(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2016-104736
(P2016-104736A)
(43)公開日　平成28年6月9日(2016.6.9)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 38/00	***(2006.01)***	A61K	37/02	ZNA	4C076
A61K 31/495	***(2006.01)***	A61K	31/495		4C084
A61K 9/14	***(2006.01)***	A61K	9/14		4C086
A61P 3/10	***(2006.01)***	A61P	3/10		
A61P 43/00	***(2006.01)***	A61P	43/00	121	

審査請求 有　請求項の数 1　OL　（全 70 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2015-233125 (P2015-233125)
(22)出願日　平成27年11月30日 (2015.11.30)
(62)分割の表示　特願2013-191549 (P2013-191549)の分割
原出願日　平成19年4月16日 (2007.4.16)
(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)

(71)出願人　503208552
マンカインド　コーポレイション
アメリカ合衆国　９１３５５　カリフォルニア州　バレンシア　ライキャニオンループ２５１３４
(74)代理人　100095407
弁理士　木村　満
(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　100148633
弁理士　桜田　圭
(74)代理人　100147924
弁理士　美恵　英樹

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)【要約】　（修正有）
【課題】糖尿病、癌、肥満等の疾患の治療に有用な医薬品であって、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グルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ－１）製剤の提供。
【解決手段】インビトロ及びインビボの両方で安定であるジケトピペラジン（ＤＫＰ）と組み合わせたグルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ－１）粒子を含む乾燥粉末組成物。該組成物は、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の有用性を有し、特に、該組成物は、肺内送達のための医薬製剤としての有用性を有する医薬組成物。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
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。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願との相互参照
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。
【０００２】
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（ＧＬＰ－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。
【背景技術】
【０００３】
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（ＧＬＰ－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。
【０００４】
無病状態において、ＧＬＰ－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ＧＬＰ－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。ＧＬＰ－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、β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ることにより、β細胞集団が増殖する。さらに、ＧＬＰ－１受容体のシグナル伝達はβ細胞のアポトーシスを減少させ、それはさらにβ細胞集団の増殖に寄与する。
【０００５】
胃腸管において、ＧＬＰ－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。ＧＬＰ－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ＧＬＰ－１が脳に直接影響し得ることを示唆している。循環するＧＬＰ－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ＧＬＰ－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ＧＬＰ－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ＧＬＰ－１の役割が予測される。これらの仮説は、ＧＬＰ－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、投与されたＧＬＰ－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）。

【０００６】

ＧＬＰ－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、ＧＬＰ－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、ＧＬＰ－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ＧＬＰ－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、ＨｂＡ１ｃ濃度が低下することが明らかとなった（Zanderら、2002）。ＧＬＰ－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。ＧＬＰ－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ＩＶ（ＤＰＰ－ＩＶ）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）。

【０００７】

糖尿病におけるＧＬＰ－１の生理学的な重要性や、外因性のＧＬＰ－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ＧＬＰ－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ＧＬＰ－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ＧＬＰ－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－ＬＡＲ、Eli Lilly、米国インディアナ州インディアナポリス）は、臨床試験で研究されてきた。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ＩＶ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（シタグリプチン））もまた、研究中である（Deaconら、2004）。したがって、ＧＬＰ－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。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】

しかしながら、ＧＬＰ－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（ＨｂＡ１ｃ、空腹時血糖、グルコース可動域）に達することが可能な、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、悪心、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ＧＬＰ－１製剤が当技術分野で必要とされている。

【０００９】

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（ＧＬＰ－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（ＤＫＰ）粒子と組み合わせたＧＬＰ－１の製剤を提供するものである。

【課題を解決するための手段】

【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（lyotrope）、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_2）$_7$$SO_4$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、ヘキシレングリコール（Ｈｅｘ－Ｇｌｙ）や、トレハロース、グリシン、ポリエチレングリコール（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。

【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一態様においては、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、術後の異化的変化、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。

【００１８】

本発明の別の一態様においては、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。

【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。

【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。別の一態様においては、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生合成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塩である。別の一態様においては、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生合成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～１０ｍ

ｇ／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。

【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。

【００３０】

別の一態様においては、該方法は、該共通の溶液の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。

【００３１】

本発明の別の一態様においては、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って、ＧＬＰ－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、膵島細胞移植および再生治療を含む。

【００３３】

別の一態様においては、該粒子の該提供は、天然のＧＬＰ－１よりも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。

【００３４】

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ＧＬＰ－１分子と該溶液とを混合するステップ；および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、ＧＬＰ－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。

【００３５】

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

【図面の簡単な説明】

【００３６】

【図１Ａ】ＧＬＰ－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ＧＬＰ－１が自己会合することを示唆している。

【図１Ｃ】２８０ｎｍでのトリプトファンの励起により生じる各種濃度（ｐＨ４、２０℃）のＧＬＰ－１の蛍光放射。

【図１Ｄ】各種濃度（ｐＨ４、２０℃）におけるＧＬＰ－１の透過型ＦＴＩＲ。

【図２Ａ】１．０ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１の遠紫外ＣＤは、塩の濃度が増加すると、ＧＬ

Ｐ－１の不規則構造がより規則的なα－ヘリックス構造に変わることを示している。
【図２Ｂ】１．０ｍｇ／ｍＬのペプチドの近紫外ＣＤは、ＮａＣｌ濃度の増大によってもＧＬＰ－１の３次構造が増大することを示す。
【図２Ｃ】２８０ｎｍでのトリプトファンの励起後の各種のＮａＣｌ濃度（ｐＨ４、２０℃）における１．０ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１の内部蛍光放射。
【図２Ｄ】各種イオン強度（ｐＨ４、２０℃）での１０ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１の３次構造解析。
【図３Ａ】近紫外ＣＤは、温度の上昇と共にＧＬＰ－１オリゴマーが分離することを示している。
【図３Ｂ】各種温度（ｐＨ４）における１０ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１の構造解析。
【図３Ｃ】各種温度（ｐＨ４）における０．０５ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１の構造解析。
【図４Ａ】各種ｐＨ（２０℃）での１０ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１の遠紫外ＣＤ。
【図４Ｂ】ｐＨ７．６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ＧＬＰ－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】ＨＰＬＣによって示されるアミド分解および酸化に対する１ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１の耐性。
【図６Ａ】１．５および９．４ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１（ｐＨ４）の３次構造における撹拌の効果。近紫外ＣＤ（図６Ａ）およびＧＬＰ－１の蛍光放射（図６Ｂ）は、両方とも、ＧＬＰ－１ペプチドの３次構造が、撹拌のためには有意に変化しないことを示している。
【図６Ｂ】１．５および９．４ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１（ｐＨ４）の３次構造における撹拌の効果。近紫外ＣＤ（図６Ａ）およびＧＬＰ－１の蛍光放射（図６Ｂ）は、両方とも、ＧＬＰ－１ペプチドの３次構造が、撹拌のためには有意に変化しないことを示している。
【図７Ａ】１．６、５．１および８．４ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１（ｐＨ４）の３次構造に対する１０回の凍結融解サイクルの効果。近紫外ＣＤ（図７Ａ）およびＧＬＰ－１の蛍光放射（図７Ｂ）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７Ｂ】１．６、５．１および８．４ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１（ｐＨ４）の３次構造に対する１０回の凍結融解サイクルの効果。近紫外ＣＤ（図７Ａ）およびＧＬＰ－１の蛍光放射（図７Ｂ）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７Ｃ】遠紫外ＣＤによる１０ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１（ｐＨ４）の２次構造に対する１１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８Ａ】塩の試験。ｐＨおよびＮａＣｌ濃度の関数としてのＧＬＰ－１／ＦＤＫＰについての負荷曲線。
【図８Ｂ】ｐＨおよびＮａＣｌ濃度の関数としての、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の量を表す。
【図９Ａ】界面活性剤の試験。ｐＨおよび界面活性剤の関数としてのＧＬＰ－１／ＦＤＫＰについての負荷曲線。
【図９Ｂ】ｐＨ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ＦＤＫＰを含まない対照試料において検出されたＧＬＰ－１の量を表す。
【図１０Ａ】イオンの試験。ｐＨおよびイオンの関数としてのＧＬＰ－１／ＦＤＫＰについての負荷曲線。負荷は、５ｍｇ／ｍＬのＦＤＫＰおよび０．２５ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１で行った（図１０Ａおよび１０Ｃ）。
【図１０Ｂ】ｐＨ、イオンおよび１ＭのＮａＣｌの関数としての、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の量を表す。
【図１０Ｃ】イオンの試験。ｐＨおよびイオンの関数としてのＧＬＰ－１／ＦＤＫＰについての負荷曲線。負荷は、５ｍｇ／ｍＬのＦＤＫＰおよび０．２５ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１で行った（図１０Ａおよび１０Ｃ）。
【図１０Ｄ】ｐＨ、イオンおよび１ＭのＮａＣｌの関数としての、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の量を表す。

【図１１Ａ】オスモライトの試験。一般の安定剤の存在下でのｐＨの関数としてのＧＬＰ－１／ＦＤＫＰについての負荷曲線（オスモライト；図１１Ａ）。
【図１１Ｂ】ｐＨおよびオスモライトの関数としての、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の量を表す。
【図１２Ａ】カオトロープ／リオトロープの試験。ｐＨ３．０（図１２Ａ）およびｐＨ４．０（図１２Ｃ）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ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰについての負荷曲線。
【図１２Ｂ】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、ｐＨの関数としての、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の量を表す。
【図１２Ｃ】カオトロープ／リオトロープの試験。ｐＨ３．０（図１２Ａ）およびｐＨ４．０（図１２Ｃ）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ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰについての負荷曲線。
【図１２Ｄ】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、ｐＨの関数としての、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の量を表す。
【図１３Ａ】アルコールの試験。ｐＨおよびアルコールの関数としてのＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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、ＦＤＫＰを含まない対照試料について検出されたＧＬＰ－１の量を表す。
【図１４Ａ】ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ濃度試験からの負荷。
【図１４Ｂ】複数のＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ製剤の走査型電子顕微鏡（ＳＥＭ）画像（１００００×の拡大倍率）。
【図１５】複数のＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ製剤に対するストレスの効果を表す。
【図１６Ａ】ＧＬＰ－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ＤＰＰＩＶ活性の阻害。
【図１６Ｃ】ＤＰＰＩＶ阻害剤によるＤＰＰＩＶ活性の阻害。
【図１７】肺洗浄液におけるインキュベーション後のＧＬＰ－１の検出。
【図１８Ａ】血漿中のＧＬＰ－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】血漿中のＧＬＰ－１の定量化を表す。図１８Ｂは、血漿の１：１０の希釈率における定量化を示す。
【図１９Ａ】細胞の生存に対するＧＬＰ－１およびＧＬＰ－１類似体の作用。ラット膵上皮（ＡＲＩＰ）の細胞死に対するＧＬＰ－１の作用。
【図１９Ｂ】単剤として、および併用でのＧＬＰ－１およびスタウロスポリン（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。
【図２０】細胞生存度に対する、ＧＬＰ－１類似体であるエキセンジン－４の作用。
【図２１】スタウロスポリン誘発性細胞死に対する複数のＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ製剤の作用。
【図２２Ａ】各種濃度のＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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（ＩＳ；図２２Ｂ）を示す薬物動態学的試験。
【図２２Ｂ】各種濃度のＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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（ＩＳ；図２２Ｂ）を示す薬物動態学的試験。
【図２３Ａ】投与後２時間（図２３Ａ）および６時間（図２３Ｂ）におけるＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ製剤を投与したラットの累積的摂食量の減少。
【図２３Ｂ】投与後２時間（図２３Ａ）および６時間（図２３Ｂ）におけるＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ製剤を投与したラットの累積的摂食量の減少。
【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ＧＬＰ－１／ＦＤ

ＫＰの薬力学的試験。
【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ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰの薬力学的試験。
【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ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰの薬力学的試験。
【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。
【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。
【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。
【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。
【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。
【発明を実施するための形態】
【００３７】
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。
図１Ａ～１Ｄ。各種濃度（ｐＨ４、２０℃）におけるＧＬＰ－１の構造解析。図１Ａ：ＧＬＰ－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ＧＬＰ－１が自己会合することを示唆している。図１Ｃ：２８０ｎｍでのトリプトファンの励起により生じる各種濃度（ｐＨ４、２０℃）のＧＬＰ－１の蛍光放射。図１Ｄ：各種濃度（ｐＨ４、２０℃）におけるＧＬＰ－１の透過型ＦＴＩＲ。１６５６ｃｍ$^{-1}$におけるアミドＩバンドは、ＧＬＰ－１が、２ｍｇ／ｍＬ以上の濃度でα－ヘリックス構造を有することを示す。
【００３８】
図２Ａ～２Ｄ。各種イオン強度（ｐＨ４、２０℃）における低濃度ＧＬＰ－１の構造解析。図２Ａ：１．０ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１の遠紫外ＣＤは、塩の濃度が増加すると、ＧＬＰ－１の不規則構造がより規則的なα－ヘリックス構造に変わることを示している。図２Ｂ：１．０ｍｇ／ｍＬのペプチドの近紫外ＣＤは、ＮａＣｌ濃度の増大によってもＧＬＰ－１の３次構造が増大することを示す。図２Ｃ：２８０ｎｍでのトリプトファンの励起後の各種のＮａＣｌ濃度（ｐＨ４、２０℃）における１．０ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－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２Ｄ：各種イオン強度（ｐＨ４、２０℃）での１０ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１の３次構造解析。近紫外ＣＤスペクトルは、イオン強度の増大により、自己会合したＧＬＰ－１の３次構造が増大することを示す。
【００３９】
図３Ａ～３Ｂ。各種温度（ｐＨ４）における１０ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１の構造解析。図３Ａ：近紫外ＣＤは、温度の上昇と共にＧＬＰ－１オリゴマーが分離することを示している。図３Ｂ：各種温度（ｐＨ４）における１０ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１の構造解析。図３Ｃ：各種温度（ｐＨ４）における０．０５ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１の構造解析。遠紫外ＣＤは、ペプチドが温度に非感受性であることを示している。
【００４０】

図４Ａ～４Ｂ。各種ｐＨ（２０℃）でのＧＬＰ－１の構造解析。図４Ａ：各種ｐＨ（２０℃）での１０ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１の遠紫外ＣＤ。ｐＨが増加するにつれて、自己会合したＧＬＰ－１がｐＨ６．３～７．６の間で析出するが、ｐＨ１．５および１１．７においては、ヘリックス構造が維持される。図４Ｂ：ｐＨ７．６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ＧＬＰ－１の２次構造が不規則になることが明らかにされる。

【００４１】

図５。ＨＰＬＣによって示されるアミド分解および酸化に対する１ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１の耐性。アミド分解の条件は、４０℃で５日間のｐＨ１０．５でＧＬＰ－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_2O_2中でＧＬＰ－１をインキュベートすることによって達成された。

【００４２】

図６Ａ～６Ｂ。１．５および９．４ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１（ｐＨ４）の３次構造における撹拌の効果。近紫外ＣＤ（図６Ａ）およびＧＬＰ－１の蛍光放射（図６Ｂ）は、両方とも、ＧＬＰ－１ペプチドの３次構造が、撹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３０分間および９０分間試料を攪拌し、２８０ｎｍ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。

【００４３】

図７Ａ～７Ｃ。１．６、５．１および８．４ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１（ｐＨ４）の３次構造に対する１０回の凍結融解サイクルの効果。近紫外ＣＤ（図７Ａ）およびＧＬＰ－１の蛍光放射（図７Ｂ）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－２０℃で凍結し、室温で解凍した。２８０ｎｍ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ＣＤによる１０ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１（ｐＨ４）の２次構造に対する１１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７Ｃ）。

【００４４】

図８Ａ～８Ｂ。塩の試験。ｐＨおよびＮａＣｌ濃度の関数としてのＧＬＰ－１／ＦＤＫＰについての負荷曲線（図８Ａ）。負荷は、５ｍｇ／ｍＬのＦＤＫＰおよび０．２５ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１で行った。ＮａＣｌ濃度は、ｍＭで表した。図８Ｂ：ｐＨおよびＮａＣｌ濃度の関数としての、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の量を表す。

【００４５】

図９Ａ～９Ｂ。界面活性剤の試験。ｐＨおよび界面活性剤の関数としてのＧＬＰ－１／ＦＤＫＰについての負荷曲線（図９Ａ）。負荷は、５ｍｇ／ｍＬのＦＤＫＰおよび０．２５ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１で行った。図９Ｂ：ｐＨ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ＦＤＫＰを含まない対照試料において検出されたＧＬＰ－１の量を表す。

【００４６】

図１０Ａ～１０Ｄ。イオンの試験。ｐＨおよびイオンの関数としてのＧＬＰ－１／ＦＤＫＰについての負荷曲線。負荷は、５ｍｇ／ｍＬのＦＤＫＰおよび０．２５ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１で行った（図１０Ａおよび１１Ｃ）。イオン濃度は、凡例にて示す（ｍＭ）。右側の曲線は、１ＭのＮａＣｌについての結果を表す。図１０Ｂおよび１０Ｄ：ｐＨ、イオンおよび１ＭのＮａＣｌの関数としての、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の量を表す。

【００４７】

図１１～１１Ｂ。オスモライトの試験。一般の安定剤の存在下でのｐＨの関数としてのＧＬＰ－１／ＦＤＫＰについての負荷曲線（オスモライト；図１１Ａ）。負荷は、５ｍｇ／ｍＬのＦＤＫＰおよび０．２５ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１で行った。図１１Ｂ：ｐＨおよびオスモライトの関数としての、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。
【００４８】
図１２Ａ～１２Ｂ。カオトロープ／リオトロープの試験。ｐＨ３．０（図１２Ａ）およびｐＨ４．０（図１２Ｃ）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ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰについての負荷曲線。負荷は、５ｍｇ／ｍＬのＦＤＫＰおよび０．２５ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１で行った。図１２Ｂおよび１２Ｄ：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、ｐＨの関数としての、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。
【００４９】
図１３Ａ～１３Ｂ。アルコールの試験。ｐＨおよびアルコールの関数としてのＧＬＰ－１／ＦＤＫＰについての負荷曲線。負荷は、５ｍｇ／ｍＬのＦＤＫＰおよび０．２５ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－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１３Ａ）。ＴＦＥ＝トリフルオロエタノール；ＨＦＩＰ＝ヘキサフルオロイソプロパノール。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、ＦＤＫＰを含まない対照試料について検出されたＧＬＰ－１の量を表す。
【００５０】
図１４Ａ～１４Ｂ。ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ濃度試験からの負荷（図１４Ａ）。負荷は５ｍｇ／ｍＬのＦＤＫＰで行われ、解析されたＧＬＰ－１濃度はＸ軸に示される。図１４Ｂ：複数のＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ製剤の走査型電子顕微鏡（ＳＥＭ）画像（１００００×の拡大倍率）は、球状および棒状のＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ粒子製剤のクラスターを表す。（パネルＡ）０．５ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１および２．５ｍｇ／ｍＬのＦＤＫＰ；（パネルＢ）０．５ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１および１０ｍｇ／ｍＬのＦＤＫＰ；（パネルＣ）、ｐＨ４．０における２０ｍＭ塩化ナトリウム、２０ｍＭ酢酸カリウムおよび２０ｍＭリン酸カリウム中の０．５ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１および１０ｍｇ／ｍＬのＦＤＫＰ；および（パネルＤ）ｐＨ４．０における２０ｍＭ塩化ナトリウム、２０ｍＭ酢酸カリウムおよび２０ｍＭリン酸カリウム中の１０ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１および５０ｍｇ／ｍＬのＦＤＫＰ。
【００５１】
図１５。複数のＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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、ＦＤＫＰ粒子に対するＧＬＰ－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。ＧＬＰ－１の構造。図１６Ａ：ＧＬＰ－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ＤＰＰＩＶ活性の阻害。図１６Ｃ：ＤＰＰＩＶ阻害剤によるＤＰＰＩＶ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ＧＬＰ－１の検出。
【００５４】
図１８Ａ～１８Ｂ。血漿中のＧＬＰ－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ＧＬＰ－１およびＧＬＰ－１類似体の作用。ラット膵上皮（ＡＲＩＰ）の細胞死に対するＧＬＰ－１の作用（図１９Ａ）。単剤として、および併用でのＧＬＰ－１およびスタウロスポリン（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（図１９Ｂ）。ＧＬＰ－１の濃度は１５ｎＭであり、スタウロスポリンの濃度は１μＭである。
【００５６】
図２０。細胞生存度に対する、ＧＬＰ－１類似体であるエキセンジン－４の作用。ＡＲ

ＩＰ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。スタウロスポリン誘発性細胞死に対する複数のＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ製剤の作用。ＧＬＰ－１試料が前もって投与されたＡＲＩＰ細胞を５μＭのスタウロスポリンに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、ＧＬＰ－１、ＳＴＡＵ、ＧＬＰ＋ＳＴＡＵ）に示される対照試料は、培地中（ＧＬＰ－１もスタウロスポリンも有さない）、ＧＬＰ－１、スタウロスポリン、およびＧＬＰ－１とスタウロスポ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ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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（ＩＳ；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ＦＤＫＰ粒子に対するＧＬＰ－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ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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ＧＬＰ－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ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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_{max}）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（フマリルジケトピペラジン）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。また、そのような製剤における天然のＧＬＰ－１の変異体の使用も意図される。
【００７０】
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（ＤＫＰ）粒子と組み合わせたＧＬＰ－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、ＧＬＰ－１／ＤＫＰ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、ＧＬＰ－１／ＤＫＰ製剤は、フマリルジケトピペラジン（ＦＤＫＰ）を含むが、それに限定されず、他のＤＫＰ（非対称ＤＫＰ、ｘＤＫＰ）（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（ＳＤＫＰ）、ＤＫＰ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、ＦＤＫＰの「片腕」類似体）およびＤＫＰ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、ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ製剤の投与は、肺内送達により行われる。
【００７１】
ＧＬＰ－１分子の治療用製剤の開発の際、溶液中のＧＬＰ－１の構造的特性は、遠紫外円偏光二色性（遠紫外ＣＤ）や、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）、質量分析（ＭＳ）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（ＣＤ）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用いる強力なツールであって、当技術分野でよく知られている。これらの解析が実施された実験条件には、濃度、イオン強度、温度、ｐＨ、酸化ストレス、撹拌、およびＧＬＰ－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（ＰＫ）特性および薬力学的（ＰＤ）特性を有する好ましいＧＬＰ－１／ＤＫＰ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ＧＬＰ－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。

【００７２】

ＧＬＰ－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、ＧＬＰ－１の構造は、それが可逆的に沈殿するまで増大した。ＮａＣｌの存在は、図２Ｄに示すような近ＣＤバンドの強度の増大により明らかな通り、ＧＬＰ－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ＧＬＰ－１は、２０８ｎｍおよび２２２ｎｍ（図２Ａ）への遠ＣＤの極小値の移動によって表されるようなα－ヘリックスの形態と、図２Ｂおよび２Ｄにおける塩の増大および近ＣＤ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。ＧＬＰ－１の不規則構造がこれらのパラメーターのどちらによっても変化しなかったという点では、温度およびｐＨがＧＬＰ－１の立体配座に及ぼす影響は異なるものだった。一方で、ＧＬＰ－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、１０ｍｇ／ｍＬのペプチド濃度でｐＨ６．３～７．６の間でＧＬＰ－１ペプチドが可逆的に析出することを示す図４Ａおよび４Ｂ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。ＧＬＰ－１の各種立体配座は、撹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、ＧＬＰ－１については認められなかった。

【００７３】

また、ＦＤＫＰ粒子へのＧＬＰ－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、ＧＬＰ－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。ＦＤＫＰ粒子へのＧＬＰ－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、ｐＨ４．０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ＦＤＫＰ粒子へのＧＬＰ－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。

【００７４】

本発明のＧＬＰ－１／ＤＫＰ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、ＧＬＰ－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。

【００７５】

得られたＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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。ＧＬＰ－１の安定性は、ＨＰＬＣ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、ＧＬＰ－１の安定性は、肺洗浄液（ＤＰＰＩＶを含む）で試験された。また、天然のＧＬＰ－１の安定性は、溶液中の濃度に依存することが見出された。

【００７６】

また、インビトロにおけるＧＬＰ－１の生物学的活性の試験は、ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ製剤方法のさらなる同定に寄与するものだった。さらに、ＧＬＰ－１が、アポトーシスの阻害（β細胞増殖および膵島新生の刺激）によりβ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ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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。

【００７７】
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（ＦＤＫＰ）と組み合わせた天然のヒトＧＬＰ－１を含む最適化された製剤を提供するものである。
【００７８】
ＩＩ．ＧＬＰ－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（ＦＤＫＰ）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（ＧＬＰ－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ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ製剤は、分解に対して安定的で且つ抵抗性がある。
【００７９】
ヒトＧＬＰ－１は、当技術分野でよく知られており、回腸末端部、膵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。ＧＬＰ－１は、２つの分子形態、７－３６および７－３７（７－３６形態が主要）、で存在する３０～３１個のアミノ酸からなるペプチドである。ＧＬＰ－１（７－３６）アミドおよびＧＬＰ－１（７－３７）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ＧＬＰ－１濃度は約４０ｐｇ／ｍＬ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ＧＬＰ－１濃度は、約５０～１６５ｐｇ／ｍＬに急激に増加する。
【００８０】
本明細書で使用される「ＧＬＰ－１分子」という用語は、ＧＬＰ－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ＧＬＰ－１分子としては、天然に生じるＧＬＰ－１ポリペプチド（ＧＬＰ－１（７－３７）ＯＨ、ＧＬＰ－１（７－３６）NH_2）やＧＬＰ－１代謝産物（例えばＧＬＰ－１（９－３７））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、ＧＬＰ－１分子としては：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生合成ＧＬＰ－１類似体が挙げられる。
【００８１】
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。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種の固体を単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。

【００８７】

本発明において意図される天然のＧＬＰ－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ＧＬＰ－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ＧＬＰ－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ＧＬＰ－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ＧＬＰ－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、ＧＬＰ－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ＧＬＰ－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ＧＬＰ－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β－ＴＣ１細胞上のＧＬＰ－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ＧＬＰ－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ＧＬＰ－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ＧＬＰ－１分子は、天然のＧＬＰ－１の少なくとも１つの生物学的活性（例えば、ＧＬＰ－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、ＧＬＰ－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ＧＬＰ－１の少なくとも１つの生物学的活性を保持する。ＧＬＰ－１分子はまた、天然由来のヒトＧＬＰ－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ＧＬＰ－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ＧＬＰ－１分子はまた、ＧＬＰ－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ＩＶ（ＤＰＰ－ＩＶ）保護ＧＬＰ－１を含むことができる。

【００９２】

本発明のＧＬＰ－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ＧＬＰ－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。従って、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種の一般のアミノ酸（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α－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α－アミノ酸と類似しているβ－アミノ酸が挙げられる。しかしながら、β－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β－アミノ酸は、α（Ｃ２）炭素またはβ（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。

【００９３】

本発明のＧＬＰ－１分子はまた、ハイブリッドＧＬＰ－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ＧＬＰ－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かにかかわらず）、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）。

【００９４】

ＩＩＩ．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、ＧＬＰ－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。

【００９５】

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、ＧＬＰ－１分子を組み込む粒子、またはＧＬＰ－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ＧＬＰ－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ンおよびＧＬＰ－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ＧＬＰ－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ＧＬＰ－１分子との間の会合は、溶剤除去により促進させるか、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ｐＨ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。

【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；３，６－ジ（オ

キサリル－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。

【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。

【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）プロピル－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】

ＩＶ．ＧＬＰ－１／ＤＫＰ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ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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、ＩＩ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もおよび／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、術後の異化的変化、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、ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ乾燥粉末製剤は、ＩＩ型糖尿病および高血糖のヒト細胞におけるβ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ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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）。

【０１０７】

乾燥粉末製剤として、本発明のＧＬＰ－１／ＤＫＰ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／ＤＫＰ粒子は、静脈内懸濁剤形に組込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／ＤＫＰ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。
【０１０８】
さらなる態様においては、「有効量」のＧＬＰ－１／ＤＫＰ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／ＤＫＰ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／ＤＫＰ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、膵臓β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／ＤＫＰ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／ＤＫＰ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／ＤＫＰ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／ＤＫＰ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。
【０１０９】
本発明のＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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ＧＬＰ－１／ＤＫＰ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。ＧＬＰ－１／ＤＫＰ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ＧＬＰ－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ＧＬＰ－１／ＤＫＰ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。
【実施例】
【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。

【０１１２】

実施例１

ＧＬＰ－１の構造の生物物理学的および解析的な分析

ＧＬＰ－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。ＧＬＰ－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、撹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ＧＬＰ－１／ＤＫＰ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、ＧＬＰ－１のペプチド構造を操作する条件を確立した。

【０１１３】

実験手順

ＧＬＰ－１は、American Peptide（米国カリフォルニア州サニーヴェール）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ＧＬＰ－１試料は、特に明記しない限りｐＨ４．０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_2O_2等）と混合した。さらに、各種条件下のＧＬＰ－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、ＧＬＰ－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。

【０１１４】

ＧＬＰ－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α－ヘリックス、ランダムコイル、β－プリーツシート、β－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、例えば純粋なα－ヘリックスやβ－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１Ａ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８．６ｍｇ／ｍＬ）にわたってα－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（２ｍｇ／ｍＬ以下）では、ＧＬＰ－１は、２０５ｎｍ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、２０８ｎｍおよび２２４ｎｍにおける２つの極小値によって決定される通りのα－ヘリックス構造をとる（図１Ａ）。

【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１Ｂ）における２５０～３００ｎｍ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（ｐＨ４．０、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、２８０ｎｍでのトリプトファン励起から得られた（図１Ｃ）。低濃度のＧＬＰ－１についての３５５ｎｍ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。

【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（ｐＨ４．０、２０℃）で行った。１６５６ｃｍ$^{-1}$でのアミドＩバンドにより、ＧＬＰ－１は、２ｍｇ／ｍＬ以上の濃度でα－ヘリックス構造を有することが明確に示される（図１Ｄ）。それ故、ＧＬＰ－１はβ－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。

【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２Ａ（遠紫外ＣＤ）は、２０８ｎｍおよび２２４ｎｍでの極小値により明らかとなる通り、塩の濃度（１００ｍＭ～１０００ｍＭ）を増加させることによって、ＧＬＰ－１の不規則構造がα－ヘリカル構造に変化することが示される。ＮａＣｌ濃度を１Ｍまで上げると、ペプチドの多く（１．０ｍｇ／ｍＬ）が溶液から析出する（図２Ａ）。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。

【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２Ｂ（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、１．０ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１はシグナルを示さないが、イオン強度の増加と共に増大する明確な３次構造を示す。これらの結果は、２８０ｎｍでのトリプトファン励起後の各種ＮａＣｌ濃度（ｐＨ４．０、２０℃）における１．０ｍｇ／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、１．０ｍｇ／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（ｐＨ４．０、２０℃）での１０ｍｇ／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α－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、はっきりと現れる。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、α－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、１０ｍｇ／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ｐＨ４．０での低濃度（０．０５ｍｇ／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、α－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。１０ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１の構造がｐＨ４．４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（ｐＨ６．３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２０８ｎｍ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ｐＩ５．５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、ｐＨ１１．７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ｐＨ９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

撹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】

ｐＨ１０．５のＧＬＰ－１（１ｍｇ／ｍＬ）を４０℃で５日間インキュベートし、その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）とを行った。また、酸化の試験は、ＨＰＬＣおよびＭＳを使用して０．１％のH_2O_2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、質量は不変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_2O_2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に対する撹拌および連続的凍結融解サイクルの作用を、近紫外Ｃ

Ｄ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の撹拌は、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分間攪拌し、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、α－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／ＤＫＰ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／ｗ）の濃度のＧＬＰ－１を含有した。上澄液中の非結合のＧＬＰ－１を、懸濁液から濾過した。会合したＧＬＰ－１タンパク質を有するＦＤＫＰ粒子を、１００ｍＭ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ＧＬＰ－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ＧＬＰ－１の量は、ＨＰＬＣ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ＧＬＰ－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。

【０１３３】

塩の試験

ＦＤＫＰ粒子へのＧＬＰ－１の結合に対する塩の作用を、ＨＰＬＣ解析によって観察した。ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ粒子の負荷を、０、２５、５０、１００、２５０、５００、１０００および１５００ｍＭのＮａＣｌの存在下で、５ｍｇ／ｍＬのＦＤＫＰおよび０．２５ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１で実施した（図８Ａ）。また、ｐＨおよびＮａＣｌ濃度の関数としての、再組成された、ＦＤＫＰを含まない対照試料中に検出されるＧＬＰ－１の量を評価した（図８Ｂ）。両方のデータセットのｐＨを、２０ｍＭリン酸塩／２０ｍＭ酢酸塩混合物により制御した。

【０１３４】

図８Ａにおいて観察される通り、ＦＤＫＰ粒子へのＧＬＰ－１の最適な結合（吸着）は、懸濁液のｐＨに強く影響された。４以上のｐＨで、溶液中のＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ比が

５％ｗ／ｗであった場合、ＦＤＫＰ粒子へのＧＬＰ－１の約３．２％～約４％の結合が認められた。０および２５ｍＭのＮａＣｌの存在下で、ＦＤＫＰ粒子へのＧＬＰ－１の吸着は、ｐＨ２．０では本質的に明らかではなったが、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。ＧＬＰ－１析出は、１Ｍ以上のＮａＣｌを有するＦＤＫＰを含まない対照中に認められた（図８Ｂ）。１Ｍ以上のＮａＣｌにおけるこの見かけの負荷は、高イオン強度のＧＬＰ－１ペプチドの可逆的析出（塩析）の結果である。また、ＦＤＫＰ粒子を含まないＧＬＰ－１の高塩分対照は、再組成された試料において高いＧＬＰ－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ＧＬＰ－１がフィルター内に捕集されることが示された。１Ｍを下回るＮａＣｌにおいては、ＦＤＫＰ粒子の非存在下におけるＧＬＰ－１の析出の証拠はなかった。

【０１３５】

界面活性剤の試験

ＦＤＫＰ粒子へのＧＬＰ－１の結合に対する界面活性剤の作用は、ＨＰＬＣ解析によって観察した。負荷は、界面活性剤の存在下で５ｍｇ／ｍＬのＦＤＫＰおよび０．２５ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１で行った（図９Ａ）。また、ｐＨおよび界面活性剤濃度の関数としての、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の量を評価した（図９Ｂ）。ｐＨ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：０．０９ｍＭのＢｒｉｊ７８、０．０１ｍＭのＴｗｅｅｎ８０、０．２ｍＭのＴｒｉｔｏｎＸ、０．１２ｍＭのＰｌｕｒｏｎｉｃ（プルロニック）Ｆ６８、０．９ｍＭの、Ｈ（CH_2）$_7$$SO_4$Ｎａ、０．９ｍＭのＣＨＡＰＳ、０．９ｍＭのＣｅｔｒｉｍｉｄｅ（セトリミド）が含まれた。各界面活性剤の存在下のＧＬＰ－１についての負荷曲線は、ｐＨの関数としてＧＬＰ－１／ＦＤＫＰについて示した。

【０１３６】

そのデータにより、ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ粒子についてのｐＨ－吸着曲線が、それらの臨界ミセル濃度（ＣＭＣ）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ったことが分かる。それ故、後述するように安定性および／または薬物動態（ＰＫ）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、ＧＬＰ－１とＦＤＫＰ粒子との相互作用は懸濁液の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^-はカチオンの対イオンであり、Na^+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ｐＨ３．０、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：２０ｍＭまたは２５０ｍＭのＬｉＣｌ、２０ｍＭまたは２５０ｍＭのNH_4Cl、２０ｍＭまたは２５０ｍＭのＮａＦ、および２０ｍＭまたは２５０ｍＭの$NaCH_3COO$。

【０１３８】

図１０Ａ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、２０ｍＭまたは２５０ｍＭ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（吸着を高めた）、２５０ｍＭ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２０ｍＭと２５０ｍＭ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。１Ｍ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。１Ｍ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１０Ｂでさらに示されており、その図１０Ｂによって、ＧＬＰ－１は、１Ｍ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。

【０１３９】

第２のイオン実験（図１０Ｃ）において、ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ試料を、２０ｍＭまたは２５０ｍＭのＫＣｌ、２０ｍＭまたは２５０ｍＭのイミダゾール、２０ｍＭまたは２５０ｍＭのＮａＩ、あるいは２０ｍＭまたは２５０ｍＭの$NaPO_4$の存在下で調製した。そのデータにより、２５０ｍＭでイミダゾールが１ＭのＮａＣｌの存在下で負荷を減少させ、２５０ｍＭのリン酸塩および２５０ｍＭにより、高い「見かけの」負荷が生じたことが示される（図１０Ｃ）。０Ｍおよび１Ｍ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１０Ｄ）、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、１Ｍ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、２５０ｍＭのリン酸塩およびヨウ化物を有する０ＭのＮａＣｌ対照中にも認められた。

【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１１Ａ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、ｐＨ３．０、且つ２０、５０、１００、１５０、２００または３００ｍＭ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、ヘキシレングリコール（Ｈｅｘ－Ｇｌｙ）、トレハロース、グリシン、ＰＥＧ、ＴＭＡＯ、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、ＦＤＫＰ面へのＧＬＰ－１の吸着に劇的な影響を与えなかった。ＧＬＰ－１の析出は、再組成された、ＦＤＫＰ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ＦＤＫＰへのＧＬＰ－１吸着に果たす役割を決定するために検討した。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。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：ＮａＳＣ

Ｎ、ＣｓＣｌ、Na_2SO_4、$(CH_3)_3N$－ＨＣｌ、Na_2NO_3、クエン酸ナトリウムおよび$NaClO_4$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ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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ＦＤＫＰ粒子へのＧＬＰ－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、ＦＤＫＰ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ＧＬＰ－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$NaClO_4$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ＦＤＫＰへのＧＬＰ－１吸着において果たす役割を決定するために評価した。ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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、ＦＤＫＰ粒子に対するＧＬＰ－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、ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ吸着は抑制された。図１３Ｂにより、２０％のアルコール濃度では、ＧＬＰ－１の有意な析出は、再組成された、ＦＤＫＰを含まない対照試料において特に認められなかったことが分かる。

【０１４６】

これにより、薬物の構造柔軟性（すなわち形成され得るＦＤＫＰ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ＧＬＰ－１のＦＤＫＰ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ＦＤＫＰ－ＧＬＰ－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。

【０１４７】

濃度の試験

各種濃度におけるＧＬＰ－１のＦＤＫＰ粒子表面への吸着を調べた。図１４Ａは、各種ｐＨでのＧＬＰ－１濃度の関数としてのＧＬＰ－１／ＦＤＫＰからの負荷曲線を示すものである。ＧＬＰ－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１０ｍｇ／ｍＬであった。試料のｐＨは、２．５、３．０、３．５、４．０、４．５または５．０であった。

【０１４８】

ＦＤＫＰ粒子に対するＧＬＰ－１負荷の増大は、ＦＤＫＰ濃度が５ｍｇ／ｍＬで一定に

維持され、且つＧＬＰ－１の濃度が増加した際に認められた。ＧＬＰ－１の濃度がｐＨ４で１０ｍｇ／ｍＬだった場合は、ＦＤＫＰ粒子に対する約２０％のＧＬＰ－１の吸着が認められた。意外にも、ＦＤＫＰ粒子に対するＧＬＰ－１負荷の吸着の飽和は、高濃度のＧＬＰ－１では確認されなかった。この確認結果は、おそらく多層へのＧＬＰ－１の自己会合によるものと考えられる。

【０１４９】

走査型電子顕微鏡（ＳＥＭ）によるＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ製剤の形態の解析により、ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ粒子は、２個以上のＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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１４Ｂ）。これらの製剤は、（パネルＡ）０．５ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１および２．５ｍｇ／ｍＬのＦＤＫＰ；（パネルＢ）０．５ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１および１０ｍｇ／ｍＬ中のＦＤＫＰ；（パネルＣ）ｐＨ４．０における２０ｍＭ塩化ナトリウム、２０ｍＭ酢酸カリウムおよび２０ｍＭリン酸カリウムの、０．５ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１および１０ｍｇ／ｍＬのＦＤＫＰ；および（パネルＤ）ｐＨ４．０における２０ｍＭ塩化ナトリウム、２０ｍＭ酢酸カリウムおよび２０ｍＭリン酸カリウムの、１０ｍｇ／ｍＬのＧＬＰ－１および５０ｍｇ／ｍＬのＦＤＫＰ、を含有する溶液を凍結乾燥することにより調製した。

【０１５０】

結果の要旨

全体的に、ＧＬＰ－１のＦＤＫＰ粒子との相互作用についての吸着試験によって、ＧＬＰ－１が、ｐＨ４以上で、高吸着で、ｐＨに依存する様式でＤＫＰ粒子表面に結合することが示された。ＤＫＰ粒子表面へのＧＬＰ－１の吸着はｐＨに最も強く影響を受けることが明らかになったが、ｐＨ２．０では本質的な吸着は生じず、ｐＨ４．０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ｐＨで吸着が高まった。界面活性剤等の他の添加剤、および一般の安定剤の、ＦＤＫＰ粒子表面へのＧＬＰ－１の吸着に対する作用は、ほんのわずかだった。

【０１５１】

さらに、ＧＬＰ－１自体の性質もこれらの実験の結果に影響を及ぼした。ＧＬＰ－１の作用は、吸着の飽和が認められなかったという点で、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ＧＬＰ－１の自己会合によるものであった。高濃度でのＧＬＰ－１の自己会合によって、ＧＬＰ－１ペプチドの複数層によるＤＫＰ粒子のコーティングが可能となり、このことによりＧＬＰ－１ペプチドの負荷率がより高いものとなる。この驚異的な自己会合の特質は、安定したＧＬＰ－１の投与形態の調製に有益であることが分かる。さらに、ＧＬＰ－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ＧＬＰ－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

ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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ＧＬＰ－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、ＧＲＡＳ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に選択した。

【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_3N･HCl	50			×	
クエン酸塩	50			×	
Am_2SO_4	50			×	
ClO_4	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、ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰの第ＩＩ相完全性試験のために選択した。下記の表２には、第ＩＩ相完全性のために選択された６種のＧＬＰ－１製剤を示す。粉剤の調製後、それらをブランクのＦＤＫＰと混合して、各製剤中に同等の質量のＧＬＰ－１ペプチドおよびＦＤＫＰの両方を生成した。

【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_2O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$CD4^+$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、それにより膵臓のβ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５ＴＩＵ／ｍＬで、採集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

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った。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β細胞死の抑制に対するＧＬＰ－１の作用を決定した。ラット膵上皮（ＡＲＩＰ）細胞（膵臓β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のスタウロスポリン（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、スタウロスポ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変化が生じる前、および膜完全性が失われる前のリン脂質（ＰＳ）非対称性の変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スタウロスポリンを４時間、または１μＭスタウロスポリン＋１５ｎｍのＧＬＰ－１を投与した細胞か、あるいはスタウロスポリンも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、スタウロスポ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

。５μＭのスタウロスポリンを、０、１０、２０または４０ｎＭのエキセンジンの存在下でそれぞれ１６、２４または４８時間ＡＲＩＰ細胞に投与した。そのデータ（図２０）により、１０ｎＭ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４０ｎＭでは、エキセンジンはアポトーシスをある程度抑制し、４０ｎＭ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ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ製剤の作用

細胞に基づくアッセイを行って、ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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、ＡＲＩＰ細胞におけるスタウロスポ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。ＧＬＰ－１試料を前もって投与したＡＲＩＰ細胞を、５μＭスタウロスポリンに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。

【０１６５】

各種ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ試料を、４５ｎＭで、細胞に基づくアッセイで使用して、スタウロスポ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、ＧＬＰ－１単独の場合、スタウロスポリン単独の場合、あるいはＧＬＰ－１およびスタウロスポ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。

【０１６６】

そのデータは、ストレスが加えられたＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ凍結乾燥製剤のすべてにより、スタウロスポ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、ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ懸濁製剤の多くは、細胞死を抑制しなかった。

【０１６７】

実施例７

ＧＬＰ－１／ＤＫＰ粒子の肺吸入

ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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ＧＬＰ－１濃度を評価した。予備試験において、ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ粒子製剤の約４％および１６％（ｗ／ｗ）のＧＬＰ－１を使用した。ラットは、肺内液体滴下注入またはＩＶ注射により投与されたＧＬＰ－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ＩＶ注射により投与されたＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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ＩＶ注射により投与されたＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ塩と関連した混合製剤の投与を受けた。ＧＬＰ－１／ＤＫＰ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ＤＫＰ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、０．０８ｍｇのＧＬＰ－１総投与量のために０．５ｍｇまたは２．０ｍｇの粒子（それぞれ１６％または４％のＧＬＰ－１負荷）で行った。

【０１６８】

動物の個々の群（群７～１２）においては、Ｄａｙ２に投与を反復した。群１、４、７および１０には、８０μｇのＧＬＰ－１溶液を投与した。群２、５、８、および１１には、ＧＬＰ－１／ＤＫＰ塩関連製剤（約１６％ＧＬＰ－１負荷）を投与した。群３、６、９、１２は、ＧＬＰ－１／ＤＫＰ塩関連混合製剤（約４％ＧＬＰ－１負荷）の投与を受けた

。
【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ルズ）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。
【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）。
【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（ＩＳ）により１５．８％のＧＬＰ－１／ＦＤＫＰが投与され、群３には、肺内吸入（ＩＳ）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（ＩＳ）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（ＩＳ）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。
【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。
【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

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。

【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 (μg)/μM	経路	$T_{1/2}$ (分)	T_{max} (分)	C_{max} (pM)	投与 30 分後 (～pM)	AUC (pM*分/mL)
1	GLP-1	80/24	LIS	1.0	5	1933	0	29350
2	FDKP-GLP-1	80/24	IS	9.9	10	3154	1000	145082
3	FDKP-GLP-1*	80/24	IS	7.7	10	2776	400	60171

*FDKP粒子と3:1で混合。

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。

【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。

【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／ＤＫＰ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、およびサルの２８日間の試験を実施した。ＧＬＰ－１／ＤＫＰ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ヵ月間の回復期間を与える。すべての動物は、臨床徴候、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。

【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、胚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Ｑ－Ｔ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_{50}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ったため（９ヵ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った。静脈内投与の場合は、安全性薬理コアバ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った。

【０１８２】

実施例１０

β－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、β細胞の成長および生存ならびにβ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、β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、β細胞アポトーシスの減少が生じ、それにより、β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（β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β細胞集団を調節することが知られている。

【０１８３】

β細胞集団に対するＧＬＰ－１の作用を示すために、Ｄａｙ１、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、β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。

【０１８４】

β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、雄性ズッカー糖尿病性脂肪過多／肥満（ＺＤＦ）ラット（ｎ＝８／群）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／ＦＤＫＰ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集した。免疫組織化学によるインスリン分泌、β細胞集団およびアポトーシスの解析のために膵組織を採集した。

【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／ＦＤＫＰ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集した。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／ＦＤＫＰ）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－／ＤＫＰ）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β膵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ラットの膵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ラットの膵組織でアポトーシス解析を実施した。膵臓外分泌細胞および膵臓内分泌細胞を、ＴＵＮＥＬアッセイ（Tornusciolo D.R.ら、1995）によって評価した。膵臓内の約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、β細胞の増殖を、対照（空気）またはＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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膵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膵島内および膵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ラットにおける膵臓の膵島β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／ＦＤＫＰ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、膵島１個あたりのインスリン分泌細胞の数を増加させた。

【０１９２】

実施例１１

ＧＬＰ－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。

【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。

【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。

【０１９６】

ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ（５％製剤）の投与後の最大血漿中ＧＬＰ－１濃度（C_{max}）は、投与５分後のT_{max}での２，３２１ｐＭ、投与（１０％製剤）の１０分後のT_{max}での４，８８７ｐＭ、および投与（１５％製剤）の１０分後のT_{max}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＊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。

【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_{max}）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ＧＬＰ－１濃度は、ＳＤラットにおける肺内吸入によるＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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ＧＬＰ－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ＧＬＰ－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。

【０１９９】
実施例１３
肺内吸入により投与されたＧＬＰ－１／ＦＤＫＰの薬力学的特性
ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰの薬力学的性質を評価するために、雌性Ｓｐｒａｇｕｅ　Ｄａｗｌｅｙ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％ＧＬＰ－１（０．３ｍｇのＧＬＰ－１）を含有する２ｍｇのＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ（ｎ＝１０）のいずれかの投与を４日間連続で受けた。

【０２００】
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、Ｄａｙ１、２および３において、肺内吸入によるＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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＜０．０５）。Ｄａｙ１の１時間目および６時間目の時点、およびＤａｙ２の４時間目および６時間目、およびＤａｙ３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。

【０２０１】
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。

【０２０２】
実施例１４～１６
毒物動態学（ＴＫ）試験
下記の実施例１４～１６は、ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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。

【０２０３】
実施例１４
肺内吸入により５日間投与されたサルにおけるＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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。

【０２０４】
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（Ｄａｙ１）、雄性動物は、３０月齢～５６月齢、および体重が２．３～４．０ｋｇであり、雌性動物は、３１月齢～６４月齢、および体重が１．６～３．４ｋｇ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）、２ｍｇ／ｋｇのＦＤＫＰ、あるいは０．３（０．０４ｍｇのＧＬＰ－１）、１．０（０．１３ｍｇのＧＬＰ－１）または２．０

（０．２６ｍｇのＧＬＰ－１）ｍｇ／ｋｇＧＬＰ－１／ＦＤＫＰの投与を受けた。

【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*による決定)

群番号	群名称	推定用量レベル(mg／kg／日)					
		FDKP[3]		GLP-1[3]		GLP-1/FDKP	
		目標[1]	達成[2]	目標[1]	達成[2]	目標[1]	達成[2]
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。

[1]2．5kgの推定体重に基づく。

[2]測定体重(雄性および雌性の平均)に基づく。

[3]提示された目標用量レベルおよび達成用量レベルは、発生雰囲気中の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[1]		GLP-1[1]		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。**

[1]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、発生雰囲気中の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。

全血試料（１．４ｍＬ／血液試料）をＤａｙ５の以下の時点で得た：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集した。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）に採集した。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_{max}）、T_{max}、ＡＵＣおよび$T_{1/2}$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Ｄａｙ５のすべての投与前試料において検出された。Ｄａｙ５に、ＧＬＰ－１の最高血漿中濃度（C_{max}）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_{max}およびAUC_{last}（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、Ｄａｙ５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_{last}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_{las}

$_{t}$の２．９倍の増加、および雌性のAUC_{last}の１．１倍の増加が生じただけであった。

【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。

【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_{last}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。

【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_{max}）、T_{max}、ＡＵＣ、$T_{1/2}$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_{max}）は、投与の約１０～３０分後に達成された。

【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_{last}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－１Ｆ／ＤＫＰを投与した場合、ＦＤＫＰの最高濃度（C_{max}）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_{max}の濃度は、T_{max}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。

【０２１５】
全体として、ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰは、臨床徴候がなく、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ＧＬＰ－１の用量に相当）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、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
肺内吸入によって１４日間投与されたラットにおけるＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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ＦＤＫＰ粒子、１ｍｇ／ｋｇのＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ（０．１５ｍｇのＧＬＰ－１）、３ｍｇ／ｋｇのＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ（０．４５ｍｇのＧＬＰ－１）または１０ｍｇ／ｋｇのＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ（１．５ｍｇのＧＬＰ－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、毒性の臨床徴候について毎日観察し、体重および摂食量も記録した。

【０２１７】
Ｄａｙ１および１４に、ＧＬＰ－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ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰでのＧＬＰ－１の最高濃度の平均は、雄性と雌性においてそれぞれ、Ｄａｙ１では６７１４ｐｇ／ｍＬおよび６２７０ｐｇ／ｍＬであり、Ｄａｙ１４では２９７９ｐｇ／ｍＬおよび５８３４ｐｇ／ｍだった。血漿中ＧＬＰ－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。ＧＬＰ－１の平均ＡＵＣ濃度は、最高用量の１０ｍｇ／ｋｇ／日のＧＬＰ－１／ＦＤＫＰにおいて、雄性は２１８７ｐＭ＊ｈ、雌性は２７０３ｐＭ＊ｈだった。ＧＬＰ－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。ＧＬＰ－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ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰが投与されたラットにおける無毒性量（ＮＯＡＥＬ）は、１０ｍｇ／ｋｇ／日のＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ（１．５ｍｇ／ｋｇ／日のＧＬＰ－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）付随動物（１２／性別／群）を、最終的な血液採取後の投与のＤａｙ１４に屠殺した。ＧＬＰ－１／ＤＫＰ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ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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。ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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２：３．６７ｍ

ｇ／ｋｇ／日のＦＤＫＰ粒子、群３：０．３ｍｇ／ｋｇ／日のＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ（０．０４５ｍｇ／ｋｇ／日のＧＬＰ－１）、群４：１ｍｇ／ｋｇ／日のＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ（０．１５ｍｇ／ｋｇ／日のＧＬＰ－１）、または群５：２．６ｍｇ／ｋｇ／日のＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ（０．３９ｍｇ／ｋｇ／日のＧＬＰ－１）。４２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：ＦＤＫＰ（約４ｍｇ／ｋｇ／日）、群３：０．３ｍｇ／ｋｇ／日のＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ（低用量）、群４：．０ｍｇ／ｋｇ／日のＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ（中用量）、群５：２．６ｍｇ／ｋｇ／日のＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ（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。

【０２２２】

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、異常および毒性の徴候について投与の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、Ｄａｙ１、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、Ｄａｙ２９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、Ｄａｙ５７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。

【０２２３】

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。Ｄａｙ２９（投与最終日）の高用量の雌の乳酸脱水素酵素（ＬＤＨ）およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）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、ＬＤＨ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関していなかった。高用量雌性群のＡＳＴ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。

【０２２４】

【表６】

表7:ALT、ASTおよびLDHの平均変化率(%)

	平均値の変化率(%)		
群	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

２．６ｍｇ／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変化や組織学的変化の形跡も認められなかった。ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰは、著しい臨床徴候や、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、２．６ｍｇ／ｋｇ／日までのＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ（０．３９ｍｇ／ｋｇ／日のＧＬＰ－１）の用量で認められる肉眼的変化や顕微鏡的変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３．６７ｍｇ／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_{max}およびAUC_{last}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_{last}ではなくＧＬＰ－１のC_{max}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。２．６ｍｇ／ｋｇ／日のＧＬＰ－１／ＦＤＫＰのＧＬＰ－１の最高血中濃度の平均値は、雄性で２５９ｐｇ／ｍＬおよび雌性で１６４ｐｇ／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１０３ｐｇ＊ｈｒ／ｍＬおよび雌性で１０４ｐｇ＊ｈｒ／ｍＬだった。低用量の場合、ＡＵＣ値およびC_{max}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。２．６ｍｇ／ｋｇ／日のＧＬＰ－１／ＦＤＫＰでのＦＤＫＰの最高濃度の平均値は、雄性で１８００ｎｇ／ｍＬおよび雌性で１９００ｐｇ／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２．６ｍｇ／ｋｇ／日のＧＬＰ－１／ＦＤＫＰまたは０．３９ｍｇ／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、２．６ｍｇ／ｋｇ／日のＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ（０．３９ｍｇ／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１．５ｍｇのＧＬＰ－１／ＦＤＫＰまたは約０．０２１ｍｇ／ｋｇのＧＬＰ－１

（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に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

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。

【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。

【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

群（ｎ＝３）には、液体滴下注入によりＧＬＰ－１を投与した。また、ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ（０．３ｍｇのＧＬＰ－１）を肺内吸入により投与し、第２対照として使用した。ＧＬＰ－１／ｘＤＫＰ投与群の各群には、１０％および１５％のＧＬＰ－１を負荷した約２．０ｍｇ用量のｘＤＫＰで、肺内吸入によりＧＬＰ－１／ｘＤＫＰ製剤を投与した。使用したｘＤＫＰ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ＧＬＰ－１濃度の評価のために採集した。

【０２３５】

実施例２０

健康な成人男性被験者におけるＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ吸入粉剤の第１ａ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

ＧＬＰ－１は、静脈内（ｉｖ）または皮下（ｓｃ）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、ＧＬＰ－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。

【０２３６】

ＧＬＰ－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ＧＬＰ－１の群発と関連があると思われる。ＧＬＰ－１のこの早期の急増をＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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ＧＬＰ－１の後期の急増は、ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ吸入粉剤の食後投与によって模倣することができる。

【０２３７】

ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ吸入粉剤の第１ａ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、ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ吸入粉剤の用量の範囲を同定することである。第１ａ相臨床試験のために選択する用量は、ラットおよび霊長類の、上記の実施例に記載されたＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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。

【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、ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ吸入粉剤としてグルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ－１）が１回投与された：コホート１：０．０５ｍｇ、コホート２：０．４５ｍｇ、コホート３：０．７５ｍｇ、コホート４：１．０５ｍｇ、およびコホート５：１．５ｍｇのＧＬＰ－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７０ｋｇ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。

【０２３９】

この試験の目的は、健康な成体男性被験者のＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ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（ＡＥ）や、バイタルサイン（vi

tal signs）、理学的検査、臨床検査、心電図（ＥＣＧ）が挙げられる。

【０２４０】

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ＡＥ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；$AUC_{0-120(min)}$の血漿ＧＬＰ－１および$AUC_{0-480min}$の血清ＦＤＫＰにより測定される、ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ吸入粉剤の投与後の血漿ＧＬＰ－１および血清フマリルジケトピペラジン（ＦＤＫＰ）の薬物動態学的（ＰＫ）パラメーターが含まれ、血漿ＧＬＰ－１のさらなるＰＫパラメーターとしてはt_{max}血漿ＧＬＰ－１、C_{max}血漿ＧＬＰ－１および$T_{1/2}$血漿ＧＬＰ－１等が挙げられる。血清ＦＤＫＰのさらなるＰＫパラメーターとしては、T_{max}血清ＦＤＫＰ、C_{max}血清ＦＤＫＰおよび$T_{1/2}$血清ＦＤＫＰが挙げられる。

【０２４１】

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ＡＥ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、悪心および／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次的評価項目としては、血漿ＧＬＰ－１および血清ＦＤＫＰ（$AUC_{0-120(min)}$の血漿ＧＬＰ－１および$AUC_{0-480min}$の血清ＦＤＫＰ）のＰＫ素因；血漿ＧＬＰ－１のさらなるＰＫパラメーター（T_{max}血漿ＧＬＰ－１、C_{max}血漿ＧＬＰ－１、$T_{1/2}$血漿ＧＬＰ－１）；血清ＦＤＫＰのさらなるＰＫパラメーター（T_{max}血清ＦＤＫＰ、C_{max}血清ＦＤＫＰ）；さらなる安全性パラメーター（肺機能検査（ＰＦＴ））やＥＣＧが挙げられる。

【０２４２】

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（ＩＭＰ）の安全性および忍容性を決定するための２１ＣＦＲ３１２、医薬品の臨床試験の実施に関する基準（Good Clinical Practice）：統合されたガイダンス（Consolidated Guidance）（ＩＣＨ－Ｅ６）および臨床試験の一般指針（Guidanceon General Considerations for Clinical Trials）（ＩＣＨ－Ｅ８）についてのガイダンスに合致している。

【０２４３】

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）。ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ吸入粉剤の単回投与は、２回目の来院時に行われる。

【０２４４】

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（ＰＩ）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悪心および／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ＰＩの判断で、投与を中止することができる。

【０２４５】

ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ吸入粉剤の５種の用量（０．０５、０．４５、０．７５、１．０５および１．５ｍｇのＧＬＰ－１）を評価する。すべての用量に対応するために、調製したＧＬＰ－１／ＦＤＫＰは、ＦＤＫＰ吸入粉剤と混合する。そのままたは適切な量のＦＤＫＰ吸入粉剤と混合し、ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰ吸入粉剤（ＧＬＰ－１／ＦＤＫＰの重量に対して１５％の重量）からなる１０ｍｇの乾燥粉末を含有する単回投与カートリッジを用いて、ＧＬＰ－１の所望の用量（０．０５ｍｇ、０．４５ｍｇ、０．７５ｍｇ、１．０

５ｍｇ、１．５ｍｇ）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】

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
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
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
Schеpp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
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

【０２５６】

（付記１）

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。

【０２５７】

（付記２）

前記ＧＬＰ－１分子が、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、Ｇ

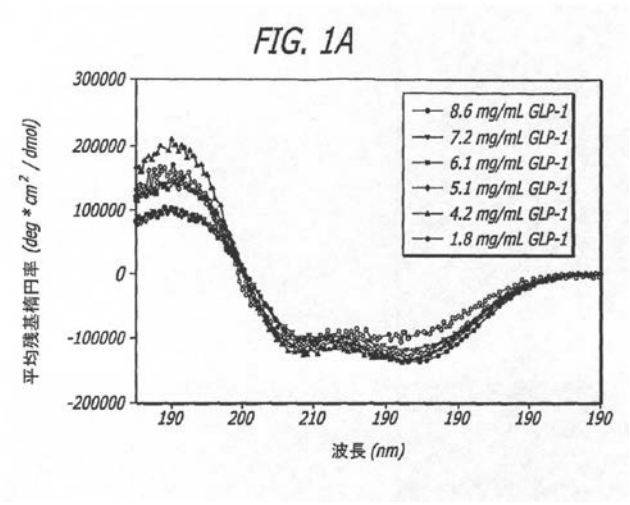
ＬＰ－１模倣体、ＧＬＰ－１ペプチド類似体または生合成ＧＬＰ－１類似体からなる群から選択される、付記１に記載の乾燥粉末組成物。
【０２５８】
（付記３）
前記ジケトピペラジンが、式：２，５－ジケト－３，６－ジ（４－Ｘ－アミノブチル）ピペラジンを有するジケトピペラジンであって、式中Ｘは、スクシニル、グルタリル、マレイルおよびフマリルからなる群から選択される、付記１に記載の乾燥粉末組成物。
【０２５９】
（付記４）
ジケトピペラジン塩を含む付記１に記載の乾燥粉末組成物。
【０２６０】
（付記５）
前記ジケトピペラジンが２，５－ジケト－３，６－ジ（４－フマリル－アミノブチル）ピペラジンである、付記３に記載の乾燥粉末組成物。
【０２６１】
（付記６）
前記ＧＬＰ－１分子が天然のＧＬＰ－１である、付記１に記載の乾燥粉末組成物。
【０２６２】
（付記７）
前記ＧＬＰ－１分子が、アミド化されたＧＬＰ－１分子である、付記１に記載の乾燥粉末組成物。
【０２６３】
（付記８）
前記アミド化されたＧＬＰ－１分子がＧＬＰ－１（７－３６）アミドである、付記７に記載の乾燥粉末組成物。
【０２６４】
（付記９）
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前記ＧＬＰ－１分子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、
前記ＧＬＰ－１分子および前記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。
【０２６５】
（付記１０）
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、付記９に記載の方法。
【０２６６】
（付記１１）
前記ＧＬＰ－１分子および前記ジケトピペラジンを含む前記粒子が、前記溶媒を除去することによって形成される、付記１０に記載の方法。
【０２６７】
（付記１２）
前記ＧＬＰ－１分子および前記ジケトピペラジンを含む前記粒子が、前記溶媒を除去する前に形成される、付記１０に記載の方法。
【０２６８】
（付記１３）
前記ＧＬＰ－１分子が、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、ＧＬ

Ｐ－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、付記９に記載の方法。
【０２６９】
（付記１４）
前記ＧＬＰ－１分子が、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、付記９に記載の方法。
【０２７０】
（付記１５）
前記ＧＬＰ－１分子が、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、付記９に記載の方法。
【０２７１】
（付記１６）
前記ＧＬＰ－１分子が、約０．２５ｍｇ／ｍＬの濃度のＧＬＰ－１を含む溶液の形態で提供される、付記９に記載の方法。
【０２７２】
（付記１７）
前記ジケトピペラジンが、ジケトピペラジン粒子の懸濁液の形態で提供される、付記９に記載の方法。
【０２７３】
（付記１８）
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、付記９に記載の方法。
【０２７４】
（付記１９）
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、界面活性剤、イオン、オスモライト、カオトロープ、リオトロープ、酸、塩基および有機溶媒からなる群から選択される、付記１７または付記１８に記載の方法。
【０２７５】
（付記２０）
前記作用剤が前記ＧＬＰ－１分子と前記ジケトピペラジン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、付記１９に記載の方法。
【０２７６】
（付記２１）
前記作用剤が前記ＧＬＰ－１分子の安定性または薬効を改善する、付記１９に記載の方法。
【０２７７】
（付記２２）
前記作用剤が塩化ナトリウムである、付記１９に記載の方法。
【０２７８】
（付記２３）
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、付記１７または付記１８に記載の方法。
【０２７９】
（付記２４）
ｐＨを約４以上に調整する、付記２３に記載の方法。
【０２８０】
（付記２５）
前記粒子内の前記ＧＬＰ－１分子がより大きな安定性を有する、付記９に記載の方法。
【０２８１】

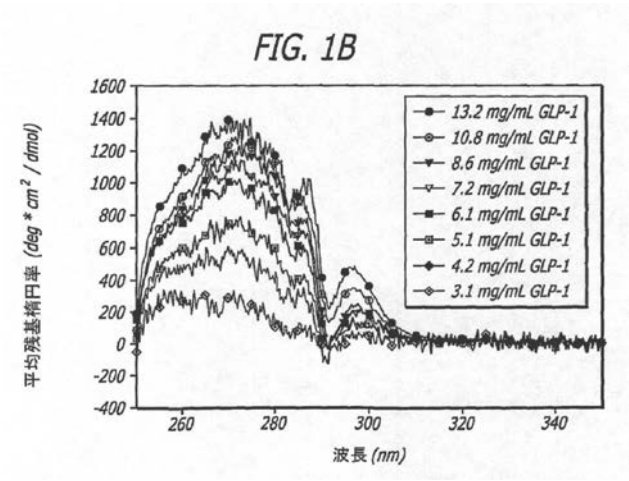
（付記２６）
前記共通の溶液が、約１μｇ／ｍＬ～５０ｍｇ／ｍＬの濃度のＧＬＰ－１を含む、付記９に記載の方法。
【０２８２】
（付記２７）
前記共通の溶液が、約０．１ｍｇ／ｍＬ～１０ｍｇ／ｍＬの濃度のＧＬＰ－１を含む、付記９に記載の方法。
【０２８３】
（付記２８）
前記共通の溶液が、約０．２５ｍｇ／ｍＬの濃度のＧＬＰ－１を含む、付記９に記載の方法。
【０２８４】
（付記２９）
前記共通の溶液に作用剤を添加することをさらに含み、該作用剤が、塩、界面活性剤、イオン、オスモライト、カオトロープ、リオトロープ、酸、塩基および有機溶媒からなる群から選択される、付記９に記載の方法。
【０２８５】
（付記３０）
前記作用剤が前記ＧＬＰ－１分子と前記ジケトピペラジン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、付記２９に記載の方法。
【０２８６】
（付記３１）
前記作用剤が該ＧＬＰ－１分子の安定性または薬効を改善する、付記２９に記載の方法。
【０２８７】
（付記３２）
前記作用剤が塩化ナトリウムである、付記２９に記載の方法。
【０２８８】
（付記３３）
前記共通の溶液のｐＨを調整することを更に含む、付記９に記載の方法。
【０２８９】
（付記３４）
ｐＨを約４以上に調整する、付記３３に記載の方法。
【０２９０】
（付記３５）
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って、ＧＬＰ－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。
【０２９１】
（付記３６）
前記提供が、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、付記３５に記載の方法。
【０２９２】
（付記３７）
前記提供が肺内送達により行われる、付記３５に記載の方法。
【０２９３】
（付記３８）
前記必要の対象が、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、膵島細胞移植、および再生治療、からなる群から選択される症状または疾患の治療を含む、付記３５に記載の方法。

【０２９４】
（付記３９）
前記粒子の提供が、天然のＧＬＰ－１よりも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、付記３５に記載の方法。
【０２９５】
（付記４０）
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ＧＬＰ－１分子と該溶液とを混合するステップ；および
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、ＧＬＰ－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。
【０２９６】
（付記４１）
前記改善されたＧＬＰ－１薬物動態プロファイルがより高いＧＬＰ－１半減期を含む、付記４０に記載の方法。
【０２９７】
（付記４２）
前記より高いＧＬＰ－１半減期が７．５分以上である、付記４１に記載の方法。
【０２９８】
（付記４３）
前記改善されたＧＬＰ－１薬物動態プロファイルが、天然のＧＬＰ－１よりも改善されたＧＬＰ－１の生物学的利用能を含む、付記４０に記載の方法。

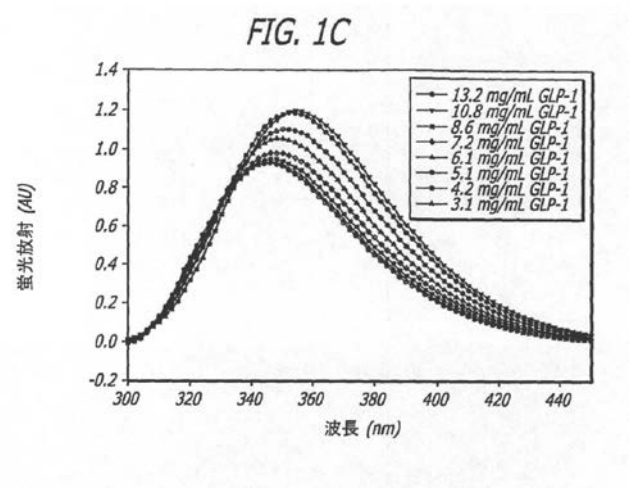
【図１Ａ】



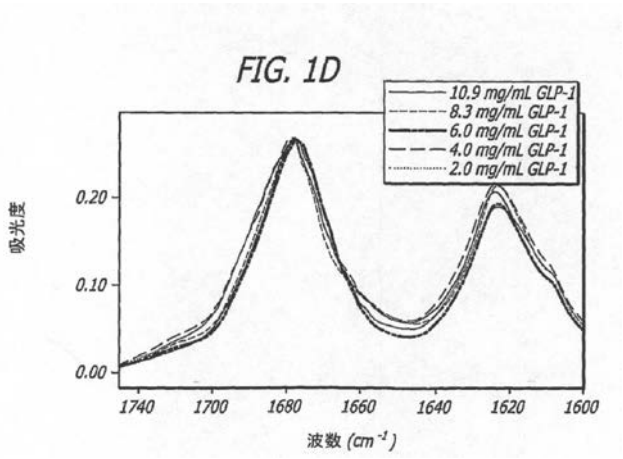
【図１Ｂ】



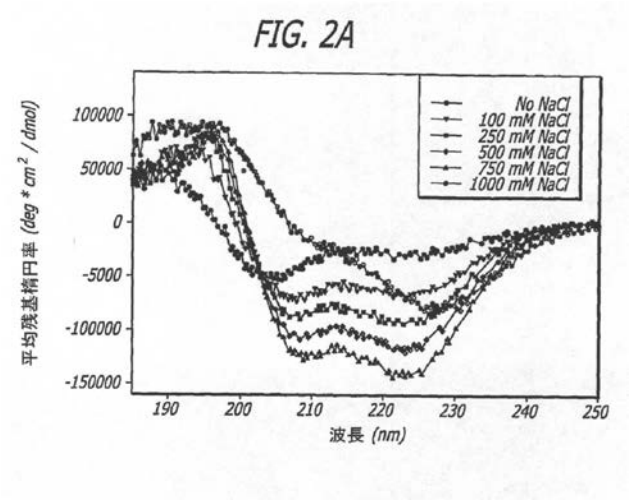
【図１Ｃ】



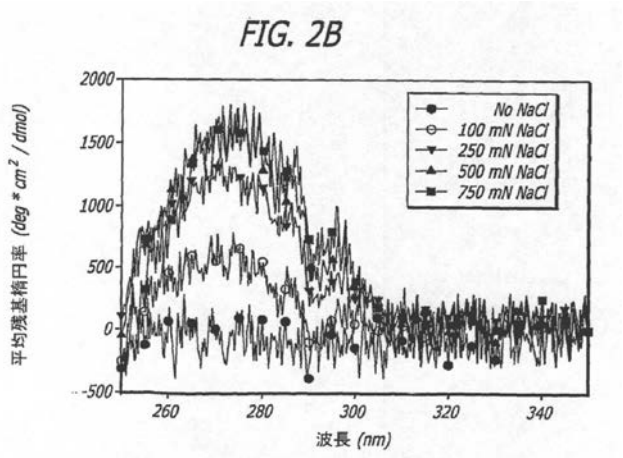
【図１Ｄ】



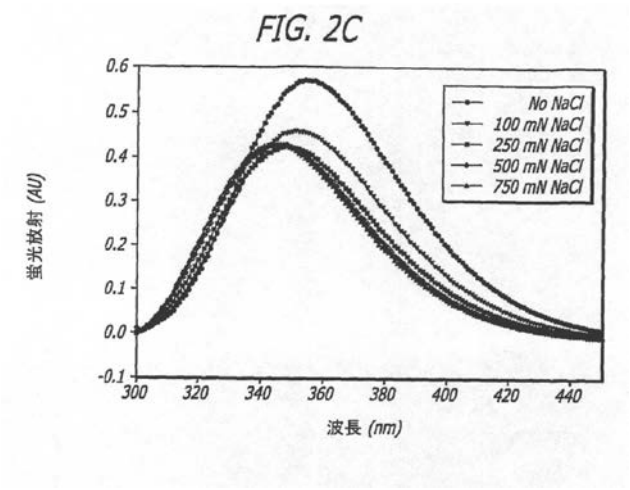
【図２Ａ】



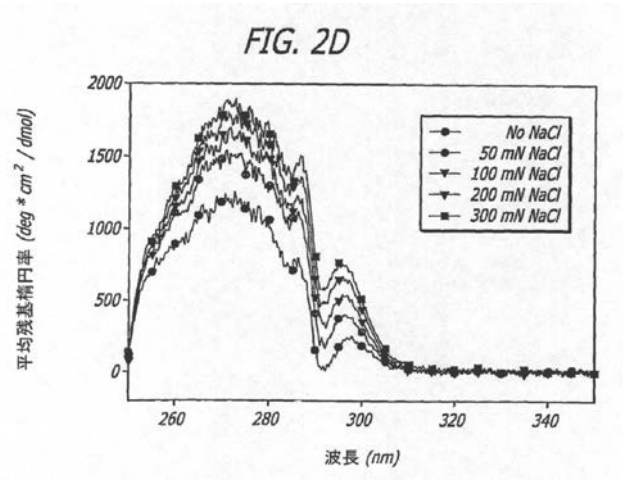
【図２Ｂ】



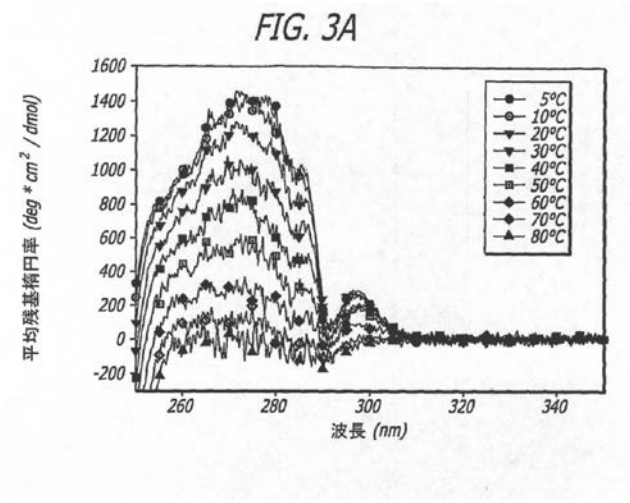
【図２Ｃ】



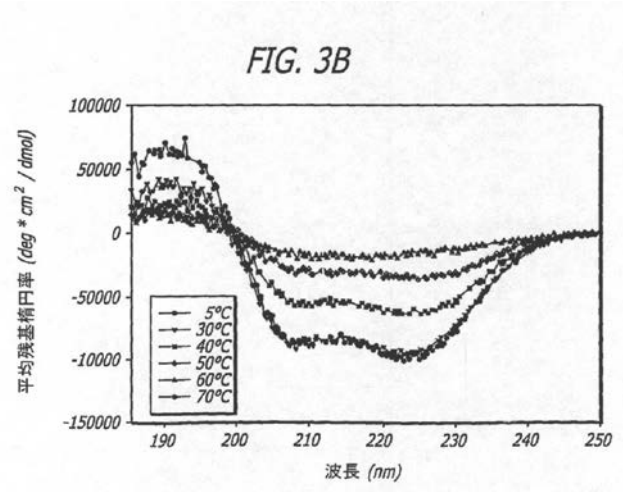
【図２Ｄ】



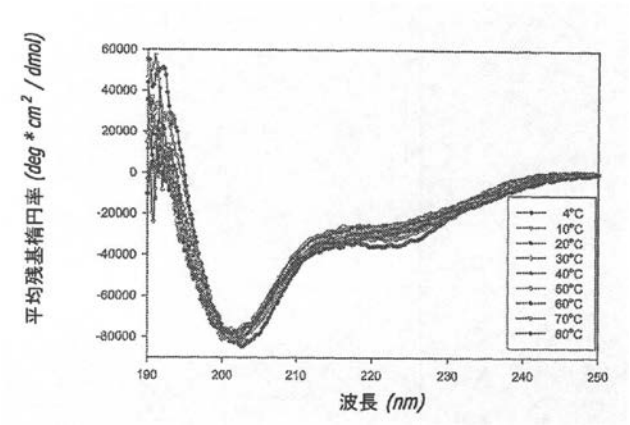
【図３Ａ】



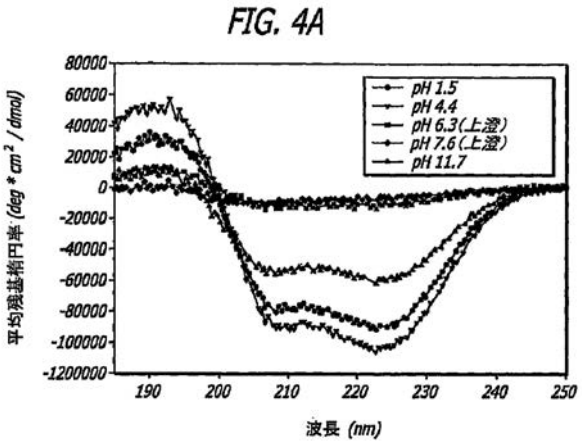
【図３Ｂ】



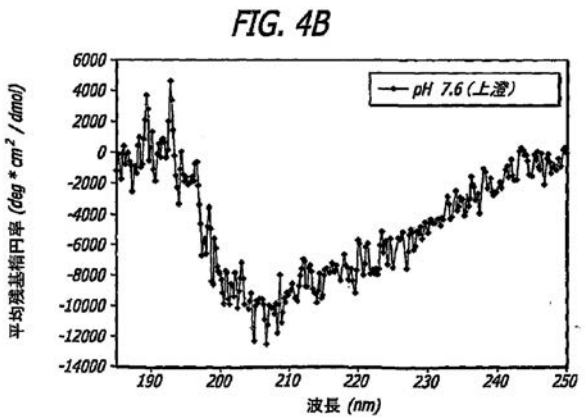
【図３Ｃ】



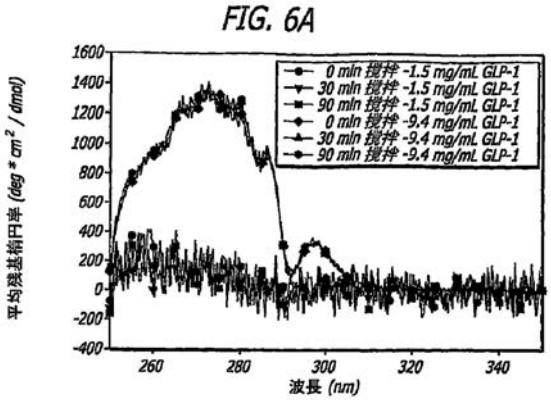
【図４Ａ】



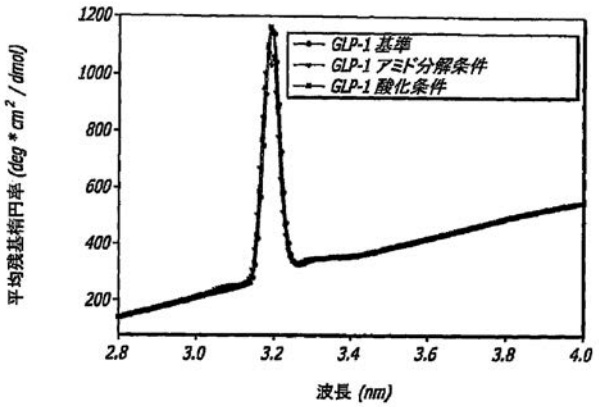
【図４Ｂ】



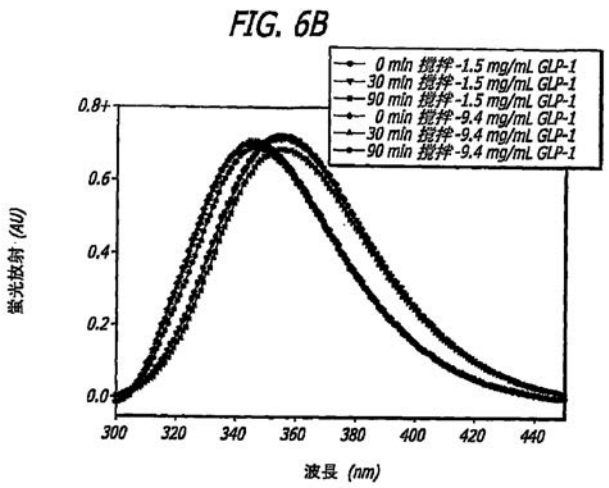
【図６Ａ】



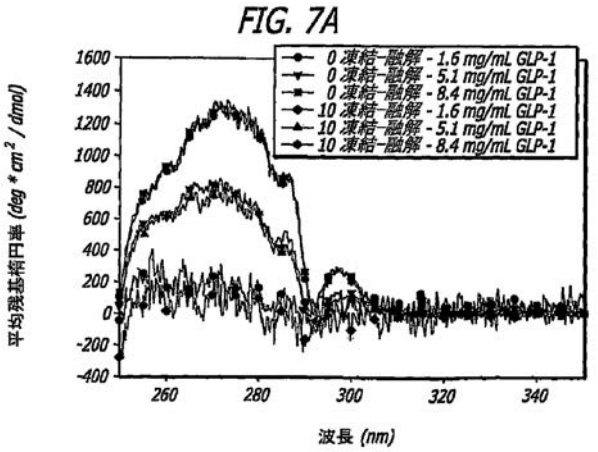
【図５】



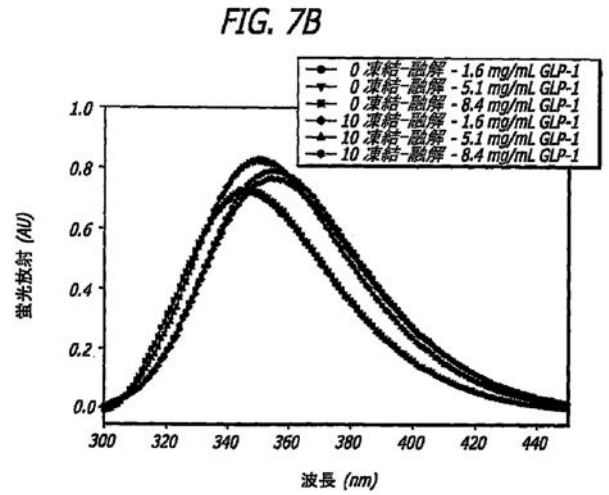
【図６Ｂ】



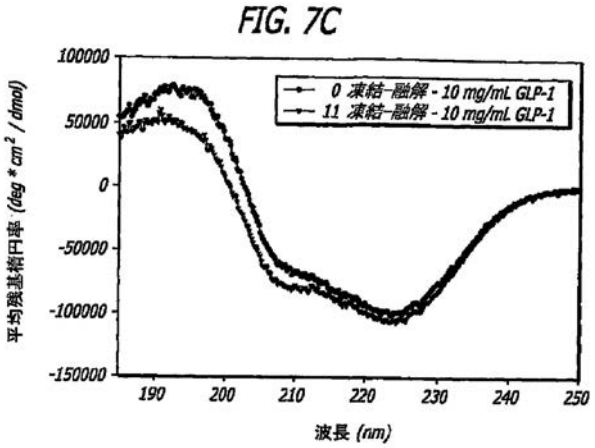
【図７Ａ】



【図７Ｂ】

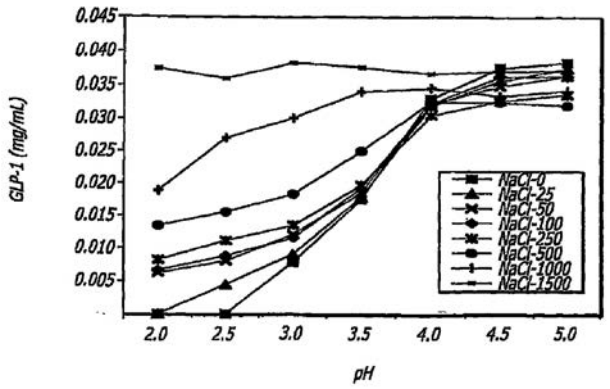


【図７Ｃ】



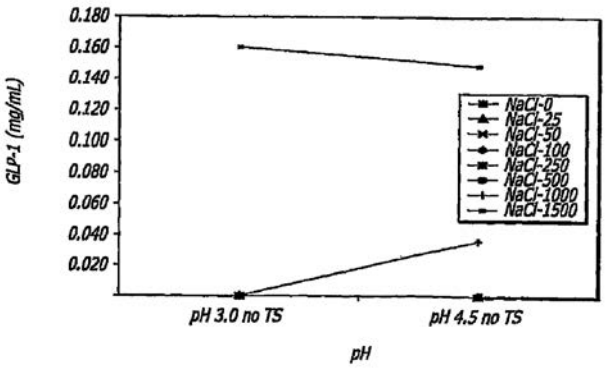
【図８Ａ】

FIG. 8A



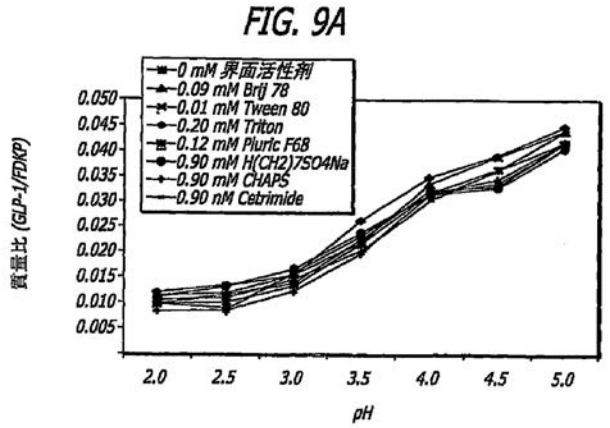
【図８Ｂ】

FIG. 8B



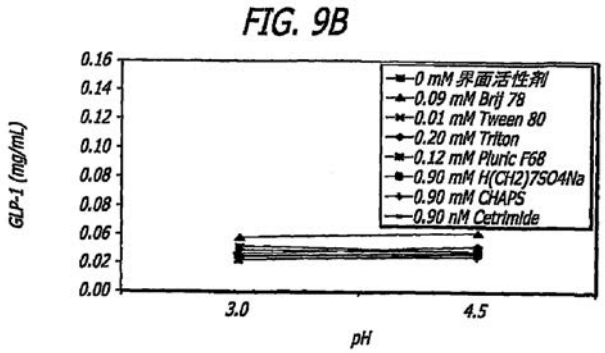
【図９Ａ】

FIG. 9A



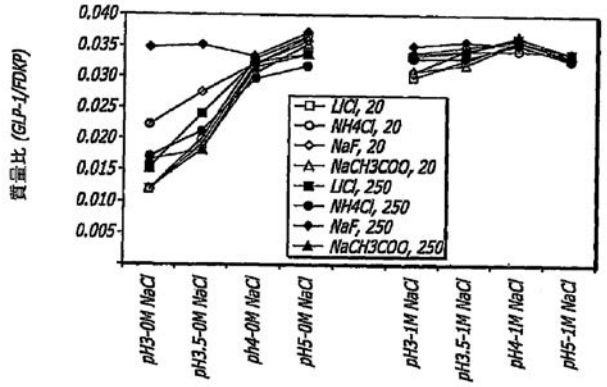
【図９Ｂ】

FIG. 9B



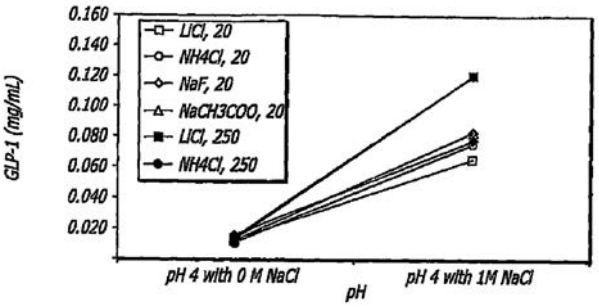
【図１０Ａ】

FIG. 10A



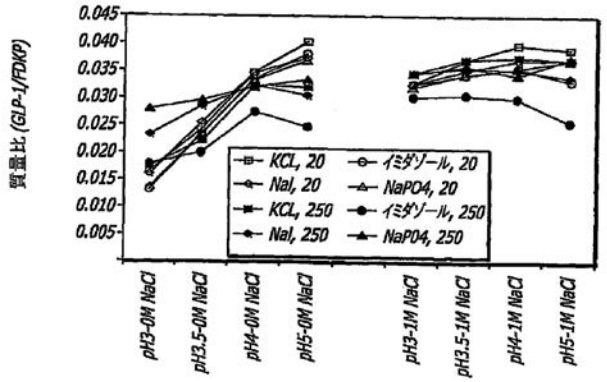
【図１０Ｂ】

FIG. 10B



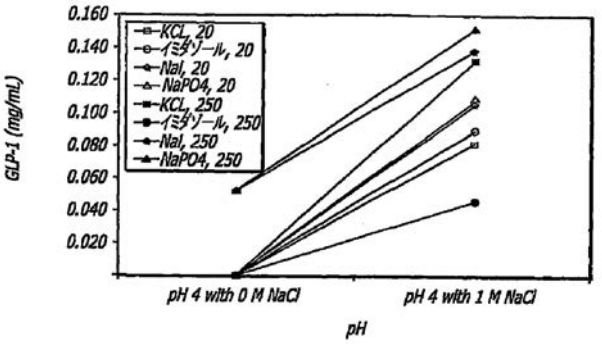
【図１０Ｃ】

FIG. 10C



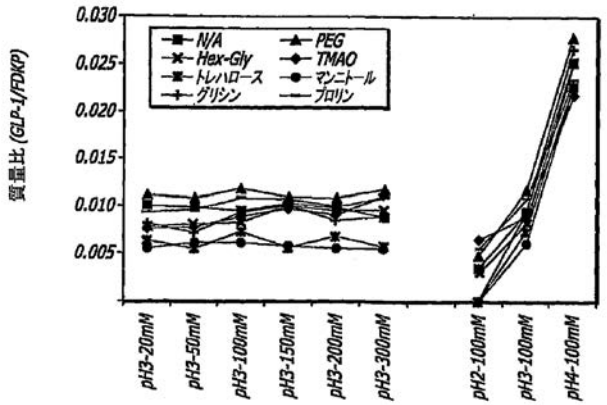
【図１０Ｄ】

FIG. 10D



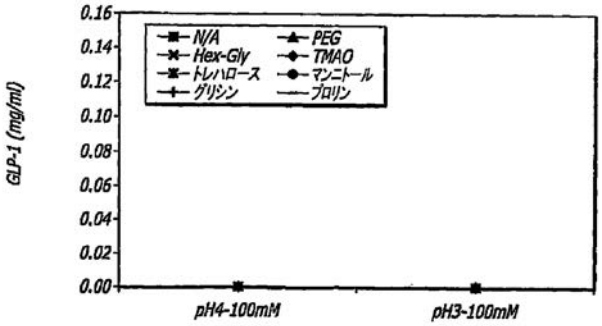
【図１１Ａ】

FIG. 11A



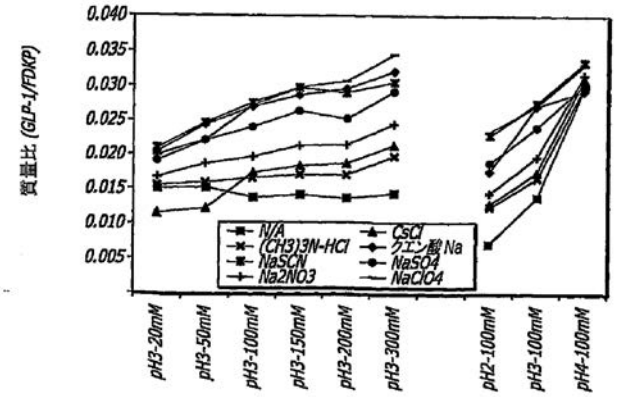
【図１１Ｂ】

FIG. 11B



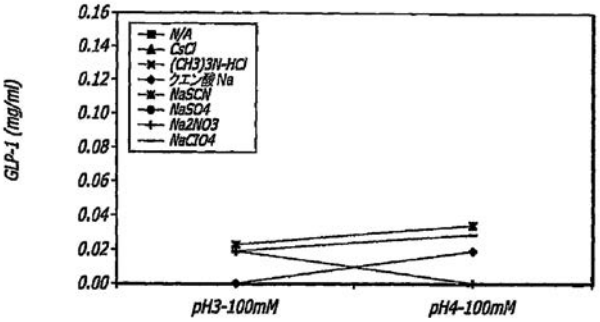
【図１２Ａ】

FIG. 12A



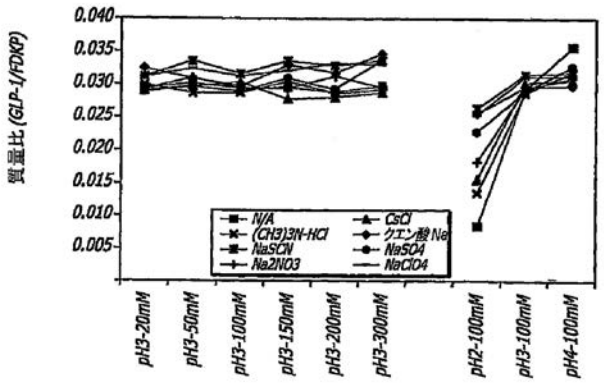
【図１２Ｂ】

FIG. 12B



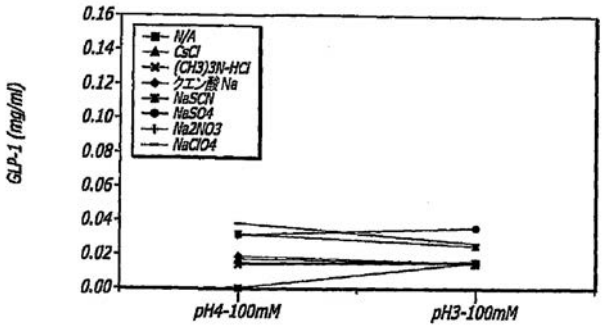
【図１２Ｃ】

FIG. 12C



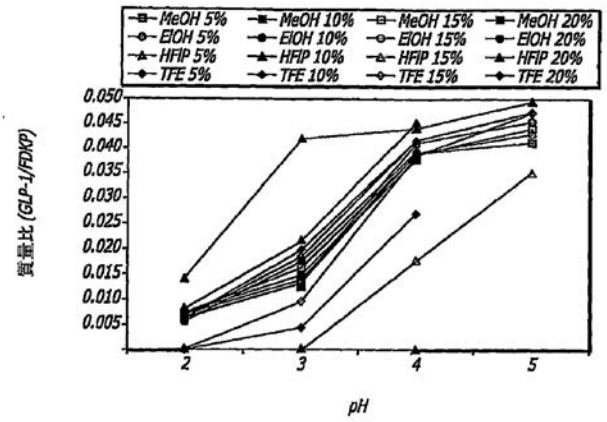
【図１２Ｄ】

FIG. 12D



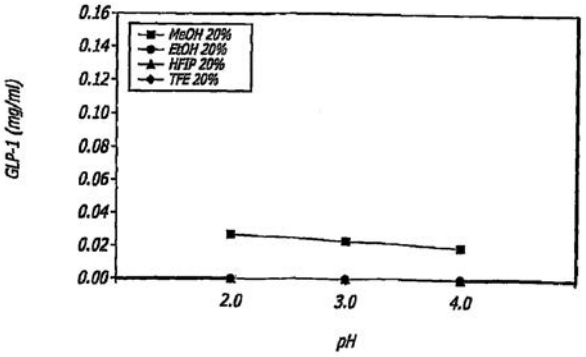
【図１３Ａ】

FIG. 13A



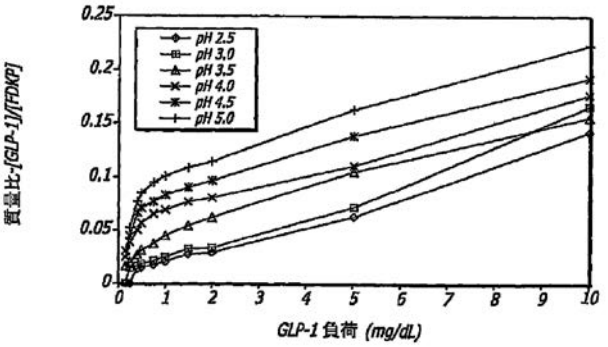
【図１３Ｂ】

FIG. 13B



【図１４Ａ】

FIG. 14A



【図１４Ｂ】

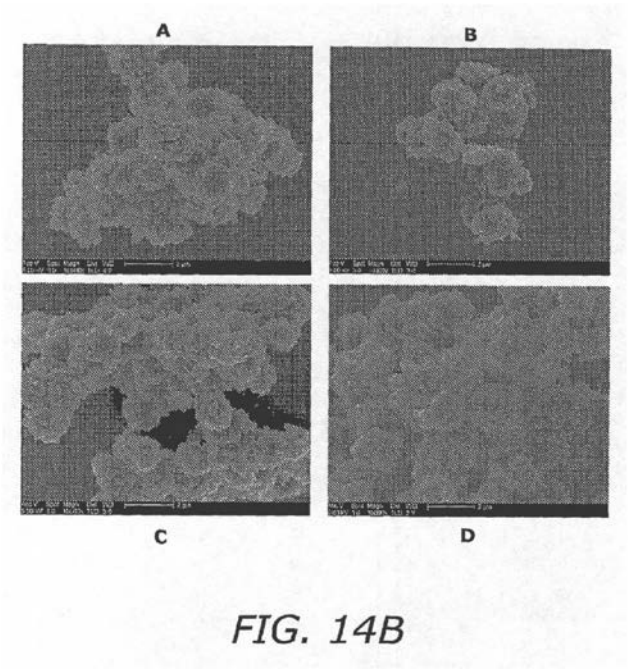
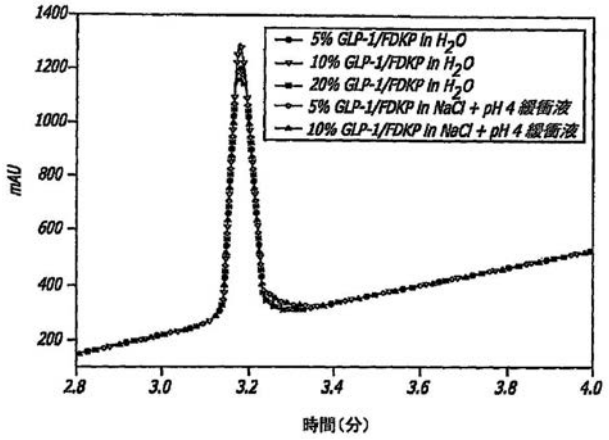
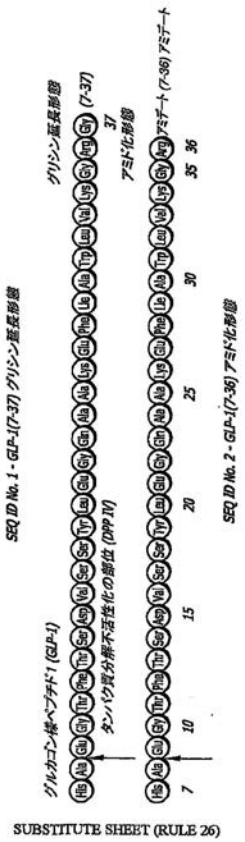


FIG. 14B

【図１５】

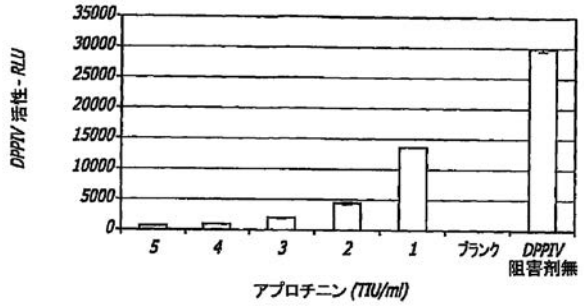


【図１６Ａ】



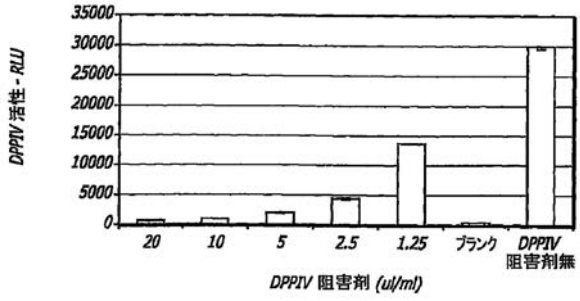
【図１６Ｂ】

FIG. 16B

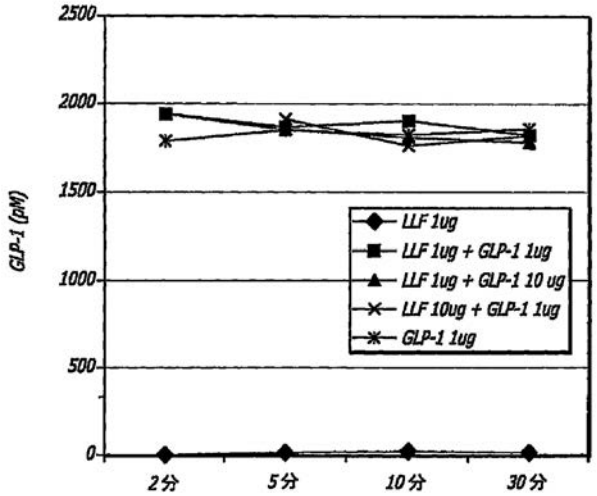


【図１６Ｃ】

FIG. 16C

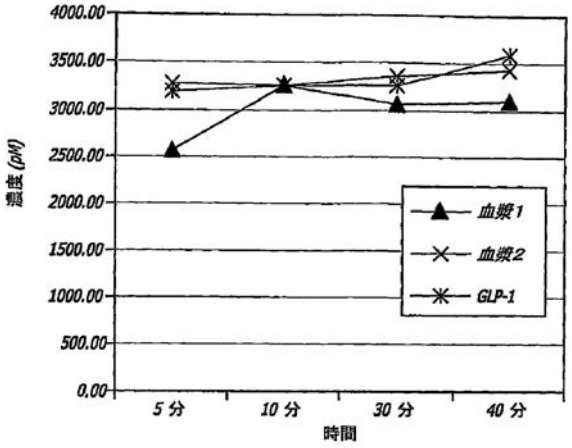


【図１７】



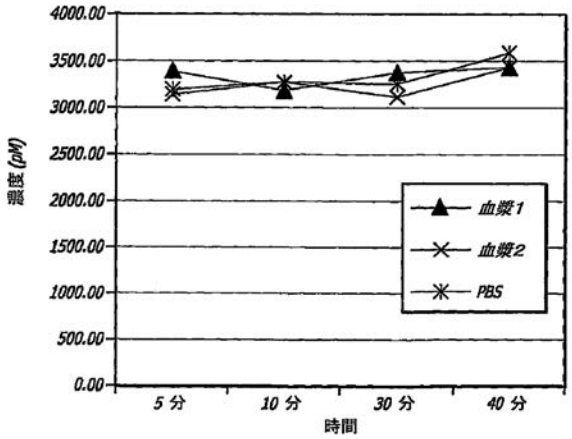
【図１８Ａ】

FIG. 18A



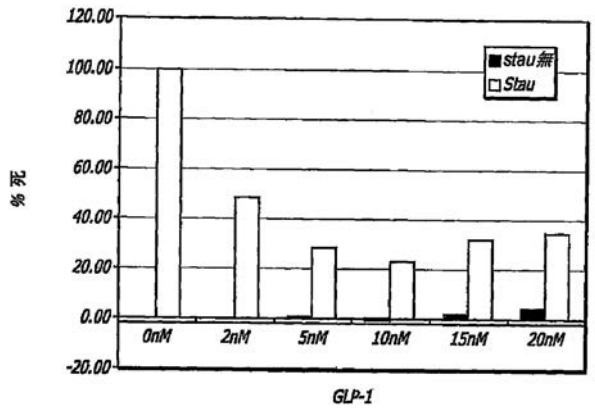
【図１８Ｂ】

FIG. 18B

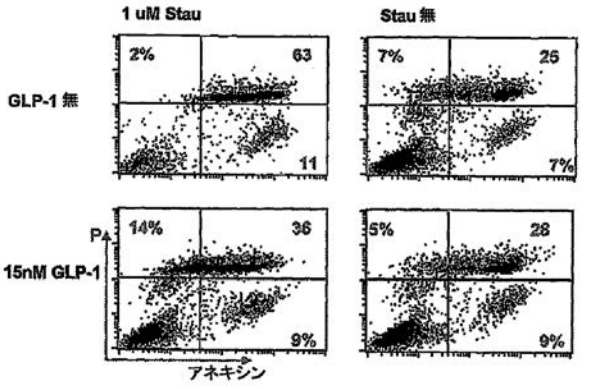


【図１９Ａ】

FIG. 19A

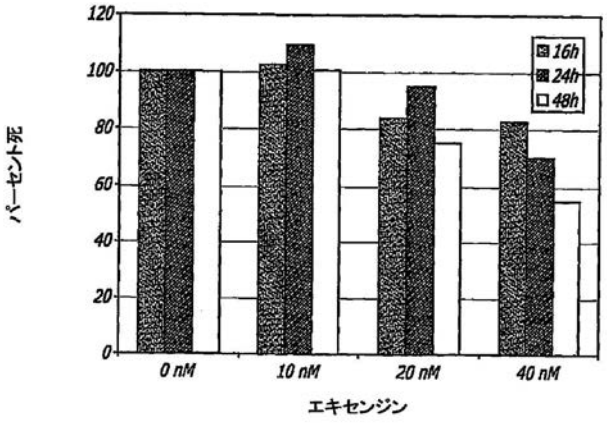


【図１９Ｂ】

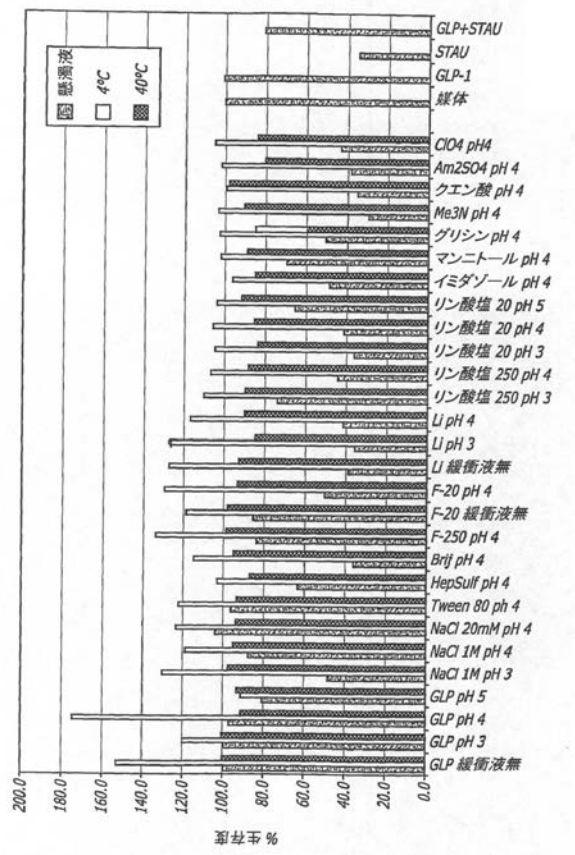


投与		% アポトーシス	% 阻害
無	-	32	0
	+ GLP-1	38	-11
スタウロスポリン	-	74	0
	+ GLP-1	45	40

【図２０】



【図２１】



【図２２Ａ】

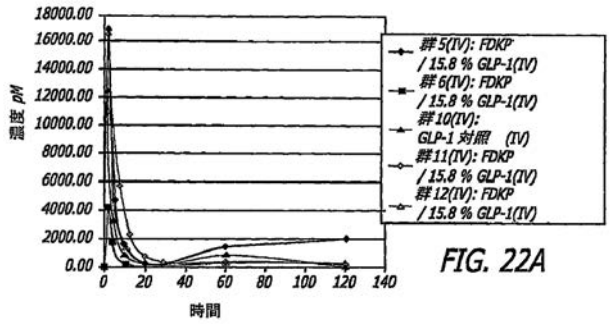


FIG. 22A

【図２２Ｂ】

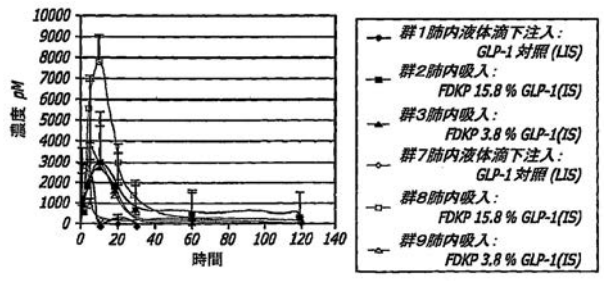


FIG. 22B

【図２３Ａ】

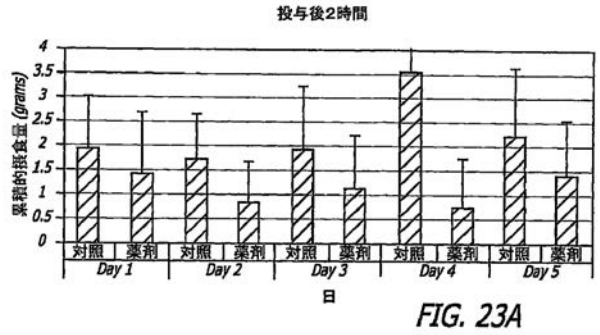


FIG. 23A

【図２３Ｂ】

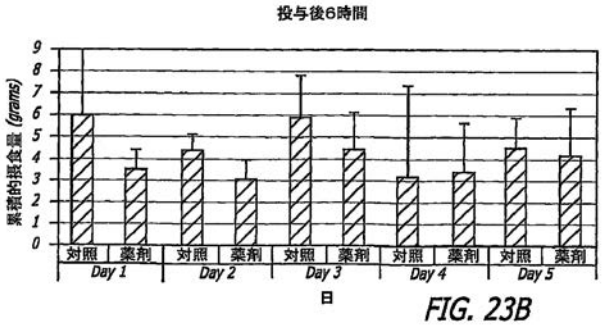
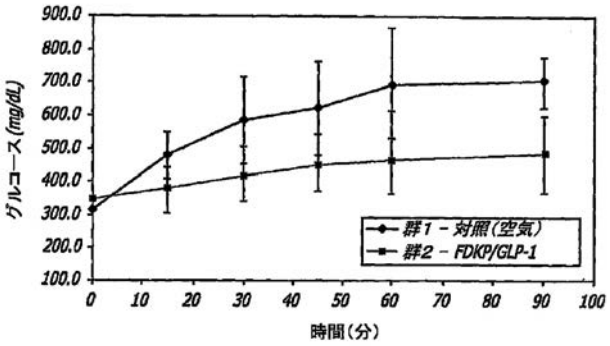
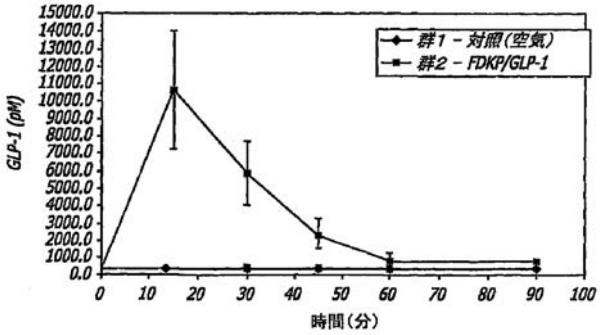


FIG. 23B

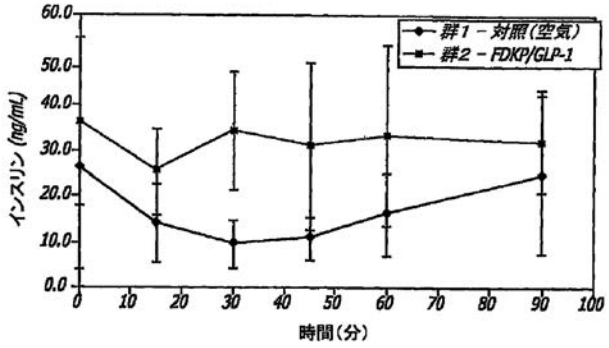
【図２４】



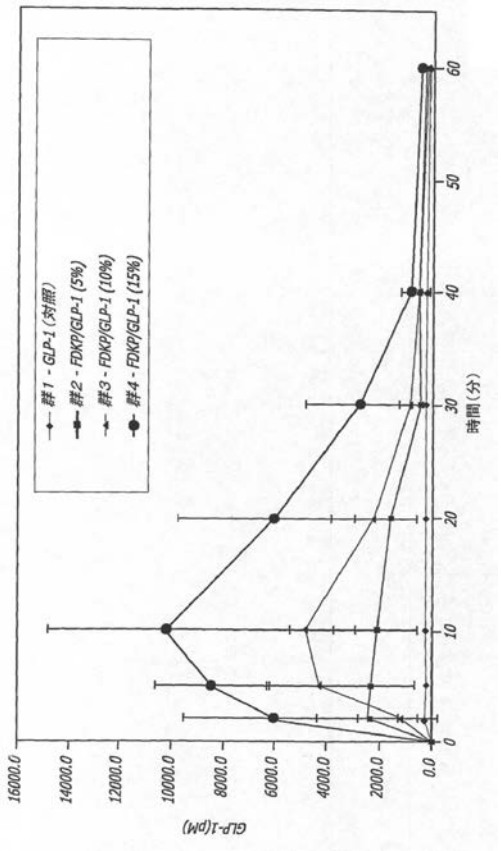
【図２５】



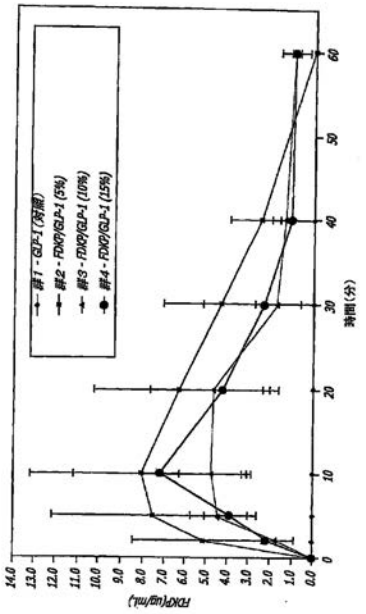
【図２６】



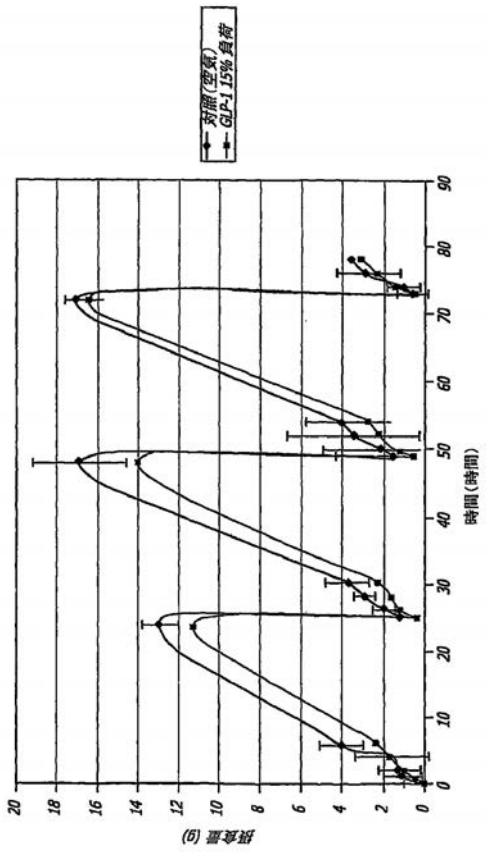
【図２７】



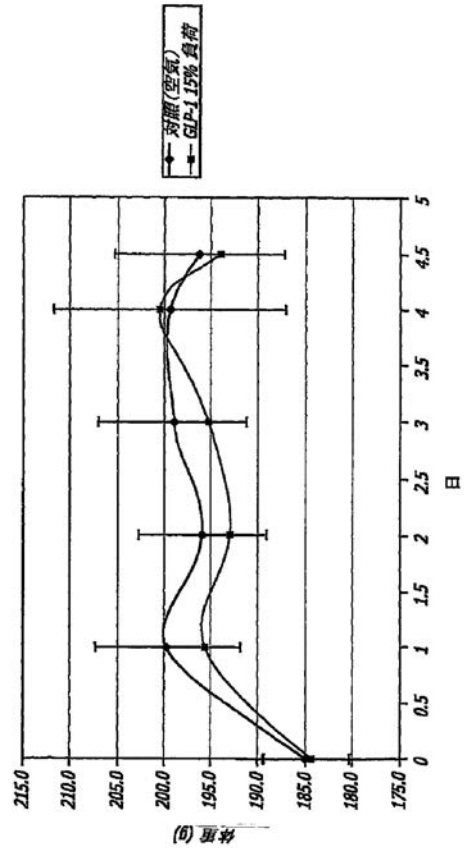
【図２８】



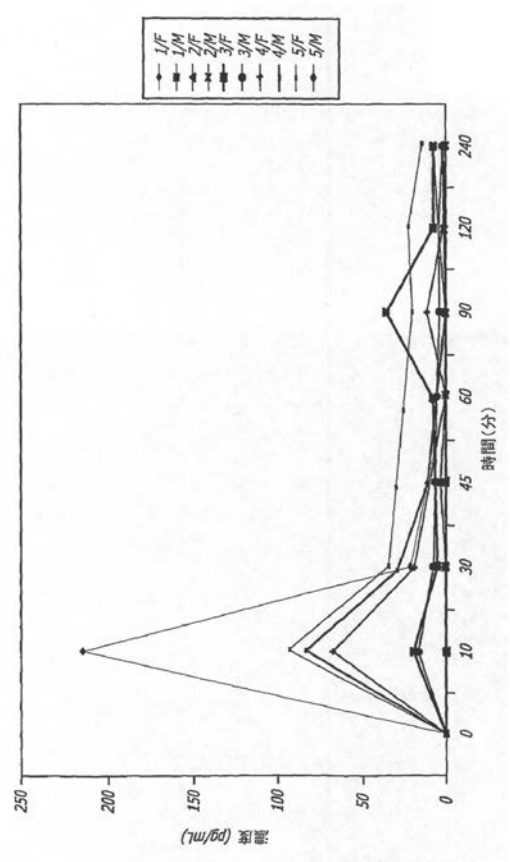
【図２９】



【図３０】



【図３１】



【配列表】
2016104736000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		テーマコード（参考）
A61P	*3/04*	*(2006.01)*	A61P	3/04	
A61P	*35/00*	*(2006.01)*	A61P	35/00	
A61P	*9/10*	*(2006.01)*	A61P	9/10	
A61P	*3/06*	*(2006.01)*	A61P	3/06	
A61P	*1/04*	*(2006.01)*	A61P	1/04	
A61P	*9/00*	*(2006.01)*	A61P	9/00	
A61P	*25/00*	*(2006.01)*	A61P	25/00	
A61P	*25/28*	*(2006.01)*	A61P	25/28	

(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，ベントゥーラ，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　ナンバー　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　６２１８
(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

Ｆターム(参考)　4C076 AA29 BB01 BB13 BB16 BB22 BB25 BB27 BB29 CC01 CC11
CC16 CC21 CC27 CC30 GG06
4C084 AA01 AA02 AA03 BA01 BA08 BA19 BA23 DB37 MA02 MA43
MA44 MA52 MA56 MA57 MA59 MA60 MA66 NA05 ZA011 ZA021
ZA151 ZA361 ZA591 ZA681 ZA701 ZB261 ZC331 ZC351 ZC751
4C086 AA01 AA02 BC50 MA02 MA04 MA43 MA44 MA52 MA56 MA57
MA59 MA60 MA66 NA05 ZA01 ZA02 ZA15 ZA36 ZA59 ZA68
ZA70 ZB26 ZC33 ZC35 ZC75