては8%w/w未満の水分、  
さらに好ましい実施態様においては5%w/w未満の水分、またさらに好ましい実施態様  
においては3%w/w未満の水分、特に好ましい実施態様においては2%w/w未満の水分  
を含有する。

【0018】

ポリペプチドに関連してここで使用される「脱水」なる用語は、水溶液から乾燥された  
ポリペプチドを意味する。ここで使用される場合、「標的pH」なる用語は、脱水された  
ポリペプチドが、約40mg/ml又はそれ以上の濃度で、純水に再水和された場合に確  
立されるであろう水溶液のpHを意味する。標的pHは、乾燥によりポリペプチドが回収  
される、ポリペプチド水溶液のpHと、典型的には同一である。しかしながら、ポリペ  
プチド溶液が揮発性の酸又は塩基を含有しているならば、ポリペプチド溶液のpHは標的  
pHと同一ではない。ポリペプチドのpH履歴は、半極性プロトン性有機溶媒に溶解可能な  
ポリペプチドの量に対する決定因子となるであろうことが見出された。

【0019】

本発明において、ポリペプチドは、水溶液中のポリペプチドのpIから少なくとも1p  
H単位である標的pHで脱水されている。よって、本発明の一態様では、標的pHは、ポ  
リペプチドの等電点より1pH単位以上、上である。本発明の別の態様では、標的pHは  
、ポリペプチドの等電点より1pH単位以上、下である。好ましい態様では、標的pHは  
、ポリペプチドのpIより、1.5pH以上、上又は下である。さらに好ましい態様では  
、標的pHは、ポリペプチドのpIより、2.0pH以上、上又は下である。さらなる態  
様では、標的pHは、ポリペプチドのpIより、2.5pH単位、上又は下である。さら  
なる態様では、標的pHは、ポリペプチドのpIより上である。

【0020】

「揮発性塩基」とは、室温で65Pa以上の蒸気圧を有する塩基、又は室温で65Pa  
以上の蒸気圧を有する塩基を含む水性共沸混合物等、加熱及び/又は減圧時に、ある程度  
蒸発するであろう塩基を意味する。揮発性塩基の例は、水酸化アンモニウム、テトラアル  
キルアンモニウム水酸化物、第2級アミン類、第3級アミン類、アリアルアミン類、脂肪  
族アミン類又は重炭酸アンモニウム又は組合せである。例えば、揮発性塩基は、重炭酸塩  
、炭酸塩、アンモニア、ヒドラジン、又は有機塩基、例えば低級脂肪族アミン類、特にト  
リメチルアミン、トリエチルアミン、ジエタノールアミン類、トリエタノールアミン、及  
びそれらの塩であってよい。さらに、揮発性塩基は、水酸化アンモニウム、エチルアミン  
又はメチルアミン又はそれらの組合せであってもよい。

「揮発性酸」とは、室温で65Pa以上の蒸気圧を有する酸、又は室温で65Pa以上  
の蒸気圧を有する酸を含む水性共沸混合物等、加熱及び/又は減圧時に、ある程度蒸発す

10

20

30

40

50

るであろう酸を意味する。揮発性酸の例は、炭酸、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、及び酪酸である。

【 0 0 2 1 】

ここに記載する「非揮発性塩基」とは、室温で 6 5 P a 以下の蒸気圧を有する塩基等、加熱時に蒸発しない又は一部のみが蒸発する塩基を意味する。非揮発性塩基は、アルカリ金属塩、アルカリ金属の水酸化物、アルカリ土類金属塩、アルカリ土類金属の水酸化物、及びアミノ酸、又はその組合せからなる群から選択可能である。非揮発性塩基の例は、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、及び酸化カルシウムである。

ここに記載する「非揮発性酸」とは、室温で 6 5 P a 以下の蒸気圧を有する酸等、加熱時に蒸発しない又は一部のみが蒸発する酸を意味する。非揮発性酸の例は、塩酸、リン酸及び硫酸である。

【 0 0 2 2 】

ここで使用される「ポリペプチドの p I 」なる用語は、ポリペプチドの等電点を意味する。

ここで使用される場合「等電点」なる用語は、ペプチド等の高分子の全体的な正味荷電が 0 である p H 値を意味する。ペプチドにはいくつかの荷電群が存在してよく、等電点においては、これら全ての荷電の合計が 0 になる。等電点を越えた p H では、ペプチドの全体的な正味荷電は負であるのに対し、等電点以下の p H 値では、ペプチドの全体的な正味荷電は正となるであろう。

【 0 0 2 3 】

タンパク質の p I は、等電点電気泳動等、電気泳動技術により実験的に決定することができる：

p H 勾配は、非対流培地、例えばポリアクリルアミドゲルにおいて確立される。タンパク質がシステムに導入されると、適用される電場の影響下、ゲルを通過して移動する。正に荷電したタンパク質は陰極に移動するであろう。最終的に、移動したタンパク質は、正味電荷が 0 であり、焦点が合ったと言われる p H 勾配の所定の点に到達する。これがタンパク質の等電点 ( p I ) である。ついで、タンパク質はゲルに固定され、染色される。ついで、公知の p I 値を有するマーカー分子に対して、ゲル上のタンパク質の位置を比較することにより、タンパク質の p I を決定することができる。

【 0 0 2 4 】

与えられた p H 値におけるタンパク質の正味荷電は、従来からの方法により、当業者により理論的に推定されるであろう。本質的に、タンパク質の正味荷電は、タンパク質中の荷電アミノ酸：アスパラタート ( -カルボキシル基)、グルタマート ( -カルボキシル基)、システイン (チオール基)、チロシン (フェノール基)、ヒスチジン (イミダゾール側鎖)、リジン ( -アンモニウム基) 及びアルギニン (グアニジニウム基) の分数電荷の合計に等価である。さらに、タンパク質末端基 ( -N H <sub>2</sub> 及び -C O O H ) の電荷も考慮すべきである。イオン化基の分数電荷は固有の p K a 値から算出することができる。

【 0 0 2 5 】

ポリペプチドの乾燥、すなわち脱水は、任意の従来からの乾燥方法、例えば噴霧-、凍結-、真空-、オープン (open) - 及び接触乾燥により実施することができる。本発明の一態様では、ポリペプチド溶液は噴霧乾燥されて、約 1 0 % 以下の水分含有量となる。水分含有量は、実験部分に記載されているような乾燥試験における損失 (重量) により算出 / 測定されて、約 8 % 以下、約 6 % 以下、約 5 % 以下、約 4 % 以下、約 3 % 以下、約 2 % 以下、又は約 1 % 以下であってよい。

本発明の一態様では、ポリペプチドは噴霧乾燥される。本発明のさらなる態様では、ポリペプチドは凍結乾燥される。

【 0 0 2 6 】

本発明の一態様では、有機溶媒での選択された標的 p H で脱水することによる、ポリペプチドの事前処理で得られる溶解度は、少なくとも 2 0 m g / m l である。さらなる態様では、有機溶媒での脱水されたポリペプチドの溶解度は少なくとも 3 0 m g / m l である

10

20

30

40

50

。またさらなる態様では、有機溶媒での脱水されたポリペプチドの溶解度は少なくとも 40 mg / ml である。またさらなる態様では、有機溶媒での脱水されたポリペプチドの溶解度は少なくとも 50 mg / ml である。またさらなる態様では、有機溶媒での脱水されたポリペプチドの溶解度は少なくとも 60 mg / ml である。またさらなる態様では、有機溶媒での脱水されたポリペプチドの溶解度は少なくとも 70 mg / ml である。またさらなる態様では、有機溶媒での脱水されたポリペプチドの溶解度は少なくとも 80 mg / ml である。またさらなる態様では、有機溶媒での脱水されたポリペプチドの溶解度は少なくとも 100 mg / ml である。

#### 【0027】

ここで使用される「半極性プロトン性有機溶媒」なる用語は、O-H 又は N-H 結合を有する親水性で水混和性の炭素含有溶媒、又はその混合物を意味する。極性は溶媒の誘電率又は双極子モーメントに反映される。溶媒の極性は、溶解する化合物の種類、混和している他の溶媒又は液状化合物に応じて決定される。典型的には、極性溶媒は極性化合物を溶解させ、無極性溶媒は無極性化合物を溶解させ：「同類のものが同類のものを溶解する」。

#### 【0028】

半極性溶媒は、20 - 50 の範囲の誘電率を有する溶媒として定義され、これに対し、極性及び無極性溶媒は、それぞれ 50 以上、20 以下の誘電率により定義される。半極性かつプロトン性の例は、参照としての水と共に表 1 に列挙している。

表 1 . 選択された半極性プロトン性有機溶媒及び参照としての水の誘電率 (静的誘電率) (Handbook of Chemistry and Physics, CMC Press, 誘電率は静電場又は緩和が生じない比較的 low 周波数で測定)

溶媒 (温度, ケルビン)	誘電率, $\epsilon^*$
水 (293.2)	80.1
プロパントリオール [グリセロール] (293.2)	46.53
エタンジオール [エチレングリコール] (293.2)	41.4
1,3-プロパンジオール (293.2)	35.1
メタノール (293.2)	33.0
1,4-ブタンジオール (293.2)	31.9
1,3-ブタンジオール (293.2)	28.8
1,2-プロパンジオール [プロピレングリコール] (303.2)	27.5
エタノール (293.2)	25.3
イソプロパノール (293.2)	20.18

#### 【0029】

本文脈中、1, 2-プロパンジオールとプロピレングリコールは交換可能に使用される。本文脈中、プロパントリオールとグリセロールは交換可能に使用される。本文脈中、エタ

ンジオールとエチレングリコールは交換可能に使用される。本発明の一態様では、溶媒は、ポリオール類からなる群から選択される。ここで使用される場合「ポリオール」なる用語は、複数のヒドロキシル基を有する化学化合物を意味する。

本発明のさらなる態様では、溶媒は、ジオール類及びトリオール類からなる群から選択される。ここで使用される場合「ジオール」なる用語は、2つのヒドロキシル基を有する化学化合物を意味する。ここで使用される場合「トリオール」なる用語は、3つのヒドロキシル基を有する化学化合物を意味する。

#### 【0030】

本発明のさらなる態様では、溶媒は、グリセロール (プロパントリオール)、エタ

ール(エチレングリコール)、1,3-プロパンジオール、メタノール、1,4-ブタンジオール、1,3-ブタンジオール、プロピレングリコール(1,2-プロパンジオール)、エタノール、及びイソプロパノール、又はそれらの混合物からなる群から選択される。本発明のさらなる態様では、溶媒はプロピレングリコール及びグリセロールからなる群から選択される。本発明の好ましい態様では、溶媒はグリセロールである。この溶媒は高用量であっても生体融合性があり、インスリンペプチド化合物に対して高い溶媒キャパシティを有する。本発明の他の好ましい態様では、溶媒はプロピレングリコール及びエチレングリコールからなる群から選択される。これらの溶媒は低粘度であり、中程度の用量で生体融合性があり、インスリンペプチドに対して非常に高い溶媒キャパシティを有する。

#### 【0031】

10

溶媒は、メイラード反応等、溶解したポリペプチドの化学的劣化を最小にするために、例えばアルデヒド類、ケトン類及び他の還元不純物が低含有量である高純度のものであるべきである。ポリペプチドの劣化を低下させるために、ポリオール等の半極性プロトン性有機溶媒(類)を含有する製剤に、グリシルグリシン及びエチレンジアミン等のスカベンジャー分子を添加してもよく、さらなる還元不純物の形成率を低下させるために、酸化防止剤を添加することもできる。

#### 【0032】

本発明の一態様では、有機溶媒は、少なくとも20% w/wの量で、薬学的組成物に存在している。本発明のさらなる態様では、有機溶媒は、少なくとも30% w/wの量で存在している。本発明のさらなる態様では、有機溶媒は、少なくとも40% w/wの量で存在している。本発明のさらなる態様では、有機溶媒は、少なくとも50% w/wの量で存在している。本発明のさらなる態様では、有機溶媒は、少なくとも80% w/wの量で存在している。

20

#### 【0033】

薬学的組成物の保存安定性を増加させるために、有利には、標的pHを約6.0~約9.0に調節することが見出されている。本発明の一態様では、標的pHは、約6.0~約9.0、例えば約6.2~約8.4、約6.4~約8.7、約6.5~約8.5、約7.0~約8.5、又は約7.2~約8.3である。一態様では、標的pHは、約7.4以上、約7.6以上、約7.8以上、約8.0以上、約8.2以上、約8.4以上、又は約8.6以上である。上述したような脱水の後には、ポリペプチドがフィブリル化する傾向が少なくなるため、保存安定性が増加すると考えられる。

30

#### 【0034】

ここで使用される場合、「保存安定性のある薬学的組成物」なる用語は、治療用タンパク質に関連して、少なくとも規制当局により要求されている期間、安定している薬学的組成物を意味する。好ましくは、保存安定性のある薬学的組成物は、5で少なくとも1年安定している。保存安定性は、化学的安定性並びに物理的安定性を含む。化学的不安定性は、加水分解、ラセミ化、酸化又は架橋等、共有結合の分解に関与している。製剤の化学的安定性は、逆相(RP-HPLC)及びサイズ排除クロマトグラフィー(SE-HPLC)により評価される。本発明の一態様では、保存期間中のペプチド関連不純物の形成は、全ペプチド含有量の10%未満である。本発明のさらなる態様では、保存期間中のペプチド関連不純物の形成は5%未満である。RP-HPLC分析は、典型的には、水-アセトニトリル又は水-エタノール混合物において実施される。一実施態様では、RP-HPLC工程における溶媒は、塩、例えば $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{KCl}$ 、及びバッファー系、例えばホスファート、及びシトラート、及びマレイン酸を含有しているであろう。溶媒中に必要とされる塩の濃度は、約0.1M~約1M、好ましくは0.2M~0.5M、最も好ましくは0.3~0.4Mであってよい。適切な時間内にカラムから溶出させるために、塩濃度を増加するには、有機溶媒の濃度を増加させる必要がある。

40

#### 【0035】

物理的不安定性は、高次構造の損失、凝集、フィブリル化、沈殿、又は表面への吸着を含む、天然構造に関連した立体構造変化に関与している。例えば、インスリンペプチド及

50



びアミリン化合物は、フィブリル化により不安定になる傾向があることが知られている。製剤の物理的安定性は、種々の期間、異なる温度で製剤を保存した後の、例えば目視検査、比濁分析、及びチオフラビンTアッセイ等の従来からの手段により評価されうる。

立体構造安定性は、例えばHudson及びAndersen, Peptide Science, vol 76 (4), pp. 298-308 (2004)に記載されているようなNMR、及び円偏光二色性により評価することができる。

#### 【0036】

ここで使用される場合「治療的に活性なポリペプチド」又は「治療用ポリペプチド」なる用語は、付与された疾患又はその合併症の臨床症状を治癒、軽減又は部分的に停止させることができるポリペプチドを意味する。

10

本発明のさらなる態様では、ここで使用される場合「治療的に活性なポリペプチド」又は「治療用ポリペプチド」なる用語は、治療用途用の開発されている、又は治療用途用の開発されたポリペプチドを意味する。

#### 【0037】

このことを達成するのに十分な量が、「治療の有効量」として定義される。

それぞれの目的に対する有効な量は、疾患又は損傷の重症度、並びに被験者の体重及び一般的状態に依存するであろう。適切な用量を決定するには、全て熟練した医師又は獣医の通常の技量の範囲内である、値のマトリックスを構築し、マトリックスにおける種々の点を試験することにより、常套的な実験を使用して達成することができることが理解されるであろう。

20

#### 【0038】

「ポリペプチド」又は「ペプチド」なる用語は、ここでは交換可能に使用され、ペプチド結合により結合した少なくとも5つの構成アミノ酸からなる化合物を意味する。構成アミノ酸は遺伝暗号によりコードされたアミノ酸の群からのものであってよく、それらは、遺伝暗号によりコードされない天然アミノ酸、並びに合成アミノ酸であってもよい。遺伝暗号によりコードされない天然アミノ酸は、例えばヒドロキシプロリン、 $\gamma$ -カルボキシグルタマート、オルニチン、ホスホセリン、D-アラニン、及びD-グルタミンである。合成アミノ酸は、化学合成により製造されたアミノ酸、すなわち遺伝暗号によりコードされたアミノ酸のD-異性体、例えばD-アラニン及びD-ロイシン、Aib( $\alpha$ -アミノイソ酪酸)、Abu( $\beta$ -アミノ酪酸)、Tle(tert-ブチルグリシン)、 $\gamma$ -アラニン、3-アミノメチル安息香酸、アントラニル酸を含む。

30

#### 【0039】

ポリペプチド及びペプチドの生産は当該分野でよく知られている。ポリペプチド又はペプチドは、例えば古典的なペプチド合成、例えばt-Boc又はFmoc化学を使用する固相ペプチド合成、又は他の十分に確立された技術により生成されてもよい。Green及びWuts, 「Protective Groups in Organic Synthesis」, John Wiley & Sons, 1999を参照。またポリペプチド又はペプチドは、(ポリ)ペプチドをコードし、(ポリ)ペプチドを発現可能なDNA配列を含有する宿主細胞を、ペプチドの発現を可能にする条件下、適切な栄養培地で培養することを含む方法により生成されてよい。非天然アミノ酸を含有する(ポリ)ペプチドにおいて、組換え細胞は、例えばtRNA変異体の使用によって非天然アミノ酸が(ポリ)ペプチド内に導入されるように修飾されるべきである。

40

#### 【0040】

ここで使用される「薬学的組成物」なる用語は、製薬用賦形剤、例えば界面活性剤、バッファー、保存料、及び浸透圧調節剤と共に、治療的に活性なポリペプチドを含有する生成物を意味し、該薬学的組成物は、ヒトに投与されることにより、重度の疾患又は疾病を処置、予防又は軽減させるのに有用である。よって、薬学的組成物は、製薬用製剤としても、当該分野で公知である。再構成される薬学的組成物のpHは、室温で所定の再構成液中における再構成によって生産される再構成組成物について測定されるpH値であることが理解されなければならない。

ここで使用される場合「製薬的に許容可能な」なる用語は、通常の製薬適用に適してい

50

る、すなわち患者に重大な有害事象を生じせしめないことを意味する。

【 0 0 4 1 】

ここで使用される「バッファー」なる用語は、化学反応のために生じるような組成物の pH が経時的に変化する傾向を低減させる薬学的組成物中の化学的化合物を意味する。バッファーには、化学物質、例えばリン酸ナトリウム、トリス、グリシン、及びクエン酸ナトリウムが含まれる。

ここで使用される「保存料」なる用語は、微生物の活性(増殖及び代謝)を防止又は遅延化させるために薬学的組成物に添加される化学的化合物を意味する。薬学的に許容可能な保存料の例は、フェノール、m-クレゾール、及びフェノールとm-クレゾールの混合物である。

10

ここで使用される「安定剤」なる用語は、ペプチドを安定させるために、すなわちこのような組成物の保存期間及び/又は使用中期間を増加させるために、ペプチド含有薬学的組成物に添加される化学物質を意味する。薬学的製剤に使用される安定剤の例は、L-グリシン、L-ヒスチジン、アルギニン、グリシルグリシン、エチレンジアミン、シトラート、EDTA、亜鉛、塩化ナトリウム、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、及び界面活性剤及び酸化防止剤、例えば -トコフェロール及びL-アスコルビン酸である。

【 0 0 4 2 】

ここで使用される「界面活性剤」なる用語は、表面及び界面、例えば液体-空気、液体-液体、液体-容器、又は液体-任意の固体に吸着可能な任意の物質、特に洗浄剤を意味する。界面活性剤は、洗浄剤、エトキシ化ヒマシ油、ポリグリコール化グリセリド、アセチル化モノグリセリド、ソルビタンの脂肪酸エステル、ポリソルバート、例えばポリソルバート 20、ポロキサマー、例えばポロキサマー 188 及びポロキサマー 407、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン誘導体、例えばアルキル化及びアルコキシ化された誘導体(トウイーン類(tweens)、例えばトウイーン-20又はトウイーン80)、モノグリセリド類又はそのエトキシ化誘導体、ジグリセリド類又はそのポリオキシエチレン誘導体、グリセロール、コール酸又はその誘導体、レシチン類、アルコール類及びリン脂質、グリセロリン脂質(レシチン類、ケファリン類、ホスファチジルセリン)、グリセロ糖脂質(ガラクトピラノシド)、スフィンゴリン脂質(スフィンゴミエリン)、及びスフィンゴ糖脂質(セラミド類、ガングリオシド類)、DSS(ドキュセートナトリウム、CAS登録番号[577-11-7])、ドキュセートカルシウム、CAS登録番号[128-49-4])、ドキュセートカリウム、CAS登録番号[7491-09-0])、SDS(ドデシル硫酸ナトリウム又はラウリル硫酸ナトリウム)、ホスファチジン酸ジバルミトイル、カプリル酸ナトリウム、胆汁酸及びその塩、及びグリシン又はタウリンコンジュゲート、ウルソデオキシコール酸、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、タウロコール酸ナトリウム、グリココール酸ナトリウム、N-ヘキサデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホナート、アニオン性(アルキル-アリール-スルホナート類)の一価の界面活性剤、バルミトイル-リゾホスファチジル-L-セリン、リゾリン脂質(例えば、エタノールアミン、コリン、セリン又はスレオニンの1-アシル-sn-グリセロ-3-ホスファートエステル)、リゾホスファチジル及びホスファチジルコリンのアルキル、アルコキシ(アルキルエステル)、アルコキシ(アルキルエーテル)-誘導体、例えばリゾホスファチジルコリンのラウロイル及びミリストイル誘導体、ジバルミトイルホスファチジルコリン及び極性頭部基の修飾体、コリン類、エタノールアミン類、ホスファチジン酸、セリン類、スレオニン類、グリセロール、イノシトール、及び正に帯電したDODAC、DOTMA、DCP、BISHOP、リゾホスファチジルセリン、及びリゾホスファチジルスレオニン、双性イオン性界面活性剤(例えば、N-アルキル-N,N-ジメチルアンモニオ-1-プロパンスルホナート、3-コールアミド-1-プロピルジメチルアンモニオ-1-プロパンスルホナート、ドデシルホスホコリン、ミリストイルリゾホスファチジルコリン、鶏卵リゾレシチン)、カチオン性界面活性剤(第4級アンモニウム塩基)(例えばセチル-トリメチルアンモニウムブロミド、セチルピリジニウムクロリド)、非イオン性界面活性

20

30

40

50

剤(例えば、アルキルグルコシド類、例えばドデシル- $\beta$ -D-グルコピラノシド、ドデシル- $\alpha$ -D-マルトシド、テトラデシル- $\beta$ -D-グルコピラノシド、デシル- $\beta$ -D-マルトシド、ドデシル- $\beta$ -D-マルトシド、テトラデシル- $\beta$ -D-マルトシド、ヘキサデシル- $\beta$ -D-マルトシド、デシル- $\beta$ -D-マルトトリオシド、ドデシル- $\beta$ -D-マルトトリオシド、テトラデシル- $\beta$ -D-マルトトリオシド、ヘキサデシル- $\beta$ -D-マルトトリオシド、n-ドデシル-スクロース、n-デシル-スクロース、脂肪アルコールエトキシラート(例えば、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、特にオクタエチレングリコールモノトリデシルエーテル、オクタエチレングリコールモノドデシルエーテル、オクタエチレングリコールモノテトラデシルエーテル)、ブロックコポリマー、例えばポリエチレンオキシド/ポリプロピレンオキシドのブロックコポリマー(プルロニクス(Pluronic)/テトロニクス(Tetronics)、トリトン(Triton) X-100)、エトキシ化ソルビタンアルカノアート類の界面活性剤(例えば、トウイーン-40、トウイーン80、ビリジ(Brij)-35)、フシジン酸誘導体(例えばタウロ-ジヒドロフシジン酸ナトリウム等)、長鎖脂肪酸及びそれらのC<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>塩(例えばオレイン酸及びカプリル酸)、アシルカルニチン類及び誘導体、リジン、アルギニン又はヒスチジンのN-アシル化誘導体、リジン又はアルギニンの側鎖アシル化誘導体、リジン、アルギニン又はヒスチジンと中性又は酸性アミノ酸の任意の組合せを含有するジペプチドのN-アシル化誘導体、中性アミノ酸と2つの帯電したアミノ酸の任意の組合せを含有するトリペプチドのN-アシル化誘導体から選択されてよく、又は界面活性剤は、イミダゾリン誘導体又はそれらの混合物の群から選択されてもよい。

#### 【0043】

ここで使用される「疾患の処置」なる用語は、疾患、病状又は疾病が発症した患者の管理及び世話を意味する。処置の目的は、疾患、病状又は疾病に抗することである。処置は、疾患、病状又は疾病をなくす又はコントロールするための、並びに疾患、病状又は疾病に関連する兆候又は合併症を軽減するための活性化化合物の投与、及び疾患、病状又は疾病の予防を含む。

ここで使用される「疾患の予防」なる用語は、疾患の臨床的発症の前に、疾患が発症する危険性を個々に管理及び世話することと定義される。予防の目的は、疾患、病状又は疾病の発症に抗することであり、兆候又は合併症発症を予防又は遅延化するため、関連する疾患、病状又は疾病の発症を予防又は遅延化するための、活性化化合物の投与を含む。

#### 【0044】

ペプチドに言及してここで使用される「アナログ」なる用語は、ペプチドの一又は複数のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている、及び/又は一又は複数のアミノ酸残基がペプチドから欠失している、及び/又は一又は複数のアミノ酸残基がペプチドに付加されている、修飾ペプチドを意味する。アミノ酸残基のこのような付加又は欠失は、ペプチドのN末端及び/又はペプチドのC末端で生じる可能性がある。一実施態様では、アナログは天然のペプチドに対して6未満の修飾(置換、欠失、付加)を有する。他の実施態様では、アナログは天然のペプチドに対して5未満の修飾(置換、欠失、付加)を有する。他の実施態様では、アナログは天然のペプチドに対して4未満の修飾(置換、欠失、付加)を有する。他の実施態様では、アナログは天然のペプチドに対して3未満の修飾(置換、欠失、付加)を有する。他の実施態様では、アナログは天然のペプチドに対して2未満の修飾(置換、欠失、付加)を有する。他の実施態様では、アナログは天然のペプチドに対して唯一の修飾(置換、欠失、付加)を有する。付加及び/又は交換されたアミノ酸残基は、コード化可能なアミノ酸残基、又は他の天然に生じる残基、又は純粋に合成されたアミノ酸残基のいずれであってもよい。

#### 【0045】

親ペプチドに関してここで使用される「誘導体」なる用語は、化学的に修飾された親タンパク質又はそのアナログを意味し、ここで少なくとも一の置換も親タンパク質又はそのアナログには存在せず、すなわち親タンパク質は共有的に修飾されている。典型的な修飾は、アミド類、炭水化物、アルキル基、アシル基、エステル、ペグ化等である。

#### 【0046】

ここで使用される「GLP-1化合物」なる用語は、GLP-1(7-37)(配列番号：1)、のインスリン分泌性アナログ、及びそのインスリン分泌性誘導体を意味する。

ペプチド又は化合物に言及してここで使用される「インスリン分泌性」なる用語は、血糖値の上昇に応じて、インスリンの分泌を刺激する能力を意味する。インスリン分泌性ペプチド及び化合物は、GLP-1レセプターのアゴニストである。化合物のインスリン分泌性は当該分野で公知のインビトロ又はインビボアッセイにより測定されうる。

【0047】

ここで使用される「エキセンディン-4化合物」なる用語は、エキセンディン-4(1-39)(配列番号：2)、そのインスリン分泌性フラグメント、そのインスリン分泌性アナログ、及びそのインスリン分泌性誘導体と定義される。

10

ここで使用される「インスリンペプチド」とは、CysA7とCysB7との間、及びCysA20とCysB19との間にジスルフィド架橋、及びCysA6とCysA11との間に内部ジスルフィド架橋を有するヒトインスリン、ブタインスリン又はウシインスリン、又はそのインスリンアナログ又は誘導体を意味する。

【0048】

ここで使用される場合、インスリンアナログとは、天然インシュリンに生じる少なくとも一のアミノ酸残基が欠失及び/又は置換される、及び/又は少なくとも一のアミノ酸残基が付加されることにより、自然に生じるインスリン、例えばヒトインスリンの構造から形式的に誘導可能な分子構造を有するポリペプチドのことである。

一態様では、本発明のインシュリンアナログは、親インスリンに対して8未満の修飾(置換、欠失、付加)を有する。一態様では、インシュリンアナログは、親インスリンに対して7未満の修飾(置換、欠失、付加)を有する。一態様では、インシュリンアナログは、親インスリンに対して6未満の修飾(置換、欠失、付加)を有する。他の態様では、インシュリンアナログは、親インスリンに対して5未満の修飾(置換、欠失、付加)を有する。他の態様では、インシュリンアナログは、親インスリンに対して4未満の修飾(置換、欠失、付加)を有する。他の態様では、インシュリンアナログは、親インスリンに対して3未満の修飾(置換、欠失、付加)を有する。他の態様では、インシュリンアナログは、親インスリンに対して2未満の修飾(置換、欠失、付加)を有する。

20

【0049】

インスリンアナログは、速効性、持続性及び/又はプロテアーゼに対する安定性が得られるようなものであってよい。

30

一態様では、インスリンアナログは速効性が得られるような、すなわち、インスリンアナログの作用開始が、投与後4時間、又は3時間、2時間、1時間又は0.5時間内であるようなものである。他の態様では、インスリンアナログは持続性が得られるような、すなわちインスリンアナログの作用が、投与後4時間、又は6時間、8時間、12時間、18時間又は24時間以上継続するようなものである。

【0050】

インスリンアナログは、B鎖の28位が、天然Pro残基から、Asp、Lys、Leu、Val、Ala又はIleの一つに修飾され得るものであってよい。他の態様では、インスリンのB29位のLysは、Pro又はGluに修飾されている。一態様では、本発明のインスリンアナログは、インスリンのB28位にあるアミノ酸残基が、Pro、Asp、Lys、Leu、Val、又はAlaであり、B29位にあるアミノ酸残基がLys又はProであり、場合によってはB30位のアミノ酸残基が欠失しているものである。また、A21位のAsnは、Ala、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Met、Ser、Thr、Trp、Tyr又はVal、特にGly、Ala、Ser、又はThr、好ましくはGlyに修飾されてもよい。さらに、B3位のAsnはLys、Thr、Ser、Gln、Glu又はAspに修飾されてよい。インスリンアナログのさらなる具体例は、des(B30)ヒトインスリン；des(B30)ヒトインスリンアナログ；PheB1が欠失しているインスリンアナログ；A鎖及び/又はB鎖がN-末端伸長を有しているインスリンアナログ、及びA鎖及び/又はB鎖がC-末端伸長を有して

40

50

いるインスリンアナログである。例えば、1又は2のArgが、B1位に付加されていてもよい。他の態様では、本発明のインスリンアナログは、des(B28-B30)ヒトインスリン、des(B27)ヒトインスリン、又はdes(B30)ヒトインスリンである。さらなる他の態様では、本発明のインシュリンアナログは、B3位にあるアミノ酸残基がLysであり、B29位にあるアミノ酸残基がGlu又はAspであるインスリンアナログである。

他の態様では、本発明のインシュリンアナログは、des(B28-B30)ヒトインスリン、des(B27)ヒトインスリン、又はdes(B30)ヒトインスリンである。さらなる他の態様では、本発明のインシュリンアナログは、B3位にあるアミノ酸残基がLysであり、B29位にあるアミノ酸残基がGlu又はAspであるインスリンアナログである。

10

#### 【0051】

本発明のインシュリンアナログは、タンパク質分解的に安定したインスリンアナログ、すなわちプロテアーゼによる分解に対して保護されているインスリンアナログであってよい。タンパク質分解的に安定したインスリンアナログの非限定的例は、例えば国際公開第2008/034881号(Novo Nordisk)に記載されている。

一態様では、本発明のインシュリンアナログはタンパク質分解的に安定したインスリンアナログである。

#### 【0052】

ここで使用される場合「タンパク質分解的に安定したインスリンアナログ」とは、ヒトインスリンに対して一又は複数の変異、すなわち一又は複数の置換、付加、挿入及び/又は欠失を含み、ヒトインスリンに対して、一又は複数のプロテアーゼによる低速分解を受けたインスリンアナログを意味する。本発明の一態様では、本発明のインシュリンアナログは：ペプシン(例えば、イソ型のペプシンA、ペプシンB、ペプシンC及び/又はペプシンF)、キモトリプシン(例えば、イソ型のキモトリプシンA、キモトリプシンB及び/又はキモトリプシンC)、トリプシン、インスリン分解酵素(IDE)、エラスターゼ(例えば、イソ型の膵エラスターゼI及び/又はII)、カルボキシペプチダーゼ(例えば、イソ型のカルボキシペプチダーゼA、カルボキシペプチダーゼA2、及び/又はカルボキシペプチダーゼB)、アミノペプチダーゼ、カテプシンD、及びラット、ブタ又はヒトから誘導される腸抽出物に存在する他の酵素からなる群から選択される一又は複数の酵素による分解に対して安定している。

20

30

#### 【0053】

本発明の一態様では、タンパク質分解的に安定したインスリンアナログは、A14位のアミノ酸がGlu又はHisであり、B25位のアミノ酸がHisであり、場合によっては一又は複数の付加的な変異をさらに有するインスリンアナログ：

- ・A8位のアミノ酸がHisであり、及び/又はA12位のアミノ酸がGlu又はAspであり、及び/又はA13位のアミノ酸がHis、Asn、Glu又はAspであり、及び/又はA14位のアミノ酸がAsn、Gln、Glu、Arg、Asp、Gly又はHisであり、及び/又はA15位のアミノ酸がGlu又はAspであり；さらに

- ・B1位のアミノ酸がGluであり、及び/又はB16位のアミノ酸がGlu又はHisであり、及び/又はB25位のアミノ酸がHisであり、及び/又はB26位のアミノ酸がHis、Gly、Asp又はThrであり、及び/又はB27位のアミノ酸がHis、Glu、Lys、Gly又はArgであり、及び/又はB28位のアミノ酸がHis、Gly又はAspであり；

40

場合によっては一又は複数の付加的な変異をさらに有するインスリンアナログ；又はA14位のアミノ酸がLys、Glu、Arg、Asp、Pro及びHisからなる群から選択され；インスリンアナログのB鎖が親インスリンに対して少なくとも2の変異を有しており、2又はそれ以上の変異がB27、B28、B29及びB30位にあるアミノ酸の欠失、又はB30位にあるアミノ酸の欠失と、B25位はHis、B26位はGly又はGlu、B27位はGly又はLys、B28位はAsp、His、Gly、Lys又はG

50

1 u へのアミノ酸置換から選択されるアミノ酸置換との組合せの形態であるインスリンアナログである。

【0054】

さらなる態様では、本発明のインシュリンは、ヒトインスリン；Des B30ヒトインスリン；Asp B28ヒトインスリン；Asp B28, Des B30ヒトインスリン；Lys B3, Glu B29ヒトインスリン；Lys B28, Pro B29ヒトインスリン；Glu A14, His B25ヒトインスリン；His A14, His B25ヒトインスリン；Glu A14, His B25, Des B30ヒトインスリン；His A14, His B25, Des B30ヒトインスリン；Glu A14, His B25, des B27, des B28, des B29, des B30ヒトインスリン；Glu A14, His B25, Glu B27, des B30ヒトインスリン；Glu A14, His B16, His B25, des B30ヒトインスリン；His A14, His B16, His B25, des B30ヒトインスリン；His A8, Glu A14, His B25, Glu B27, des B30ヒトインスリン；His A8, Glu A14, Glu B1, Glu B16, His B25, Glu B27, des B30ヒトインスリン；及びHis A8, Glu A14, Glu B16, His B25, des B30ヒトインスリンからなる群から選択される。

10

「des B30インスリン」、「des B30ヒトインスリン」とは、B30アミノ酸残基を欠くインスリン、又はそのアナログを意味する。

【0055】

20

「親インスリン」とは、天然に生じるインスリン、例えばヒトインスリン又はブタインスリンを意味する。また親インスリンはインスリンアナログであってもよい。

本発明の一態様では、治療的に活性なポリペプチドはインスリンペプチドである。

本発明の一態様では、インスリンペプチドは、ヒトインスリン、ヒトインスリンのアナログ、ヒトインスリンの誘導体、又はヒトインスリンアナログの誘導体である。

本発明の一態様では、インスリンペプチドはヒトインスリンである。

【0056】

本発明の一実施態様では、インスリンペプチドはインスリン誘導体である。本発明のさらなる態様では、インスリン誘導体は、B29-N<sup>-</sup>-ミリスチル-des(B30)ヒトインスリン、B29-N<sup>-</sup>-パルミトイル-des(B30)ヒトインスリン、B29-N<sup>-</sup>-ミリスチルヒトインスリン、B29-N<sup>-</sup>-パルミトイルヒトインスリン、B28-N<sup>-</sup>-ミリスチル Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>ヒトインスリン、B28-N<sup>-</sup>-パルミトイル Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>ヒトインスリン、B30-N<sup>-</sup>-ミリスチル-Thr<sup>B29</sup>Lys<sup>B30</sup>ヒトインスリン、B30-N<sup>-</sup>-パルミトイル-Thr<sup>B29</sup>Lys<sup>B30</sup>ヒトインスリン、B29-N<sup>-</sup>-(N-パルミトイル-<sup>-</sup>-グルタミル)-des(B30)ヒトインスリン、B29-N<sup>-</sup>-(N-リトコリル-<sup>-</sup>-グルタミル)-des(B30)ヒトインスリン、B29-N<sup>-</sup>-(<sup>-</sup>-カルボキシヘプタデカノイル)-des(B30)ヒトインスリン、及びB29-N<sup>-</sup>-(<sup>-</sup>-カルボキシヘプタデカノイル)ヒトインスリンからなる群から選択される。

30

本発明の他の態様では、インスリン誘導体はB29-N<sup>-</sup>-ミリスチル-des(B30)ヒトインスリンである。

40

【0057】

本発明のさらなる実施態様では、インスリンペプチドは酸安定性インスリンである。酸安定性インスリンは、次のアミノ酸残置換：

A21G

A21G、B28K、B29P

A21G、B28D

A21G、B28E

A21G、B3K、B29E

A21G、des B27

A21G、B9E

50

A 2 1 G、B 9 D

A 2 1 G、B 1 0 E

の一つを有するヒトインスリンのアナログから選択されてよい。

【0058】

本発明のさらなる態様では、インスリンペプチドはインスリンアナログである。インスリンアナログは、B 2 8 位が、A s p、L y s、L e u、V a l、又はA l aであり、B 2 9 位がL y s又はP r oであるアナログ；及びd e s (B 2 8 -B 3 0)、d e s (B 2 7)又はd e s (B 3 0)ヒトインスリンからなる群から選択されてよい。

【0059】

本発明の他の態様では、インスリンアナログは、B 2 8 位がA s p又はL y sであり、B 2 9 位がL y s又はP r oであるヒトインスリンのアナログである。

本発明の他の態様では、インスリンアナログはd e s (B 3 0)ヒトインスリンである。

本発明の他の態様では、インスリンアナログは、B 2 8 位がA s pであるヒトインスリンのアナログである。

本発明の他の態様では、インスリンアナログは、B 3 位がL y sであり、B 2 9 位がG l u又はA s pであるアナログである。

【0060】

本発明の他の態様では、インスリンアナログ又は誘導体は、欧州特許第0792290号(Novo Nordisk A/S)、欧州特許第0214826号、及び欧州特許第0705275号(Novo Nordisk A/S)、米国特許第5504188号(Eli Lilly)、欧州特許第0368187号(Aventis)、米国特許第5750497号及び同6011007号、欧州特許第375437号及び欧州特許第383472号に開示されているものから選択され、このようなインスリンには、限定されるものではないが、インスリングルリジン(B位にあるアミノ酸アスパラギンがリジンで置換され、B 2 9 位にあるリジンがグルタミン酸で置換されていることで、ヒトインスリンとは異なり、Apidra(登録商標)としても公知)、L y s<sup>B 2 8</sup> P r o<sup>B 2 9</sup> ヒトインスリン(Humalog(登録商標))、及びA s p<sup>B 2 8</sup> ヒトインスリン(インスリンアスパルト(Novolog(登録商標)))が含まれ得る。

【0061】

本発明の一態様では、前記ヒトインスリンアナログはA s p<sup>B 2 8</sup>-ヒトインスリンである。本発明の他の態様では、前記ヒトインスリンアナログはL y s<sup>B 2 8</sup>、P r o<sup>B 2 9</sup>-ヒトインスリンである。本発明の他の態様では、前記ヒトインスリンアナログはL y s<sup>B 3</sup>、G l u<sup>B 2 9</sup>-ヒトインスリン(インスリンガルリジン)である。本発明の他の態様では、前記ヒトインスリンアナログはd e s (B 3 0)ヒトインスリンである。

【0062】

また、前駆体又は中間体の誘導体は、本発明でカバーされる。このような誘導体の例は、ヒトインスリンのB-及びA-鎖を含有する単鎖インスリン、又は結合ペプチドにより結合しているそのアナログ又は誘導体である。

【0063】

本発明のインシュリン誘導体は、天然に生じるインスリン、又は、例えばインスリン骨格の一又は複数の位置に側鎖が導入されることにより、もしくはインスリンのアミノ酸残基の基を酸化又は還元することにより、もしくは遊離のカルボキシル基をエステル基又はアミド基に転換することにより化学的に修飾されたインスリンアナログである。他の誘導体は、例えば、d e s B 3 0ヒトインスリン、又はヒトインスリンのB 2 9 位にある遊離のアミノ基又はヒドロキシル基をアシル化することにより得られる。アシル化ポリペプチドの非限定的例は、例えば参照としてここに導入される、国際公開第95/07931号に見出される。

【0064】

本発明の一態様では、治療的に活性なポリペプチドは、100kDa未満、50kDa未満、又は10kDa未満の分子量を有する。

本発明の一態様では、治療的に活性なポリペプチドは、100kDa未満、50kDa

10

20

30

40

50

未満、又は10kDa未満の分子量を有し、但し、ポリペプチドはインスリン分泌性ペプチド、GLP-1(7-37)又はそのアナログ又は誘導体、又はエキセンディン又はそのアナログ又は誘導体ではない。

【0065】

本発明の他に態様では、治療的に活性なポリペプチドは、100未満のアミノ酸、又は90未満のアミノ酸、又は60未満のアミノ酸を含有する。本発明の他の態様では、治療的に活性なポリペプチドは、少なくとも10のアミノ酸、少なくとも15のアミノ酸、又は少なくとも20のアミノ酸を含有する。本発明のさらなる態様では、治療的に活性なポリペプチドは、10-100のアミノ酸、さらなる態様では15-90のアミノ酸、さらなる態様では20-80のアミノ酸、さらなる態様では20-70のアミノ酸、さらなる態様では25-70のアミノ酸、さらなる態様では25-65のアミノ酸、さらなる態様では25-60のアミノ酸、又は25-55のアミノ酸を含有する。さらなる態様では、治療的に活性なポリペプチドは、30-70のアミノ酸、30-65のアミノ酸、30-60のアミノ酸、又は30-55のアミノ酸を含有する。

10

【0066】

本発明のさらなる態様では、治療的に活性なポリペプチドは、100未満のアミノ酸、又は90未満のアミノ酸、又は60未満のアミノ酸を含有する。本発明の他の態様では、治療的に活性なポリペプチドは、少なくとも10のアミノ酸、少なくとも15のアミノ酸、又は少なくとも20のアミノ酸を含有する。本発明のさらなる態様では、治療的に活性なポリペプチドは、10-100のアミノ酸、さらなる態様では15-90のアミノ酸、さらなる態様では20-80のアミノ酸、さらなる態様では20-70のアミノ酸、さらなる態様では25-70のアミノ酸、さらなる態様では25-65のアミノ酸、さらなる態様では25-60のアミノ酸、又は25-55のアミノ酸を含有する。さらなる態様では、治療的に活性なポリペプチドは、30-70のアミノ酸、30-65のアミノ酸、30-60のアミノ酸、又は30-55のアミノ酸を含有し、但し、ポリペプチドはインスリン分泌性ペプチド、GLP-1(7-37)又はそのアナログ又は誘導体、又はエキセンディン又はそのアナログ又は誘導体ではない。

20

【0067】

本発明の一態様では、治療的に活性なポリペプチドは、水溶性のポリペプチドである。他の態様では、治療的に活性なポリペプチドは、25の溶液当たり少なくとも100μgのポリペプチド濃度で水に溶解する。さらなる他の態様では、治療的に活性なポリペプチドは、水溶液中のポリペプチドの等電点から、少なくとも2pH単位のpH値で水に溶解する。よって、本発明の一態様では、ポリペプチドは、ポリペプチドの等電点より2pH単位以上、上のpH値で水に溶解する。本発明の他の態様では、ポリペプチドは、ポリペプチドの等電点より2pH単位以上、下のpH値で水に溶解する。さらなる態様では、ポリペプチドは、ポリペプチドのpIより2.5pH単位以上、上又は下のpH値で水に溶解する。さらなる態様では、ポリペプチドは、ポリペプチドのpIより3.0pH単位以上、上又は下のpH値で水に溶解する。さらなる態様では、ポリペプチドは、ポリペプチドのpIより3.5pH単位、上又は下のpH値で水に溶解する。

30

【0068】

本発明の一態様では、治療的に活性なポリペプチドは、上述した態様のいずれかに従い、水に溶解するポリペプチドであり、但し、ポリペプチドはインスリン分泌性ペプチド、GLP-1(7-37)又はそのアナログ又は誘導体、又はエキセンディン又はそのアナログ又は誘導体ではない。

40

【0069】

「水に溶解する」とは、高濃度のポリペプチド、例えば溶液1ml当たり100μgのポリペプチドが、25の水溶液又はバッファーに溶解することを意味する。水溶液中に含有されるポリペプチドが溶解しているかどうかを測定する方法は、当該技術で公知である。

一実施態様では、溶液を30000gで20分、遠心分離にかけ、上清中のポリペプチ

50



ド濃度をRP-HPLCにより測定してもよい。この濃度が、組成物を作製するのに通常使用されるポリペプチド濃度に対する実験誤差の範囲内で等しいならば、ポリペプチドは本発明の組成物に十分に溶解している。

他の実施態様では、本発明の組成物におけるポリペプチドの溶解度は、組成物が収容され天然イル容器を目視することにより、簡単に測定することができる。溶液が目で見えて透明であり、何の粒状物質も懸濁、又は容器の側面/底に沈殿していないならば、ポリペプチドは溶解している。

#### 【0070】

例えばシクロスポリン類は水に溶解しないことが、当業者に知られている。本発明の一態様では、治療的に活性なポリペプチドは、単鎖インスリン(例えば、国際公開第2005/054291号に記載されているもの)、インスリン模倣物(例えば、国際公開第2006/018450号に記載されているもの)、MC4レセプターに結合するポリペプチド、ヒト成長ホルモン又はそのアナログ、第VII因子又はそのアナログ、副甲状腺ホルモン又はそのアナログ、ヒト卵胞刺激ホルモン又はそのアナログ、成長ホルモン、例えば血小板由来増殖因子(PDGF)、オベスタチン(Obestatin)、トランスフォーミング増殖因子(TGF- $\beta$ )、トランスフォーミング増殖因子(TGF- $\beta$ )、上皮成長因子(EGF)、血管内皮増殖因子(VEGF)、ソマトメジン、例えばインスリン成長因子I(IGF-I)、インスリン成長因子II(IGF-II)、エリスロポエチン(EPO)、トロポポエチン(TPO)又はアンジオポエチン、インターフェロン、プロ-ウロキナーゼ、ウロキナーゼ、組織プラスミノゲンアクチベーター(t-PA)、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター1、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター2、フォン・ヴィルブランド因子、サイトカイン、例えばインターロイキン、例えばインターロイキン(IL)1、IL-1Ra、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-20又はIL-21、コロニー刺激因子(CFS)、例えばGM-CSF、幹細胞因子、腫瘍壊死因子、例えばTNF- $\alpha$ 、リンホトキシン- $\alpha$ 、リンホトキシン- $\beta$ 、CD40L、又はCD30L、プロテアーゼインヒビター、例えばアプロチニン、酵素、例えばスーパーオキシドジスターゼ、アスパラギナーゼ、アルギナーゼ、アルギニンデアミナーゼ、アデノシンデアミナーゼ、リボヌクレアーゼ、カタラーゼ、ウリカーゼ、ビリルビンオキシダーゼ、トリプシン、パパイン、アルカリホスファターゼ、 $\beta$ -グルコニダーゼ(glucoronidase)、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ又はバトロキソピン、オピオイド、例えばエンドルフィン類、エンケファリン類又は非天然オピオイド類、ホルモン又はニューロペプチド、例えばカルシトニン、グルカゴン、ガストリン類、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)、コレシストキニン類、黄体形成ホルモン、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン、絨毛性ゴナドトロピン、コルチコトロピン放出因子、パソプレシン、オキシトシン、抗利尿ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン、レラキシン、プロラクチン、ペプチドYY、ニューロペプチドY、膵臓ポリペプチド、レプチン、CART(コカイン及びアンフェタミン調節転写物)、CART関連ペプチド、ペリリピン、ACTH又は $\beta$ -MSH等、メラノコルチンレセプターに作用するペプチドホルモン、メラニン凝集ホルモン、ナトリウム利尿ペプチド、アドレノメデュリン、エンドセリン、セクレチン、アミリン、血管作用性小腸ペプチド(VIP)、脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)、ボンベシン、ボンベシン様ペプチド、チモシン、ヘパリン結合タンパク質、可溶性CD4、視床下部放出ホルモン、メラノトニン類(melanotonins)、及びそのアナログからなる群から選択される。

#### 【0071】

立体構造が安定しているタンパク質をベースにした薬剤は、変性及びフィブリル化による構造の不可逆的損失を最小にするため、また生物活性を維持するために重要である。特に大きなポリペプチド及びタンパク質は、複雑な折り畳みパターンの故に、立体構造の変化に関して不安定である。また、既知のフィブリル化の経緯を持つポリペプチド、例えばインスリン及びアミリンは、三次構造の不安定化(つまり、溶融球状状態の形成)に対し

10

20

30

40

50

て特に感受性である。

【 0 0 7 2 】

それぞれの目的に有効な量は、疾患又は損傷の重症度、並びに被験者の体重及び一般的状態に依存するであろう。

本発明の一態様では、製薬用製剤は 0 . 1 % w / w ~ 5 0 % w / w の濃度で、治療的に活性なポリペプチドを含有する。

それぞれの目的に有効な量は、疾患又は損傷の重症度、並びに被験者の体重及び一般的状態に依存するであろう。

ここで使用される場合「約」なる用語は、記載された数値にほぼ近接している、例えばプラス又はマイナス 1 0 % であることを意味している。

10

【 0 0 7 3 】

本発明は：

a ) 場合によっては賦形剤を含有する治療的に活性なポリペプチドの水溶液を提供し、  
b ) p H 値を、ポリペプチドの p I より、1 単位、好ましくは 2 単位、より好ましくは 2 . 5 p H 単位以上、上又は下の標的 p H 値に調節し、  
c ) 従来からの乾燥技術、例えば凍結-及び噴霧乾燥により、ポリペプチドから水分を除去(脱水)し、

d ) 例えば攪拌、回転又は他の混合方法により、半極性かつプロトン性の非水性媒体に、ポリペプチドを混合及び溶解させ、

e ) 場合によっては、ポリペプチドの非水性溶液を濾過又は遠心分離し、溶解していない無機塩を除去し、

20

f ) 場合によっては、例えば固体状乾燥剤の添加又は真空乾燥により、残留していた水分を除去し、

g ) 場合によっては、溶液用には、加圧された定量吸入器に、賦形剤、例えばヒドロフルオロアルカン噴霧剤及び共溶媒を添加、又は経口投与形態用には、洗浄剤、ポリマー、脂質及び共溶媒を添加する；

ことによる、製薬用溶液を調製する方法をさらに提供する。

【 0 0 7 4 】

本発明は：

a ) 場合によっては賦形剤を含有する治療的に活性なポリペプチドの水溶液を提供し、  
b ) p H 値を、ポリペプチドの p I より、1 単位、好ましくは 2 単位、より好ましくは 2 . 5 p H 単位以上、上又は下の標的 p H 値に調節し、  
c ) 従来からの乾燥技術、例えば凍結-及び噴霧乾燥により、ポリペプチドから水分を除去(脱水)し、

30

d ) 例えば攪拌、回転又は他の混合方法により、半極性かつプロトン性の非水性媒体に、ポリペプチドを混合及び溶解させ、

e ) 場合によっては、ポリペプチドの非水性溶液を濾過又は遠心分離し、溶解していない無機塩を除去し、

f ) 場合によっては、例えば固体状乾燥剤の添加又は真空乾燥により、残留していた水分を除去し、

40

g ) 場合によっては、溶液用には、加圧された定量吸入器に、賦形剤、例えばヒドロフルオロアルカン噴霧剤及び共溶媒を添加、又は経口投与形態用には、洗浄剤、ポリマー、脂質及び共溶媒を添加する；

ことによる、製薬用溶液を調製する方法で、但し、ポリペプチドが、インスリン分泌性ペプチド、G L P - 1 ( 7 - 3 7 ) 又はそのアナログもしくは誘導体、又はエキセンディン又はそのアナログもしくは誘導体ではない方法をさらに提供する。

【 0 0 7 5 】

本発明は：

a ) 場合によっては安定剤、例えば亜鉛及びグリシルグリシンを含有する、治療的に活性なポリペプチドの水溶液を提供し、

50

b) 例えば、非揮発性塩基又は酸、特に塩酸又は水酸化ナトリウムを溶液に添加することにより、ポリペプチドのpIより、1単位、好ましくは2単位、より好ましくは2.5pH単位以上、上又は下のpH値に調節し、

c) 従来からの乾燥技術、例えば凍結-及び噴霧乾燥により、ポリペプチドから水分を除去(脱水)し、

d) 例えば攪拌、回転又は他の混合方法により、半極性かつプロトン性の非水性媒体に、ポリペプチドを混合及び溶解させ、

e) 場合によっては、ポリペプチドの非水性溶液を濾過又は遠心分離し、溶解していない無機塩を除去し、

f) 場合によっては、例えば固体状乾燥剤の添加又は真空乾燥により、残留していた水分を除去し、

g) 場合によっては、溶液用には、加圧された定量吸入器に、賦形剤、例えばヒドロフルオロアルカン噴霧剤及び共溶媒を添加、又は経口投与形態用には、洗浄剤、ポリマー、脂質及び共溶媒を添加する；

ことによる、薬学的組成物を調製する方法をさらに提供する。

#### 【0076】

本発明は：

a) 場合によっては安定剤、例えば亜鉛及びグリシルグリシンを含有する、治療的に活性なポリペプチドの水溶液を提供し、

b) 例えば、非揮発性塩基又は酸、特に塩酸又は水酸化ナトリウムを溶液に添加することにより、ポリペプチドのpIより、1単位、好ましくは2単位、より好ましくは2.5pH単位以上、上又は下のpH値に調節し、

c) 従来からの乾燥技術、例えば凍結-及び噴霧乾燥により、ポリペプチドから水分を除去(脱水)し、

d) 例えば攪拌、回転又は他の混合方法により、半極性かつプロトン性の非水性媒体に、ポリペプチドを混合及び溶解させ、

e) 場合によっては、ポリペプチドの非水性溶液を濾過又は遠心分離し、溶解していない無機塩を除去し、

f) 場合によっては、例えば固体状乾燥剤の添加又は真空乾燥により、残留していた水分を除去し、

g) 場合によっては、溶液用には、加圧された定量吸入器に、賦形剤、例えばヒドロフルオロアルカン噴霧剤及び共溶媒を添加、又は経口投与形態用には、洗浄剤、ポリマー、脂質及び共溶媒を添加する；

ことによる、薬学的組成物を調製する方法で、但し、ポリペプチドが、インスリン分泌性ペプチド、GLP-1(7-37)又はそのアナログもしくは誘導体、又はエキセンディン又はそのアナログもしくは誘導体ではない方法をさらに提供する。

#### 【0077】

本発明の一態様では、ポリペプチドは水溶液に添加される。水溶液は純水であってもよく、又は賦形剤もしくはアルカリ性溶液を含有していてもよい。本発明の一態様では、ポリペプチド溶液のpHは、非揮発性塩基を含有するアルカリ性溶液を用いて調節される。非揮発性塩基は、アルカリ金属塩、アルカリ金属の水酸化物、アルカリ土類金属塩、アルカリ土類金属の水酸化物、及びアミノ酸、又はそれらの組合せからなる群から選択することができる。例えば、pHは、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、酸化カルシウム、又はそれらの任意の組合せを用いて調節することができる。本発明の他の態様では、ポリペプチド溶液のpHは、塩酸、リン酸及び硫酸から選択される非揮発性酸を用いて調節される。

#### 【0078】

本発明の一態様では、ポリペプチドの非水性溶液はグリシルグリシンを含有する。グリシルグリシンは、グリセルアルデヒド等、溶媒中の還元不純物のスカベンジャーとして作用する可能性がある。一態様では、グリシルグリシンは、例えば溶液中、約4mM~20

10

20

30

40

50

0 m Mのグリシルグリシン濃度で、インスリンを含有するプロピレングリコール溶液に添加される。

【 0 0 7 9 】

本発明の一態様では、ポリペプチドの非水性溶液は、トウイーン 8 0 とオレイン酸を含有する。トウイーン 8 0 とオレイン酸がポリペプチドの非水性媒体に添加される場合、ポリペプチド溶液は、水性液体での希釈時にマイクロエマルジョンを形成し、その後経口投与される。マイクロエマルジョンは吸収促進剤として作用する可能性があり、さらなる再現可能な吸収動態を生じせしめる。溶液中のトウイーン 8 0 の濃度は例えば約 3 0 ~ 7 0 % w / w であり、オレイン酸の濃度は例えば 1 0 ~ 3 0 % w / w であろう。

【 0 0 8 0 】

一態様では、本発明は、このような処置を必要とする患者において、1 型糖尿病、2 型糖尿病、及び高血糖症に起因する他の状態を処置するための、薬学的組成物に関連している。

一態様では、本発明は、製薬的に許容可能な担体及び / 又は製薬的に許容可能な添加剤を有する、本発明の薬学的組成物で、このような処置を必要とする患者において、1 型糖尿病、2 型糖尿病、及び高血糖症に起因する他の状態を処置するために提供可能な組成物に関する。

【 0 0 8 1 】

本発明の一態様では、治療的有效量の本発明の薬学的組成物を患者に投与することを含む、このような処置を必要とする患者において、1 型糖尿病、2 型糖尿病、及び高血糖症に起因する他の状態を処置する方法を提供する。

本発明の一態様では、場合によっては製薬的に許容可能な担体及び / 又は製薬的に許容可能な添加剤と共に、治療的有效量の本発明の薬学的組成物を患者に投与することを含む、このような処置を必要とする患者において、1 型糖尿病、2 型糖尿病、及び高血糖症に起因する他の状態を処置する方法を提供する。

【 0 0 8 2 】

本発明の一態様では、1 型糖尿病、2 型糖尿病、及び高血糖症に起因する他の状態の処置に使用される、本発明の薬学的組成物を製造する方法を提供する。

本発明の一態様では、1 型糖尿病、2 型糖尿病、及び高血糖症に起因する他の状態の処置に使用される、薬学的組成物を製造する方法を提供する。

【 0 0 8 3 】

薬学的組成物

本発明の組成物は、例えば皮下、経口、経鼻又は肺に投与することができる。

皮下投与用として、本発明の組成物は、公知の治療的に活性なポリペプチド製剤と同じように処方される。さらに、皮下投与用として、本発明の組成物は、公知の治療的に活性なポリペプチドと同じように投与され、一般的に、医者はこの手順に通じている。

【 0 0 8 4 】

治療的に活性なペプチドがインスリンである本発明の一態様では、本発明の組成物は、循環インスリンペプチドレベルを増加させ、及び / 又は循環グルコースレベルを低下させるための用量効果的方式で、吸入により投与されてよい。このような投与は、糖尿病又は高血糖症等の疾患を処置するのに効果的である。例えばインスリンの効果的な投与を達成するには、約 0 . 5  $\mu$  g / k g ~ 約 5 0  $\mu$  g / k g 以上のインスリンを含有する本発明の組成物を、吸入量で投与することが必要である。治療的有效量は、インスリンレベル、血糖値、患者の身体コンディション、患者の肺の状態等を含む要因を考慮し、博識な実施者により決定することができる。

【 0 0 8 5 】

本発明の組成物は、インスリン等、治療的に活性なポリペプチドの素早い吸収を達成するために、吸入により送達されてもよい。吸入による投与は、インスリンの皮下投与に匹敵する薬物動態をもたらすことができる。治療用ペプチドがインスリンである本発明の組成物を吸入することで、循環インスリンレベルの素早い上昇、続いて血糖値の素早い低下

10

20

30

40

50

に至る。同様の粒子径及び同様の肺沈着レベルで比較される場合、典型的には、種々の吸入装置により、同様の薬物動態が提供される。

【 0 0 8 6 】

本発明において、組成物は、吸入による治療剤、例えばインスリンペプチドの投与において、当該技術で公知の任意の様々な吸入装置により送達され得る。これらの装置には、定量吸入器、ネブライザー、乾燥パウダー発生器、スプレー等が含まれる。一態様では、この発明の組成物は、加圧された定量吸入器又はスプレーにより送達される。本発明の組成物を投与するための吸入装置には、いくつかの所望される特徴がある。例えば、吸入装置による送達には、有利には信頼性、再現性及び正確性がある。良好な呼吸性のためには、吸入装置は、小粒子、例えば約  $10\ \mu\text{m}$  未満、例えば約  $1 - 5\ \mu\text{m}$  未満の粒子を送達すべきである。この発明の実施に適した商業的に入手可能な吸入装置のいくつかの特定の例は、Turbohaler<sup>TM</sup> (Astra)、Rotahaler (登録商標) (Glaxo)、Diskus (登録商標) (Glaxo)、Spiros<sup>TM</sup> 吸入器 (Dura)、Nektar より販売されている装置、3M Drug Delivery Systems and Bsepak、AERx<sup>TM</sup> (Aradigm)、Ultravent (登録商標) ネブライザー (Mallinckrodt)、Acoron II (登録商標) ネブライザー (Marquest Medical Products)、Ventolin (登録商標) 定量吸入器 (Glaxo)、Spinhaler (登録商標) パウダー吸入器 (Fisons) 等である。

10

【 0 0 8 7 】

加圧された定量吸入器 (pMDI s) は、吸入による気道への製薬用生成物の投与については、よく知られている装置である。pMDI s は、典型的には生成物、例えば液化噴霧剤に溶解した薬剤 (液状製剤)、又は液化噴霧剤に懸濁したマイクロ化粒子 (懸濁製剤) が充填された圧力抵抗性のエアゾールキャニスターを具備しており、該キャニスターには絞り弁が固定されている。液状製剤により、噴霧ビヒクル、又は適切な共溶媒、例えばエタノールとの混合物に、活性成分又は賦形剤が完全に溶解して均質であるという利点が提供される。また液状製剤により、懸濁製剤に関連した物理的安定性の問題が未然に防止され、より一貫した均一な投与形態が保証される。

20

【 0 0 8 8 】

ヒドロフルオロアルカン類、特に 1, 1, 1, 2 -テトラフルオロエタン (HFA 134a) 及び 1, 1, 1, 2, 3, 3, 3 -ヘプタフルオロプロパン (HFA 227) 及びそれらの混合物は、非-CFC 噴霧剤の最も好ましい候補であると認識されている。絞り弁を作動させることにより、少量のスプレー生成物が放出され、それによって、液状の噴霧剤の圧力で、溶解した又はマイクロ化した薬剤粒子が、容器の外、患者に運ばれる。弁アクチュエーターは、患者の中咽頭にエアゾールスプレーを向けるのに使用される。キャニスターは、不活性有機コーティングで被覆された内部表面を有する、アルミニウム又はステンレススチールからなり、国際公開第03/078538号に記載されているような、ブチルゴムガasketを有する、63マイクロリットルと計測されたチャンバーを有する絞り弁を具備する。

30

【 0 0 8 9 】

当業者が認識しているように、本発明の製剤、送達される製剤の量、及び単一用量の投与の持続時間は、使用される吸入装置の種類に依存している。ネブライザー等、いくつかのエアゾール送達システムにとって、投与頻度及びシステムが稼働している時間の長さは、主として、エアゾール中の治療用ポリペプチドの濃度に依存するであろう。

40

例えば、投与時間が短いと、ネブライザー溶液においては、より高い濃度の治療用ポリペプチドを使用することができる。定量吸入器等の装置は、高濃度のエアゾールを生成することができ、所望の量のポリペプチドの送達を、より短い時間で作動させることができる。パウダー吸入器等の装置は、付与された充填量の薬剤が装置から排出されるまで、活性剤を送達させる。この種の吸入器において、付与されたパウダー量における、この発明の組成物の量は、一回の投与で送達される用量を決定する。

【 0 0 9 0 】

吸入装置で送達される製剤におけるポリペプチド、例えばインスリンの粒子径は、肺、気道下部及び肺胞内においてなされる、例えばインスリンの能力に関して重要である。この発明の組成物中のポリペプチドは、送達されるポリペプチドの少なくとも約 10 %、例

50

えば約10%~20%、又はそれ以上が肺に沈着するように処方される。口呼吸するヒトにとって、肺沈着の最大効率、約2 $\mu$ m~約3 $\mu$ mの粒子径で得られることが知られている。粒子径が約5 $\mu$ m以上になると、肺沈着はかなり低減する。粒子径が約1 $\mu$ m以下であると、肺沈着の低下が引き起こされ、治療に有効な十分な量の粒子を送達することが困難になる。よって、吸入器により送達されるポリペプチドの粒子は、約10 $\mu$ m未満、例えば約1 $\mu$ m~5 $\mu$ mの範囲の粒子径を有する。ポリペプチドの処方、選択された吸入装置において所望される粒子径が生じるように選択される。

#### 【0091】

ポリペプチド溶液は、場合によっては、呼吸器官及び肺投与に適した製薬用の担体又は賦形剤と組合せてもよい。このような担体は、患者に送達される液体中の治療用ポリペプチド、例えばインスリンの濃度を低下させることが所望されている場合は、単に増量剤として供給されてもよいが、組成物の安定性を高めるように供給されてもよい。

10

適切な物質には、炭水化物、例えば(a)単糖類、特にフルクトース、ガラクトース、グルコース、D-マンノース、ソルボース等；二糖類、例えばラクトース、トレハロース、セロビオース等；シクロデキストリン類、例えば2-ヒドロキシプロピル-シクロデキストリン；及び多糖類、例えばラフィノース、マルトデキストリン類、デキストラン類等；(b)アミノ酸、例えばグリシン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン、リジン、ヒスチジン、アルギニン等；(c)有機酸と塩基から調製される有機塩、例えばクエン酸ナトリウム、アスコルビン酸ナトリウム、グルコン酸マグネシウム、グルコン酸ナトリウム、塩酸トロメタミン等；(d)ペプチド及びタンパク質、例えばアスパルテーム、ヒト血清アルブミン、ゼラチン等；(e)アルジトール類、例えばマンニトール、キシリトール等が含まれる。担体の好ましい群には、ラクトース、トレハロース、ラフィノース、マルトデキストリン、グリシン、クエン酸ナトリウム、塩酸トロメタミン、ヒト血清アルブミン、及びマンニトールが含まれる。

20

#### 【0092】

このような担体物質は、脱水、例えば噴霧乾燥前に、すなわち噴霧乾燥用に調製されるポリペプチド溶液に担体物質を添加することにより、治療用ポリペプチド、例えばインスリンと組合せられてもよい。そのように、担体物質はタンパク質粒子の一部として、同時に形成されるであろう。

典型的には、担体がポリペプチドと共に噴霧乾燥により形成される場合、ポリペプチドは5%~95%、好ましくは20%~80%の範囲の重量パーセントで、個々の粒子に存在しているであろう。粒子の残りは、主として担体物質(典型的には、重量で5%~95%、通常は20%~80%)であるが、上述した他の成分を含み得る、バッファ(類)を含有していてもよい。

30

#### 【0093】

非水性インスリン製剤は、他の活性成分と組合せられてもよい。例えば、糖尿病の処置性を改善するために、インスリンに、少量のアミリン又は活性アミリンアナログを組合せることが望ましい場合もある。アミリンは、正常な(糖尿病ではない)個人において、膵臓 $\beta$ -細胞からインスリンと共に分泌されるホルモンである。アミリンはインビボにおいてインスリン活性を調節すると考えられており、インスリンとアミリンの同時投与により、血糖の制御を改善することが提案されている。本発明の組成物において、インスリンとアミリンとを組合せることにより、このような同時投与を達成するための、特に簡便な生成物が提供されるであろう。アミリンは、0.1重量%~10重量%(一服中のインスリンの全重量に基づく)、好ましくは0.5重量%~2.5重量%でインスリンと組合せてよい。アミリンは商業的供給者、例えばAmylin Corporation, San Diego, Californiaから入手され、本発明の組成物に容易に処方することができる。例えば、アミリンは、インスリン、場合によっては担体、パウダー状生成物を生成するために乾燥された溶液スプレーと共に、水溶液又は他の適切な溶液に溶解されていてもよい。

40

#### 【0094】

噴霧乾燥されたポリペプチドを含むスプレーは、ポリペプチドの懸濁液又は溶液を、加

50

圧下にて、強いてノズルを通過させることにより製造することができる。ノズルサイズ及び構造、適用圧力、及び液体供給速度は、所望する出量及び粒子径が達成されるように選択することができる。例えば、キャピラリー又はノズルフィード部に接続した電場により、電気スプレーを製造することができる。

有利には、スプレーにより送達される例えばインスリンの粒子は、約  $10\text{ }\mu\text{m}$  未満、例えば約  $1\text{ }\mu\text{m}$  ~ 約  $5\text{ }\mu\text{m}$  の範囲の粒子径を有する。

【0095】

ポリオール等の半極性プロトン性有機溶媒に溶解し、脱水された、例えば噴霧乾燥されたポリペプチドを含有する本発明の薬学的組成物は、このような処置を必要とする患者に、非経口的に投与されてもよい。非経口投与は、シリンジ、場合によってはペン様シリンジにより、皮下、筋肉内又は静脈内注射で実施されてよい。また非経口投与は、注入ポンプにより実施することもできる。

【0096】

本発明の調製物は、ポンプ、例えばインスリンポンプに関連して使用されてよい。インスリンポンプはプレフィックスされ、使い捨てのものであってよく、又はインスリン調製物は、取り外し可能な容器から供給されてもよい。インスリンポンプは皮膚に搭載、移植又は持ち運び去れてもよく、ポンプの保存区画から患者へのインスリン調製物の経路は、多少曲がっていてもよい。インスリンポンプの非限定的例は、米国特許第5,957,895号、米国特許第5,858,001号、米国特許第468,221号、米国特許第4,468,221号、米国特許第5,957,895号、米国特許第5,858,001号、米国特許第6,074号、米国特許第5,858,001号、米国特許第5,527,288号、及び米国特許第6,074,369号に開示されている。

【0097】

脱水、例えば噴霧乾燥されたポリペプチドの、本発明の注射用組成物は、所望する最終生成物が付与されるのに適切なように、半極性プロトン性有機溶媒、例えばポリオールに成分を溶解及び混合することを含む、製薬工業の従来からの技術を使用して調製することができる。

【0098】

近年、注射は、体循環のために、生物学的に活性なタンパク質を投与する典型的な方法である。受容者は、注射により不快感や痛みを被るおそれがある。この理由等のため、投与方法として、注射を使用するには、患者のコンプライアンスに関して問題がある場合がある。注射の代替法の一つは、生物学的に活性なポリペプチドの経口投与である。インスリンのケースにおいて、経口送達は、簡便性及びコンプライアンスの問題を越える利点を有する。胃腸管に吸収されるインスリンは、門脈に放出され、直接肝臓に運ばれるために、膵臓から分泌されるインスリンの生理機能を模倣している。門脈循環への吸収により、インスリン分泌を調節する末梢-門脈のインスリン勾配が維持される。肝臓へのその第1経路で、約60%のインスリンが保持され、代謝され、よって末梢性高インスリン血症の発生率、糖尿病関連性の全身合併症の要因が低下する。インスリン処置及び他の経口用抗糖尿病剤の心配される珍しくはない合併症は、低血糖症である。

【0099】

しかしながら、ポリペプチドの経口生物学的利用能は、胃腸管での広範囲にわたるタンパク質分解、及び上皮透過性の低さのため、極めて低い。例えば、酵素的分解の研究では、天然インシュリンが、トリプシン及び -キモトリプシンの存在下で、かなり分解されることが示されている。よって、タンパク質工学、例えばペグ化又はホットスポットの変異による、タンパク質分解に対するポリペプチドの安定化は、経口生物学的利用能を改善するために、一般的に使用される方法である。タンパク質分解を低減させる他の方法は、ナノ粒子、マイクロ粒子、マイクロエマルジョン、マイクロエマルジョンプレ濃縮物(プレコンセントレイト)、リボソーム等に、ポリペプチドを導入することである。薬剤は胃及び胃腸管の不適な環境から保護されるばかりでなく、これらの粒子は、経腸経路から、バイエル板を介して、体循環に取り込まれ得る。

【0100】

一実施態様では、非水性薬学的組成物は、マイクロエマルジョンプレ濃縮物である。これは、例えば水中油型(o/w)マイクロエマルジョン中、水性媒体、例えば水又は胃腸液での希釈時に自発的自己乳化した組成物である。マイクロエマルジョンは、低nm範囲、例えば20-400nmでの乳化相の平均ドメインサイズを有する、熱力学的に安定した系であると理解される。

#### 【0101】

一般的に、マイクロエマルジョンプレ濃縮物は、一又は複数の親水性成分、一又は複数の脂質親和性成分、一又は複数の非イオン性界面活性剤及び/又は共界面活性剤、及び活性成分、例えば治療用ペプチド又はタンパク質で、プレ濃縮混合物に完全に溶解するものを含有する。さらに、マイクロエマルジョンプレ濃縮物は、適切であるならば、従来からのアジュバント及び添加剤を含有してよい。これらの自己(マイクロ)-乳化プレ濃縮物は、胃腸管でマイクロエマルジョンを形成するとの見込みで、摂取することができる。マイクロエマルジョンプレ濃縮物は、腸溶コーティングされたソフトゼラチンカプセルにカプセル化されて投与されてよい。多くのマイクロエマルジョンが、経口投与後に、いくつかの治療用化合物の生物学的利用能を高めると報告されている。

#### 【0102】

マイクロエマルジョンプレ濃縮物の組成例は以下の通りである：

- a) 少なくとも一の半極性プロトン性有機溶媒、例えばポリオール(例えば、プロピレングリコール及び/又はグリセロール)
- b) 一又は複数の親水性成分、例えばグリセロール及び/又はプロピレングリコール
- b) 一又は複数の脂質親和性成分、例えば油(例えば、モノ-ジグリセリド類及び/又はトリグリセリド類)
- c) 一又は複数の非イオン性界面活性剤、例えばポロキサマー及び/又はポリソルバート類
- d) 一又は複数の共界面活性剤、例えばエタノール
- e) 脱水された治療的に活性なポリペプチド(例えばインスリン)
- f) 一又は複数の添加剤、例えば酸化防止剤及び/又は安定剤

#### 【0103】

半極性プロトン性有機溶媒、例えばポリオールに溶解し、脱水された、例えば噴霧乾燥された治療的に活性なポリペプチドを含有する本発明の薬学的組成物は、このような処置を必要とする患者に、エアゾールスプレーの形態で、口腔又は舌下に投与されてもよい。Generex Biotechnology Corporationにより開発されたOral-lyn<sup>TM</sup>製剤は、加圧された定量吸入器(pMDI)を介して投与される、口腔用エアゾール製剤の一例である。ヒドロフルオロアルカン類(HFA)、例えばHFA134a及び227は、典型的には噴霧剤として使用される。一実施態様では、本発明の治療的に活性なポリペプチドは、典型的には、pIより1単位以上、上又は下のpH値で、水に高度に溶解する。水はHFA噴霧剤と極めて乏しい混和性しかないため、タンパク質用に、プロピレングリコール及びエタノール等の溶媒を使用するのが有利である。前記溶媒はHFA噴霧剤との混和性を有する。溶液型の定量吸入器は、一般的に、粒子のクリーム化又は沈殿のために、用量均一性がかなり変動する傾向のある懸濁型のpMDIよりも好ましい。

溶液型のpMDIは、治療的に活性なポリペプチドに加えて、安定剤及び他の添加剤、例えば透過促進剤と共に処方されてよい。

#### 【0104】

また加圧システムの代わりに、治療的に活性なポリペプチドは、例えばニトログリセリンの舌下投与用のCoro Nitro Pump Spray(登録商標)のようにポンプ移送可能な(pumpable)ものとして口腔又は舌下に投与されてもよい。

肺沈着を回避するために、経口スプレー用エアゾールは、好ましくは10µm以上の大きさの液滴直径を有するべきである。

粘膜付着性の薬剤送達系は、非湿潤性タンパク質/ペプチド送達において、かなりの興味をもたれている。それらにより、粘膜組織における送達系の滞留時間が増加する。いく

10

20

30

40

50



つかの生体付着性送達系が、例えば経口投与後のタンパク質及びペプチドの生物学的利用能を向上させることが報告されている。

【 0 1 0 5 】

好ましい実施態様では、非水性でフリーの生体付着性組成物は、活性タンパク質又はペプチド、少なくとも一の生体付着性ポリマー、一又は複数の半極性プロトン性有機溶媒、例えばポリオール(類)を含有する。さらに組成物は、適切であるならば、従来からのアジュバント及び添加剤を含有してもよい。生体付着性ポリマーは、例えばポリ(エチレンオキシド)-ポリ(プロピレンオキシド)-ポリ(エチレンオキシド)ブロックコポリマー(例えばポロキサマー類)、ポリビニルピロリドン(例えばポビドン又はPVP)、ポリアクリル酸、ポリカルボフィル(例えばカルボポール(Carbopol)又はカーボマー(Carbomer))、キトサン、全種類のチオラート化ポリマー(例えばチオマー類(Thiomers))、セルロース、アルギナート類、ヒドロキシエチルセルロース、又は他の生体付着性ポリマーであってよい。

10

【 0 1 0 6 】

組成物は、液体、半固体又は固体状の投与形態とすることができる。

これらの新規の組成物は、これらの製剤に必要とされる水性媒体が回避でき、その保存安定性の増加、並びに生物学的利用能の増大(ポリオールにより誘発)が達成されるといった、例えば従来の生体付着性ヒドロゲルと比較して利点を有する。

生体付着性組成物の一例は以下の通りである。

- a) 脱水された治療的に活性なポリペプチド(例えばインスリン)
- b) 少なくとも一の半極性プロトン性有機溶媒、例えばポリオール(例えばプロピレングリコール及び/又はグリセロール)
- c) 生体付着性ポリマー(例えばポビドン及び/又はポロキサマー)
- d) 添加剤

20

【 0 1 0 7 】

一実施態様では、非水性の組成物は、脱水された治療的に活性なポリペプチド、少なくとも一の半極性プロトン性有機溶媒、例えばポリオール、及び一又は複数の従来からの透過促進剤の組合せを含有する。透過促進剤の例は、限定されるものではないが、脂肪酸、パルミトイルカルニチンクロリド、エチレングリコール-ビス(ベータ-アミノエチルエーテル)-N,N,N',N'-四酢酸(EGTA)、EDTA、胆汁酸塩、イオン性-並びに非イオン性界面活性剤、例えばリン脂質及びアルキルグリコシド類、ポリマー、キトサン、クエン酸、及びサリチル酸ナトリウムである。さらに組成物は、適切であるならば、従来からのアジュバント及び添加剤を含有してよい。

30

【 0 1 0 8 】

本発明の組成物は、例えば錠剤、カプセル、坐薬、液体、スプレー又はエアゾールから選択される形態で、口腔及び経口投与することができる。

好ましい実施態様では、半極性プロトン性有機溶媒、例えばポリオールをベースにした固体状の投与形態は、少なくとも一のポリオール、及び一又は複数の室温で固体状の賦形剤、例えばポロキサマー、PEG又はPEGステアラートを含有する。

【 0 1 0 9 】

他の実施態様では、組成物は、脱水された治療的に活性なポリペプチド、少なくとも一の半極性プロトン性有機溶媒、例えば少なくとも一のポリオール、及び少なくとも一の室温で固体状の非イオン性賦形剤、例えばポリキサマー類又はポリオキシエチレングリコール、又は固体状賦形剤の混合物を含有する。固体状ポロキサマー類の例は、プルロニック(Pluronic) F-127、プルロニック F-68である。固体状PEGの例はPEG 3350、PEG 4000、PEG 8000である。さらに、固体状組成物は、適切であるならば、従来からのアジュバント及び添加剤、例えば十分な錠剤化を確実にするためのバインダー、流動促進剤及び滑剤；及び錠剤が消化管で確実に破壊されるための錠剤分解剤を含有してもよい。

40

【 0 1 1 0 】

錠剤及びカプセルは、腸用コーティングで被覆されていてもよく、特定の領域について

50

適切な pH-溶解ポリマーを選択することにより、定められた pH の水性環境との接触時に破裂又は透過して、投与形態の内容物が、胃腸管(例えば、小腸及び大腸)の所望の部位で選択的に放出可能となる。適切な腸溶ポリマーの例には、限定されるものではないが、セルロースアセタートフタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、ポリビニルアセタートフタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、メタクリル酸コポリマー、セラック、メチルセルロースフタレート、セルロースアセタートトリメリタート(mellitate)、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセタートスクシナート、セルロースアセタートフタレート、セルロースアセタートスクシナート、セルロースアセタートマラート、セルロースベンゾアートフタレート、セルロースプロピオナートフタレート、カルボキシメチルエチルセルロース、エチルヒドロキシエチルセルロースフタレート、セラック、スチレン-アクリル酸のコポリマー、アクリル酸メチル-アクリル酸のコポリマー、アクリル酸メチル-メタクリル酸のコポリマー、アクリル酸ブチル-スチレン-アクリル酸のコポリマー、メタクリル酸-メタクリル酸メチルのコポリマー、メタクリル酸-アクリル酸エチルのコポリマー、アクリル酸メチル-メタクリル酸-アクリル酸オクチルのコポリマー、アクリル酸ビニル-無水マレイン酸のコポリマー、スチレン-無水マレイン酸のコポリマー、スチレン-マレイン酸モノエステルのコポリマー、ビニルメチルエーテル-無水マレイン酸のコポリマー、エチレン-無水マレイン酸のコポリマー、ビニルブチルエーテル-無水マレイン酸のコポリマー、アクリロニトリル-アクリル酸メチル-無水マレイン酸のコポリマー、アクリル酸ブチル-スチレン-無水マレイン酸のコポリマー、ポリビニルアルコールフタレート、ポリビニルアセタールフタレート、ポリビニルブチラートフタレート、及びポリビニルアセトアセタールフタレート、又はそれらの組合せが含まれる。

好ましい実施態様では、投与形態は液体を含有するソフトゼラチンカプセルである。

#### 【0111】

また本発明は、以下の実施態様に関する。

1. a) 好ましくは 10 - 100 のアミノ酸を含有する、脱水された治療的に活性なポリペプチドと、

b) 少なくとも一の半極性プロトン性有機溶媒の混合物を含有し、

該ポリペプチドが、水溶液中のポリペプチドの pI から少なくとも 1 pH 単位である標的 pH で脱水され、該標的 pH が、好ましくは約 6.0 ~ 約 9.0 の範囲にある非水性薬学的組成物。

2. a) 好ましくは 10 - 100 のアミノ酸を含有する、脱水された治療的に活性なポリペプチドと、

b) 少なくとも一の半極性プロトン性有機溶媒、の混合物を含有し、

該ポリペプチドが、水溶液中のポリペプチドの pI から少なくとも 1 pH 単位である標的 pH で脱水され、該標的 pH が、好ましくは約 6.0 ~ 約 9.0 の範囲にあり、

但し、該ポリペプチドが、インスリン分泌性ペプチド、GLP-1(7-37)又はそのアナログもしくは誘導体、又はエキセンディン又はそのアナログもしくは誘導体ではない、非水性薬学的組成物。

#### 【0112】

3. 有機溶媒がポリオール類からなる群から選択される、実施態様 1 又は 2 の薬学的組成物。

4. 有機溶媒がジオール類及びトリオール類からなる群から選択される、実施態様 3 の薬学的組成物。

5. 有機溶媒がプロピレングリコール及びグリセロールからなる群から選択される、実施態様 4 の薬学的組成物。

6. 有機溶媒がプロピレングリコールである、実施態様 5 の薬学的組成物。

7. 有機溶媒がグリセロールである、実施態様 5 の薬学的組成物。

## 【 0 1 1 3 】

- 8 . ポリペプチドが噴霧乾燥される、実施態様 1 ないし 7 のいずれか一つの薬学的組成物。
- 9 . ポリペプチドが凍結乾燥させる、実施態様 1 ないし 7 のいずれか一つの薬学的組成物。

## 【 0 1 1 4 】

- 1 0 . ポリペプチドが、ポリペプチドの p I から少なくとも 1 . 5 p H 単位である p H で脱水される、実施態様 1 ないし 9 のいずれか一つの薬学的組成物。
- 1 1 . ポリペプチドが、ポリペプチドの p I から少なくとも 2 p H 単位である p H で脱水される、実施態様 1 ないし 1 0 のいずれか一つの薬学的組成物。
- 1 2 . ポリペプチドが、ポリペプチドの p I から少なくとも 2 . 5 p H 単位以上である p H で脱水される、実施態様 1 ないし 1 1 のいずれか一つの薬学的組成物。

10

## 【 0 1 1 5 】

- 1 3 . 有機溶媒での脱水されたポリペプチドの溶解度が少なくとも 2 0 m g / m l である、実施態様 1 ないし 1 2 のいずれか一つの薬学的組成物。
- 1 4 . 有機溶媒での脱水されたポリペプチドの溶解度が少なくとも 3 0 m g / m l である、実施態様 1 ないし 1 2 のいずれか一つの薬学的組成物。
- 1 5 . 有機溶媒での脱水されたポリペプチドの溶解度が少なくとも 4 0 m g / m l である、実施態様 1 ないし 1 2 のいずれか一つの薬学的組成物。
- 1 6 . 有機溶媒での脱水されたポリペプチドの溶解度が少なくとも 5 0 m g / m l である、実施態様 1 ないし 1 2 のいずれか一つの薬学的組成物。
- 1 7 . 有機溶媒での脱水されたポリペプチドの溶解度が少なくとも 6 0 m g / m l である、実施態様 1 ないし 1 2 のいずれか一つの薬学的組成物。

20

## 【 0 1 1 6 】

- 1 8 . 標的 p H が約 6 . 5 ~ 約 8 . 5 の範囲にある、実施態様 1 ないし 1 7 のいずれか一つの薬学的組成物。
- 1 9 . 標的 p H が約 7 . 2 ~ 約 8 . 3 の範囲にある、実施態様 1 ないし 1 7 のいずれか一つの薬学的組成物。
- 2 0 . 標的 p H が約 7 . 0 ~ 約 8 . 5 の範囲にある、実施態様 1 ないし 1 7 のいずれか一つの薬学的組成物。

30

## 【 0 1 1 7 】

- 2 1 . 有機溶媒が少なくとも 2 0 % w / w の量で存在している、実施態様 1 ないし 2 0 のいずれか一つの薬学的組成物。
- 2 2 . 有機溶媒が少なくとも 3 0 % w / w の量で存在している、実施態様 1 ないし 2 0 のいずれか一つの薬学的組成物。
- 2 3 . 有機溶媒が少なくとも 4 0 % w / w の量で存在している、実施態様 1 ないし 2 0 のいずれか一つの薬学的組成物。
- 2 4 . 有機溶媒が少なくとも 5 0 % w / w の量で存在している、実施態様 1 ないし 2 0 のいずれか一つの薬学的組成物。
- 2 5 . 有機溶媒が少なくとも 8 0 % w / w の量で存在している、実施態様 1 ないし 2 0 のいずれか一つの薬学的組成物。

40

## 【 0 1 1 8 】

- 2 6 . 1 0 % w / w 未満の水分を含有する、実施態様 1 ないし 2 5 のいずれか一つの薬学的組成物。
- 2 7 . 5 % w / w 未満の水分を含有する、実施態様 1 ないし 2 5 のいずれか一つの薬学的組成物。
- 2 8 . 2 % w / w 未満の水分を含有する、実施態様 1 ないし 2 5 のいずれか一つの薬学的組成物。

## 【 0 1 1 9 】

- 2 9 . 組成物が、糖尿病又は高血糖症の、肺、非経口、鼻又は経口処置用である、実施態

50

様 1 ないし 2 8 のいずれか一つの薬学的組成物。

3 0 . 組成物が、糖尿病又は高血糖症の、肺処置用である、実施態様 1 ないし 2 8 のいずれか一つの薬学的組成物。

3 1 . 組成物が、糖尿病又は高血糖症の経口処置用である、実施態様 1 ないし 2 8 のいずれか一つの薬学的組成物。

【 0 1 2 0 】

3 2 . ポリペプチドが水溶性である、実施態様 1 ないし 3 1 のいずれか一つの薬学的組成物。

3 3 . ポリペプチドが、インスリンペプチド、アミリン、アミリンアナログ、アミリン誘導体、 $\alpha$ -M S H、 $\alpha$ -M S H アナログ、 $\alpha$ -M S H 誘導体、及び / 又はその組合せからなる群から選択される、実施態様 1 ないし 3 2 のいずれか一つの薬学的組成物。

10

3 4 . インスリンペプチドがインスリンアナログである、実施態様 1 ないし 3 3 のいずれか一つの薬学的組成物。

3 5 . インスリンペプチドが、A s p B 2 8 ヒトインスリン ; L y s B 2 8 P r o B 2 9 ヒトインスリン ; L y s B 3 G l u B 2 9 ヒトインスリン、及び A 1 4 G l u B 2 5 H i s s d e s B 3 0 ヒトインスリンからなる群から選択されるインスリンアナログである、実施態様 1 ないし 3 4 のいずれか一つの薬学的組成物。

【 0 1 2 1 】

3 6 . 組成物が、肺処置、経口処置、鼻処置又は口腔処置に適している、実施態様 1 ないし 3 5 のいずれか一つの薬学的組成物。

20

3 7 . 組成物が肺使用に適している、実施態様 1 ないし 3 5 のいずれか一つの薬学的組成物。

3 8 . 組成物が鼻処置に適している、実施態様 1 ないし 3 5 のいずれか一つの薬学的組成物。

3 9 . 組成物が経口使用に適している、実施態様 1 ないし 3 5 のいずれか一つの薬学的組成物。

4 0 . 組成物が口腔使用に適している、実施態様 1 ないし 3 5 のいずれか一つの薬学的組成物。

【 0 1 2 2 】

4 1 . 実施態様 1 ないし 4 0 のいずれか一つの薬学的組成物を治療的有效量、患者に投与することを含む、このような処置を必要とする患者における糖尿病を処置する方法。

30

4 2 . 実施態様 1 ないし 4 0 のいずれか一つの薬学的組成物を治療的有效量、患者に投与することを含む、このような処置を必要とする患者における、高血糖症、2 型糖尿病、耐糖能異常、及び 1 型糖尿病を処置又は予防する方法。

4 3 . 実施態様 1 ないし 4 0 のいずれか一つの薬学的組成物を治療的有效量、患者に投与することを含む、このような処置を必要とする患者における 2 型糖尿病の病気進行を遅延化又は予防する方法。

【 0 1 2 3 】

4 4 . 高血糖症、2 型糖尿病、耐糖能異常、及び 1 型糖尿病を処置又は予防する医薬として使用される、実施態様 1 ないし 4 0 のいずれか一つの薬学的組成物。

40

4 5 . 2 型糖尿病の病気進行を遅延化又は予防する医薬として使用される、実施態様 1 ないし 4 0 のいずれか一つの薬学的組成物。

【 0 1 2 4 】

ここに引用された刊行物、特許出願及び特許を含む全ての文献は、各文献が、出典明示により個々にかつ特に援用され、その全内容がここに記載されているかの如く、その全体が出典明示によりここに援用される(法律により許容される最大範囲)。

全ての表題及び副題は、ここでは便宜的に使用され、決して本発明を限定するものと解してはならない。

ここに提供される任意かつ全ての例、又は例示的言語(例えば「等」)の使用は、単に本発明をより明らかにすることを意図しており、特に請求項に記載がない限り、本発明の

50

範囲に限定をもたらすものではない。明細書中の如何なる語句も請求項に記載していない要素が本発明の実施に必須であることを示しているものと解してはならない。

ここでの特許文献の引用及び援用は単に便宜上なされているもので、そのような特許文献の有効性、特許性、及び／又は権利行使性についての見解を反映させるものではない。

この発明は、適用される法律に容認される場合、ここに付加される請求項に列挙された主題事項の全ての修正点及び等価物を含む。

#### 【実施例】

#### 【0125】

#### 一般的手順

#### チオフラビンT(ThT)フィブリル化アッセイ：原理及び実施例

10

ペプチドの物理的安定性が低いと、サンプルにおいて、秩序だったより糸状の高分子構造として観察される、アミロイドのフィブリル形成に至る可能性があり、最終的にはゲル形成に帰する。このことは、伝統的には、サンプルの目視検査により測定される。しかしながら、その種類の測定は非常に主観的で、観察者に依存するものである。よって、小分子指示プローブの適用がより有利である。チオフラビンT(ThT)はこのようなプローブであり、フィブリルに結合した場合は、明確な蛍光的特徴を有する[Naikiら (1989) Anal. Biochem. 177,244-249; LeVine (1999) Methods. Enzymol. 309,274-284]。

#### 【0126】

#### 動的(加速)ThTアッセイ

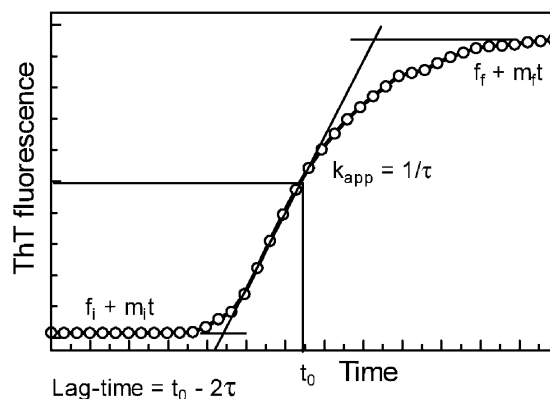
フィブリル形成の時間経過は、以下の式を用いたS字形曲線により記述することができる[Nielsenら (2001) Biochemistry 40,6036-6046],cn.f 図6:

20

$$F = f_i + m_i t + \frac{f_f + m_f t}{1 + e^{-[(t-t_0)/\tau]}} \quad \text{Eq.(1)}$$

ここで、Fは時間tにおけるThT 蛍光である。定数t<sub>0</sub>は最大蛍光の50%に達するのに必要な時間である。フィブリル形成を記述する2つの重要なパラメータは、t<sub>0</sub>-2により算出されるラグタイムと、見かけ速度定数k<sub>app</sub> = 1/τ である。

30



40

ペプチドの部分的に折り畳まれた中間体の形成は、フィブリル化の一般的な開始メカニズムとして示唆される。その中間体のほとんどが核とならずに鑄型を形成し、それにさらなる中間体が集まり、フィブリル化が進行する。ラグタイムは、核の臨界質量が累加する間隔に対応し、見かけ速度定数はフィブリル自体が形成される速度である。

#### 【0127】

#### サンプル調製

サンプルを各アッセイの前に新たに調製した。チオフラビンTを、H<sub>2</sub>O中の保存溶液から、最終濃度1μMまで、サンプルに添加した。200μlのサンプルアリコート

50

6 ウェルマイクロタイタープレート(Packard OptiPlate<sup>TM</sup>-96、白色ポリスチレン)に配した。通常、各サンプルの8つの複製(一つのテスト条件に相当)を、ウェルの一つのカラムに配した。プレートをスコッチ・パッド(Scotch Pad)(Qiagen)で密封した。

#### 【0128】

##### インキュベート及び蛍光測定

付与された温度でのインキュベート、振揺、及びThT蛍光発光の測定を、フルオロスキヤン・アセントFL蛍光プレートリーダー(Thermo Labsystems)において実施した。温度を37に調節した。軌道振揺を、全ての提供されたデータにおいて、1mmの振幅を有する960rpmに調節した。444nmのフィルターを通した励起を使用して、蛍光測定を実施し、発光測定を485nmのフィルターを通して実施した。

10

各操作を、10分間、アッセイ温度でプレートをインキュベートすることにより開始した。典型的には45時間、20分毎にプレートを測定した。各測定の間、プレートを振揺し、記載したようにして加熱した。

#### 【0129】

##### 静的ThTアッセイ

##### サンプル調製及び蛍光測定

非水性のプロピレングリコールにインスリンアスパルトを含有せしめたサンプルを、5及び40で1ヶ月保存した。脱塩水を使用し、測定前に1mg/mlの予期濃度(フィブリル化した天然タンパク質を含有)に、サンプルを希釈した。パーキン・エルマー・モデル(Perkin-Elmer model)LS 50 B発光分光計を使用し、0.3cmの励起光路を有する半ミクロの石英キュベット(Hellma Germany)において、蛍光測定を実施した。450nmで励起し、5nmのスリット幅を有する、470~560nmの発光スペクトルを、196µlの希釈したサンプルに4µlのThT 1mM保存溶液を添加した直後に記録した。反応混合物におけるThTの濃度は20µmol/lであった。結果は、I 482nm/[タンパク質濃度(mg/ml)×キュベット路程(cm)]として報告され、すなわち、結果を、1mg/mlのタンパク質濃度、及び1cmのキュベット路長に対して標準化した。

20

#### 【0130】

##### 実施例1

##### A) ヒトインスリンの溶解及び標的pHの7.0への調節

30

9.5gのヒトインスリンを、200gの氷冷水に分散させた。懸濁液を氷浴に配し、最初のpHはpH5.12と測定された。5.8gの氷冷された0.2N水酸化ナトリウムを用い、pHを7.04に調節した。溶液をさらに2時間、氷浴で維持し、ついで、全重量が240gになるように、脱塩水を添加した。

50gのpH7.04の溶液を、さらにプロセッシングした。氷冷された1NのNH4OHを用い、pHを7.04から7.50に調節し、ついで、一晩、冷蔵庫に配した。次の日、pHは7.32と測定され、氷冷された1NのNH4OHを用い、pHを8.06に調節した。ついで、水を60.0gまで添加した。ヒトインスリンの最終濃度は約30mg/mlであった。

#### 【0131】

40

##### B) インスリン水溶液の乾燥

乾燥した固体状のマイクロ粒子を、0.7mmの並流二流体ノズル(co-current two-fluid nozzle)を具備するブッチB-290ミニスプレードライヤー(Buchi B-290 mini spray dryer)(Buchi, Labortechnik AG Flawil, Switzerland)において調製した。ヒトインスリン溶液を、2ml/分の液体供給速度、及び600-800リットル/時間の噴霧空気流にて、乾燥チャンバー内での温気流により噴霧化した。乾燥空気は150の入口温度と35m3/時間の乾燥空気流速を有する。出口温度は約70であった。

固体状のマイクロ粒子を、乾燥チャンバーに連結されたサイクロンにより捕捉し、ついで収集し、乾燥状態で保存した。

#### 【0132】

50

## C) 固体状インスリンパウダーの標的 pH の検証

噴霧乾燥されたヒトインスリンを、40 mg/mL、80 mg/mL 及び 160 mg/mL の濃度で、脱塩水に再溶解させ、異なる濃度が測定される pH 値に影響を与えるかどうかについて研究した。

25.3 mg を 633 µL の水に添加：pH は 6.95 と測定された

43.5 mg を 545 µL の水に添加：pH は 6.95 と測定された

81.7 mg を 510 µL の水に添加：pH は 7.01 と測定された

## 【0133】

## 実施例 2

1,2 プロパンジオール(プロピレングリコール)における、pH 5.4 ~ pH 7.4 の範囲の標的 pH を有するインスリンアスパルトの可溶性

10

種々の標的 pH 値を有する種々のインスリンアスパルト溶液を、噴霧乾燥する前に調製した。

## 【0134】

溶液 A、標的 pH 5.35：

氷浴において、16 g のインスリンアスパルトを 150 mL の水に懸濁させた。次に、2.6 mL の氷冷された濃アンモニア水(25% w/w)を、pH が 7.53 になるまで滴下し、透明溶液を得た。最後に、インスリンアスパルトの最終濃度が 40 mg/mL になるまで、水を添加した。

溶液 B、標的 pH 6.04：

20

氷浴において、16 g のインスリンアスパルトを 150 mL の水に懸濁させた。最初、2.2 mL の氷冷された 1N NaOH、ついで 750 µL の氷冷された濃アンモニア水(25% w/w)を、pH が 7.52 になるまで滴下し、透明溶液を得た。最後に、インスリンアスパルトの最終濃度が 40 mg/mL になるまで、水を添加した。

## 【0135】

溶液 C、標的 pH 6.27：

氷浴において、16 g のインスリンアスパルトを 150 mL の水に懸濁させた。最初、4.4 mL の氷冷された 1N NaOH、ついで 750 µL の氷冷された濃アンモニア水(25% w/w)を、pH が 7.48 になるまで滴下し、透明溶液を得た。最後に、インスリンアスパルトの最終濃度が 40 mg/mL になるまで、水を添加した。

30

溶液 D、標的 pH 6.66：

氷浴において、16 g のインスリンアスパルトを 150 mL の水に懸濁させた。最初、6.6 mL の氷冷された 1N NaOH、ついで 370 µL の氷冷された濃アンモニア水(25% w/w)を、pH が 7.47 になるまで滴下し、透明溶液を得た。最後に、インスリンアスパルトの最終濃度が 40 mg/mL になるまで、水を添加した。

溶液 E、標的 pH 7.47：

氷浴において、16 g のインスリンアスパルトを 150 mL の水に懸濁させた。最初、9.6 mL の氷冷された 1N NaOH を、pH が 7.49 になるまで滴下し、透明溶液を得た。

## 【0136】

40

乾燥パウダーを、0.7 mm の並流二流体ノズルを具備する、ブッチ B-290 ミニスプレードライヤー(Buchi, Labortechnik AG Flawil, Switzerland)において調製した。供給された液体(溶液 A、B、C、D 及び e)を、2 mL/分の液体供給速度、及び 600-800 リットル/時間の噴霧空気流にて、乾燥チャンバー内での温気流により噴霧化した。乾燥空気は 150 °C の入口温度と 35 m<sup>3</sup>/時間の乾燥空気流速を有する。出口温度は 41 ~ 61 °C で変化した。

乾燥パウダーを、乾燥チャンバーに連結されたサイクロンにより捕捉し、ついで収集し、乾燥状態で保存した。

## 【0137】

乾燥粒子中の含水量を、パーキンエルマー・ピリス(Pyris) TGA 1 熱重量分析器を使

50

用し、最小で3時間、110での乾燥における損失度により測定した。水分損失による重量変化を記録し、重量によるパーセントで表した。

噴霧乾燥されたパウダーを約40mg/mlの濃度になるまで脱塩水に溶解させ、電位差計(Radiometer, Denmark)でpHを測定することにより、噴霧乾燥されたインスリンの標的pHを測定した。

噴霧乾燥されたパウダーの濃度

溶液	含水量(% w / w)	標的 pH
A	5.6	5.35
B	6.3	6.04
C	6.7	6.27
D	5.9	6.66
E	6.6	7.43

10

#### 【0138】

ねじ式キャップバイアルに固体状のパウダー(典型的には200mgのパウダー)、続いて2gの1,2プロパンジオール(プロピレングリコール)を添加することにより、種々のインスリンアスパルトパウダーの溶解度を測定した。パウダー及び1,2プロパンジオール(プロピレングリコール)を、周囲温度で少なくとも48時間、スウェラブ(Swelab)820ミキサー、15rpm(Boule Medical AB)で振揺した。1,2プロパンジオール(プロピレングリコール)が浄化されているならば、さらなるパウダーをバイアルに添加したついで、4000rpmで0.5時間遠心分離することにより、溶解したインスリンアスパルトから、溶解していないインスリンアスパルトを分離した。上清中のインスリンアスパルトの濃度をHPLCにより測定した。HPLC分析からの結果を図1に示す。

20

#### 【0139】

##### 実施例3

種々の半極性プロトン性有機溶媒における、pH7.5の範囲の標的pHを有するインスリンアスパルトの可溶化

種々の半極性プロトン性有機溶媒(エタジオール(エチレングリコール); 1,4ブタンジオール; 1,3ブタンジオール; 1,3プロパンジオール、プロパントリオール(グリセロール); 1,2プロパンジオール(プロピレングリコール))における、標的pH7.5を有するインスリンアスパルトパウダーの溶解度を、実施例2に記載したようにして測定した。

30

溶解度研究からの結果を図2に示す。

#### 【0140】

##### 実施例4

ラットの腸囊モデルにおける、インスリンアスパルト10%プロピレングリコール製剤のインビトロ評価

新たに摘出されたラットの小腸を、氷冷された生理食塩水ですすいだ。ついで、各長さが4cmの腸囊を調製した。簡単には、4cmの腸セグメントの一端を糸で結紮し、ついで、テスト溶液(1mM)を含有する0.25mlのインスリンを腸に充填し、ついで、他端を同様の方法で結紮した。その後、充填された腸囊を、0.5mlの培養培地、pH7.4、37で2時間インキュベートした。2時間後、インキュベート培地を、浸透インスリンについて、HPLC及びMALDIにより分析した。HPLC分析からの結果を図3に示す。10%PGの存在下、インスリンは腸粘膜を通して、高含有量になるまで浸透することが観察可能である。

40

MALDI-MS(マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析)を使用し、分解産物を分析した。酸性化したサンプル溶液及び参照サンプルのアリコート(1μl)を、PAC384MALDIプレートに配し、30秒後に濾紙にプロットし、0.1%のTFAに15mMのリン酸アンモニウムが入ったもの5μlで、2回洗浄した。オートフレックス・トフトフ(Autoflex ToFToF)(Bruker Daltonics, USA)を使用し、サンプルを分析した。結果を図4に示す。PGにより、胃腸管におけるインスリンの分解が低減すると思われる

50



る。

#### 【0141】

##### 実施例 5

経口投与後の、ラットにおけるインスリンアスパルトプロピレングリコール製剤のインビボ評価

スプラグドローラーラットを使用した。実験前、ラットは絶食させたが、飲用水には自由にアクセスできるようにした。ラットを4つの群に分けた。2つの群のラットに、水又は1,2プロパンジオール(プロピレングリコール)のいずれかに溶解させた、1.2 ml/kgのA14G1uB25HisdesB30ヒトインスリン(8 mM)を経管栄養した。他の2つの群には、それぞれコントロールとして、1.2 ml/kgの純水又は1,2プロパンジオール(プロピレングリコール)を受容させた。240分の期間、20分の間隔で、尾の静脈から血滴を収集し、グルコースレベルを分析した。結果を血糖(mmol/l)として表した。結果を図5に示す。

10

#### 【0142】

##### 実施例 6

プロピレングリコール(PG)におけるインスリンアスパルトの円偏光二色性分光法

遠紫外線及び近紫外線円偏光二色性測定を、立体構造の安定性をモニターするために使用した。ジャスコ(Jasco)J-715円偏光二色性分光計(Jasco,Tokyo,Japan)において、遠紫外線及び近紫外線円偏光二色性スペクトルを得た。バンド幅2.0 nm、応答時間2秒、データピッチ0.5 nm、及びスキャン速度20 nm/分を使用し、0.5又は0.02 cmのセルにおいて、インスリンサンプルをスキャンした。バッファのスペクトルを記録し、各サンプルのスペクトルから差し引いた。

20

遠紫外線スペクトルは、ペプチドアミド発色団を探查し、タンパク質の二次構造を推定するのに使用可能であり、よって209 nm及び222 nmでの負バンドは、 $\alpha$ -ヘリックス構造を示す。100%水におけるアスパルトのスペクトルと比較して、化合物として100%PGにおけるアスパルトのスペクトルには、強度にわずかな変化が観察され(図6)、100%PGでは、インスリン内に $\alpha$ -ヘリックス構造が増えることを示唆している。しかしながら、この差異は、PG中で種々のアスパルト調製物を比較した場合には有意ではないように思われる。水中でのアスパルトのスペクトル、及び100%PGのサンプルから2%PGまで希釈されたアスパルトのサンプルは非常に類似しており、 $\alpha$ -ヘリックス含有量における可能な程度の小さな変化は可逆的である。

30

#### 【0143】

250-350 nmの領域におけるCDスペクトルは、ジスルフィド架橋の局所的環境に加えて、チロシン側鎖残基の局所的環境を反映している。100%PGにおけるインスリンアスパルトの遠紫外線スペクトル(図7)は、250 nm及び270 nmで増加した振幅を有する、GuHCl等の変性溶媒におけるインスリンで観察されたものと、非常に類似している。しかしながら、100%PGにおけるインスリンが、水で2%PGに希釈された場合、スペクトルは、純水中のインスリンで観察された形状を維持している。このことは、側鎖環境におけるPGの影響にかかわらず、これらの構造効果は可逆的であることを示している。

40

FUV CD及びNUD CDデータの双方を考慮すると、データには、ペプチド骨格の二次構造が、100%PGにおいては多少とも不変であることが示されている。同じサンプルの側鎖環境における顕著な変化は、インスリンがいわゆる溶融球形構造をとり、骨格折り畳みは無傷であるが、側鎖環境は崩壊していることを示唆する。しかしながら、PGにおけるアスパルトが水で希釈されているならば、構造変化は可逆的である。

#### 【0144】

##### 実施例 7

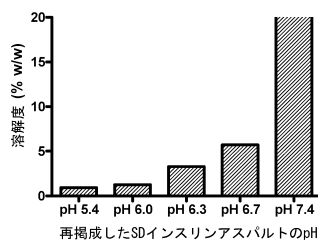
プロピレングリコール溶液対水溶液においてインスリンアスパルトの保存安定性

インスリンアスパルト(IA)の標的pH7.5を有する脱水パウダーを、ストレートのプロピレングリコール、又は0.1 Mの水性トリスバッファ、pH7.5のいずれかに

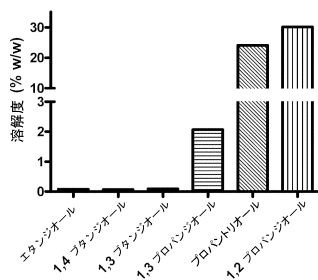
50

溶解させた。水溶液中のインスリン濃度は約  $35 \text{ mg/ml}$  であった。溶液を、周囲温度及び  $40^\circ\text{C}$  で、40週間までインキュベートした。溶解した共有結合性のジ-及びポリマー生成物の含有量を、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により分析した。15容量の氷酢酸、15容量のアセトニトリル、及び70容量のL-アルギニン溶液  $0.65 \text{ g/l}$  を含有する溶出液を用い、流速  $1 \text{ ml/分}$ 、ウォーターズ (Waters) インスリン H M W P カラム  $7.8 \times 300 \text{ mm}$  (Waters Corporation, Milford, MA, USA) を使用し、室温にて、サンプルを SEC にかけた。検出は  $276 \text{ nm}$  で実施した。脱アミド化生成物及び他のインスリン関連物質の含有量を、逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) により分析した。サンプル中のフィブリルの量を、静的 T h T 分析により測定した。

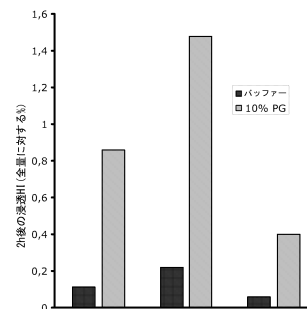
【図1】



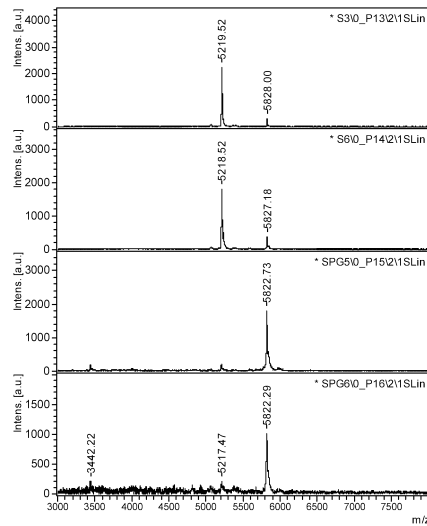
【図2】



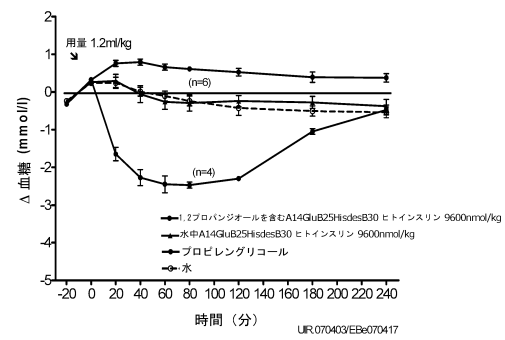
【図3】



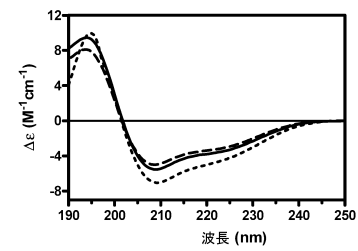
【図 4】



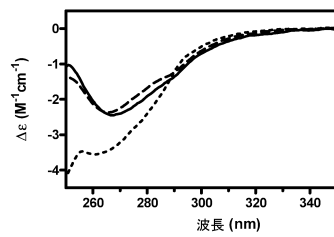
【図 5】



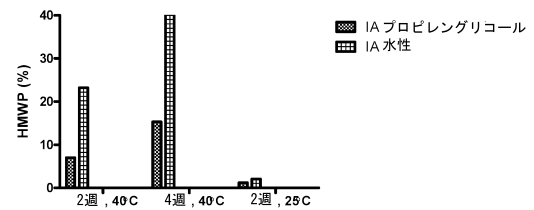
【図 6】



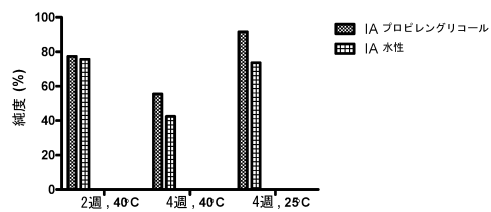
【図 7】



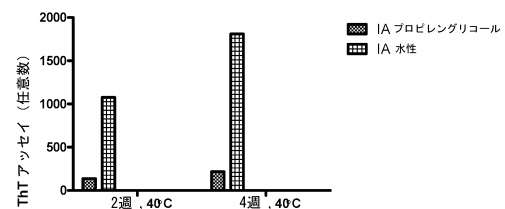
【図 9】



【図 8】



【図 10】



【配列表】

0005628026000001.app

---

フロントページの続き

(72)発明者 フォガー, フローリアン アンダース  
デンマーク国 ディーケー - 1952 フレデリクスベア, シー, ファルコネルヴァエンゲッ  
ト 29

審査官 中尾 忍

(56)参考文献 特表2007-513084(JP, A)  
国際公開第2004/105790(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
A61K 38/00  
A61K 38/28  
A61K 47/10

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)