



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년04월05일  
(11) 등록번호 10-1966484  
(24) 등록일자 2019년04월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 9/08 (2006.01) A61K 38/28 (2006.01)  
A61K 47/02 (2006.01) A61K 47/12 (2006.01)  
A61K 47/18 (2017.01)  
(21) 출원번호 10-2014-7032221  
(22) 출원일자(국제) 2013년04월16일  
심사청구일자 2018년04월16일  
(85) 번역문제출일자 2014년11월17일  
(65) 공개번호 10-2014-0146209  
(43) 공개일자 2014년12월24일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2013/036742  
(87) 국제공개번호 WO 2013/158618  
국제공개일자 2013년10월24일  
(30) 우선권주장  
13/826,806 2013년03월14일 미국(US)  
(뒷면에 계속)  
(56) 선행기술조사문헌  
EP02403520 B1  
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자  
일라이 릴리 앤드 캄파니  
미국 46285 인디애나주 인디애나폴리스 릴리 코포  
레이트 센터  
(72) 발명자  
폴, 로데리크  
미합중국 코네티컷 06784 셔먼 코번 로드 이스트  
9  
하우저, 로버트  
미합중국 메릴랜드 21045 컬럼비아 엔드리스 오션  
웨이 8730  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
박창남, 정대섭

전체 청구항 수 : 총 24 항

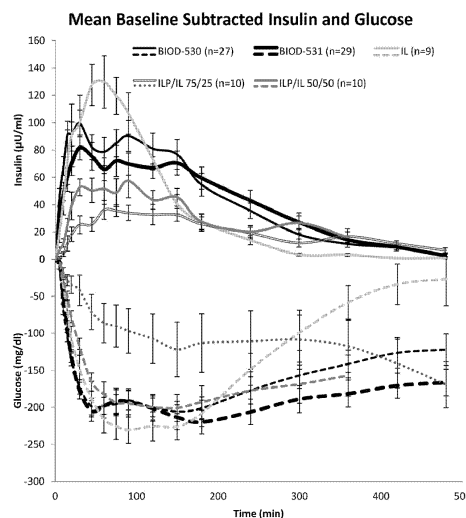
심사관 : 최원철

(54) 발명의 명칭 인슐린 및 인슐린 유사체의 약동학 및 약역학과 주사 통증을 조절하기 위한 마그네슘 조성물

(57) 요약

초속효형 주사가 가능한 인슐린제형과 연관된 주사부의 통증을 조절하는 조성물 및 방법이 피하주사용으로 개발되어 왔다. 상기 제형은 에틸렌디아민 테트라아세트산(ethylenediamine tetraacetic acid, "EDTA")과 같은 아연 킬레이트, 시트르산 및/또는 시트르산 나트륨과 같은 용해/안정화제, 하나 또는 그 이상의 마그네슘 화합물 및 선택적으로 추가의 부형제로 조합된 인슐린을 포함한다. 새로운 제안은 속효형 농축 인슐린 제형과, 상업적으로 이용 가능한 속효형 유사 제형의 흡수를 강화하기 위한 건조 분말 부형제를 포함하는 용기에서 혼합함으로써 흡수를 강화하기 위한 방법을 포함한다. 부형제와 인슐린을 투여할 때 함께 혼합하고 혼합잔류시간을 최소화하는 장치도 설명된다.

대표도 - 도9



(72) 발명자

리, 밍

미합중국 뉴욕10598 요크타운 하이츠 히커리 스트리트 2979

월슨, 브라이언, 알.

미합중국 뉴욕 10509 브류스터 캐리지 힐 로드 12

(56) 선행기술조사문헌

JP2011500581 A

JP63179831 A

KR1020110137815 A

KR1020120006991 A\*

US20090280532 A1

US20100151435 A1

W01999034821 A1

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(30) 우선권주장

61/624,844 2012년04월16일 미국(US)

61/704,066 2012년09월21일 미국(US)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

주사가능한 인슐린 제형이고,

상기 인슐린 제형은

아연의 존재하에서 육량체를 형성하는 인슐린 단량체, 및

아연;

상기 아연을 킬레이트화하여 인슐린 단량체 및 이량체가 해리된 상태로 유지되도록, 에틸렌디아민 테트라아세트산 (ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA), EGTA, 알긴산, 알파리포산, 디메르캅토숙신산(DMSA), CDTA(1,2-디아미노사이클로헥산테트라아세트산), 및 시트르산 삼나트륨(TSC)으로 이루어진 군에서 선택된 아연 킬레이터의 유효량;

상기 해리된 인슐린 단량체 및 이량체를 안정화시키는 용해/안정화용 이산 및 다산의 유효량; 및

하나 또는 하나 이상의 마그네슘 화합물이 존재하지 않는 제형과 주사부위의 불편함을 비교하여 주사부위의 불편함을 감소할 수 있도록, 0.1 내지 10 mg/ml의 하나 또는 하나 이상의 마그네슘 염의 유효량을 포함하는 약학적으로 수용가능한 부형제;를 포함하는 것을 특징으로 하는 인슐린 제형.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 인슐린은 인간 재조합 인슐린인 것을 특징으로 하는 인슐린 제형.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 인슐린은 인슐린 유사체인 것을 특징으로 하는 인슐린 제형.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 인슐린 농도는 100, 200, 400 또는 500U/mL인 것을 특징으로 하는 인슐린 제형.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 하나 또는 하나 이상의 마그네슘 염은 무기마그네슘 염, 유기마그네슘 염, 및 이들의 조합인 것을 특징으로 하는 인슐린 제형.

#### 청구항 6

제5항에 있어서,

상기 무기마그네슘 염은 수산화마그네슘( $Mg(OH)_2$ ), 황산마그네슘( $Mg(SO_4)_2$ ), 염화마그네슘( $MgCl_2$ ), 브롬마그네슘( $MgBr_2$ ), 및 요오드마그네슘( $MgI_2$ )을 포함하는, 마그네슘할로겐화물, 마그네슘인산염, 황산마그네슘, 산화마그네슘( $MgO_2$ ), 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 인슐린 제형.

#### 청구항 7

제5항에 있어서,

상기 유기마그네슘 염은 마그네슘EDTA, 마그네슘 락테이트, 마그네슘 아스파라테이트, 마그네슘 아세테이트, 마그네슘 카보네이트( $\text{Mg}(\text{CO}_3)_2$ ), 시트르산 마그네슘 및 마그네슘 글루코네이트로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 인슐린 제형.

#### 청구항 8

제1항에 있어서,

상기 하나 또는 하나 이상의 마그네슘 염은,  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ , 마그네슘 EDTA 또는 그 조합인 것을 특징으로 하는 인슐린 제형.

#### 청구항 9

제1항에 있어서,

상기 하나 또는 하나 이상의 마그네슘 화합물의 농도는 0.1 내지 10 mg/ml인 것을 특징으로 하는 인슐린 제형.

#### 청구항 10

제1항에 있어서,

상기 인슐린 제형은 0.2 내지 0.3mg/ml의  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ , 1.7 내지 2.0mg/ml의 마그네슘EDTA, 0.4 내지 0.5mg/ml의 황산마그네슘, 또는 이들의 조합인 것을 특징으로 하는 인슐린 제형.

#### 청구항 11

제1항에 있어서,

상기 용해/안정화제는 아세트산, 아스코르빈산, 시트르산, 글루타민 산, 아스파르트산, 숙신산, 푸마르산, 말레산, 아디프산 및 이들의 염으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 인슐린 제형.

#### 청구항 12

제1항에 있어서,

상기 용해/안정화제는 시트르 이온을 형성하고, pH는 7인 것을 특징으로 하는 인슐린 제형.

#### 청구항 13

제11항에 있어서,

상기 용해/안정화제는, 시트르산 또는 시트르산나트륨인 것을 특징으로 하는 인슐린 제형.

#### 청구항 14

제11항에 있어서,

상기 용해/안정화제는  $2.0 \times 10^{-4} \text{ M}$  내지  $4.5 \times 10^{-3} \text{ M}$  범위의 시트르산 또는 시트르산나트륨 것을 특징으로 하는 인슐린 제형.

#### 청구항 15

제1항에 있어서,

상기 용해/안정화제는  $7 \times 10^{-3} \text{ M}$  내지  $2 \times 10^{-2} \text{ M}$ 의 범위에 있는 시트르산 나트륨인 것을 특징으로 하는 인슐린 제형.

#### 청구항 16

제1항에 있어서,

상기 용해/안정화제는  $9.37 \times 10^{-3} \text{ M}$  또는  $1.4 \times 10^{-2} \text{ M}$ 에 있는 시트르산 나트륨인 것을 특징으로 하는 인슐린 제형.

#### 청구항 17

제1항에 있어서,

염화칼슘을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 인슐린 제형.

#### 청구항 18

제1항에 있어서,

글리세린 및 m-크레졸을 더 포함한 것을 특징으로 하는 인슐린 제형.

#### 청구항 19

제1항에 있어서,

상기 킬레이트화제는 EDTA 나트륨인 것을 특징으로 하는 인슐린 제형.

#### 청구항 20

인슐린 제형이고, 이 인슐린 제형은 7.0pH에서, 100 U/ml의 인간 재조합 인슐린, 1.5 mg/ml의 무수시트르산, 1.5 mg/ml의 EDTA나트륨, 18 mg/ml의 글리세린, 0.481 mg/ml의  $\text{MgSO}_4$ , 및 3.0 mg/ml의 m-크레졸을 포함하는 것을 특징으로 하는 인슐린 제형.

#### 청구항 21

인슐린 제형이고, 이 인슐린 제형은 400 U/ml의 인간 재조합 인슐린, 3.6 mg/ml의 EDTA나트륨, 1.8 mg/ml의 시트르산삼나트륨, 2.0 mg/ml의 m-크레졸, 16 mg/ml의 글리세린, 12.12 mg/ml의 인슐린(400U/mM) 및 0.481mg/ml의  $\text{MgSO}_4$ 을 포함하는 것을 특징으로 하는 인슐린 제형.

#### 청구항 22

삭제

#### 청구항 23

삭제

#### 청구항 24

제1항에 있어서,

상기 아연 킬레이터는 이나트륨EDTA, 칼슘이나트륨EDTA 또는 이들의 조합인 것을 특징으로 하는 인슐린 제형.

#### 청구항 25

제6항에 있어서,

상기 무기마그네슘 염은 황산마그네슘( $\text{Mg}(\text{SO}_4)_2$ )인 것을 특징으로 하는 인슐린 제형.

#### 청구항 26

제1항에 있어서,

상기 하나 또는 하나 이상의 마그네슘 화합물의 농도는, 0.2 내지 2 mg/ml인 것을 특징으로 하는 인슐린 제형.

**발명의 설명**

**기술 분야**

- [0001] 관련 출원의 상호 참조
- [0002] 본 출원은 2012. 9. 21 출원한 미국 임시출원 번호 No. 61/704,066, 2012. 4. 16 출원한 미국 임시출원 번호 61/624,844, 및 2013. 3. 14 출원한 미국 실용특허출원 번호 13/836,806의 이익을 청구하고, 여기에서는 이들을 완전히 전체로 통합된다.

[0003] 본 발명은 주사가 가능한 초속 효형 약물전달 인슐린 제형의 분야에 속하고, 그 들을 사용하는 방법 및 주사통증의 감소에 관한 것이다.

## 배경 기술

- [0004] 당뇨병 개관
- [0005] 포도당은 인간이 에너지를 생산하고 생명을 유지하기 위하여 신체의 모든 세포들이 사용하는 단순한 당이다.
- [0006] 인간은 생명을 유지하기 위하여 항상 혈액내에 최소한의 포도당 농도를 필요로 한다. 신체가 혈당을 생산하는 일차적인 방식은 음식물 소화에 의하는 것이다. 사람이 음식물 소화에서 이러한 포도당을 얻지 않을 때에는, 포도당은 세포조직안에 저장된 것으로부터 생산된다. 신체의 포도당 농도는 인슐린에 의해 조절된다. 인슐린은 췌장에서 자연적으로 분비되는 펩티드 호르몬이다. 인슐린은 포도당의 신체 세포에의 유입을 도와서 생체 에너지를 제공한다.
- [0007] 건강한 인간이 식사를 시작하면, 췌장은 제1기 인슐린 분비라고 하는 인슐린의 자연 스파이크(spike)를 분비한다. 음식물 소화로부터 포도당의 혈액내 유입을 진행시키기 위하여 충분한 인슐린을 제공하는 것 외에, 제1기 인슐린 분비는 음식물 소화가 일어나는 동안에 포도당 생산을 중지하기 위한 신호로서 간에 작용한다. 간은 포도당을 생산하지않고 소화로부터 포도당 유입을 진행하는데 충분한 추가적인 인슐린이 있기 때문에 건강한 사람들의 혈당치는 상대적으로 일정하게 유지되고 그 사람들의 혈당치는 높지 않게 된다.
- [0008] 당뇨병은 비정상적으로 높은 혈당치와 부적합한 인슐린 수치에 의해 특징되는 질병이다. 당뇨병에는 2가지 타입, 제1형 및 제2형이 있다. 제1형 당뇨병에 있어서는, 신체는 인슐린을 생산하지 않는다. 제2형 당뇨병의 초기 단계에서는, 췌장이 인슐린을 생산하지 않지만, 신체도 적시에 인슐린을 생산하지도 않고 신체의 세포는 인슐린을 무시한다(인슐린 저항으로 알려진 조건이다).
- [0009] 다른 징후가 있기전에도, 상기 제2형 당뇨병의 첫번째 효과중 하나는 음식물에서 유발된 제1기 인슐린 분비의 손실이다. 제1기 인슐린 분비가 없으면, 간은 포도당 생산 중지 신호를 수신하지 않는다. 그 결과, 간은 신체가 음식물 소화를 통하여 새로운 포도당을 생산하기 시작할 때 포도당을 계속 생산하게 된다. 그 결과, 당뇨병 환자의 포도당 수치는 식사후 너무 높아져 고혈당으로 알려진 조건으로 된다. 고혈당은 포도당이 비자연적으로 혈중내 어떤 단백질에 부착되는 것을 야기하여 단백질이 작은 혈액 용기들의 집합체를 유지하는 정상적인 기능을 수행하는 단백질의 능력을 방해하게 된다. 고혈당이 매 식사후 마다 발생함에 따라 상기 작은 혈액 용기는 결국에는 파괴되고 누설된다. 고혈당의 장기간 역효과는 실명, 콩팥기능 소실, 신경 손상 및 감각 손실, 잠재적으로 사지 절단이 요구되는 말초 순환불량을 포함한다.
- [0010] 식사 후 2 내지 3시간 사이에 조치되지 않은 당뇨병성 혈당은 상승하여 췌장은 과도하게 많은 량의 인슐린을 분비하는 신호를 수신한다. 제2형 당뇨병의 초기 환자에서는, 췌장은 여전히 반응하고 많은 량의 인슐린을 분비할 수 있다. 그러나, 이러한 현상은 소화가 거의 끝나고 혈당치가 떨어지기 시작할 때 일어난다. 이와 같은 과도하게 많은 량의 인슐린은 해로운 2가지 효과를 가진다. 하나는 이미 절충된 췌장에 부적절하게 과도한 요구를 가하고, 이는 췌장의 급속한 악화를 유발하고 궁극적으로는 췌장이 인슐린을 생산할 수 없도록 한다. 둘째, 식사후 너무 많은 인슐린이 체중 증가를 유발하고, 이는 질병 조건을 추가로 악화시킨다.

[0011] 당뇨병에 대한 현재의 치료 및 그 한계

[0012] 제1형 당뇨병 환자들은 인슐린을 전혀 생산하지 않으므로, 제1형 당뇨병의 일차적 치료는 매일 집중 인슐린 요법이다. 제2형 당뇨병의 치료는 전형적으로 다이어트 및 운동의 관리로 시작한다. 짧은 시간동안의 다이어트와 운동을 통한 치료는 도움이 되지만, 다이어트와 운동만으로는 제2형 당뇨병 환자의 대부분에게는 유효한 장기간

해결책은 아니다. 다이어트와 운동이 더 이상 충분하지 않을 때, 치료는 다양한 비-인슐린 경구 투약으로 시작된다. 이러한 경구 투약은 췌장에 의해 생산되는 인슐린 양을 증가시키고, 인슐린-민감 세포의 감도를 증가시키고, 간에서의 포도당 생산량을 감소시키는 작용을 하거나 이들 메카니즘의 몇몇 조합에 의해 작용한다. 이러한 치료들에는 질병을 효과적으로 관리하는 능력에 있어서 한계가 있고, 일반적으로 체중증가 및 고혈당과 같은 심각한 부작용을 가지고 있다. 비-인슐린 치료의 한계 때문에, 많은 제2형 당뇨병 환자들은 시간이 경과함에 따라 악화되고 결국에는 그들의 대사를 지원하기 위하여 인슐린 요법을 필요로 한다.

[0013] 환자의 인슐린 저항이 진행함에 따라, 저 포도당 수치에 점차 더 많은 인슐린 투여가 요구된다. U-500 (단위 ml당 500 유닛)까지 농축된 인슐린은 이들 환자에게 적용가능하지만, 늦은 흡수 형태로 인하여 기저 사용에 한정되고 있다.

[0014] 인슐린 요법은 당뇨병을 치료하기 위하여 80년 이상동안 사용되어 오고 있다. 이 인슐린 요법은 통상 매일 수회의 인슐린 주사를 투여하는 것을 포함한다. 이러한 주사는 매일 1 내지 2회의 지속형 기초 주사와, 매 식사 때마다 속효형 인슐린의 주사를 투여하는 것을 포함한다. 이러한 치료 요법은 효과적인 것으로 인정되지만, 한계를 가지고 있다. 첫째, 환자들은 불편함과 주사바늘의 고통때문에 인슐린을 주사하는 것을 싫어한다. 그 결과 환자들은 처방된 치료요법에 적절하게 따르지 않는 경향이 있고, 종종 부적절하게 투약한다.

[0015] 더 중요한 것은, 적절하게 투여되는 경우에도 인슐린 주사는 자연적인 시간-작용 프로파일(profile)을 모사(replicate)하지 않는다. 특히, 당뇨병이 없는 사람에서 제1기 인슐린 분비의 자연적인 스파이크(spike)는 식사에 의한 혈당안으로 진입되는 혈중 인슐린 수치 증가를 초래한다. 대조적으로, 주사된 인슐린은 혈액안으로 서서히 진입하여 정상인의 인슐린의 주사후 80 내지 100분 이내에 최대 인슐린 수치가 발생한다.

[0016] 잠재적 해결책은 식사 직후에 당뇨병 환자의 정맥에 인슐린을 직접 주사하는 것이다. 정맥내 주사에 관한 연구에서, 환자들은 식사 후 3 내지 6시간 동안 그들의 혈당을 더 잘 조절할 수 있음을 보여주었다. 그러나 여러가지 의학적 이유로 인하여, 식사전 정맥내 인슐린 주사는 실용적인 요법이 아니다.

[0017] 인슐린치료에 있어서 중요한 개선 사항 중 하나는 HUMALOG®(인슐린 리스프로), NOVOLOG®(인슐린 아스파르트), 및 APIDRA®(인슐린 글루리신)과 같은, 1990년대의 초속 효형 인슐린 유사체의 도입이었다. 그러나 상기 초속 효형 인슐린 유사체로써도, 최고 인슐린 수치는 전형적으로 주사후 50 내지 70분 이내에 일어난다. 상기 초속 효형 인슐린 유사체가 제1기 인슐린 분비를 적절히 모방하지 않기 때문에, 인슐린 요법을 사용한 당뇨병은 식사 초기에 부적절한 인슐린 수치가 존재하게 하고, 식사 사이에는 너무 많은 인슐린이 존재하게 된다. 이러한 인슐린 전달의 지연은 식사 개시후 초기에 저혈당을 유발할 수 있다. 더욱이, 식사 사이에 과도한 인슐린은 저혈당 증으로 알려진 비정상적으로 낮은 혈당 수치를 초래할 수 있다. 저혈당은 정신적 명료도의 손실, 착란, 증가된 심박수, 허기, 실신을 초래할 수 있다. 아주 낮은 혈당 수치에서, 저혈당은 의식의 손실, 혼수 및 사망에 이르게 할 수 있다. 미국 당뇨병 협회(American Diabetes Association, ADA)에 따르면, 인슐린-사용 당뇨병 환자는 매년 평균 1.2건의 심각한 저혈당 사례를 가지고, 그 사례중 많은 경우 환자들이 응급실을 찾게 된다.

[0018] 인슐린 작용의 급속성은 인슐린이 얼마나 신속하게 흡수되는지에 달려있다. 통상의 인간 인슐린이 100IU/ml로 피하에 주사될 때, 그 제형은 주로 크기나 전하 때문에 쉽게 흡수되지 않는 육량체(거의 36kDa)로 구성된다. 분자를 안정화시키는 2개의 아연 원자들이 상기 육량체 내에 위치한다. 후주사(post injection), 농도 유도 동적 평형은, 상기 육량체가 이합체(dimer)안으로 그리고나서 단량체(약 6kDa)안으로 해리되게 하는 피하조직에 발생한다. 연혁적으로, 이들 통상의 인간 인슐린 제형들은 최대 혈장 농도치에 도달하기 위하여 약 120분이 요구된다.

[0019] 작용의 급속 시작을 가진 인슐린 제형, 예를 들면 VIAJECT®,들이 미국 특허 No. 7,279,457 및 미국 특허출원 공개 2007/0235365, 2008/0085298, 2008/90753, and 2008/0096800, and Steiner, et al., *Diabetologia*, 51:1602-1606 (2008)에 개시되어 있다. 상기 초속 효형 인슐린 제형들은 인슐린 유사체 보다 훨씬 급속한 약동력학적 형태를 제공함으로써 환자가 주사후 최초 시간에 고혈당이 되는 것을 방지하고 그후 2 내지 4시간 후에는 고혈당이 되게 하는 인슐린 제형을 만들도록 디자인되었다.

[0020] VIAJECT®의 급속 시작은 2개의 주요 부형제, 인슐린 육량체를, 이나트륨EDTA 및/또는 인슐린 육량체를 단량체 또는 이량체안으로 급속히 해리시키는 칼슘이나트륨EDTA와 같은 아연 킬레이터, 및 해리된 단량체와 이량체를 혈액내 흡수되기 전에 D나정화시키는 스트르산과 같은 용해/안정화제의 포함에 기인한다(Pohl et al., *J. Diabetes Sci. and Technology*, 2012. 6(4)755-763).

[0021] 불행히도, 이러한 제품으로 초기 치료 시도는 주사부위 통증을 보여주었다. 칼슘, 염화칼슘 및/또는 EDTA 칼슘



염과 같이, 주사부위 통증을 감소시키고, 통증은 주사부위에 인접한 곳의 세포외액에서 칼슘의 제거때문에 발생한다는 이론을 지지한다. 그러나, 칼슘의 추가는 약동력을 변경하였다.

- [0022] 농축된 인슐린 제형들이 동일한 개념으로 개발되었으나, 이들 제형은 초 급속 작용과 어떤 연장된 작용시간을 결합한 독특한 형태를 가진다. 그 것들은 특히 식사 인슐린과 기초 인슐린 주사를 필요로 하는 인슐린 내성 환자들에게 특히 적합하다. 그 흡수형태는 식사 및 중간 작용 인슐린(즉, NPH)의 필요성을 충족시킬 수 있었기 때문에 이 U-400 제형으로써 2개의 주사제들의 필요성이 제거된다. 또, 이들 농축된 인슐린 제형들은 인슐린 저항 환자들용 인슐린 펌프로써 사용될 수 있었다. 감소된 체적은 소형 펌프 또는 인공 췌장용으로 개발될 이중 호르몬 펌프의 향후 디자인을 유도할 수 있다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0023] 본 발명의 목적은, 주사부위의 통증이 감소된 초속 효형 주사가능한 인슐린 조성물의 조성을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0024] 본 발명의 다른 목적은 인슐린 저항 당뇨병 환자를 치료하기 위하여, 피하 주사 부위에서 흡수율을 증가시킴으로써 주사가능한 인슐린 조성물의 약동학 및 약역학을 조절하는 특정농도의 인슐린 제형을 제공하는 것에 있다.

### 과제의 해결 수단

- [0025] 주사 부위의 개선된 상태(견딜수 있음)를 가지고, U-100, 초급속 유사체 및 U-400 초속 효형 주사 인슐린 제형의 약동학 및 약역학을 조절하기 위한 조성물 및 방법이 개발되었다. 상기 제형은 인간의 인슐린, 에틸렌디아민 테트라아세트산(ethylenediamine tetraacetic acid, "EDTA")과 같은 아연 킬레이트, 시트르산 및/또는 시트르산 나트륨과 같은 용해/안정화제, 하나 또는 그 이상의 마그네슘 화합물 및 선택적으로 추가의 부형제로 조합된 인슐린을 포함한다.
- [0026] 하나의 실시예에서, 상기 제형은 재조합된 인간 인슐린, EDTA 나트륨, 시트르산 및/또는 시트르산 나트륨과 같은 용해/안정화제, EDTA 마그네슘,  $Mg(OH)_2$ ,  $MgSO_4$ , 또는 이들의 조합과 같은 하나 또는 하나 이상의 마그네슘 화합물을 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 마그네슘 화합물은  $MgSO_4$ 이다. 마그네슘 화합물의 농도는 약 0.1에서 약 10mg/ml 이고, 바람직하게는 약 0.1에서 약 5mg/ml 이고, 더욱 바람직하게는 약 0.1에서 약 2mg/ml 이고, 가장 바람직하게는 약 0.2에서 약 2mg/ml 이다. 몇몇 실시예에서는, 상기 제형은 약 0.2-0.3 mg/ml  $Mg(OH)_2$  (예컨대, 0.282), 약 1.7-2.0 EDTA 마그네슘(예컨대, 1.89), 및/또는 약 0.4-0.5 황산 마그네슘 (예컨대, 0.481)을 포함한다. 안정성은 m-크레졸 및 시트르산염 이온 농도를 최적화함으로써 강화된다. 상기 제형으로 된 인슐린의 농도는 100-500units/mL에서 변화한다.
- [0027] 바람직한 실시예에서, 상기 제형들은 피하 주사에의해 투여된다.

### 발명의 효과

- [0028] 본 발명에 따르면, 주사부위의 통증이 감소된 초속 효형 주사가능한 인슐린 조성물의 얻는다.
- [0029] 인슐린 저항 당뇨병 환자를 치료하기 위하여, 피하 주사 부위에서 흡수율을 증가시킴으로써 주사가능한 인슐린 조성물의 약동학 및 약역학을 조절할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0030] 도 1은 노출된 표면전하를 보여주고 전하를 차폐하기에 적합한 크기를 가진 분자("용해 및 킬레이트제")로써 중첩된 인슐린의 3차원 구조이다.
- 도 2 및 도 3은 Mg EDTA 인슐린제형 BIOD 123 및 125의 투여후 시간 함수(도 2는 0-60분: 도 2는 0-480분)에 따른 평균 인슐린 농도(mU/L)를 HUMALOG®와 비교한 그래프이다.



도 4 및 5는 HUMALOG®와 비교한, Mg EDTA 인슐린제형 BIOD 123 및 125의 시간 함수에 따른 평균 GIR(mg/kg/분)의 그래프이다.

도 6은 당뇨병의 miniature swine에서, 시간에 대한 평균 기저 감한 인슐린(실선) 및 포도당(점선)을 나타낸 도면이다. BIOD-530 (검은색) 및 Lilly U-500(회색),  $\pm$ SEM.

도 7은 당뇨병의 miniature swine에서, BIOD-530 (어두운 회색), BIOD-531(밝은 회색)와 HUMALOG®(검은색)의 평균 기저 감한 인슐린(실선) 및 포도당 감소(대시 선)의 그래프이다.  $n=9$ ,  $\pm$ SEM.

도 8은 당뇨병의 miniature swine에서, BIOD-530 (어두운 회색), BIOD-532(어두운 회색), BIOD-533(밝은 회색)의 시간에 대한 평균 기저 감한 인슐린 농도의 그래프이다.  $n=9$ ,  $\pm$ SEM.

도 9는 당뇨병의 miniature swine에서, 다른 인슐린 제형의 투여에 이어, 시간에 대한 평균 기저 감한 인슐린(실선)과 포도당(점선)을 보여준다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 이하에 개시된 인슐린 제형은 식사 전 즉시 또는 식사 끝에 투여된다. 상기 제형은 최근 시중에서 판매되는 급속-작용 인슐린 또는 인슐린 유사체보다 더 빨리 혈액속에 흡수되게 고안된다. 상기 인슐린 제형의 중요한 특징 중의 하나는 인슐린의 육량체 형태에서 단량체 및/또는 이량체의 인슐린 형태로 용해 또는 분해하고 주사 후 육량체의 형태로 재결합을 방지 또는 최소화함으로써 주사후 혈류속으로 급속 흡수를 촉진하는 아연 킬레이터가 포함되는 것이다.
- [0032] 단량체 또는 이량체의 형태를 선호함으로써 이 인슐린 제형은, 인슐린이 요구되는 생물학적 효과를 생성하기 위하여 체내로 흡수될 수 있기 전에 인간의 신체가 인슐린을 단일의 분자 형태로 요구함에 따라, 혈액속으로 더 빠른 인슐린 수송을 허용한다. 주사용으로 판매되는 대부분의 인간 인슐린은 육량체 형태로 되어 있다. 이것은, 인슐린 육량체가 이량체를 형성하고나서 단량체를 형성하기 위하여 먼저 용해되어야 하므로, 신체가 흡수하는 것을 더 어렵게 한다.
- [0033] EDTA 이나트륨과 같은 아연 킬레이터의 농도와, 혈액에서 포도당 흡수 속도 사이의시스템적인 관계가 존재한다는 것을 발견하였다. EDTA 농도 변화는 초속 효형 인슐린 제형의 약동학 및 약역학을 변경한다.
- [0034] 이론에 구속되지 않지만, EDTA-시트르산-인슐린 제형의 주사 부위 불편감에 대한 가능한 설명은 EDTA 이나트륨에 의한 세포외 칼슘의 킬레이트화이다. 칼슘은 약 1mM의 농도에서 세포의 유체속에 있고, 흥분수축결합, 근육기능, 신경전달물질 분비, 및 세포대사를 위해 필수적이다. 국소 칼슘의 손실은 근육 경직, 근원섬유 떨림, 이상중세, 근육통증이 수반되는, 간헐성 긴장 근육 수축에 의해 표시되는 장애인 근육 경직을 야기할 수 있다.
- [0035] EDTA 이나트륨을 EDTA의 칼슘 킬레이트화된 형태(예를 들면 칼슘 EDTA 이나트륨)로 치환하면, EDTA 이나트륨의 동일한 양과 비교하여 주사 부위 통증을 줄일 수 있다. 그러나, 칼슘 이나트륨 EDTA는 생체내 흡수율을 약간 지연시킨다. 그러므로, 마그네슘은 과도한 EDTA를 킬레이트화하는 데 칼슘 대신에 사용되었다. 마그네슘을 상기한 제형에 첨가하는 것은 주사 부위 견딜수 있음을 증가시키고, 인슐린 흡수율을 변경하지 않는다.
- [0036] 일 실시예에서, 상기 제형은 재조합된 인간의 인슐린, EDTA 이나트륨, 시트르산 및/또는 시트르산 나트륨과 같은 용해/안정화제, 및 마그네슘 EDTA,  $Mg(OH)_2$ ,  $MgSO_4$ , 또는 이들의 조합과 같은 하나 또는 하나 이상의 마그네슘 화합물을 포함한다. 특히, 일 실시예에서, 마그네슘 화합물은  $MgSO_4$  이다. 마그네슘 화합물의 농도는 약 0.1에서 약 10mg/ml이고, 바람직하게는 약 0.1에서 약 5 mg/ml이며, 더욱 바람직하게는 약 0.1에서 2mg/ml이며, 가장 바람직하게는 0.2에서 약 2mg/ml이다. 몇몇 실시예에서는, 상기 제형은 약 0.2-0.3 mg/ml  $Mg(OH)_2$  (예를 들면, 0.282),  $\circ$ 약 1.7-2.0 마그네슘 EDTA (예를 들면, 1.89), 및/또는 약 0.4-0.5 황산 마그네슘 (예를 들면, 0.481)을 포함한다. 안정성은 m-크레졸 및 시트르산염 이온 농도를 최적화함으로써 강화된다. 상기 제형으로 된 인슐린의 농도는 100-500units/mL에서 변화한다.
- [0037] I. 정의
- [0038] 여기서, "인슐린"은, 자연적 소스에서 고립되거나 유전적으로 변경된 미생물에 의해 만들어지는 것이든, 인간의 췌장에서 분비되는 펩티드 호르몬이다. 여기서, "비인간 인슐린"은 인간의 인슐린과 같지만 돼지나 소와 같은 동물에서 비롯된다.
- [0039] 여기서, "인슐린 유사체"는 췌장에서 분비되는 인슐린과는 다른, 변경된 인슐린이지만, 천연 인슐린로서 동일한

작용을 수행하기 위하여 인간에 유용하다. 근간을 이루는 DNA의 유전공학을 통하여, 인슐린의 아미노산 서열은 그의 ADME(흡수, 분배, 대사, 및 배설)의 특성을 변경하기 위하여 변경될 수 있다. 실시예들은 인슐린 리스프로(insulin lispro), 인슐린 글라진(insulin glargine), 인슐린 아스파르트(insulin aspart), 인슐린 디테머(insulin detemir)를 포함한다. 인슐린은 에킨대 아세틸화에 의해 화학적으로 변경될 수 있다. 여기서 사용되는 바와 같이, 인간 인슐린 유사체는 인간 인슐린으로서 동일한 생물학적 작용을 수행할 수 있는 변경된 인간 인슐린이다.

[0040] "킬레이터(chelator)" 또는 "킬레이트제(chelating agent)"란 아연 이온과 하나 또는 하나 이상의 결합을 이루는 능력을 가진 화학적 화합물을 의미한다. 상기 아연 이온과의 결합은 전형적으로 이온 또는 배위결합이다. 상기 킬레이터는 무기 또는 유기 화합물일 수 있다. 킬레이트 합성물(chelate complex)은 금속이온이 킬레이트제의 둘 또는 그 이상의 원자와 결합된 합성물이다.

[0041] "가용화제(solubilizing agent)"는 용매에의 물질의 가용성, 에킨대 수용액내에 인슐린의 가용성을 증가시키는 화합물이다. 가용화제의 예들은, 표면활성제(TWEENS®); 에탄올과 같은 용매; 옥시에틸렌 모노스테레이트와 같은 미셀(micelle) 형성 화합물; 및 pH-조절제를 포함한다.

[0042] "용해/안정화제(dissolution/stabilization agent)"는, 인슐린 및 EDTA에 첨가될 때, 아래의 실시예에서 설명하는 바와 같이 상피세포 트랜스웰 분석을 사용하여 측정한다, 동일한 pH에서 HCl 및 EDTA에 대한 인슐린의 수송 및 흡수를 강화하는, 산 또는 염이다. HCl은 용해제는 아니지만 용해에 도움이 될 수 있다. 시트르산은 이 분석에서 측정될 때 용해제이다.

[0043] "무기 마그네슘 화합물" 또는 "무기 마그네슘 염"은 음이온이 하나 또는 하나 이상의 탄소 원자를 포함하지 않는 화합물을 말한다.

[0044] "유기 마그네슘 화합물" 또는 "유기 마그네슘 염"은 음이온이 하나 또는 하나 이상의 탄소 원자를 포함하는 화합물을 말한다.

[0045] "부형제(excipient)"는 킬레이터 또는 용해제 이외의 비활성 물질로서, 인슐린의 캐리어로서 사용되거나 물질이 제조되는 공정을 보조하기 위하여 사용되는 물질이다. 그러한 경우에, 상기 비활성 물질은 용해되거나 부형제와 혼합된다.

[0046] "생리적 pH(physiological pH)"는 6.8와 7.6 사이, 바람직하게는 7과 7.5, 가장 바람직하게는 약 7.4이다.

[0047] 여기서, "Cmax"는 약물 투여후 관찰되는 그 약물의 최대 또는 피크 농도이다.

[0048] "Tmax"는 최대 농도(Cmax)가 일어날 때의 시간이다.  $1/2T_{max}$ 는 혈액내 인슐린 최대 농도의  $1/2(1/2 C_{max})$ 일 때의 시간이다. 이는 T50%로 표현될 수 있다.

## [0049] II. 제형(Formulations)

[0050] 제형은 인슐린 또는 인슐린 유사체, 아연 킬레이터 및 용해/안정화제, 마그네슘 및 선택적으로 하나 또는 하나 이상의 다른 부형제를 포함한다.

[0051] 바람직한 실시예에서, 상기 제형은 피하투여에 적합하고, 피하 조직에 빠르게 흡수된다. 용해/안정화제 및 킬레이트제(chelator)의 선택, 상기 용해/안정화제와 킬레이트제의 농도 및 제형이 조정될 pH는 모두 시스템의 효과에 중대한 영향을 미친다. 많은 조합들이 효과를 가지지만, 바람직한 실시예는 안전성, 편안함, 안정성, 조절 프로파일(profile) 및 성능을 포함하는 이유를 고려하여 선택된다.

[0052] 바람직한 실시예에서, 제형 성분들중 적어도 하나는 인슐린상의 전하를 마스킹하기 위해 선택된다. 이것은 인슐린의 막이동을 촉진하여 작용 개시와 인슐린의 생체이용율을 증가시킨다. 상기 성분들은 또한 수성 매체안에서 급속히 용해되는 조성물을 형성하기 위하여 선택된다. 바람직하게는, 인슐린은 신속하게 혈장안으로 흡수되고 수송되어 초속 작용 개시(바람직하게는 투여후 약 5분이내에 시작하고 투여후 약 15 내지 30분에서 피크로 된다)를 이루어 낸다.

[0053] EDTA와 같은 킬레이트제는 인슐린내의 아연을 킬레이트화하여 인슐린에서 아연을 제거한다. 이 것은 욕량체 인슐린이 그 이량체 및 단량체 형태로 분리되게 하고, 주사후 욕량체로 변환을 지연시킨다. 이들 두가지 형태는 농도-유도 평형상태로 존재하므로, 단량체가 흡수될 때 더 많은 단량체가 생성된다. 그리하고 인슐린 단량체들이 피하 조직을 통하여 흡수될 때, 추가적인 이량체들은 더 많은 단량체를 형성하기 위하여 숨겨진다. 상기 단량체 형태는 욕량체 형태의 분자량의 1/6이하의 분자량을 가지고, 그 결과 인슐린 흡수량 및 속도를 현저히 증

가시킨다. 킬레이트제(예컨대, EDTA) 및/또는 용해/안정화제(시트르산) 수소가 인슐린과 결합할 정도로, 인슐린 상의 전하를 마스킹하여 인슐린의 막수송을 촉진하여 그 결과 작용 개시 및 인슐린의 생체이용률을 증가시킨다.

[0054] 마그네슘 염은 약동학 프로파일을 중요하지 않게 변경하지 않고, 주사 부위의 통증을 감소시키는 것으로 밝혀졌다.

[0055] 바람직한 실시예에서, M-크레졸은 항균 특성 및 수명의 향상을 위해 첨가된다.

## [0056] 인슐린

[0057] 인슐린 또는 인슐린 유사체는 이 제형에 사용될 수 있다. 바람직하게는, 인슐린은 재조합 인간 인슐린이다. 재조합 인간 인슐린은 많은 소스에서 이용할 수 있다.

[0058] 상기 인슐린의 투여량은 그의 생체이용률과 치료될 환자에게 달려 있다. 인슐린은 대개 1.5-200 IU의 범위내로 포함되고, 개인의 인슐린 저항성의 수준에 의존한다. 전형적으로 인슐린은 100 IU 바이알로 제공된다.

[0059] 200, 400 또는 500 U/ml의 다른 프리젠 테이션이 설명된다 하더라도 일반적으로, 인슐린은 100 IU 바이알로 제공된다. 가장 바람직한 실시예에서, 주사 제형은 인슐린 100U를 포함하는 1 ml의 부피이다. 다른 실시예는 높은 농도의 인슐린 제형, 가장 바람직 U-400 등이 있다.

[0060] 당뇨병 환자에게 인슐린의 상용 가능한 여러가지 다른 유형이 있다. 이러한 인슐린 유형은 (1)인슐린이 혈류에 도달하고 혈당 수준의 감소가 시작하는 데 걸리는 시간; (2) 인슐린이 최대 강도에서 작동하는 시간; 및 (3) 인슐린이 혈당에 계속 영향을 미치는 시간에 따라 변한다.

## [0061] 초속 효형 인슐린(Fast Acting Insulin)

[0062] 신속 작용 인슐린은 식사 중 탄수화물의 섭취 유래의 글루코스 응답하도록 의도된다. 초속 효형 인슐린은 1 내지 20 분 이내에 작용을 시작하고, 약 1 시간 후에 피크가 되며, 3-5시간 지속한다. 초속 효형 인슐린은 완전히 전신 순환으로 흡수하기 위해 약 2 시간이 소요된다. 초속 효형 인슐린은 일반 재조합 인간 인슐린(예 : Eli Lilly에 의해 판매되는 HUMULIN®, Novo Nordisk A/S에 의해 판매 NOVALIN®)을 포함하고, 이들은 pH 7에서 등장성 용액에서 투여된다. 인간의 인슐린과는 여러 아미노산에서 다르지만 인간에 생리활성적인 소와 돼지의 인슐린도 초속 효형 인슐린이다.

## [0063] 농축된 인슐린 제제

[0064] 더욱 농축된 형태의 인슐린은 인슐린 저항성 개인들을 위하여 제공된다. 상업적으로 가용한 제형 Humulin R U-500 는 속 효형시간을 가지고, 단지 느린 방출 프로파일 때문에 기초 사용에 적합하다.

## [0065] 속 효형 인슐린(Rapid Acting Insulin)

[0066] 일부 당뇨병 환자는 식사때 급속작용 인슐린을 사용하고, 배경 연속 인슐린을 위하여 속 효형 인슐린을 사용한다. 이 그룹은 변형된 또는 흡수속도를 향상시키기 위해 아미노산의 위치를 변경한 인슐린을 포함한다.

[0067] 현재 판매되고 있는 이용가능한 초속 효형 인슐린 유사체는 세 가지 유형이 있다: 인슐린 lispro (Eli Lilly에 의해 HUMALOG®로 판매되는 라이신- 프로린 인슐린), 인슐린 glulisine(사노피 - 아벤티스에서 APIDRA®으로 판매)과 인슐린 aspart(Novo Nordisk 에 의해 NOVOLOG®로 판매).

## [0068] 중간 작용 인슐린

[0069] 중간 작용 인슐린은 단기작용 인슐린보다 더 긴 수명을 가지지만, 작용을 시작하는 데 느리며 최대 강도에 도달하는 데 시간이 더 걸린다. 중간 작용 인슐린은 통상 주사후 2-4 시간 내에 작용을 시작하고, 4 내지 14시간 사이 어딘가에 피크에 도달하고, 24 시간까지 유효하다. 중간 작용 인슐린의 형태는, NPH (Neutral Protamine Hagedorn)과 LENTE 인슐린을 포함한다. NPH 인슐린은 흡수속도를 늦추는 프로타민을 포함하여, 인슐린이 혈류에 도달하는 데 시간이 더 걸리지만 더 긴 피크와 수명을 가진다. 중간 작용 인슐린은 일일 총 주사수를 줄이기 위하여 중성 pH에서 속효형 인슐린과 결합될 수 있다.

## [0070] 즉시 작용 인슐린과 중간 작용 인슐린의 혼합 :

[0071] 신속 작용 인슐린과 NPH 인슐린의 혼합물은 한 번의 주사에 식후 및 기저 사용에 대한 필요성을 충족하기 위해 상업적으로 사용될 수 있다. 이러한 인슐린 혼합물은 일반 재조합 인슐린 기반(HUMULIN® 70/30 (70 % 인간 인슐린 isophane와 30 % 인간 인슐린, Eli Lilly) 또는 HUMALOG®Mix75/25 (75 % 인슐린 lispro의 프로타민 현탁

액과 25 % 인슐린 lispro 용액) (Eli Lilly)와 같은 유사체 기반일 수 있으며, 100 U ml이다. 이러한 혼합물은, HUMULIN®R (정상 인간 인슐린)로 인슐린 작용의 지속 기간을 연장하기 위하여 프로타민 인슐린 현탁액 (HUMULIN® 또는 HUMALOG®)을 사용하거나, 식사의 필요를 커버하기 위하여 또는 HUMALOG®cmf 사용한다.

[0072] 지속형 인슐린(Long Acting Insulin)

[0073] 지속형 인슐린의 예는 인슐린 글라진(glargine)(상품명 LANTUS®로 판매, , Sanofi Aventis)와 인슐린 디테미어(detemir) (LEVEMIR®, Novo Nordisk A/S)이다. LANTUS®은 보통 피하주사후 4 내지 7 일 사이에 pH 상승에 의해 유도된다. 이것은 미세 석출(microprecipitate)을 생성하여 인슐린 글라진의 용해도를 변화시킨다. 이 미세석출(microprecipitate)은 피하 섬유 내에 서서히 용해되고, 최대 24 시간 동안 포도당 강하 효과를 유지한다. 이는 위치 21에서 아스파라긴 대신에 글리신을 가지고, 2개의 아르긴이 베타 사슬의 카르복시-말단(carboxy-terminus)에 추가됨으로써 인간 인슐린과 다르다.

[0074] 용해/안정화제(Dissolution/Stabilization agents)

[0075] 어떤 다중산들(polyacid)은 인슐린상의 전하를 마스크(mask)하는 것으로 보이고, 도 1에 도시된 바와 같이, 섭취와 수송을 촉진하는 것으로 보인다. 용해/안정화제제로서 유효한 산들은, 전하 마스크제가 아닌 염산에 비하여, 아세트산, 아스코르빈산, 시트르산, 글루타민 산, 아스파르트산, 숙신산, 푸마르산, 말레산 및 지방산을 포함한다.효과적인 산들은 모두 이산들 또는 다중산들이다. 예를 들면, 만약 활성제제가 인슐린이라면, 바람직한 용해/안정화제는 시트르산 및/또는 시트르산 나트륨이다. 염산은 상기 제형중 어느 것과도 결합되어 사용될 수 있지만, 용해/안정화제는 아니다.

[0076] 상기 산들은 직접 또는 염의 형태로, 첨가될 수 있고, 수용액안에 해리된다. 상기 산들의 염은 아세트산 나트륨, 아스코르빈산염, 시트르산염, 글루타민산염, 아스파르트산염, 숙신산염, 푸마르산염, 말레산염, 및 지방산염을 포함한다. 유기산의 염들은 다양한 염기, 금속 수화물, 금속산화물, 금속탄산염, 금속중탄산염, 금속 아민을 포함하지만, 그러나 이들에 한정되지 않는다, 뿐만아니라 염화암모늄, 탄산암모늄 등과 같은 암모늄 염기를 포함한다. 적합한 금속은 일가 및 다가 금속이온을 포함한다. 전형적인 금속 이온에는, 리튬, 나트륨, 칼륨과 같은 1가 금속; 바륨, 마그네슘, 칼슘 및 스트론튬과 같은 2가 금속; 및 알루미늄과 같은 반금속이 포함된다. 다가 금속이온은 카르복실산기 이상을 포함하는 유기산에 바람직할 수 있다. 이 것은 이들 이온들이 하나의 카르복실 산 기이상과 동시에 결합할 수 있기 때문이다.

[0077] 용해/안정화제의 범위는 인슐린 및 EDTA 이나트륨과 결합되어 시트르산의 유효량에 대응한다. 예를 들면  $9.37 \times 10^{-4} \text{ M}$  내지  $9.37 \times 10^{-2} \text{ M}$  범위의 시트르산은 만약 시트르산이 약  $192 \text{ g/mole}$ 의 질량을 가지는 무수 시트르산이면, 약  $0.18 \text{ mg/ml}$  내지 약  $18 \text{ mg/ml}$ 을 가진 것에 대응한다.

[0078] 어떤 실시예에서, 무수 시트르산의 양은,  $1.8 \text{ mg/ml}$  ( $0.9 \text{ mg/ml}$ )의 약 50% 내지  $1.8 \text{ mg/ml}$  ( $9 \text{ mg/ml}$ )의 약 500%, 더욱 바람직하게는  $1.8 \text{ mg/ml}$  ( $1.35 \text{ mg/ml}$ )의 약 50% 내지  $1.8 \text{ mg/ml}$  ( $5.4 \text{ mg/ml}$ )의 약 300%의 범위이다. 바람직한 실시예에서, 무수 시트르산의 양은, 약  $1.8 \text{ mg/ml}$ , 또는 약  $2.7 \text{ mg/ml}$ , 또는 약  $3.6 \text{ mg/ml}$ , 또는 약  $5.4 \text{ mg/ml}$ 일 수 있다. 가장 바람직한 실시예에서, 시트르산의 양은  $2.7 \text{ mg/ml}$ 의 주사가가능한 제형이다. 만약 예를들면 무수 시트르산 또는 시트르산삼나트륨 또는 다른 시트르산이 무수 시트르산 대신에 사용된다.

[0079] 바람직한 용해/안정화제는, 상기 인슐린제형이 생리학적 pH범위에 있을 때, 시트르산나트륨이다.

[0080] 특히 바람직한 실시예에서, 상기 제형은 EDTA이나트륨 및 시트르산의 혼합물을 포함한다. 일반적으로 EDTA이나트륨에 대한 시트르산의 비율은 300:100의 범위, 예를 들면 100:120, 100:100, 200:100, 150:100, 300:200, 및 500:100의 범위에 있다.

[0081] 킬레이트제(Chelators)

[0082] 바람직한 실시예에서, 아연 킬레이트제는 인슐린과 혼합된다. 그 킬레이트제는 이온성 또는 비이온성일 수 있다. 킬레이트제는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), EGTA, 알긴산, 알파리포산, 디메르캡토숙신산(DMSA), CDTA(1,2-디아미노사이클로헥산테트라아세트산), 시트르산 삼나트륨(TSC)이 포함된다. 염산은 pH를 조정하기 위하여 TSC와 결합하여 사용되고, 그 과정에서 용해/안정화제인 시트르산 제형을 생성한다.

[0083] 킬레이트제는 인슐린에서 아연을 포획하고, 그에 따라 용량체의 형태보다 단량체 또는 이량체의 형태를 선호하고 투여 부위(예를 들면, 점막, 지방조직)를 둘러싸는 조직에 의해 인슐린 흡수를 촉진한다. 또, 수소 킬레이트제는 인슐린에 결합할 수 있고, 그로써 전하가 인슐린 단량체를 덮어주는 것을 도와주고 인슐린 단량체의 막수



송을 촉진한다.

- [0084] 바람직한 실시예에서, 킬레이트제는 EDTA이다. 가장 바람직한 실시예에서, 상기 제형은 인슐린, EDTA이나트륨, 염화칼슘 및 시트르산 또는 시트르산나트륨과 같은 용해/안정화제를 포함한다.
- [0085] EDTA의  $2.42 \times 10^{-4} \text{ M}$  내지  $9.68 \times 10^{-2} \text{ M}$  범위는, 만약 EDTA가 약 292g/mole의 분자량을 가진 에틸렌디아민에테트라산이면, 약 0.07 mg/ml 내지 약 28 mg/ml 범위의 중량/체적에 대응한다. EDTA의 농도 감소는 인슐린 흡수율을 낮출수 있고, 인슐린 주사에 대한 포도당 응답을 지연시킬 수 있다. 또한 이러한 농도 증가는 흡수율에서 무시할 수 있는 이익을 제공한다.
- [0086] 바람직한 실시예에서, EDTA 양은, 1.8 mg/ml (0.09 mg/ml)의 약 5% 내지 1.8 mg/ml (9 mg/ml)의 약 500%, 더욱 바람직하게는 1.8 mg/ml (0.27 mg/ml)의 약 15% 내지 1.8 mg/ml (3.6mg/ml)의 약 200%의 범위이다. EDTA의 양은, 0.1 mg/ml, 0.25mg/ml, 1.0mg/ml, 1.8mg/ml, 2.0mg/ml 또는 2.4mg/ml이다.
- [0087] EDTA의 농도 감소는 인슐린 흡수율을 낮출수 있고, 인슐린 주사에 대한 포도당 응답을 지연시킬 수 있다. 바람직한 실시예에서는, 상기 킬레이트제는 바람직하게 2.0mg/ml와 동일하거나 이보다 더 작은 경우 EDTA이나트륨이다. 몇몇 실시예에서, EDTA는 EDTA이나트륨과 EDTA칼슘이나트륨의 조합이다. 예를 들면, 일성시예에서 EDTA는 약 1.8-2.0mg/ml의 EDTA칼슘이나트륨과 조합된 약 0.27-0.3 mg/ml 의 EDTA이나트륨이다. 몇몇 실시예에서는, 상기 EDTA는 약 1.8-2.0mg/ml의 EDTA칼슘이나트륨 또는 EDTA이나트륨 및  $\text{CaCl}_2$  사이에 있다.
- [0088] **마그네슘 화합물**
- [0089] 제형은 하나 이상의 약학적으로 수용가능한 마그네슘 화합물을 포함한다. 위에서 상술한 바와 같이, EDTA는 투여 부위에서 내인성 칼슘 착물로 인해 주사 부위에서 염증을 유발할 수 있다. EDTA칼슘이 포함되면 자극을 개선할 수 있지만, 제형 에 EDTA칼슘의 첨가는 인슐린의 흡수를 느리게 한다. 피하 흡수 속도를 변경 최소화하거나 주사 부위에 자극을 방지하기 위해서, 하나 이상의 마그네슘 화합물은 제형에 혼입된다.
- [0090] 마그네슘 화합물은 무기 및/또는 유기 마그네슘 염이 될 수 있다. 적합한 마그네슘 무기염은 다음을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: 수산화마그네슘( $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ), 황산 마그네슘( $\text{Mg}(\text{SO}_4)$ ), 예컨대 염화마그네슘( $\text{MgCl}_2$ ), 브롬화마그네슘 ( $\text{MgBr}_2$ ), 및 마그네슘, 요오드화마그네슘 할라이드, ( $\text{MgI}_2$ ); 피로인산마그네슘, 황산 마그네슘 수화물, 및 산화 마그네슘( $\text{MgO}_2$ ).
- [0091] 적합한 유기 마그네슘염은 다음을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: EDTA마그네슘, 마그네슘 락테이트, 마그네슘 아스파르트레이트 등의 아미노산 킬레이트에 한정되지 않는다; 아세트산 마그네슘, 탄산마그네슘( $\text{Mg}(\text{CO}_3)_2$ ), 마그네슘, 시트르산마그네슘, 마그네슘 글루코 네이트.
- [0092] 특히 바람직한 실시예에서, 하나 이상의 마그네슘 화합물이, 황산, 또는 이들의 조합 마그네슘 EDTA의  $\text{Mg}(\text{OH})$ 이다. 일 실시예에서, 하나 이상의 마그네슘 화합물은 황산이다.
- [0093] 하나 이상의 마그네슘 화합물의 농도는 0.1 내지 약 5 mg/ml이고, 더욱 바람직하게는 약 0.1 내지 약 2 mg/ml이며, 가장 바람직하게는 약 0.2 내지 2 mg/ml이다. 일부 실시 예에서, 제형은 약 0.2-0.3 mg/ml의  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  (예를 들면, 0.282), 약 1.7-2.0 EDTA마그네슘(예, 1.89), 및/또는 약 0.4-0.5 황산마그네슘(예 0.481)을 포함한다.
- [0094] **부형제(excipients)**
- [0095] 약학적 조성물은, 하나 또는 그 이상의 생리학적으로 수용가능한 캐리어를 사용하는 전통적인 방식으로 제형화될 수 있고, 그 캐리어는 활성의 화합물을 약학적으로 사용될 수 있는 약제로의 처리를 촉진하는 부형제 및 보조제를 포함한다. 약물의 제형은 예를 들면, Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania (1975), 및 Liberman, H. A. and Lachman, L., Eds., Liberman, H. A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, New York, N.Y. (1980)에 논의된다.
- [0096] 바람직한 실시예에서, 하나 또는 그 이상의 가용화제들이 수용성 매개체에 급속한 용해를 촉진하기 위하여 인슐린제와 함께 포함된다. 적합한 가용화제에는, 폴리소르베이트, 글리세린 및 폴록사머(poloxamers), 비-이온성 및 이온성 표면활성제, 산성 및 염기성 식품(예, 중탄산나트륨)과 같은 습윤제와, 알코올 및 pH 조절을 위한 완충염이 포함된다.
- [0097] 바람직한 실시예에서, pH는 염산(HCl) 또는 수산화나트륨(NaOH)을 사용하여 조정될수 있다. 주사가가능한 제형의

pH는 전형적으로 약 6.8내지 7.8이고, 바람직하게는 약 7.1이다.

- [0098] 안정화제는 예를 들면 산화반응을 포함하는 약물 분해반응을 방해하거나 억제하기 위하여 사용된다. 많은 안정화제가 사용될 수 있다. 적합한 안정화제는, 시트르산, 인산염 및 아세테이트산; 셀룰로스, 셀룰로스 유도체와 같은 다당류, 황화폴리사카라이드 화합물 및 글리세롤(또는글리세린)과 같은 단순 알코올; 페놀과 같은 정균제, 벤질알콜, 메타-크레졸(m-크레졸), 2-페녹시에탄올 및 메틸/프로필 파라벤; 염화나트륨, 글리세롤(또는 글리세린), 시클릭아미노산, 아미노산 및 글루코스와 같은 등장제; 천연 레시틴(예를 들면, 달걀 노른자 레시틴 또는 간장콩 레시틴)과 합성 및 반합성 레시틴(예를 들면, 디미리스토일 포스파티딜클로라인, 디팔미토일포스파티딜클로라인, 또는 디스테아로일-포스파티딜클로라인 산); 인지질산(phosphatide acids); 포스파티딜 에탄올아민(phosphatidylethanolamines); 디스테아로일-포스파티딜 세린, 디팔미토일포스파티딜 세린, 및 디아라치도일 포스파티딜세린과 같은 인지질세린(phosphatidylserines); 포스파티딜 글리세롤; 포스파티딜리노시톨; 카디오리핀; 스펅고미엘린을 포함한다. 하나의 실시예에서, 상기 안정화제는 글리세롤, 정균제, 및 등장제의 조합일 수 있다.
- [0099] 또한, 용매 또는 조용매(co-solvent) 시스템(에탄올, PEG-300, 글리세린, 프로필렌 글리콜) 및 폴리소르베이트 20/80, 폴록사머 188, 및 소르비톨과 같은 안정화제.
- [0100] 일 예에서, 안정화제는 글리세롤, 정균제, 및 등장제의 조합일 수 있다. 가장 바람직한 제형들은 글리세린 및 m-크레졸을 포함한다. 글리세린의 범위는 약 1-35 mg/ml이고, 바람직하게는 약 10-25 mg/ml이며, 가장 바람직하게는 약 19.5-22.5 mg/ml이다. m-크레졸의 범위는 약 0.75-6 mg/ml이고, 바람직하게는 약 1.8-3.2 mg/ml이며, 가장 바람직하게는 2 또는 3 mg/ml이다.
- [0101] 염화칼슘은 임의 자유 EDTA를 중화하기 위하여 제형에 첨가될 수 있고 시트르산나트륨 및/또는 시트르산은 해리된 단량체를 안정화시키기 위해 첨가될 수 있다. 염화칼슘은 보다 더 전형적으로 킬레이터가 EDTA이나트륨인 경우 제형에 첨가될 수 있다. 그 것은 EDTA와 거의 같은 몰 농도로 일치시키기는 데 첨가된다. 예를 들면, EDTA이 나트륨이 5mM이면, 5mM의 염화칼슘이 사용되어야 한다. 유효범위는 EDTA이나트륨의 80-120%이다. 이를 위한 또 다른 가능한 후보는 유사한 품질로 추가되는 마그네슘이다.
- [0102] 염화칼슘의 범위는 약 0.1 내지 10 mM, 바람직하게는 약 2.5-7.5 mM, 가장 바람직하게는 약 5 mM이다.
- [0103] 일부 실시예에서, 인슐린 및 인슐린 유사체 제형의 상업적 제제는 여기서 개시된 제형의 인슐린로서 사용될 수 있다. 따라서, 최종 제제는 추가적인 부형제를 포함하고, 이 부형제는 인슐린 및 인슐린 유사체의 상업적 제제에서 발견된 부형제이고, 이에 다음을 포함하지만 이에 한정되지 않는다: 아연, 염화 아연, 페놀, 인산나트륨, 산화아연, 인산수소이나트륨, 염화나트륨, 트로메타민 및 폴리 솔 베이트 20. 이들은 킬레이터와 여기에서 설명한 용해/안정화제를 첨가하기 전에 이들 상업적으로 이용가능한 제제에서 제거될 수 있다.
- [0104] 제형의 예들은 아래 예들에 상세히 설명된다. 칼슘-EDTA-시트르산 제형은 인슐린 100 U/ml, EDTA칼슘이나트륨 1.8 mg/ml, 시트르산 2.7 mg/ml, 글리세린 20.08mg/ml, m-크레졸("BIOD-105") 3.0mg/ml, 인슐린 또는 인슐린 유사체 100U/ml, EDTA이나트륨 1.8mg/ml, 시트르산 2.7mg/ml, 글리세린 18.1mg/ml, m-크레졸 2.0mg/ml, 및 염화칼슘("BIOD-107") 5mM을 포함한다.
- [0105] 하나 또는 하나 이상의 마그네슘 화합물을 포함하는 인슐린 제형은 아래 표1에 설명된 바와 같이 제조된다.

표 1

	<u>Insulin</u>	<u>IU/ml</u>	<u>Na<sub>2</sub>EDTA</u>	<u>Mg(OH)<sub>2</sub></u> <u>2</u>	<u>MgEDTA</u>	<u>Citric</u> <u>Acid</u>	<u>NaCitrate</u>	<u>Glycerin</u>	<u>M-Cresol</u>	<u>phenol</u>	<u>Sodium</u> <u>phosphate</u>	<u>ZnO</u>	<u>A<sub>3</sub></u>	<u>MgSO<sub>4</sub></u>
<u>Form</u>			<u>mg/ml</u>	<u>mg/ml</u>	<u>mg/ml</u>	<u>mg/ml</u>		<u>mg/ml</u>	<u>mg/ml</u>				<u>mg/ml</u>	<u>mg/ml</u>
<u>Linjeta</u>	<u>RHI</u>	<u>100</u>	<u>1.8</u>			<u>1.8</u>		<u>22</u>	<u>3</u>	<u>-</u>	<u>-</u>			
<u>BIOD-120</u>	<u>RHI</u>	<u>100</u>	<u>1.8</u>			<u>1.8</u>		<u>22</u>	<u>3</u>					<u>0.481</u> <u>(4mM)</u>
<u>BIOD-121</u>	<u>RHI</u>	<u>100</u>	<u>1.8</u>			<u>1.8</u>		<u>18</u>	<u>3</u>				<u>0.3</u>	<u>0.481</u> <u>(4mM)</u>
<u>BIOD-123</u>	<u>RHI</u>	<u>100</u>	<u>1.5</u>			<u>1.5</u>		<u>22</u>	<u>3</u>					<u>0.481</u> <u>(4mM)</u>
<u>BIOD-126</u>	<u>RHI</u>	<u>100</u>			<u>1.89</u>	<u>1.8</u>		<u>22</u>	<u>3</u>					
<u>BIOD-127/128</u>	<u>RHI</u>	<u>100</u>	<u>1.8</u>	<u>0.282</u>		<u>1.8</u>		<u>22</u>	<u>3</u>					
<u>BIOD-250</u>	<u>IL</u>	<u>100</u>	<u>0.45</u>				<u>2.4</u>	<u>16</u>	<u>3.15</u>	<u>.01</u>	<u>1.88</u>	<u>.0197</u>		<u>.481</u>
<u>BIOD-531</u>	<u>RHI</u>	<u>400</u>	<u>3.6</u>				<u>1.8</u>	<u>16</u>	<u>2</u>					<u>.481</u>

[0106]

[0107] IL= 인슐린 리스프로; RHI=제조합 인간 인슐린

[0108] III. 제형을 제조하는 방법

[0109] 바람직한 실시예에서, 주사가능한 제형은 인슐린, EDTA이나트륨 및/또는 칼슘EDT이나트륨, 시트르산, 식염수 또는 글리세린, m-크레졸 및 염화마그네슘염을 포함한다.

[0110] 가장 실시예에서, 피하주사가능한 제형은 예컨대 황산, 다목적 주입 바이알 또는 카트리지로 멸균 여과 시트르산, 글리세린, m-크레졸 및 인슐린으로서 물, 디 소듐 EDTA, 마그네슘 염을 조합하여 제조된다.

[0111] 주 사용 인슐린 제제의 제조 방법은 하기 실시예에서 상세히 설명된다.

[0112] 일 실시 예에서, EDTA는 시트르산 전에 제제 (들)에 첨가된다. 다른 실시 예에서, 시트르산 나트륨 대신 구연산을 첨가한다. 바람직한 실시 예에서, 구연산 EDTA 전에 제제에 첨가된다. 한 바람직한 실시 태양에서, 제제의 성분을 물에 첨가 : 시트르산, EDTA, 글리세린, m 크레졸, 마그네슘 염 및 인슐린. 시트르산, EDTA 및 마그네슘 염 분말, 결정질 또는 물에 미리 용해 첨가 할 수있는 반면 글리세롤 및 m 크레졸은 용액으로 첨가된다.

[0113] 일부 실시 예에서, 피하 주사제 여과 멸균된 용액( "회석제"라고 함)을 제조하기 위해 물, 시트르산, EDTA, 글리세린 및 m 크레졸을 혼합하여 제조된다. 인슐린 별도로 물, 멸균 여과에 첨가하고 정량은 분말을 형성 동결 건조 별도 멸균 주입 병의 수에 첨가된다. 동결 건조된 분말은 그 안정성을 유지하기 위해 회석제는 별도로 저장된다. 투여 전에, 회석제는 인슐린을 용해하고 최종 재구성 된 제품을 만들 인슐린 주입 병에 첨가한다.

[0114] 다른 실시 예에서, 인슐린은 용액이고 부형제, 동결 건조 및 분무 분사 이전에 인슐린에 첨가된다. 또 다른 실시 예에서, 부형제는 농축 액체로서 만들어지며 주입 전에 액체 인슐린 도입된다.

[0115] 인슐린의 소정 양이 환자의 피하에 주입 한 후, 나머지 인슐린 용액은 바람직하게는 냉장으로 저장 될 수있다. 바람직한 실시 예에서, 인슐린은 바이알 또는 카트리지에서, pH 약 7.0의 수용액으로 제조하고, 4 °C에서 보관된다.

[0116] IV. 제형을 사용하는 방법

[0117] 본 발명에 따른 제형은 피하주사 또는 근육내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 제형은 체계적인 전달을 위하여 혈장으로 급속히 흡수되고 수송되도록 고안되어 있다.

[0118] 활성 물질로서 인슐린을 포함한 제형은 제1형 또는 제2형 당뇨병 환자에게 식사 전 또는 식사 중에 투여될 수



있다. 급속한 흡수로 인하여, 조성물은 글리코젠이 간에서 포도당으로 변환되는 것을 차단할 수 있고, 그로써 당뇨병과 제2형 당뇨병의 제1기 증후군으로 인한 합병증의 주요 원인인, 고혈당을 방지한다. 인슐린이 간에서의 포도당 생산을 차단하기 위하여 너무 늦게 흡수되므로, 근래 이용가능한, 표준의 인간 인슐린의 피하 주사는, 원하는 효과 이하를 제공하기 위하여 식사 전 약 1시간 반 안에 반드시 투여되어야 한다.

[0119] 이 새로운 초속효형 제형은 식사에 가깝게 취할 수 있다. 향상된 약물 동태 학이 제제에 대한 잠재적인 이점은 인슐린 치료의 빈번한 합병증 발생이나 비만의 정도가 감소 될 수 있다.

### 실시예 1

[0120] 인간의 주사 부위의 불편에 대한 칼슘이나트륨 EDTA 농도의 효과

[0121] VIAJECT® 7의 각 밀리리터 (VJ 7)는 다음을 포함한다: 재조합 인간 인슐린 3.7 mg의 (100 IU), 구연산 1.8 mg, 디소듐 EDTA 1.8 mg, 글리세린 22.07 mg, 방부제 m 크레졸 3.0 mg, 및 약 7의 pH를 조정하기 위한 수산화 나트륨 및/또는 염산.

[0122] BIOD 102의 각 밀리리터는 다음을 포함한다: 3.7mg(100 IU)의 재조합 인간 인슐린, 구연산 1.8 mg, 칼슘 나트륨 EDTA 2.4 mg, 글리세린 15.0 mg, 방부제 m 크레졸 3.0 mg, 및 수산화 나트륨 및/또는 염산.

[0123] BIOD 103의 각 밀리리터는 다음을 포함한다: 3.7 mg(100 IU)의 재조합 인간 인슐린, 구연산 1.8 mg, 디소듐 EDTA 0.25 mg, 칼슘 나트륨 EDTA, 2.0 mg, 글리세린 15.0 mg, m 크레졸 3.0 mg의 방부제, 및 약 7.1의 pH를 조정하기 위한 수산화 나트륨 및/또는 염산.

[0124] 각 솔루션은 인간의 자원 봉사에 피하 주입 및 자원 봉사는 주입과 관련된 통증 평가하도록 요청 받았다.

[0125] 기본 약동학은 Cmax는, 티맥스를 매개 변수 및 ½ 티맥스는 비선형 모델링없이 추정되었다.

[0126] t-시험 VJ7 비교하여 각 제제로부터의 데이터에 대해 수행하였다.

### 결과

[0128] 표 2에 나타난 바와 같이, 칼슘이나트륨 EDTA(BIOD 102 및 BIOD 103)를 함유하는 샘플은 약간 낮은 Cmax를 가졌고, 단지 디소듐 EDTA(VJ 7)를 함유하는 시료보다 나중에 Tmax를 가졌다.

표 2

Variable	BIOD 102	BIOD 103	VIAJECT®7 (VJ 7)	BIOD 102 vs VJ7 Ratio/Difference (CI)	BIOD 103 vs VJ7 Ratio/Difference (CI)
AUC <sub>0-480</sub>	10005.6	10139.6	9844.8	1.02 (0.98,1.06)	1.03 ®(0.99,1.07)
Cmax	54.0	53.4	66.1	0.82 (0.68,0.98)	0.81 (0.68,0.96)
T <sub>50%</sub> (Early)	12.9	17.3	11.0	1.9 (-3.0,6.8)	6.4 (1.8,11.0)
Tmax	73.1	63.9	34.2	38.9 (17.0,60.8)	29.7 (9.0,50.1)
T <sub>50%</sub> (Late)	210.6	206.4	116.4	94.2 (49.6,138.8)	90.0 (48.2,131.7)

[0130] VIAJECT®7: 1.8 mg of disodium EDTA

[0131] BIOD 102: 2.4 mg of calcium disodium EDTA

[0132] BIOD 103: 0.25 mg of disodium EDTA, 2.0 mg of calcium disodium EDTA

[0133] 이러한 결과는 반 최대 인슐린 농도와 인슐린 농도 (표 2) 최대 및 시간으로 평균 시간으로 나타난 바와 같이, 칼슘 제제는, 원래 인슐린보다 흡수 나트륨 EDTA, 시트르산 제형의 상당히 느린 속도를 가지고 있음을 입증한다.

[0134] 표 3에 도시된 바와 같이 칼슘이온트롬 EDTA를 함유하는 인슐린 제형의 주입, 디소듐 EDTA 샘플보다 훨씬 적은 주사 부위에 통증을 초래한다.

### 표 3

[0135] 주사부위 불편한 데이터

Variable	BIOD 102	BIOD 103	VIAJECT±7 (VJ7)	BIOD 102 vs VJ7 p-value	BIOD 103 vs VJ7 p-value
VAS	7.7	12.4	21.0	0.026	0.109
Severity	0.55	0.56	1.10	0.030	0.025
Relative	2.84	2.98	3.58	0.023	0.244

[0136] VAS: 0 =None; 100 =Worst possible; VR Absolute Discomfort: 0 =None, 1=Mild, 2=Moderate, 3=Severe, VR Relative (to usual injections): 1= Much less; 2 = Less; 3 = Equal; 4 = Increased; 5 = Much increased

### 실시예 2

[0137] 미니 당뇨병 돼지에서 BIOD 105 및 107 제형의 인슐린 흡수를 연구.

[0138] 본 연구의 목적은 약동학 (PK) 및 개선된 관용성과 관련될 것으로 예상되는 변형 인슐린 제형의 약동학 (PD) 특성을 평가하는 것이었다. 인슐린 제제 (함유 디소듐 EDTA)에 칼슘 EDTA의 첨가는 디소듐 EDTA를 함유하는 인슐린 제제에 비해 추가된 칼슘 EDTA 없이, 주입 부위 반응을 감소시키는 실시예 1에 나타내었다; 그러나, 제제의 신속한 작업이 다소 지연된 치환하였다. 따라서, 새로운 인슐린 제제는 타이밍 손실 (급 동작)을 회복하고, 안정성을 향상시키기 위해 개발되었다. 추가 시트르산 일부 제형 (본래 제제 VJ 7에 비해 150 %)을 첨가하고, m 크레졸의 1/3 감소는 안정성을 향상시키기 위해, 연구하였다.

[0139] 새로운 공식 중 하나에서, 디소듐 EDTA와 CaCl<sub>2</sub>는 EDTA (BIOD 107)의 칼슘 킬레이트화된 형태를 달성하기 위해 별도의 부형제로 추가되었다. 의 BIOD (107)로부터 인슐린 흡수율은 칼슘 EDTA (BIOD 105)에 직접 첨가하는 인슐린 제제로부터 인슐린 흡수율에 비해, 및 VJ (7)로부터 인슐린 흡수 속도 (디소듐 EDTA를 함유하고, 첨가하지 칼슘).

[0140] 재료 및 방법

[0141] 칼슘 EDTA 구연산 제제 (BIOD 105)가 포함되어 인슐린 100 U/ml, 1.8 mg/ml의 칼슘이온트롬 EDTA, 2.7 mg /ml 시트르산 (= 150 % 양을 VJ 7), 20.08 mg /ml 글리세린, m 크레졸 3.0 mg/ ml.

[0142] CaCl<sub>2</sub>-EDTA 구연산 제제 (BIOD 107)가 포함되어 인슐린 또는 인슐린 유사체 100 U/ml를, 구연산 나트륨 EDTA 1.8 mg/ml, 2.7 mg/ml (= 150 % VJ 7의 양), 18.1 mg/ml의 글리세린, m 크레졸 2.0 mg/ml (VJ = 7 m 크레졸의 양의 1/3의 환원), 및 5mM의 염화칼슘.

[0143] 제형은 VJ 7의 BIOD 105, 107, 피하 미니어처 돼지 각 시험 제제의 피하 투여 후 인슐린 흡수율 측정 하였다 다음에 주입 하였다.

[0144] 6 ~ 8 당뇨병 미니 돼지는 시험 제제 대신 일상 돼지의 인슐린 0.25 U/kg으로 아침에 주입 하였다. 동물이 돼지 다이어트와 혈장 시료 500g을 공급 하였다하여 -30, -20, -10, 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180, 240에서 수거 300과 360 분 게시물 벡톤 디킨슨 (Becton Dickinson) K2EDTA의 vacutainer를 사용하여 선량. 냉동 플라즈마 인슐린 콘텐츠 (# EZHI-14K 밀리 포아, USA)에 대한 분석 및 포도당 농도 (YSI 3200 분석기, 어떡 생명 과학, USA)에 대해 분석 하였다. 소요 시간은 비선형 모델링없이 추정되었다. 약력학적 반응은 혈당치 20 기준선으로부터 점 최저점에서 20 점을 증가시키기 혈당에 대한 시간을 드롭하는데 필요한 시간 투여 후 계산 하였다. 이러한 파라미터들 사이의 시간은 작용 지속 시간으로 정의된다.

[0145] 흡광율은 (30 분. 투여 후까지) 인슐린 농도 포스트 분사의 초기 증가에 그려진 직선의 기울기로서 계산 하였다.

[0146] 결과

[0147] 흡수율 파라메타는 표 4에 나타내었다.

#### 표 4

[0148] 원 제형 VJ7에 대한 BIOD 105 및 BIOD107 제형의 초기 흡수율 비교

	Abs. Rate ( $\mu$ /mL/min)	Time to 20 pt drop (min.)
VJ 7	$5.9 \pm .6$	$7.4 \pm .8$
BIOD-105	$4.9 \pm .2$	$8.5 \pm .0$
BIOD-107	$4.6 \pm .5$	$5.5 \pm .6$

[0149] Time to 20 pt drop = 혈당농도를 기저선 아래 20포인트 강하시키는 투여후 시간

[0150] T 테스트 비교는 이러한 제형의 흡수 속도 초기에는 유의 한 차이가없는 것으로 나타났다. 시간 프로파일 대 농도의 플롯에서 곡선의 형상은 다소 다르지만, 흡수 곡선의 초기 속도는 거의 겹쳐 있었다. 이는 인슐린 작용의 개시가 빠른 것을 보장한다.

[0151] 약역학 결과를하기 표 5에 나타낸다.

#### 표 5

[0152] 약역학 파라미터 계산

	VJ7	BIOD 105	BIOD 107
Time to 20 pt drop (min.)	$7.0 \pm 1.1$	$8.6 \pm 0.8$	$5.5 \pm .9$
Time to 20 pt recovery (min.)	$193.3 \pm 7.0$	$222.4 \pm 7.3$	$186.3 \pm 9.3$
Duration (min)	$186.8 \pm 7.2$	$213.7 \pm 7.6$	$180.8 \pm 8.7$

[0153] Time to 20 pt drop = 혈당농도를 기저선 아래 20포인트 강하시키는 투여후 시간

[0154] 테이터는 칼슘이 나트륨 EDTA와 디 소듐 EDTA의 교체에도 불구하고, 달성된 원래의 제형에 유사한 구연산 이온 증가 약역학적 및 약동학적 흡수 프로파일을 보여준다.

#### 실시예 3

[0155] 마그네슘 염을 포함하는 인슐린 제형

[0156] 디 소듐 EDTA를 함유하는 인슐린 제제로 얻어진 약동학 및 약력학 주사 부위에 통증 마그네슘 염의 효과 HUMLAOG® 비교, 평가 하였다. HUMLAOG® 각 밀리리터는 다음을 포함한다 : 인슐린 lispro 100 단위, 사출 16 mg을, 글리세린, 1.88 mg의 인산 나트륨, 3.15 mg의 Metacresol, 0.0197 mg의 아연 이온을 제공하는 페놀의 양을 추적하도록 조정 산화 아연 함량, 및 물. 인슐린 lispro는 7.0-7.8의 pH가 있다.pH는 염산, 10 % 및/또는 수산화 나트륨 10 % 수용액을 첨가함으로써 조정된다.

[0157] 재료 및 방법

[0158] 표 1에 상술 된 바와 같이 인슐린 제형을 제조하였다.

[0159] 제형은 12 자원자로 평가하였다.약역학적/기초선과 용량 요약은 표 6에 설명되어 있다.

#### 표 6

[0160] 약역학/기초선 및 용량 요약

Variable	Statistic/Category	
Sex	Female (%)	2 (16.7%)
	Male (%)	10 (83.3%)

Race	Black/African American	1 (8.3%)
	White	11 (91.7%)
Ethnicity	Hispanic/Latino	2 (16.7%)
	Not Hispanic/Latino	10 (83.3%)
Age (yrs)	Mean $\pm$ SD	42.3 $\pm$ 0.9
	Median	43
	Minimum, Maximum	25, 58
HbA1c (%)	Mean $\pm$ SD	7.70 $\pm$ 0.79
	Median	7.8
	Minimum, Maximum	6.6, 8.8
Dose(Units)	Mean $\pm$ SD	16.3 $\pm$ 2.7
	Median	17
	Minimum, Maximum	11, 20

[0161] **결과**

[0162] 약물 동력학BIOD 123, 125BIOD 및 HUMLAOG® 표 7에 나타내었다 (평균값  $\pm$  SE).

[0163] EDTA 마그네슘,BIOD-123에 관하여 (표 1에 도시)는 디 소듐 EDTA하고, MgSO4,BIOD-125 디 소듐 EDTA를 포함하는 동안 (1.98 mg/ml)를 함유; 시트르산 (2.7 mg/ml)을; 글리세린 (18 mg/ml); m 크레졸 (3 mg/ml); 의 CaCl2 (3.38 mg/ml); 트윈 (1.53 mg/ml) 및 비마그네슘 화합물.

[0164] 실시예1의 재료 및 방법은 시약의 다른 농도로써 사용되었다. 이 연구에서는, 등분자 농도의 산과 킬레이트제가 첨가되었다. 용액은 물, +/-EDTA(0.56 mg/ml), NaCl(0.85% w/v), 1mg/ml 인슐린 및 산: 아스파르트산(0.2 mg/ml), 글루타민산(0.22 mg/ml) 또는 시트르산(0.20 mg/ml)으로 구성된다. 시트르산은 1.8mg/mL의 더 높은 농도에서 킬레이트제와 함께 그리고 킬레이트제 없이 시험되었다. 이 데이터는 2개의 시간 기간, 세포공여 챔버의 투여후 10분 및 30분으로 보여진다.

**표 7**

[0165] 약역학(평균값 $\pm$ SE)

Variable	BIOD-123 (n=11)	BIOD-125 (n=12)	HUMLAOG® (n=12)
Tins50% (Early)	9.8 $\pm$ 1.1	12.4 $\pm$ 2.0	27.0 $\pm$ 2.7
TinsMax	46.4 $\pm$ 14.9	60.81 $\pm$ 5.2	65.0 $\pm$ 7.0
Tins50% (Late)	206.2 $\pm$ 34.5	179.2 $\pm$ 40.5	151.2 $\pm$ 11.0
Cmax	92.7 $\pm$ 17.3	75.9 $\pm$ 14.3	75.0 $\pm$ 8.8
AUCins0-30	1803 $\pm$ 372	1331 $\pm$ 320	532 $\pm$ 107
AUCins0-45	2926 $\pm$ 563	2182 $\pm$ 472	1404 $\pm$ 216
AUCins0-60	3901 $\pm$ 710	2993 $\pm$ 611	2369 $\pm$ 314
AUCins0-120	7166 $\pm$ 950	5966 $\pm$ 987	5663 $\pm$ 644
AUCins0-480	14705 $\pm$ 699	13220 $\pm$ 1493	9080 $\pm$ 952
AUCins120-480	7539 $\pm$ 887	7254 $\pm$ 1111	3417 $\pm$ 536

[0166] 시간 관련 PK파라미터는 표 8에 나타나 있다.

**표 8**

[0167] 시간 관련 PK 파라미터(중간값)

Variable	BIOD-123	BIOD-125	HUMLAOG®
Tins50% (Early)	9.6	9.4	25.9
TinsMax	25.0	30.0	67.5

Tins50%Late	169.7	140.0	149.8
-------------	-------	-------	-------

[0168] 약역학(LS평균값)은 표9에 나타나있다.

표 9

[0169] 약역학(LS 평균값)

Variable	BIOD-123	BIOD-125			
Tins50%Early	10.0	12.4	27.0	<0.001	<0.001
TinsMax		60.8	65.0	0.256	0.769
	48.0				
Tins50%Late	210.5	179.2	151.2	0.117	0.431
Cmax	89.5	75.9	75.0	(0.264)	(0.942)
AUCins0-30	1779.8	1331.0	532.3	(0.012)	(0.225)
AUCins0-45	2872.7	2181.5	1403.5	(0.002)	(0.056)
AUCins0-60	3816.6	2993.0	2369.4	(0.009)	(0.210)
AUCins0-120	6942.0	5965.7	5663.0	(0.191)	(0.020)
AUCins0-480	14519	13220	9080	(<0.001)	(0.005)
AUCins120-480	7493.2	7254.1	3417.0	(<0.001)	(<0.001)

표 10

[0170] 약역학(LS평균값)

Variable	BIOD-123	BIOD-125	P-value BIOD-123 vs	P-value BIOD-125 vs	
GIRmax (mg/kg/min)	7.00	6.49	7.28	0.752	0.358
TGIRmax (min)	132.6	201.1	134.3	0.961	0.049
TGIRearly50% (min)	32.9	34.2	43.2	0.119	0.148
TGIRlate50% (min)	289.1	283.5	260.7	0.281	0.385
GIRAUC0-30 (mg/kg)	37.0	40.1	32.8	0.818	0.680
GIRAUC0-60 (mg/kg)	196.0	177.4	153.5	0.305	0.547
GIRAUC0-120 (mg/kg)	493.5	423.1	504.4	0.904	0.357
GIRAUC0-180 (mg/kg)	802.1	717.0	859.7	0.681	0.298
GIRAUC0-480 (mg/kg)	1575.7	1469.1	1466.0	0.571	0.987
GIRAUC180-480 (mg/kg)	781.4	752.0	606.3	0.053	0.091

[0171] GIR은 인슐린 주사 다음 글루코스 주입 속도 (mg/kg/분), 또는 정상 혈당 범위 내의 피사체를 고정하는데 필요한 글루코오스의 양, 일반적으로 80 ~ 120 mg/dL로이다. GIRmax는 TGIRmax 발생 최대 글루코스 주입 속도이다. 반 최대 속도는 후반 초반 TGIR50 %와 TGIR50 %로, 피크 (GIRearly50 %)의 이전과 피크 (GIRlate50 %)의 후 발생한다. GIR 곡선 아래 영역은 전체 연구 기간 GIRAUC0-480 (mg/kg) 및 본 연구의 시작과 끝 사이의 시간 세그먼트, 0-30, 0-60, 0-120, 0-180 추정하고 있다. 180-480분. 시간 0-60 분, 0-480 분의 시간 프로파일 대 평균 농도의 그래픽 표현은도 2 및도 3에 각각 나타내었다. 도 4 및도 5는 시간의 함수BIOD 123, 125 HUMALOG에 비해

인슐린 제형 (분)로서 평균 GIR (mg/kg/분)의 그래프이다.

표 7-10에 표시된 2-5 숫자로, (디 소듐 EDTA, CaCl<sub>2</sub>를없이 마그네슘 화합물을 포함)BIOD-125 (디 소듐 EDTA와 황산을 포함)BIOD-123보다 더 빠른 생체 내 흡수를 보여 주었다.

주사 부위 통증에 대한 정보는 다음 표에 나타낸다. 안전 집단 (LS는 의미)과 주사 부위 통증의 정도 - 테이블 (11)는 주사 부위의 불편 결과를 보여준다.

## 표 11

**Table 11. Injection Site Discomfort Results – Safety Population (LS means) and Severity of Injection Site discomfort**

Variable	BIOD-123	BIOD-125	HUMLAOG®	P-value BIOD-123 vs HUMLAOG®	P-value BIOD-125 vs HUMLAOG®
VAS	2.9	6.8	2.1	0.600	0.023
Severity Score (absolute)	0.32	0.50	0.17	0.376	0.059
Severity Score (relative)	2.92	3.08	2.85	0.749	0.424
<b>Injection Site Discomfort Severity</b>					
Treatment					
None	7 (63.4%)	7 (58.3%)	10 (83.3%)		
Mild	4 (36.4%)	4 (33.3%)	2 (16.7%)		
Moderate	0	1 (8.3%)	0		
Severe	0	0	0		

Note: VAS 0=No Discomfort, 100=Worst Possible; Severity 0=None, 1=Mild, etc; Relative Discomfort 2=Less than Usual, 3=Equal to Usual, etc.  
VAS Results (Arithmetic Mean ± SE); BIOD-123 = 3.6±2.; BIOD-125 = 6.8±2.9; Humalog = 1.8±1.1

주사부위 불편함 결과-안전집단(LS평균값) 및 주사부위 불편함의 중증도

표 12는 통상 식사시간 인슐린 주사에 대하여 주사부위 불편함을 보여준다.

## 표 12

**Table 12. Injection Site Discomfort Relative to Usual Meal Time Insulin Injection**

Treatment	Much Less	Less	Equal	Increased	Greatly Increased
BIOD-123 (n=12)	1 (9.1%)	1 (9.1%)	7 (63.4%)	2 (18.2%)	0
BIOD-125 (n=12)	1 (8.3%)	0	9 (75.0%)	1 (8.3%)	1 (8.3%)
HUMLAOG® (n=12)	0	1 (8.3%)	11 (91.7%)	0	0

불편함 형태에 대한 정보, 시작시간, 및 지속시간이 표 13에 나타나 있다.

표 13

Injection Site Discomfort Description			
Treatment	Irritation (Burning)	Other	Pain (Stinging)
BIOD-123	2	0	2
BIOD-125	1	2	2
HUMLAOG®	1	0	1
Injection Site Discomfort Onset			
Treatment	<10 sec	10 sec – 1 min	1-10 min
BIOD-123	3	0	1
BIOD-125	1	4	0
HUMLAOG®	1	1	
Injection Site Discomfort Duration			
Treatment	≤30 sec	>30 sec – < 5 min	
BIOD-123	2	2	
BIOD-125	0	5	
HUMLAOG®	1	1	

[0179]

[0180]

전술한 바와 같이, 마그네슘 화합물 (BIOD-123,  $MgSO_4$ ) 함유하는 제형은  $MgSO_4$  (BIOD-125)없이 상응하는 화합물보다 훨씬 적은 주사 부위의 통증을 보였다. BIOD-123에 대한 불편의 기간은 BIOD-125(표 13)에 비해 크게 낮았다.

실시예 4

[0181]

감소된 주사 부위통증 및 초속효(ultra-rapid)를 입증하는, BIOD-250 및 BIOD-239에 대한 인간 연구

[0182]

두 초속효형 인슐린 유사체 기반의 제형, BIOD-238, BIOD-250의 제1형 치료 시도는, HUMALOG®(인슐린 lispro)에 비하여 상대적인 약동학 및 주사 부위의 관용이 초속 효성 인슐린 유사체를 기준으로 프로파일을 평가. 은 HUMALOG® 시판 제형과 BIODe1의 독점 부형제의 조합이다. BIOD-250의 조성은 표 1에 나타낸다BIOD-238은 마그네슘이없는 제외하고 유사한 구성을 가지며, 이하 EDTA (0.225 mg/ml)을 갖는다.

[0183]

단일 중심 제 1 형 당뇨병 환자 12 명에서, 무작위, 이중 맹검, 세 기간 크로스 오버 시험은 호주에서 실시했다. 각 연구 약물은 각각 다른 날에 피하 투여 하였다. 약물 동력학 측정은 연구 약물과 HUMALOG® 활성 성분을 정량화 분석을 사용 하였다.임상 시험은 최대량의 절반 인슐린 농도의 시간 차이를 측정하기 위해 구동 하였다.

[0184]

이 연구에서 시험 된 가설은 HUMALOG® BIOD e1의 공식이 HUMALOG® 기준으로 프로필 피크 농도와 비교 주사 부위 내약성에서 유사한 감소와 매우 빠른 흡수 프로파일이 었다. 두 접근 방식은 주사 부위 통증 감소 더 나트륨 EDTA 농도 (의 BIOD 238)와 이전의 연구에서 관용성을 개선하는 것으로 관찰되었다 마그네슘 설페이트 (BIOD-250)의 추가를 완화하기 위해 취해졌다.



표 14

**Table 14: Pharmacokinetic Profiles of BIOD-238, BIOD-250 and HUMALOG®**

	Variable	BIOD-238 N=10	BIOD-250 N=11	HUMALOG® N=10	P-value BIOD-238 vs. HUMALOG®	P-value BIOD-250 vs. HUMALOG®
Absorption	Early $T_{max}$ (minutes)	13.7 ± 1.9 (13.6)	14.6 ± 1.9 (12.9)	24.8 ± 2.9 (22.6)	<0.001	0.001
	$T_{max}$ (minutes)	35.5 ± 2.5 (37.5)	40.9 ± 6.1 (40.0)	62.5 ± 8.4 (60.0)	0.013	0.025
	AUC <sub>ins0-30</sub> (mU*min/L)	1278 ± 164 (1105)	1186 ± 133 (1260)	598 ± 126 (654)	<0.001	0.002
	AUC <sub>ins0-45</sub> (mU*min/L)	2421 ± 245 (2132)	2160 ± 195 (2327)	1486 ± 216 (1458)	<0.001	0.010
	AUC <sub>ins0-60</sub> (mU*min/L)	3476 ± 326 (3197)	3081 ± 245 (3125)	2505 ± 280 (2358)	0.002	0.066
Decline from peak concentration	Late $T_{max}$ (minutes)	123.8 ± 10.5 (125.3)	132.3 ± 18.7 (117.0)	166.5 ± 10.6 (183.4)	0.009	0.016
Data represent the Mean ± SEM; Median Values are presented in parentheses.						

[0185]

표 15

Injection Site Toleration Profiles of BIOD-238, BIOD-250 and HUMALOG®			
Metrics			
	BIOD-238 N=10	BIOD-250 N=11	HUMALOG® N=10
<b>Tolerability (VAS 0 – 100 mm)</b>	24.2 ± 7.0* (15.0)	2.7 ± 1.6 (0.0)	8.2 ± 4.5 (2.0)
<b>Absolute Severity Score</b>	1.09 ± 0.2* (1.0)	0.1 ± 0.1 (0.0)	0.5 ± 0.2 (0.0)
<b>Relative Severity Score</b>	3.6 ± 0.03 (4.0)	2.9 ± 0.02 (3.0)	3.2 ± 0.1 (3.0)

- Data represent the Mean ± SEM; Median Values are presented in parentheses.
- 100 mm Visual Analog Scale (VAS): 0 = no discomfort, 100 = worst possible discomfort
- Absolute Severity Scale: 0 = None, 1 = Mild, 2 = Moderate, 3 = Severe
- Relative Severity (compared to usual meal-time insulin injections): 1 = Much less, 2 = Less, 3 = Equal, 4 = Increased, 5 = Greatly increased; \*  $p < 0.05$  vs. HUMALOG®

[0186]

[0187]

본 연구는 EDTA와 인슐린 lispro의 구연산 제제 (두 개의 BIOD-238, BIOD-250)이 더 빠른 흡수 속도와 HUMALOG에 비해 피크 농도에서 더 빠른 감소가 있음을 보여준다. 더욱이, BIOD-250에서 황산 마그네슘의 존재가 크게 BIOD-238 울트라 급속한 약동학 프로파일을 변경하지 않고 로컬 주사 부위 통증을 완화했다.

## 실시예 5

[0188] 당뇨병 미니 돼지에서 상용 U-500 제형과 비교한 초속효 농축 인슐린 제형의 PK 및 PD.

[0189] 본 연구의 목적은 식후 사용을 위하여 설계된 새로운 U-400 농축 인슐린 제형의 약동학 (PK) 및 약력학 (PD) 특성을 평가하는 것이었다.

### 방법 및 재료

[0192] 제형BIOD-530의 조성은 하기와 같다 : 3.6 mg/ml EDTA, 1.8 mg/ml 시트르산삼나트륨, 2 mg/ml의 m-크레졸, 16 mg/ml 글리세린, 12.12 mg/ml의 인슐린 (400 U/ml).

[0193] 10 당뇨병 미니 돼지까지 대신 일상의 인슐린, 릴리 U-500R 또는BIOD-530의 0.25 U/kg으로 아침에 주입하였다. 동물에 직접 투여 및 혈장 샘플을 150, 120, 90, 75, 60, 45, 30, 20, 15, 10, 5, 0, -10, -20, -30 수거 후 돼지 다이어트 500g을 먹였다 180, 240, 300, 360, 420 및 480 분 계시물 벡톤 디킨슨 (Becton Dickinson) K2EDTA의 vacutainer를 사용하여 선량. 냉동 플라즈마 인슐린 함량 (isoinsulin 키트, Mercodia, USA)에 대한 분석 및 포도당 농도 (YSI 3200 분석기, 어떡 생명 과학, USA)에 대해 분석하였다.

### 결과 :

[0195] 약동학 프로파일은도 6에 그래프로 도시되고, 계산된 PK 파라미터는 표 17에 나타나 있다.

표 17

계산된 PK파라미터

	Lilly U-500	BIOD-530
C <sub>max</sub>	135.5±22.7	159.5±18.7
T <sub>max</sub>	194±7.1	41.7±2.2*
T <sub>1/2 max</sub>	26.9±5.0	11.1±2.1*
	*p<0.05	

[0197] 약역학은 도 6에 시간에 대한 기초 감한 포도당의 평균값으로 그래프로 도시되어 있다.

### 결론

[0199] 데이터는 농축 인슐린 제제가 Lilly U-500 상업적 제GUD에 비해 초속효의 프로파일을 가진다는 것을 보여준다. BIOD-530 제형의 신속성은 식후 사용하기에 충분할 수 있다.

## 실시예 6

[0200] 당뇨병 미니 돼지에서 BIOD-530 및 BIOD531에 대한 HUMALOG®(U-100)의 비교

[0201] 본 연구의 목적은 HUMALOG®, 마그네슘을 가진 U-400 농축 인슐린 제형(BIOD-531)(표 1)과 마그네슘이 없는 제형 (BIOD-530)(실시예 4 참조)의 약동학 (PK) 및 약력학 (PD) 특성을 식후 사용을 위한 초속효 U-100의 인슐린 유사체와 비교하여 평가하는 것이다.

### 방법 및 재료

[0203] 제형의 BIOD-530의 조성은 하기와 같다: 3.6 mg/ml EDTA, 1.8 mg/ml 시트르산삼나트륨, 2 mg/ml의 m 크레졸, 16 mg/ml 글리세린, 12.12 mg/ml의 인슐린 (400 U/ml). 주사 부위 내성을 개선하기 위한, 마그네슘을 첨가 4mm SO4 와의 BIOD-530과 동일한 조성을 가진다.

[0204] 크로스 오버 연구 설계를 사용하여, 9 당뇨병 미니 돼지는 0.25 U /의 BIOD-530, BIOD-531 또는 HUMALOG®의 kg 대신 일상 인슐린 아침에 주입하였다. 동물에 직접 투여 및 혈장 샘플을 150, 120, 90, 75, 60, 45, 30, 20, 15, 10, 5, 0, -10, -20, -30 수거 후 돼지 다이어트 500g을 먹였다 180, 240, 300, 360, 420 및 480 분 계시물 벡톤 디킨슨 (Becton Dickinson) K2EDTA의 vacutainer를 사용하여 선량. 냉동 플라즈마 인슐린 콘텐츠 (ISO 인슐린 키트, Mercodia)에 대한 분석 및 포도당 농도 (YSI 3200 분석기, 어떡 생명 과학, USA)에 대해 분

석 하였다.

[0205] 결과 :

[0206] 기준선은 인슐린과 시간 대 포도당 농도를 뺀 평균 시간 반 최대 농도 ( $1/2T_{max}$ )가 도 7에 도시되어 있다. 이전 트렌드하면서 약동학 파라미터는 표 18에  $T_{max}$ 가 제형에 걸쳐 유사 최대 농도까지의 시간이다..

표 18

Study 0.023	HUMALOG®	BIOD-530	BIOD-531
$C_{max}$	153±14	108±15	125±16
$T_{max}$	55±7.5	67±15	76±16
$1/2T_{max}$	21±4	9.6±1.4	11±9
AUC	16656±1440	16508±2482	17724±2293

[0207]

[0208] 결론 : 제형 마그네슘의 첨가BIOD-530의 약동학 또는 약력 학적 프로필을 변경하지 않았다. 또한, 농축 된 제형 BIOD-530과 531는 모두 적어도 HUMALOG® 같은 신속한 흡수 등이었고, HUMALOG®보다 동작의 약간 빠른 개시했다. 행동의 총 기간은 U-400 제형은 더 이상 HUMALOG® THAN했다.

## 실시예 7

[0209] 디소듐 EDTA의 감소와 당뇨병 미니 돼지의 빠른 흡수의 손실.

[0210] 본 연구의 목적은 매우 신속한 흡수 약동학 프로파일을 유지하는데 효과적이었다 최저 EDTA 농도를 찾는 것이었다. 두 제형BIOD-530보다 연속적으로 적은 EDTA 농도 하였다.

[0211] biod-532는 2.7 mg/ml 디 소듐 EDTA를 했고, biod-533은 1.8 mg/ml 디 소듐 EDTA했다.성분의 나머지BIOD-530 (실시 예 4 참조)와 동일한 조성 남아 있었다.

[0212] 크로스 오버 연구 설계를 사용하여, 9 당뇨병 미니 돼지는 0.25BIOD-530BIOD-532 U/kg 또는 매일 인슐린BIOD-533instead 아침에 주입 하였다. 동물에 직접 투여 및 혈장 샘플을 150, 120, 90, 75, 60, 45, 30, 20, 15, 10, 5, 0, -10, -20, -30 수거 후 돼지 다이어트 500g을 먹였다 180, 240, 300, 360, 420 및 480 분 계시물 벡톤 디킨슨 (Becton Dickinson) K2EDTA의 vacutainer를 사용하여 선량. 냉동 플라스마 인슐린 콘텐츠 (ISO 인슐린 키트, Mercodia)에 대한 분석 및 포도당 농도 (YSI 3200 분석기, 어떡 생명 과학, USA)에 대해 분석하였다.

[0213] 결과 : 이하 EDTA가 추가되었을 때 AUC와  $C_{max}$ 는이 공식에서 일관 있었지만 시간 프로필 대 농도는 표 19에서 그림 8과 약물 동태 학적 파라미터에 도시는, 흡수의 초기 발병이 끊어졌다.

표 19

Table 19: Pharmacokinetic Profiles of BIOD-530, BIOD-532 and BIOD 533

	BIOD-530	BIOD-532	BIOD-533
$C_{max}$	137.7±17.8	139±21	145±21
$T_{max}$	36.1±9.3	58.9±11.8	103±28
$1/2T_{max}$	10.3±2.8	21.5±4.6*	29±7*
AUC	22674±4585	24102±4573	24427±3830

[0214]

[0215] 결론 : 인슐린 흡수의 신속한 개시를 유지하기 위해,보다 큰 2.7 mg을 /이 나트륨 EDTA의 용액이 사용되어야한다.

[0216]

### 실시예 8

[0217] 개선된 초속효형 식후 및 인슐린 리스프로 프로타민(Lispro Protamine) 혼합물과 유사한 기초 흡수를 가진 인공한 농축 재조합 인간 인슐린 제형

[0218] 배경 및 목적 : U-100 재조합 인간 인슐린 (RHI) 제형 및 EDTA 및 시트르산을 함유하는 인슐린 리스프로 (IL)의 제형은 RHI와 IL의 시판 제형과 비교하여 인간에 피하(sc) 주사한 후 흡수 속도의 향상을 보여준다.

BIOD-530 및 BIOD-531은 RHI 농도가 400 U/ml의 유사 EDTA/시트르산 제형이다. 당뇨병 돼지의 과거 연구에서는 BIOD-530은 유의하여 신속한 발현, 정렬 더 큰 주사량을 필요로 하는 제2 형 당뇨병 환자의 식사시 적용 (prandial coverage) 및 기초적인 적용(basal coverage)을 모두 제공하는 RHI U-500과 유사한 작용 지속기간이 있었다. BIOD-531은 EDTA 관련 주사 부위의 불편을 완화하도록  $MgSO_4$ 를 이용하여 개발되었다. 본 연구의 목적은 당뇨병의 미니 돼지에서 BIOD-531의 약동학 (PK) 및 약력학 (PD) 프로파일을 당뇨병 환자에서 식사시의 적용과 기초적인 적용 범위 모두 제공하는, IL- 프로타민 (ILP)와 IL 50/50 (ILP/IL 50/50) 및 75/25 (ILP/IL 75/25)의 각 혼합물로 이루어진 U-100 제제와 비교하는 것이다.

재료 및 방법 : 시험 제형은 ILP/IL 75/25, ILP/IL 50/50 및 BIOD-531로 구성되었다. 각 교차 연구가 행해지는 오전중에, 시험 준비를 당뇨병의 미니 돼지에 sc에서 (0.25U/kg) 식전 투약했다. 연구 1과 연구 2에서는 BIOD-531을 ILP/IL 75/25 및 ILP/IL 50/50와 각각 비교했다. 혈당 및 혈장 인슐린을 투약 후 -30 ~ 480 분 샘플링했다. 혈장 인슐린 측정을 ELISA 법에 의해, 그리고 포도당 농도를 측정 YSI 따라 갔다. 최대 반 농도에 도달하는 시간 (T50 % early)을 돼지마다 계산하여 시험 항목마다 평균했다. 각 연구 결과에 대해 Students t- 검정을 이용하여 BIOD-531과 ILP/IL 75/25 또는 50/50 혼합물과 비교했다.

플라즈마 인슐린은 YSI 결정 ELISA 방법 및 글루코스 농도를 측정 하였다. 반 최대 농도(초기 T50의 %)에 시간은 각 돼지에 대해 계산하고 각 시험 물질에 대한 평균되었다. 각 연구의 결과는 학생의 t-test를 이용하여 ILP/IL 75/25 또는 50/50 혼합물BIOD-531을 비교하였다.

[0220] 결과 : 농도 대 시간 프로파일을 도 9에 나타낸다; BIOD-530과 IL에 대한 데이터는 참조로 포함되어 있다. 인슐린 농도는 어느 ILP/IL 혼합물에 비해BIOD-531 주사 후 높은 피크 상승했다.  $25 \pm 5$ ,  $1582 \pm 397$ , 연구 2 : 더 높은 피크 상승에도 불구하고,BIOD-531의 T50 %의 초 (분)과 AUC0-30min ( $\mu U/ml * 분$ )에 의해 반영 흡수 속도는 (1 연구  $11 \pm 2$  및  $1475 \pm 134$ , 각각) 75/25 ( $35 \pm 6$   $351 \pm 82 * 각각 ILP/IL 이상 빨라서$ ) 또는 ILP/IL 50/50 ( $23 \pm 3 * 777 \pm 128 * 각각$ ) 및 포도당 농도의 보다 빠른 하락 (BIOD - 531 대 \*  $P < 0.05$ ) 결과. BIOD-531 (32~43%), ILP/IL 75/25 (45 %) 및 ILP/IL 50/50 (35 %) : 총 퍼센트 AUC180-480min 의해 반영된 바와 같이, 작용 지속 시간은 제형에 걸쳐 유사 . 인슐린과 포도당 농도가 IL의 투여 기준 수준으로 약 240 분을 반환하면서 세 가지 제형의 포도당 농도는 480 분까지 억제 남아 있었다.

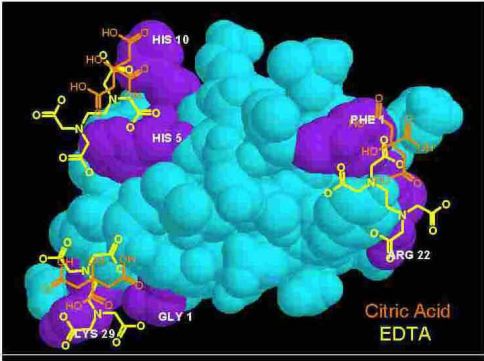
[0221] 결론 :BIOD-531은 IL 비교 및 ILP/IL 미리 혼합 된 인슐린과 유사한 기초 제어 프로파일 행동의 빠른 발병을 가지고 있다. BIOD-531은 낮은 주입량과 미리 혼합 된 인슐린으로 개선 식후과 비교 기초 보형을 제공 할 수있는 잠재력을 가지고있다.

도면

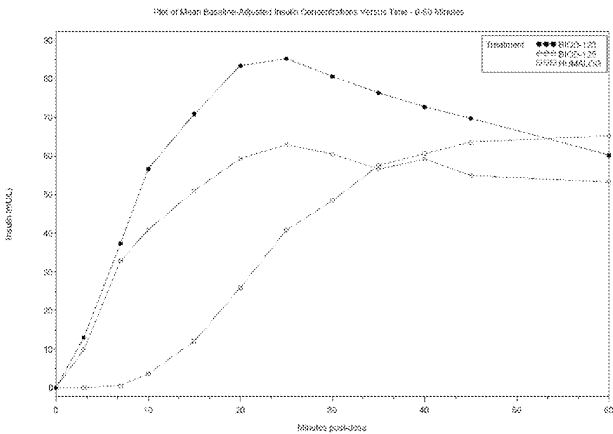
도면1

# Insulin Charge Distribution

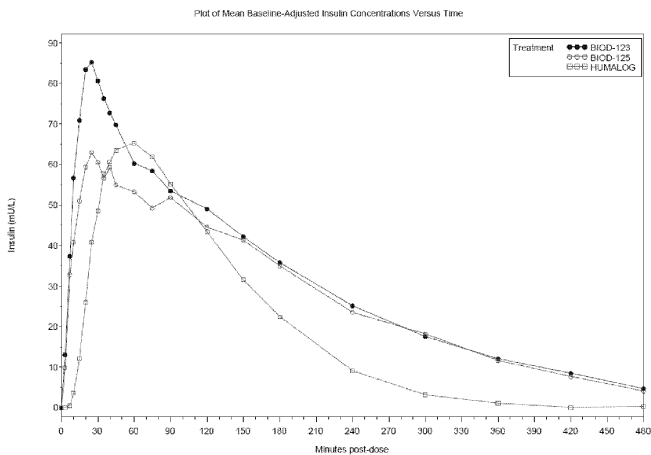
- Cationic residues on insulin are clustered
- Multivalent anions may neutralize (mask) the charge



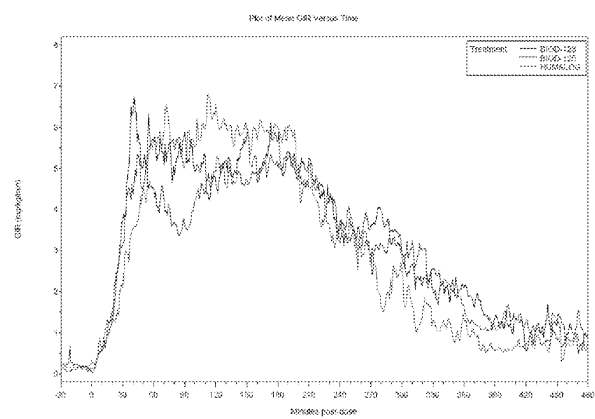
도면2



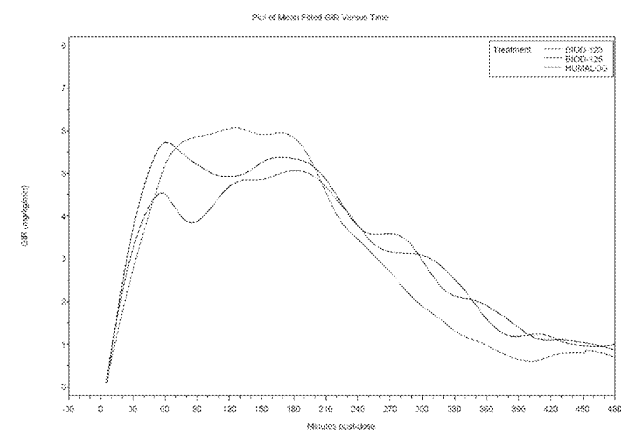
도면3



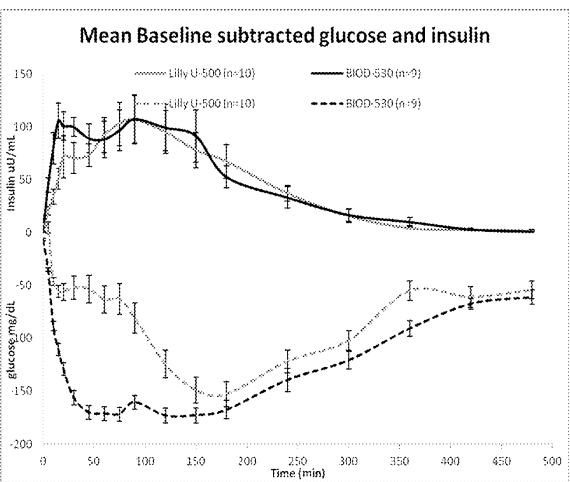
도면4



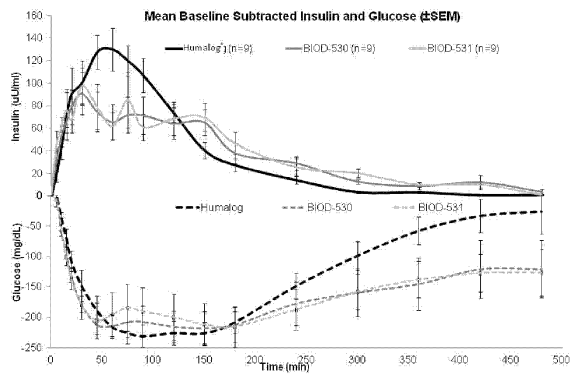
도면5



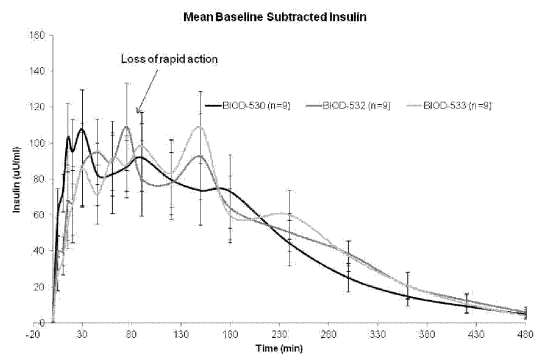
도면6



도면7



도면8



도면9

