

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5220410号
(P5220410)

(45) 発行日 平成25年6月26日(2013.6.26)

(24) 登録日 平成25年3月15日(2013.3.15)

(51) Int.Cl. F I
C O 7 K 14/62 (2006.01)
A 6 1 K 38/28 (2006.01)
A 6 1 K 47/10 (2006.01)
A 6 1 K 47/12 (2006.01)
A 6 1 K 47/24 (2006.01)

C O 7 K 14/62
A 6 1 K 37/26
A 6 1 K 47/10
A 6 1 K 47/12
A 6 1 K 47/24

請求項の数 41 (全 122 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-522670 (P2007-522670)
(86) (22) 出願日 平成17年7月19日(2005.7.19)
(65) 公表番号 特表2008-506782 (P2008-506782A)
(43) 公表日 平成20年3月6日(2008.3.6)
(86) 国際出願番号 PCT/US2005/025644
(87) 国際公開番号 W02006/014673
(87) 国際公開日 平成18年2月9日(2006.2.9)
審査請求日 平成20年6月6日(2008.6.6)
(31) 優先権主張番号 60/589,058
(32) 優先日 平成16年7月19日(2004.7.19)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 60/619,153
(32) 優先日 平成16年10月15日(2004.10.15)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 506292941
バイオコン・リミテッド
インド国、バンガロア 560100、エ
レクトロニクス・シティ、トゥエンティ
ス・ケイエム・ホスール・ロード
(74) 代理人 100079108
弁理士 稲葉 良幸
(74) 代理人 100093861
弁理士 大賀 眞司
(74) 代理人 100109346
弁理士 大貫 敏史
(72) 発明者 ラドークリスナン、バラサイアム
アメリカ合衆国、ノースカロライナ州 2
7517、チャペル ヒル、ファイゾン
ロード 209

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インスリン-オリゴマー複合体、その処方物及び使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

修飾部分に複合された、未変性ヒトインスリン化合物又はそのヒトインスリン化合物類似体を含む、インスリン化合物複合体であって、

前記ヒトインスリン化合物類似体が、1つ以上の保存的アミノ酸の付加、欠失及び／又は置換を伴うヒトインスリンの構造をもつポリペプチドであって、対応する未変性ヒトインスリン化合物に比べて同じであるか又は高い活性を示し、B28位にあるアミノ酸残基がAsp、Lys、Leu、Val又はAlaであり；B29位にあるアミノ酸残基がLys又はProであり；B10位にあるアミノ酸残基がHis又はAspであり；B1位にあるアミノ酸残基がPhe、Aspであるか又は単独で欠失させられているか又はB2位の残基の欠失と組合わせて欠失されており；B30位のアミノ酸残基がThr、Alaであるか又は欠失されており；かつB9位のアミノ酸残基がSer又はAspであり、ただし、B28位かB29位がLysであるヒトインスリン配列から選択され、前記修飾部分が親油性構成要素にカップリングされたPEG構成要素を形成する2～10ポリエチレングリコールサブユニット(OC₂H₄)を含み、前記親油性構成要素が、アルキル、脂肪酸及び直鎖又は分枝脂質からなる群から選択され、前記修飾部分がB鎖のC末端から5アミノ酸以内のリジンにカップリングされてモノ複合体を提供する、インスリン化合物複合体と、

カチオンと、
を含む錯体であって、

10

20

前記インスリン化合物複合体が二価の I I 群又は遷移金属カチオンと錯化されている錯体。

【請求項 2】

前記ヒトインスリン化合物類似体が、未変性ヒトプロインスリン化合物並びにプロインスリン化合物及び該プロインスリン化合物の C 末端又は N 末端で連結されたリーダーペプチド又は担体タンパク質を含むヒトプレプロインスリン化合物からなる群から選択される、請求項 1 に記載の錯体。

【請求項 3】

前記インスリン化合物類似体が、切断可能又は切断不可能なリーダーペプチドを含む、請求項 2 に記載の錯体。

10

【請求項 4】

前記修飾部分が未変性ヒトインスリン化合物の B 2 9にカップリングされている、請求項 1 に記載の錯体。

【請求項 5】

前記修飾部分が、前記インスリン化合物複合体を、対応する未複合インスリン化合物以上の親水性又は両親媒性を持つものにするように選択されている、請求項 1 に記載の錯体。

【請求項 6】

前記インスリン化合物複合体の親水性が亜鉛添加により低減されている、請求項 1 に記載の錯体。

20

【請求項 7】

前記修飾部分が、前記インスリン化合物複合体を、対応する未複合インスリン化合物以上の溶解度を持つものにするように選択されており；

前記インスリン化合物複合体の水溶性が亜鉛添加により低減されている、請求項 6 に記載の錯体。

【請求項 8】

前記インスリン化合物複合体がアシル化インスリン化合物であり；

前記カチオンが亜鉛であり；かつ

前記インスリン化合物複合体の水溶性が亜鉛添加により低減される、請求項 1 に記載の錯体。

30

【請求項 9】

前記インスリン化合物複合体が、対応する親インスリン化合物に対して 1 以下の相対的親油性を有する、請求項 1 に記載の錯体。

【請求項 10】

前記錯体が固体である、請求項 1 に記載の錯体。

【請求項 11】

(a) 7.4 の pH での前記ヒトインスリン化合物複合体錯体の溶解度が、7.4 の pH での溶液中の前記インスリン化合物複合体の溶解度よりも実質的に小さい、請求項 1 に記載の錯体。

【請求項 12】

40

(a) 前記錯体がプロタミンを含む R 型 Zn 錯体であり、かつ

(b) 7.4 の pH で、前記錯体の水溶解度が 10 ~ 110 g/L、20 ~ 85 g/L 又は 30 ~ 70 g/L である、請求項 1 に記載の錯体。

【請求項 13】

(a) 前記錯体がプロタミンを含む T 型 Zn 錯体であり、かつ

(b) 7.4 の pH で、前記錯体の水溶解度が 10 ~ 150 g/L、20 ~ 130 g/L、30 ~ 110 g/L 又は 35 ~ 60 g/L である、請求項 1 に記載の錯体。

【請求項 14】

前記インスリン化合物複合体が、 $pI \pm 2.5$ に等しい pH で、水溶液中で結晶を生成する、請求項 1 に記載の錯体。

50

【請求項 15】

修飾部分が、前記未変性ヒトインスリン化合物内の遊離アミノ基においてカップリングされてカルバメート結合を形成する、請求項 1 に記載の錯体。

【請求項 16】

前記カチオン構成要素が Zn^{++} 、 Mn^{++} 、 Ca^{++} 、 Fe^{++} 、 Ni^{++} 、 Cu^{++} 、 Co^{++} 及び Mg^{++} からなる群から選択される金属カチオンを含む、請求項 1 に記載の錯体。

【請求項 17】

前記カチオン構成要素が Zn^{++} を含む、請求項 1 に記載の錯体。

【請求項 18】

インスリン化合物複合体対カチオン構成要素のモル比が、 $1:1 \sim 1:100$ 、 $1:2 \sim 1:12$ 又は $1:2 \sim 1:7$ の間にある、請求項 1 に記載の錯体。

【請求項 19】

キモトリプシン分解に対する前記錯化インスリン化合物複合体の耐性が、対応する未錯化インスリン化合物複合体の耐性よりも大きい、請求項 1 に記載の錯体。

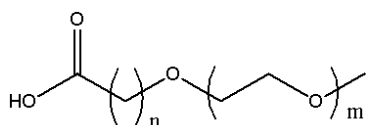
【請求項 20】

キモトリプシン分解に対する前記錯化インスリン化合物複合体の耐性が、対応する錯化、未複合のインスリン化合物の耐性よりも大きい、請求項 1 に記載の錯体。

【請求項 21】

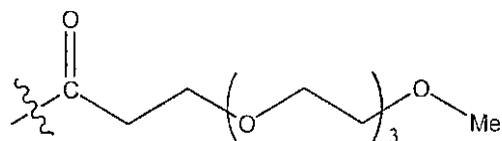
前記修飾部分が、

【化 1】



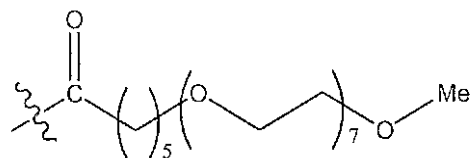
(式中、 n は 1 ～ 4 の整数であり、 m は 1 ～ 5 の整数である) と、

【化 2】



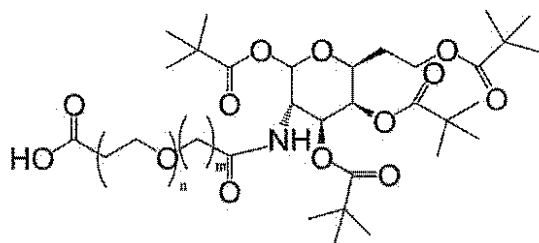
と、

【化 3】



と、

【化 4】



10

20

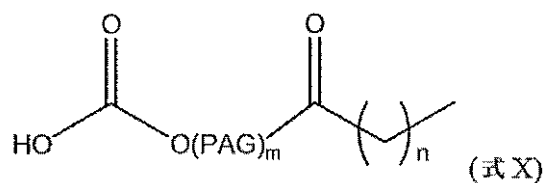
30

40

50

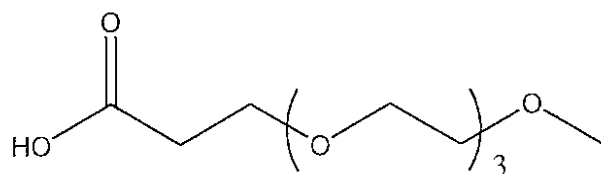
(式中、 m は1～20の整数であり、 n は1～20の整数である)と、

【化5】



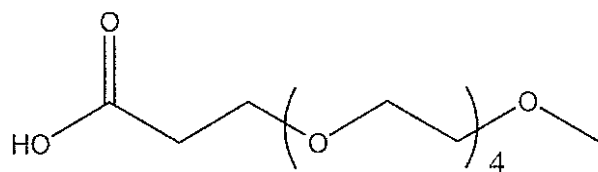
(式中、PAGは、 m 個のサブユニットを有するPAG部分であり、 m は1～20の整数
であり、 n は1～20の整数である)と、

【化6】



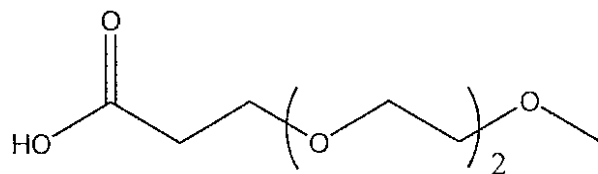
と、

【化7】



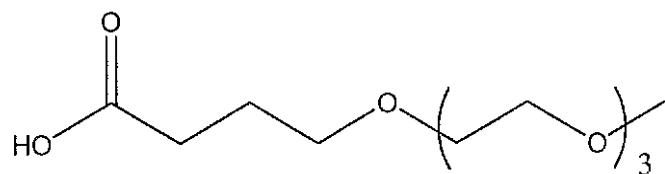
と、

【化8】



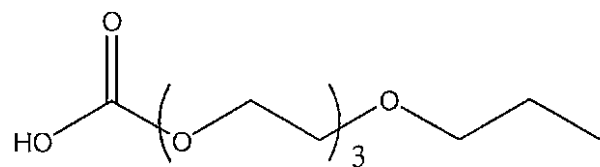
と、

【化9】



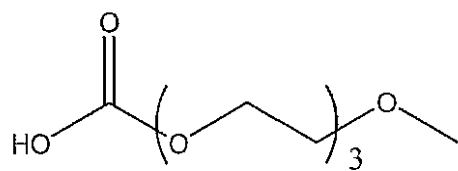
と、

【化 1 0】



と、

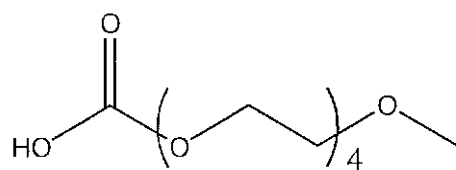
【化 1 1】



10

と、

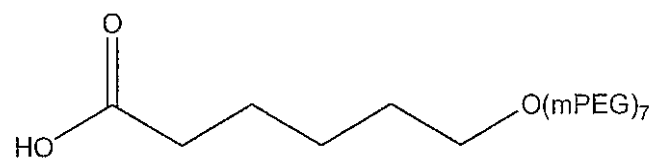
【化 1 2】



20

と、

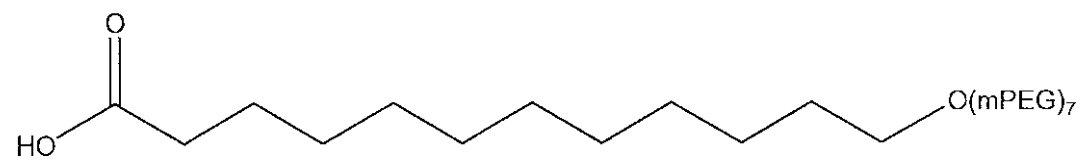
【化 1 3】



30

と、

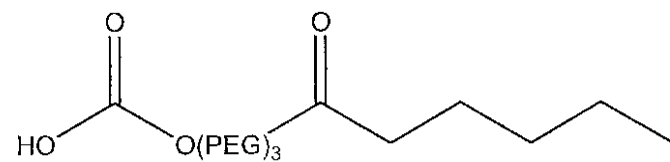
【化 1 4】



40

と、

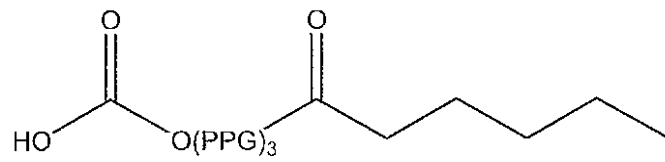
【化 1 5】



と、

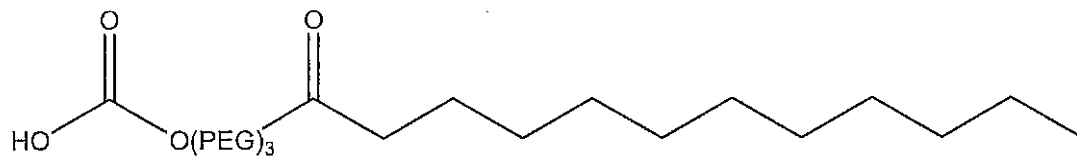
50

【化 1 6】



と、

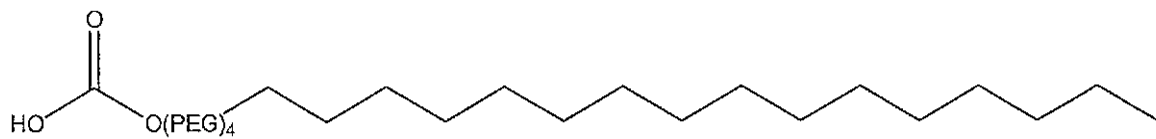
【化 1 7】



10

と、

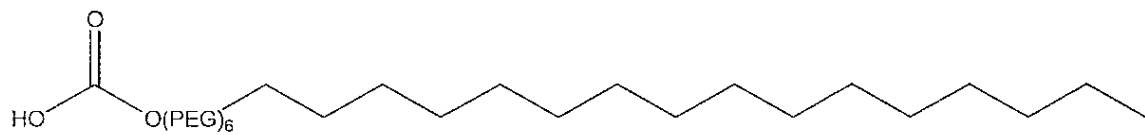
【化 1 8】



20

と、

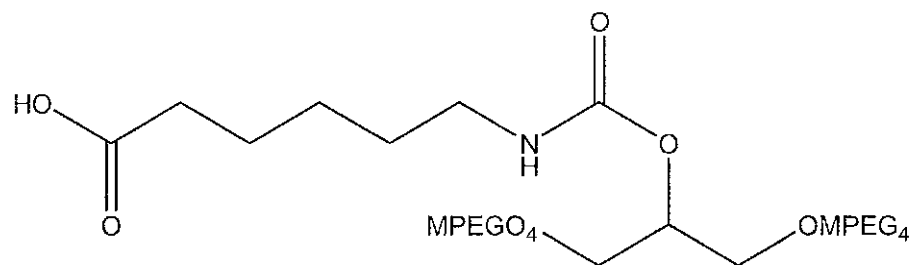
【化 1 9】



30

と、

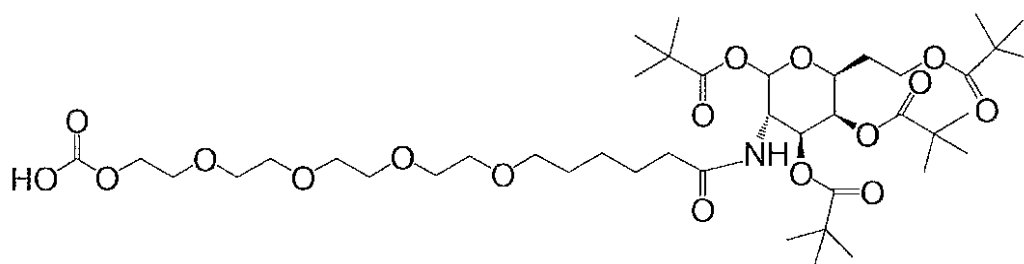
【化 2 0】



40

と、

【化 2 1】



10

とからなる群から選択される構造を有する、請求項 1 に記載の錯体。

【請求項 2 2】

請求項 1 ～ 2 1 のいずれかに記載の錯体のうち少なくとも 1 つを治療有効量含む、ヒトにおけるインスリン欠乏症を治療するための組成物。

【請求項 2 3】

ヒトインスリン化合物複合体又は未複合ヒトインスリン化合物を含む第 2 構成要素をさらに含む、請求項 2 2 に記載の組成物。

【請求項 2 4】

前記錯体が、少なくとも 2 つのインスリン化合物複合体を含む結晶性固体、非晶質固体及び共結晶からなる群から選択される形状であり、前記インスリン化合物複合体は同一のもの又は異なるものである、請求項 2 3 に記載の組成物。

20

【請求項 2 5】

凍結乾燥された粉末、固体混合物又はハイブリッド錯体として提供される、請求項 2 2 に記載の組成物。

【請求項 2 6】

前記インスリン化合物複合体が、異なるインスリン化合物複合体を含む、1 つ以上の錯体を含む、請求項 2 2 に記載の組成物。

【請求項 2 7】

前記異なるインスリン化合物複合体が、異なる溶解度、異なる循環半減期、及び、異なる修飾部分からなる群から選択される、異なる性質を有する、請求項 2 6 に記載の組成物。

30

【請求項 2 8】

(a) 前記錯体のうちの 1 つが急速作用型プロファイルを有し、かつ

(b) 前記錯体のうちのもう 1 つが中～長時間作用型プロファイルを有する、

請求項 2 7 に記載の組成物。

【請求項 2 9】

(a) 前記錯体のうちの 1 つが基礎インスリン化合物制御に適したプロファイルを有し、かつ

(b) 前記錯体のうちのもう 1 つが食後グルコース制御に適したプロファイルを有する、請求項 2 7 に記載の組成物。

40

【請求項 3 0】

H I M 2、インスリン化合物及び I N 1 0 5 からなる群から選択される少なくとも 2 つの構成要素の共結晶である、請求項 2 3 に記載の組成物。

【請求項 3 1】

食後グルコース制御又は基礎インスリン化合物オーバーナイト制御に適した P K / P D プロファイルを有する共結晶である、請求項 2 3 に記載の組成物。

【請求項 3 2】

ヒトインスリン又は l y s - p r o インスリン化合物からなる群から選択される未複合インスリン化合物を含む、請求項 2 3 に記載の組成物。

【請求項 3 3】

50

錯化剤をさらに含む、請求項 2 2 に記載の組成物。

【請求項 3 4】

前記錯化剤が、プロタミン、サルフェン (surfen)、グロビンタンパク質、スペルミン、スパーミジンアルブミン、アミノ酸、カルボン酸、ポリカチオン重合体化合物、カチオンポリペプチド、ポリリシン、アニオンポリペプチド、ヌクレオチド及びアンチセンスからなる群から選択される、請求項 3 3 に記載の組成物。

【請求項 3 5】

プロタミンを実質的に全く含んでいない、請求項 2 2 に記載の組成物。

【請求項 3 6】

前記錯体が、結晶性固体、棒状結晶、不規則形態を有する結晶、非晶質固体及び結晶性固体の混合物、又は、粉末の形状である、請求項 2 4 に記載の組成物。

【請求項 3 7】

カチオンーインスリン化合物複合体固体及び 1 つ以上の付加的な薬学的に許容可能な構成要素を含む、粉末の形状である、請求項 2 2 に記載の組成物。

【請求項 3 8】

乾燥状態で前記固体が、

(a) 71 % w/w 超のインスリン化合物複合体と、

(b) 0.5 ~ 4 % w/w の Zn^{++} と、場合により 0.1 ~ 5 % w/w のフェノールと、

を含む、請求項 2 2 に記載の組成物。

【請求項 3 9】

フェノール、m-クレゾール及びパラベンからなる群から選択される安定剤を含む、請求項 3 7 に記載の組成物。

【請求項 4 0】

糖尿病を治療するための薬剤の製造における、請求項 1 ~ 2 1 に記載の錯体の使用。

【請求項 4 1】

前記薬剤が、経口、経口摂取、非経口、口腔、舌下、経鼻、吸入及び経皮からなる群から選択される経路による送達用に製造される、請求項 4 0 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

1 関連出願

本出願は、2004 年 7 月 19 日付け米国仮特許出願第 60/589,058 号明細書、2004 年 10 月 15 日付け同第 60/619,153 号明細書、2004 年 12 月 2 日付け同第 60/632,578 号明細書、及び 2005 年 2 月 24 日付け同第 60/655,838 号明細書及び 2005 年 2 月 24 日付け同第 60/655,803 号明細書に対する優先権を請求するものであり、それらの開示全体を参照により援用する。本出願は同様に、ラトカクリシュナン (Radhakrishnan) らによる 05 年 7 月 19 日付けの本書と共に出願された以下の出願すなわち、「インスリン化合物複合体のカチオン錯体、その処方物及び使用」という題の米国特許出願第 11/184,668 号明細書；「インスリンオリゴマー化合物複合体、その処方物及び使用」という題の米国特許出願第 11/184,594 号明細書；「タンパク質及びペプチドの経口送達用脂肪酸処方物、及びその使用」という題の米国特許第 11/184,528 号明細書をも参照により援用する。

【0002】

2 技術分野

本発明は、インスリン又はインスリン類似体が修飾部分にカップリングされている新規のインスリン化合物に関する。また、本発明は、かかるインスリン化合物複合体のカチオン錯体及びかかるインスリン化合物複合体及び／又は修飾部分を含む薬学的処方物にも関する。

【背景技術】

【0003】

3 背景技術

例えば、HUMULIN（登録商標）及びHUMALOG（登録商標）という商標名で、亜鉛錯化インスリン化合物が市販されている。亜鉛錯化インスリンは標準的に六量体形態で存在する。

【0004】

アシル化インスリンの結晶化における亜鉛の使用のためのさまざまな方法が記述されてきた。例えば2001年11月15日付けで公開された、マークL. ブラダー（Mark L. Brader）らによる「安定化されたアシル化インスリン処方物」という題の米国特許出願公開報第20010041786号明細書は、脂肪酸アシル化インスリン又は脂肪酸アシル化インスリン類似体を含む亜鉛及び好ましくはフェノール化合物を用いて安定化された、pH7.1～7.6の特に注射可能な処方物としての非経口送達用水溶液を伴う処方物について記述している。「ペプチド誘導体」という題で、ノボ・ノルディスク（Novo Nordisk）A/Sに譲渡された、シャファー（Schaffer）らに対し2002年9月17日付けで発行された米国特許第6,451,970号明細書は、B28、B29又はB30位にあるLysのε-アミノ基及び／又はB-鎖のN末端アミノ基が12～22個の炭素原子及びその亜鉛錯体をもつ長鎖炭化水素基を用いて、アシル化されているインスリン類似体及びインスリン化合物の誘導体について記述している。

【0005】

アシル化インスリンの結晶化において使用するためのプロタミン及びフェノール化合物が、記述されてきた。両方共「不溶性インスリン組成物」という発明の名称の、ブラダーに対する米国特許第6,268,335号明細書（01年7月31日）及び6,465,426号明細書（02年10月10日）は、アシル化インスリン、プロタミン錯化化合物、六量体安定化フェノール化合物及び2価の金属カチオンから成る不溶性組成物について記述している。

【0006】

既存のアプローチは、特に未変性インスリン化合物又はインスリン化合物類似体の結晶化又は非アシル化インスリン化合物に比べて増大した親油性をもつアシル化インスリン化合物のために調整されたものである。当該技術分野においては、親水性及び／又は両親媒性インスリン化合物誘導体といったようなアシル化インスリン化合物以外の誘導体化されたインスリン化合物を含む薬学的に許容可能な錯体に対するニーズ、及び非アシル化親油性インスリン化合物類似体を安定化させるニーズが存在している。同様に、当該技術分野においては、既存の複合体に比べ増大した生物学的利用能又はその他の薬学的属性を有する新しいタンパク質複合体に対するニーズも存在している。又当該技術分野においては、タンパク質及びタンパク質複合体の経口送達を容易にする新しい処方物に対するニーズが存在している。最後に、タンパク質の経口送達のための利点を最大限にすべく改善された処方で固体として提供される改良型経口タンパク質複合体を取込む、インスリン化合物といったようなタンパク質の経口生物学的利用能を改善するための組合せ型アプローチに

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0007】

4 発明の要約

一般に、本発明は、修飾部分に複合されたインスリン化合物を伴うインスリン化合物複合体及びカチオンを含む錯体において、インスリン化合物複合体がカチオンと錯化されている錯体を提供する。該インスリン化合物は例えば未変性インスリン又はインスリン類似体であってよい。インスリン化合物の例としてはヒトインスリン、リスプロインスリン、des30インスリン、未変性プロインスリン、人工プロインスリンなどが含まれる。カ

チオン構成要素は、例えば Zn^{++} 、 Mn^{++} 、 Ca^{++} 、 Fe^{++} 、 Ni^{++} 、 Cu^{++} 、 Co^{++} 及び Mg^{++} から成る群から選択された 2 価の金属カチオンであり得る。

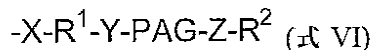
【0008】

修飾部分は、インスリン化合物複合体を、対応する未複合インスリン化合物に比べて溶解度が大きい、小さい又は同等のものにするように選択され得る。該修飾部分は好ましくは、インスリン化合物複合体を、約 7.4 の pH で、水溶液中で対応する未複合インスリン化合物に比べ少なくとも 1.05、1.25、1.5、1.75、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5 又は 15 倍の溶解度を有するものにするように選択されている。好ましくは、該修飾部分は、約 7.4 の pH で約 1 g/L、2 g/L、3 g/L、4 g/L、5 g/L、10 g/L、15 g/L、20 g/L、25 g/L、50 g/L、75 g/L、100 g/L、125 g/L 又は 150 g/L を超える水溶解度をもつインスリン化合物複合体を提供するように選択されている。さらに修飾部分は、インスリン化合物複合体を、対応する未複合インスリン化合物以上の溶解度をもつものにするように選択されており、該インスリン化合物複合体の水溶性は、亜鉛添加により低減される。もう 1 つの実施形態においては、該修飾部分は、インスリン化合物複合体を対応する未複合インスリン化合物以上の溶解度をもつものにするように選択されており、インスリン化合物複合体の水溶性は亜鉛添加により低減され、錯体の水溶性はインスリン化合物の水溶性よりも大きい。さらにもう 1 つの実施形態においては、対応する親インスリン化合物に比したインスリン化合物複合体の相対的親油性 (k_{rel}) は 1 以下である。

【0009】

本発明は同様に、修飾部分に複合されたインスリン化合物をもつ新規インスリン化合物複合体をも提供している。例えば、本発明は、

【化 1】



という式を有する修飾部分に対しカップリングされたインスリン化合物において、式中、
 — X、Y、及び Z が、独立して選択された連結基であり、各々が任意に存在し、X が存在する場合それは共有結合によりインスリン化合物にカップリングされており、
 — R^1 及び R^2 のうちの少なくとも 1 つが存在し、それが低級アルキルであり、任意にはカルボニル基を含み、
 — R^2 が $-CH_3$ 、 $-H$ 、トシレートといったようなキャッピング基であり、そうでなければ活性化基であり、
 — PAG が、2 つ以上のアルカレングリコール部分を取込み（すなわちオキシアルカレン部分）、任意には $-S-$ 、 $-O-$ 、 $-N-$ 、及び $-C(O)-$ から成る群から選択された 2 つ以上の付加的部分を取込む直鎖又は分枝炭素鎖であり、
 — 前記修飾部分が、最大 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 又は 25 個の重原子を有する、
 インスリン化合物を提供している。

【0010】

本発明の実施形態においては、X、Y 及び Z のうちのいずれか 1 つ又は複数のものが不在であってよい。さらに、X、Y 及び Z が存在する場合、それらは独立して $-C(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C-$ 及び $-N-$ の中から選択され得る。一実施形態では、Z は $-C(O)-$ である。もう 1 つの実施形態では、Z は存在しない。

【0011】

一部の実施形態において、 R^1 は低級アルキルであり、 R^2 は存在しない。その他の実

施形態においては、 R^2 は低級アルキルであり、 R^1 は存在しない。

【0012】

もう1つの実施形態においては、該修飾部分は、 $-C-$ 、 $-C-$ 、 $-O-$ 、 $=O$ 、 $-S-$ 、 $-N-$ 、 $-Si-$ から成る群から選択された3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、19、20、21、22、23、24又は25個の原子の主鎖をもつ直鎖又は分枝の置換炭素鎖部分を含み得る。重原子は標準的には2つ以上の炭素原子及び、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N-$ 及び $=O$ から成る群から選択された2つ以上の非炭素重原子を含むことになる。炭素原子及び非炭素重原子は標準的には、各非炭素重原子あたり少なくとも1個の炭素原子、好ましくは各非炭素重原子あたり少なくとも2個の炭素原子、より好ましくは各非炭素重原子あたり少なくとも3個の炭素原子という比率で存在する。炭素原子及び酸素原子は標準的には各酸素原子あたり少なくとも1個の炭素原子、好ましくは各酸素原子あたり少なくとも2個の炭素原子、より好ましくは各酸素原子あたり少なくとも3個の炭素原子という比率で存在する。修飾部分は、分枝又は直鎖 C_{1-6} 、分枝又は直鎖、又はカルボニルといった2つ以上のキャッピング基を含み得る。修飾部分は標準的には水素を含み、水素のうちの2つ以上のものは、(重原子であるものの上記式中では重原子として計数すべきでない) フッ素で置換され得る。修飾部分は、一部のケースでは特定の未置換アルキル部分を除外し得る。修飾部分は例えば、アミノ酸上の利用可能な基、例えばアミノ基、ヒドロキシル基又は遊離カルボン酸基ポリペプチドに対して、例えばカルバメート、カルボナート、エーテル、エステル、アミドといったような連結基、又は第2級アミン基又はジスルフィド結合によってカップ

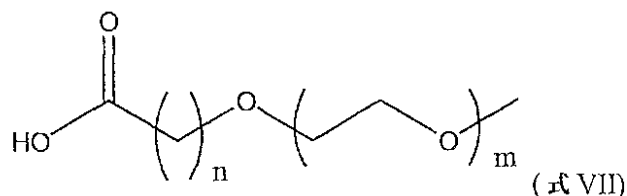
10

20

【0013】

本発明は、

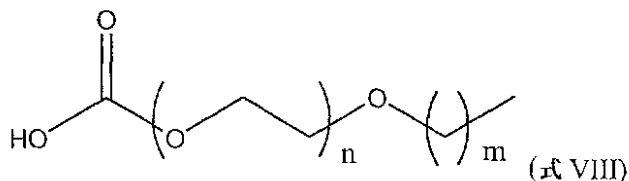
【化2】



30

(なお式中、 n は、1、2、3又は4であり m は1、2、3、4又は5である) 及び／又は

【化3】



40

(なお式中、 n は、1、2、3、4又は5であり m は1、2、3又は4である) という式をもつ修飾部分を有するインスリン化合物複合体を含む。

【0014】

新規の修飾部分ならびにインスリンを修飾するためのかかる部分の使用があれば重宝であると思われ、その他のポリペプチドがそれ自体本発明の態様である。

【0015】

また、本発明は、本発明のインスリン化合物複合体及び／又はカチオン-インスリン化合物複合体を含む新規の処方をも提供している。発明者らは、驚くべきことに、ある種の

50

脂肪酸組成物が特にポリペプチド及びポリペプチド複合体例えばインスリン及びインスリン化合物複合体の経口送達のため及び／又は本発明のカチオンーインスリン化合物複合体錯体の経口送達のために特に有用であることを発見した。1態様では、本発明は、2つ以上の飽和又は不飽和C₄、C₅、C₆、C₇、C₈、C₉又はC₁₀脂肪酸及び／又はかかる脂肪酸の塩を伴う脂肪酸組成物を提供している。好ましい脂肪酸はカプリル、カプリン、ミリスチン及びラウリン酸である。好ましい脂肪酸塩は、カプリル、カプリン、ミリスチン及びラウリン酸のナトリウム塩である。組成物の脂肪酸含有量は標準的には、約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、又は3.0 %w/wを下限とし、約3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、10.1、10.2、10.3、10.4、10.5、10.6、10.7、10.8、10.9、11.0、11.1、11.2、11.3、11.4、11.5、11.6、11.7、11.8、11.9、又は12.0 %w/wを上限とする範囲にある。さらにもう1つの実施形態においては、組成物の脂肪酸含有量は約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、又は3.0 %w/wを下限とし、約3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、10.1、10.2、10.3、10.4、10.5、10.6、10.7、10.8、10.9、11.0、11.1、11.2、11.3、11.4、11.5、11.6、11.7、11.8、11.9、又は12.0 %w/wを上限とする範囲内にあり、組成物の脂肪酸含有量は、典型的に単一脂肪酸、好ましくはカプリル酸、カプリン酸、ミリスチン酸又はラウリン酸又はその塩1個あたり90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.5、99.6、99.7、99.8、又は99.9 %w/wより大きい。

【0016】

また、本発明は、本発明のインスリン化合物複合体、カチオンーインスリン化合物複合体錯体及び／又は処方物を用いてインスリン欠乏症を治療する又は対象の体内のインスリンを補足する方法をも提供している。該方法は一般に、それを必要としている対象に対して、本発明のインスリン化合物複合体、カチオンーインスリン化合物複合体錯体及び／又は処方物のうちの2つ以上のものを治療上有効な量だけ投与するステップを含んでいる。

【0017】

6 定義

以下に示すのは、本明細書及びクレーム全体を通して使用されている用語の定義である。提供されている定義は、別に指定のない限り本明細書全体を通して適用される。本書で定義されていない用語は、その用語が関係する技術分野において一般的に理解されている意味を有する。

【0018】

「付加」は、アミノ酸配列に関して使用される場合、その配列のいずれかの端部又は両方の端部における1個以上のアミノ酸の延長、ならびにその配列内の挿入を含む。

【0019】

「錯体」というのは、1つ以上のインスリン化合物又はインスリン化合物複合体が1つ以上の金属原子又はイオンと配位結合を形成する分子会合を意味する。錯体は溶液中でも、又結晶、微結晶又は非晶質固体といった固体としても存在し得る。「錯体混合物」というのは、溶液又は固体のいずれの形態であろうと、2つ以上の異なる錯体を有する混合物を意味する。錯体混合物は、例えば、異なるインスリン化合物、異なるインスリン化合物複合体、異なるハイブリッド錯体、異なるカチオン、これらの組合せとの錯体を含み得る。10
「ハイブリッド錯体」というのは、2つ以上の異なるインスリン化合物及び／又はインスリン化合物複合体を有するカチオン-インスリン化合物複合体錯体を意味する。

【0020】

「錯化剤」というのは、多数の電荷を有し、インスリン化合物複合体に結合するか又はインスリン化合物複合体と錯化する分子を意味する。本発明で使用するのに適した錯化剤の例としては、プロタミン、スルフェン、グロビントパク質、スペルミン、スペルミジンアルブミン、アミノ酸、カルボン酸、ポリカチオン重合体化合物、カチオンポリペプチド、アニオンポリペプチド、ヌクレオチド及びアンチセンスが含まれる。その開示全体が本発明に参照として援用されているブランジェ (Brange)、J.、「Galenic 20
cs of Insulin compound」、Springer-Verlag、Berlin Heidelberg (1987年)、を参照のこと。

【0021】

アミノ酸の付加、欠失又は置換に関連して使用される「保存的」という用語は、インスリン化合物の治療的効力を完全に低減させないアミノ酸鎖内の付加、欠失又は置換を意味する。すなわち、該効力は、対応する未変性インスリン化合物といったような科学的に許容可能な対照の治療的効力に比べて低いか、同じであるか又は高い可能性がある。

【0022】

「親水性の」というのは、水溶性特性を示すことを意味し、「親水性部分」という用語は、親水性であり、及び／又はもう1つの化学物質に付着した場合にかかる化学物質の親水性を増大させる部分を意味する。例としては、ポリエチレングリコールといったような 30
ポリアルキレン部分及び糖が含まれるが、これらに制限されるわけではない。「親油性」は、脂肪及び脂肪組織内での蓄積といったような脂肪溶解度特性、脂質中で溶解する能力及び／又は生体膜に侵入し、それと相互作用し、及び／又はそれを横断する能力を意味し、「親油性部分」という用語は、親油性であり、及び／又はもう1つの化学物質に付着した時点でかかる化学物質の親油性を増大させる部分を意味する。「両親媒性」というのは、親水性と親油性の特性を示すことを意味し、「両親媒性部分」という用語は、ポリペプチド又は非ポリペプチド薬物に付着した時点で、結果として得られる複合体の両親媒性を増大させる（すなわち親水性及び両親媒性の両方を増大させる部分、例えば一部のPEG-脂肪酸修飾部分、及び糖-脂肪酸修飾部分を意味する。

【0023】

「低級アルキル」というのは、1～6個の炭素原子すなわちC₁、C₂、C₃、C₄、C₅又はC₆を有する置換又は未置換、直鎖又は分枝アルキル部分を意味する。「高級アルキル」というのは、6個以上の炭素原子、例えばC₇、C₈、C₉、C₁₀、C₁₁、C₁₂、C₁₃、C₁₄、C₁₅、C₁₆、C₁₇、C₁₈、C₁₉、C₂₀などを有する、置換又は未置換、直鎖又は分枝アルキル部分を意味する。

【0024】

「単分散型」というのは、混合物中の化合物の約100パーセントが同じ分子量をもつ化合物混合物を表わしている。「実質的に単分散型」というのは、その混合物中の化合物の少なくとも約95パーセントが同じ分子量を有する化合物混合物を表わしている。「純粋に単分散型」というのは、その混合物中の化合物の約100パーセントが同じ分子量を 50

有しかつ同じ分子構造を有する化合物混合物を表わしている。かくして、純粋に単分散型の混合物は単分散混合物であるものの、単分散型混合物は、必ずしも純粋に単分散型の混合物であるわけではない。「実質的に純粋に単分散型」というのは、その混合物内の化合物の少なくとも約95パーセントが同じ分子量及び同じ分子構造をもつ化合物混合物を表わしている。かくして、実質的に純粋に単分散型の混合物は、実質的に単分散型の混合物であるが、実質的に単分散型の混合物は必ずしも実質的に純粋に単分散型の混合物ではない。カチオンーインスリン化合物複合体組成物のインスリン化合物複合体構成要素は好ましくは単分散型、実質的に単分散型、純粋に単分散型又は実質的に純粋に単分散型であるが、多分散型でもあり得る。「多分散型」というのは、単分散型、実質的に単分散型、純粋に単分散型又は実質的に純粋に単分散型でない分散性を有することを意味する。

10

【0025】

本書で特定の使用されているとおりの「未変性インスリン化合物」は、天然、合成又は遺伝子工学処理された供給源によって提供される哺乳動物インスリン化合物（例えば、ヒトインスリン、ウシインスリン化合物、ブタインスリン化合物又は鯨インスリン化合物）を意味する。ヒトインスリンは、ジスルフィド結合により架橋される21アミノ酸A鎖及び30アミノ酸B鎖から成る。適切に架橋されたヒトインスリンはA7とB7の間に1つ、A20とB19の間に2つ目、そしてA6とA11の間に3つ目のジスルフィド架橋を含んでいる。ヒトインスリンは3つの遊離アミノ基すなわちB1ーフェニルアラニン、A1ーグリシン及びB29ーリジンを含む。A1位及びB1位の遊離アミノ基はαアミノ基である。B29位の遊離アミノ基はεアミノ基である。「インスリン類似体」は、対応する未変性インスリンに比べて一部の、全ての又は増強された活性を示すか又は対応する未変性インスリンに比べて一部の、全ての又は増強された活性を示すポリペプチドへとインビボ又はインビトロで転換されるポリペプチド、例えば1つ以上の保存的アミノ酸の付加、欠失及び／又は置換を伴うヒトインスリンの構造をもつポリペプチドを意味する。インスリン類似体は、ダヒヤット（Dahiyat）ら、の名前で02年3月18日付けで出願された米国特許出願公開第20030049654号明細書「タンパク質ライブラリ用タンパク質設計自動化」で記述されているもののような既知の技術を用いて同定可能である。ヒト及び非ヒト動物のプロインスリン、プレプロインスリン、インスリン前駆体、1本鎖インスリン前駆体及びそれらの類似体は、本書では同様に、非哺乳動物インスリンがそうであるようにインスリン類似体とも呼ばれている。当該技術分野では数多くのインスリン類似体が知られている（以下の論述参照）。前後関係から特定の別途指示がなされているのでないかぎり（例えば「ヒトインスリン」などといったような特定のインスリンに言及されている場合）、「インスリン化合物」という用語は、未変性インスリン及びインスリン類似体を含むように広く使用される。

20

30

【0026】

「ポリアルキレングリコール」又はPAGというのは、置換又は未置換の、直鎖又は分枝ポリアルキレングリコール重合体、例えばポリエチレングリコール（PEG）、ポリプロピレングリコール（PPG）及びポリブチレングリコール（PBG）及びそれらの組合せ（例えばPEG、PPG、PPG及びPBGサブユニットから選択された2つ以上の異なるPAG単位といったような2つ以上の異なるPAGサブユニットの組合せを含む直鎖及び分枝重合体）を意味し、ポリアルキレングリコールのモノアルキルエーテルを含む。PAGサブユニットという用語は、単一のPAG単位を意味し、例えば「PEGサブユニット」は単一のポリエチレングリコール単位、例えば $-(CH_2CH_2O)-$ を意味し、「PPGサブユニット」は単一のポリプロピレングリコール単位、例えば $-(CH_2CH_2CH_2O)-$ を意味し、「PBGサブユニット」は、例えば $-(CH_2CH_2CH_2CH_2O)-$ といった単一のポリブチレングリコール単位を意味する。PAG及び／又はPAGサブユニットは同様に、置換されたPAG又はPAGサブユニット、例えばメチル、エチル又はプロピル側鎖といったアルキル側鎖を含むPAG又はイソ-PPG又はイソ-PBGといった2つ以上の分枝PAGサブユニットを含むPAGをも含んでいる。

40

【0027】

50

「プロインスリン化合物」というのは、B鎖のC末端が5個以上のアミノ酸を有する天然の又は人工のCペプチドを介してA鎖のN末端にカップリングされているインスリン化合物を意味する。「プレプロインスリン化合物」は、可溶性タンパク質として排泄を促進するように選択された配列、又はN末端の複合を防止するように選択された配列、又は精製を増強させるように選択された配列（例えば精製カラムに対する結合親和性をもつ配列）といったような、B鎖のN末端にカップリングされたリーダー配列をさらに含むプロインスリン化合物を意味する。「1本鎖インスリン化合物前駆体」又は「ミニプロインスリン化合物」というのは、B鎖のC末端（又はC末端から除去された1、2、3又は4個のアミノ酸を有する切断型B鎖）が、介入するCペプチド無しで、又は1、2、3、又は4個のアミノ酸を有する短縮Cペプチドを介して、A鎖又はN末端で1、2、3又は4個のアミノ酸だけ短縮された切断型A鎖のN末端にカップリングされているインスリン化合物を意味している。

10

【0028】

「プロタミン」というのは、天然（例えば魚の精巢）又は組換え型供給源から得られる強塩基性タンパク質の混合物を意味する。ホフマン（Hoffmann）、J. A. ら、「Protein Expression and Purification」、第1号：127～133頁（1990年）を参照のこと。プロタミン組成物は、往々にしてプロタミン塩基」と呼ばれるタンパク質の塩を比較的含まない調製物又はタンパク質の塩を含む調製物の中に入って供給され得る。

20

【0029】

「タンパク質」、「ペプチド」及び「ポリペプチド」は、本書では、少なくとも2個、そして最大では任意の長さのアミノ酸配列をもつ化合物を意味するべく互換的に用いられる。

【0030】

「R型」というのは、フェノールといったような安定化化合物、カチオン、インスリン化合物複合体の存在下で形成される錯体立体構造を意味する。「T型」というのは、フェノールといったような安定化化合物無しでカチオン及びインスリン化合物複合体の存在下で形成される錯体立体構造を意味する。A型又はR型錯体はプロタミンを含んでいても、又除去してもよい。

【0031】

「科学的に許容可能な対照」というのは、実験主題の当業者にとって許容可能である実験的対照を意味する。

30

【0032】

「固体」というのは、本書では構造の3次元規則性が存在する物質の状態を意味する。この用語は、結晶性固体、非晶質固体の両方そして結晶性固体と非晶質固体の組合せを意味するように、広く使用されている。「カチオンーインスリン化合物複合体固体」というのは、好ましくは1価又は多価のカチオンと配位された、カチオンーインスリン化合物複合体を含む固体を意味している。「結晶」は、規則的多面体形状をもつ固体を意味する。

「結晶性」というのは、結晶の特性をもつ固体を意味する。「微結晶」というのは、標準的に1ミクロン～100ミクロンの範囲内の最長寸法の顕微鏡的大きさの結晶性状態にある物質で主として構成される固体を意味する。一部のケースでは、微結晶性組成物の個々の結晶は、大部分が単結晶組成のものである。一部の実施形態においては、本発明の結晶は微結晶ではない。「微晶質」という用語は、微結晶である状態を意味する。「非晶質」という用語は、形が結晶でない固体材料を意味する。当業者であれば、例えばX線結晶学技術、走査電子顕微鏡検査又は光学顕微鏡を用いて、標準的技術を利用して非晶質材料と結晶を区別することが可能である。「固体混合物」は、2つの異なる固体の混合物を意味する。「結晶混合物」は、2つの異なる結晶の混合物を意味する。「共結晶」は、2つ以上の異なるインスリン化合物及び／又はインスリン化合物複合体をもつ結晶を意味する。本発明のカチオンーインスリン化合物複合体錯体は、以上の形態のいずれかで、又はかかる形態のうちの2つ以上のものの混合物の形で提供され得る。

40

50

【0033】

「置換」というのは、インスリン化合物配列内部の2つ以上のアミノ酸残基をもう1つのアミノ酸で交換することを意味する。一部のケースでは、置換されたアミノ酸は、機能的等価物として作用し、サイレント改変を結果としてもたらす。置換は、保存的であり得、例えば、置換されたアミノ酸が属するクラスの他の成員から保存的置換を選択することができる。非極性（疎水性）アミノ酸の例としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン及びメチオニンが含まれる。極性中性アミノ酸の例としては、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン及びグルタミンが含まれる。正荷電（塩基性）アミノ酸には、アルギニン、リジン及びヒスチジンが含まれる。負荷電（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸及びグルタミン酸が含まれる。

10

【0034】

「水溶性」又は「水溶解度」は、別に指定のない限り、7.4のpHでの水性緩衝溶液中で決定される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0035】

7 発明の詳細な説明

本発明は、カチオンーインスリン化合物複合体錯体及びかかる錯体を含むさまざまな組成物ならびにかかる錯体及び組成物の製造及び使用方法を提供する。該錯体は、インスリン化合物欠乏を特徴とする身体条件といったようなさまざまな医学的身体条件の治療のためにインスリン化合物を投与する上で有用である。錯体は一般にカチオン構成要素とインスリン化合物複合体構成要素を含む。インスリン化合物複合体構成要素は一般に、修飾部分にカップリングされたインスリン化合物を含んでいる。錯体及び／又は組成物のその他の適切な構成要素の例としては、安定化剤、錯化剤及びカチオンータンパク質錯体を調製する上で使用するための当該技術分野において既知のその他の構成要素が含まれる。本発明は同様に、新規のインスリン化合物複合体及びかかるインスリン化合物複合体及び／又はカチオンーインスリン化合物複合体錯体を含む脂肪酸処方物をも提供する。

20

【0036】

7.1 インスリン化合物

該カチオンーインスリン化合物複合体は、インスリン化合物構成要素を含んでいる。該インスリン化合物は、例えばヒトインスリンといったような哺乳動物のインスリン化合物又はインスリン化合物類似体であり得る。

30

【0037】

広範なインスリン化合物類似体が当該技術分野において既知である。好ましいインスリン化合物類似体は、リジンを含む、例えばB26、B27、B28、B29及び／又はB30位でB鎖のC末端から5アミノ酸以内にリジンを含むものである。B28位にあるアミノ酸残基がAsp、Lys、Leu、Val又はAlaであり；B29位にあるアミノ酸残基がLys又はProであり；B10位にあるアミノ酸残基がHis又はAspであり；B1位にあるアミノ酸残基がPhe、Aspであるか又は単独で欠失させられているか又はB2位の残基の欠失と組合わせて欠失されており；B30位のアミノ酸残基がThrAlaであるか又は欠失されており；かつB9位のアミノ酸残基がSer又はAspである（ただしB28位かB29位がLysであることを条件とする）点を除いて、インスリン化合物の配列を有する適切な一組の類似体が、欧州特許出願公開第1227000107号明細書（その開示全体が本発明に参照として援用されている。）の中で記されている。

40

【0038】

適切なインスリン化合物類似体のその他の例としては、Asp^{B28}ヒトインスリン、Lys^{B28}ヒトインスリン、Leu^{B28}ヒトインスリン、Val^{B28}ヒトインスリン、Ala^{B28}ヒトインスリン、Asp^{B28}Pro^{B29}ヒトインスリン、Lys^{B28}Pro^{B29}ヒトインスリン、Leu^{B28}Pro^{B29}ヒトインスリン、Val^B

50

²⁸Pro^{B29}ヒトインスリン、Ala^{B28}Pro^{B29}ヒトインスリンならびに上述の置換指針を用いて提供される類似体が含まれる。インスリン化合物フラグメントには、B22-B30ヒトインスリン、B23-B30ヒトインスリン、B25-B30ヒトインスリン、B26-B30ヒトインスリン、B27-B30ヒトインスリン、B29-B30ヒトインスリン、B1-B2ヒトインスリン、B1-B3ヒトインスリン、B1-B4ヒトインスリン、B1-B5ヒトインスリン、ヒトインスリンのA鎖、及びヒトインスリンのB鎖が含まれるがこれらに制限されるわけではない。

【0039】

適切なインスリン化合物のさらにその他の例は、「血液グルコースを制御するための不溶性組成物」という題の米国特許出願公開第20030144181A1号明細書、03年7月31日；「安定なインスリン処方物」という題の米国特許出願公開第20030104983A1号明細書、03年6月5日；「インスリン前駆体及びインスリン類似体前駆体を作製するための方法」という題の米国特許出願公開第20030040601A1号明細書、03年2月27日；「改良された安定性を有する無亜鉛及び低亜鉛インスリン調製物」という題の米国特許出願公開第20030004096A1号明細書、03年1月2日；「安定なインスリン処方物」という題の米国特許第6,551,992B1号明細書、03年4月22日；「インスリン及びインスリン類似体の改良型調製のためのCペプチド」という題の米国特許第6,534,288B1号明細書、03年3月18日；「血液グルコースを制御するための不溶性組成物」という題の米国特許第6,531,448B1号明細書、03年3月11日；「イプシロンアミノ基の選択的アシル化」という題の米国特許第RE37,971E号明細書、03年1月28日；「肺インスリン結晶」という題の米国特許出願公開第20020198140A1号明細書、02年12月26日；「不溶性インスリン組成物」という題の米国特許第6,465,426B2号明細書、02年10月15日；「脂肪酸アシル化インスリン類似体」という題の米国特許第6,444,641B号明細書、02年9月3日；「イースト中での改良された発酵収量を有するインスリン前駆体及びインスリン前駆体類似体を作製するための方法」という題の米国特許出願公開第20020137144A1号明細書、02年9月26日；「安定化されたインスリン処方物」という題の米国特許出願公開第20020132760A1号明細書、02年9月19日；「不溶性インスリン組成物」という題の米国特許出願公開第20020082199A1号明細書、02年6月27日；「アシル化インスリンの投与方法」という題の米国特許第6,335,316B1号明細書、02年1月1日；「不溶性インスリン組成物」という題の米国特許第6,268,335B1号明細書、01年7月31日；「イースト中での改良された発酵収量を有するインスリン前駆体及びインスリン前駆体類似体を作製するための方法」という題の米国特許出願公開第20010041787A1号明細書、01年11月15日；「安定化されたアシル化インスリン処方物」という題の米国特許出願公開第20010041786A1号明細書、01年11月15日；「肺インスリン結晶」という題の米国特許出願公開第20010039260A1号明細書、01年11月8日；「不溶性インスリン組成物」という題の米国特許出願公開第20010036916A1号明細書、01年11月1日；「単量体インスリン類似体の投与方法」という題の米国特許出願公開第20010007853A1号明細書、01年7月12日；「アシル化インスリンの投与方法」という題の米国特許第6,051,551A号明細書、00年4月18日；「安定なインスリン処方物」という題の米国特許第6,034,054A号明細書、00年3月7日；「インスリンリスプロ送達方法」という題の米国特許第5,970,973A号明細書、99年10月26日；「単量体インスリン類似体処方物」という題の米国特許第5,952,297A号明細書、99年9月14日；「アシル化インスリン類似体」という題の米国特許第5,922,675A、99年7月13日；「吸入されたインスリンの生物学的利用能の改良手段としての単量体インスリンの使用」という題の米国特許第5,888,477A号明細書、99年3月30日；「糖尿病患者の血液グルコースレベルを所望の範囲内に維持するための方法」という題の米国特許第5,873,358A号明細書、99年2月23日；「単量体インスリン類似体処方

10

20

30

40

50

物」という題の米国特許第5, 747, 642 A号明細書、98年5月5日；「アシル化インスリン化合物類似体」という題の米国特許第5, 693, 609 A号明細書、97年12月2日；「単量体インスリン類似体処方物」という題の米国特許第5, 650, 486 A号明細書、97年7月22日；「イプシロンアミノ基の選択的アシル化」という題の米国特許第5, 646, 242 A号明細書、97年7月8日；「安定なインスリン類似体結晶の調製」という題の米国特許第5, 597, 893 A号明細書、97年1月28日；「インスリン類似体処方物」という題の米国特許第5, 547, 929 A号明細書、96年8月20日；「安定な亜鉛インスリン化合物類似体結晶の調製」という題の米国第5, 504, 188 A号明細書、96年4月2日；「インスリン類似体処方物」という題の米国第5, 474, 978 A号明細書、95年12月12日；「単量体インスリン類似体処方物」という題の米国特許第5, 461, 031 A号明細書、95年10月24日；「インスリンを製造するためのプロセス」という題の米国特許第4, 421, 685 A号明細書、83年12月20日；「増大した亜鉛結合を伴うインスリン誘導體」という題の米国特許第6, 221, 837号明細書、01年4月24日；「真性糖尿病の治療のための薬学処方物」という題の米国特許第5, 177, 058号明細書、93年1月5日（これは、インスリン化合物-B31-Arg-OH及びヒトインスリン-B31-Arg-B32-Arg-OHを含む、B31で1つの塩基で修飾され5.8～8.5の間の等電点を有するインスリン化合物誘導體及び／又は薬学的に許容可能な賦形剤の中のその生理学的に寛容された塩のうちの少なくとも1つ、そして1μg～約200μgの亜鉛/IUの範囲の比較的高い亜鉛イオン含有量を含む薬学処方物について記述している）。上述の特許文書の各々の開示全体が、特にさまざまなインスリン化合物類似体の製造、使用及び組成について教示する目的で、本発明に参照として援用されている。

【0040】

カチオン-インスリン化合物複合体を調製するために使用されるインスリン化合物は、さまざまな認識されたペプチド合成技術、例えば従来の（溶液）方法、固相方法、半合成方法及び組換え型DNA方法のいずれかにより調製され得る。例えば、チャンス（Chance）ら、米国特許出願第07/388, 201号明細書、欧州特許第383472号明細書、ブランジェら、欧州特許第214826号明細書、及びベラガヤ（Belagaje）ら、米国特許第5, 304, 473号明細書は、さまざまなプロインスリン化合物及びインスリン化合物類似体を開示し、本発明に参照として援用されている。インスリン化合物類似体のA及びB鎖は同様に、プロインスリン化合物様の前駆体分子又は1本鎖インスリン化合物前駆体分子を介して、組換え型DNA技術を用いて調製可能である。例えば、その開示全体がペプチド合成、組換え体産生及び製造に関するそれらの教示について本発明で参照として援用されている、フランク（Frank）ら、「Peptides: Synthesis-Structure-Function」、Proc. Seventh Am. Pept. Symp.、Eds. D. Rich及びE. Gross（1981年）；Bernd Gutte、「Peptides: Synthesis, Structures, and Applications」、Academic Press（1995年10月19日）；チャン（Chan）、ウェン（Weng）及びホワイト（White）、Peter（編）、「Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach」、Oxford University Press（2000年3月）を参照のこと。

【0041】

7. 2 修飾部分

カチオン-インスリン化合物複合体錯体は、インスリン化合物複合体を提供するべくインスリン化合物に（例えば共有結合又はイオンにより）カップリングされた修飾部分を含む。修飾部分は、本書に記述されているような所望の特性をもつインスリン化合物を提供する、インスリン化合物にカップリングされる部分である。例えば修飾部分は、さまざまな環境（例えば消化管及び／又は血流）内で該インスリン化合物の分解速度を低下させることができ、かくしてこのような環境内で修飾部分の不在下であれば分解させられると思

われるよりも少ないインスリン化合物が修飾された形状で分解されることになる。好ましい修飾部分は、インスリン化合物複合体が親インスリン化合物の生物活性を治療上有意な百分率だけ保持できるようにするものである。さらに好ましい修飾部分は、両親媒性又は親水性であり、及び／又はこのインスリン化合物複合体を両親媒性又は親水性にするか又は、対応するインスリン化合物又は対応する未複合インスリン化合物といったような科学的に許容可能な対照よりも低い親油性を与えるものである。

【0042】

カチオンーインスリン化合物複合体組成物中で有用である適切な修飾部分及びインスリン化合物複合体の例は、その開示全体が本発明に参照として援用されている以下の特許の中に見い出すことができる；「アミノ含有生物活性剤のトリアルキルロック促進性重合体プロドラッグ」という題の米国特許第6,303,569号明細書、01年10月16日；米国特許第6,214,330号明細書「クマリン及び関連芳香族系重合体プロドラッグ」、01年4月10日；「生物学的活性物質に対してリンク可能な水溶性非抗原性重合体」という題の米国特許第6,113,906号明細書、00年9月5日；「実質的に純粋なヒスチジンリンクされたタンパク質重合体複合体」という題の米国特許第5,985,263号明細書、99年11月16日；「酸素運搬タンパク質の投与に付随する副作用の削減方法」という題の米国特許第5,900,402号明細書、99年5月4日；「複合安定化された治療薬組成物、それを含む送達及び診断処方物、並びにそれを作製及び使用するための方法」という題の米国特許第5,681,811号明細書、97年10月28日；「アリールイミデートで活性化されたポリアルキレンオキシド」という題の米国特許第5,637,749号明細書、97年6月10日；「ポリペプチド修飾用のポリアルキレンオキシドの活性カルボン酸塩」という題の米国特許第5,612,460号明細書、97年3月18日；「生物学的に活性な求核試薬に複合されたアズラクトン活性化型ポリアルキレンオキシド」という題の米国特許第5,567,422号、96年10月22日；「環式イミドチオンで活性化されたポリアルキレンオキシド」という題の米国特許第5,405,877号明細書、95年4月11日；及び「複合安定化されたポリペプチド組成物、それを含む治療用送達及び診断処方物、並びにそれを作製及び使用するための方法」という題の米国特許第5,359,030号明細書、94年10月25日。本発明の処方物において有用である複合ポリペプチドのさらなる例は、その明細書全体が本書に参照として援用されている以下の米国特許出願の中に見い出すことができる；米国特許出願第09/134,803号明細書、98年8月14日出願；第10/018,879号明細書、01年12月19日出願；第10/235,381号明細書、02年9月5日出願；第10/235,284号明細書、02年9月5日出願；及び第09/873,797号明細書、01年6月4日出願。以下の特許及び特許出願の各々の開示全体は、ポリペプチドを修飾するために用いられる部分に関するそれらの教示のため、本発明に参照として援用されている。

【0043】

修飾部分は、その主鎖の中に弱い又は分解可能な連結を含み得る。例えば、PAGは、加水分解の可能性あるラクチド、グリコリド、カーボネート、エステル、カルバメートなどといったような加水分解不安定連結を含むことができる。このアプローチは、重合体を、より低分子量のフラグメントへと切断させることができるようにする。かかる重合体の例は、例えばその開示全体が本発明に参照として援用されている、ハッベル（Hubbel）らに対する米国特許第6,153,211号明細書の中に記述されている。同様に、その開示全体が本発明に参照として援用されているエクウライブ（Ekuribe）らに対する米国特許第6,309,633号明細書も参照のこと。

【0044】

修飾部分は、任意の親水性部分、親油性部分、両親媒性部分、塩形成部分及びその組合せを含むことができる。代表的な親水性、両親媒性及び親油性重合体及び修飾部分が、以下でより詳細に記述されている。

【0045】

7. 2. 1 親水性部分

適切な親水性部分の例としては、PAG部分、その他の親水性重合体、糖部分、ポリソルベート部分及びそれらの組合せが含まれる。

【0046】

7. 2. 2 ポリアルキレングリコール部分

PAGは反復アルキレングリコール単位を伴う化合物である。一部の実施形態においては、該単位は全て同一である（例えば、PEG又はPPG）。その他の実施形態においては、アルキレン単位は異なっている（例えばポリエチレンーコープロピレングリコール又はPLURONICS（登録商標））。重合体は、無作為共重合体（例えば酸化エチレン及び酸化プロピレンが共重合されている）又は分枝若しくはグラフト共重合体であり得る。

10

【0047】

PEGは、好ましいPAGであり、きわめて望ましい特性を有し、食品医薬品局により一般に安全なものとみなされている（GRAS）ことから、生物学的利用分野において有用である。PEGは一般に $H-(CH_2CH_2O)_n-H$ という式を有し、ここでnは約2～約4000以上の範囲にあり得るが、キャッピング部分は、例えばモノメトキシ又はジヒドロキシと変動しうる。PEGは標準的に無色無臭、水溶性又は水混和性（分子量に応じて）、熱安定性、化学的不活性、加水分解安定性を有し、一般に無毒性である。PEGは同様に、生体適合性があり、標準的に体内で免疫応答を生成しない。好ましいPEG部分は、1、2、3、4、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、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50個以上のPEGサブユニットを含む。

20

【0048】

PEGは、単分散型、実質的に単分散型、純粋に単分散型又は実質的に純粋に単分散型（例えば、その開示全体が本発明に参照として援用されている、共に01年6月4日付けの米国特許出願第09/873,731号明細書及び米国特許出願第09/873,797号明細書において当該出願人らにより以前に記述されているようなもの）、又は多分散型であり得る。比較的低分子量の単分散型重合体を使用することの1つの利点は、それらが容易に明確な複合体分子を形成し、このことが再現可能合成及びFDA承認の両方を容易にし得るという点にある。

30

【0049】

PEGは、（インスリン化合物の残りの部分に複合される前に）各末端でヒドロキシル基と直鎖になり得る。PEGは、もう一方の末端が（インスリン化合物にカップリングされる）ヒドロキシル基であるのに対し一方の末端が比較的不活性のアルコキシ基（例えば直鎖又は分枝 OC_{1-6} ）である、メトキシ-PEG（又はmPEG）といったようなアルコキシPEGであってもよい。

【0050】

PEGは、1つの実施形態において $R(-PEG-OH)_m$ として表わされ得る分枝のものであり得、ここで式中Rはペンタエリスリトール、糖、リジン又はグリセロールといったような中心（標準的には多水酸基の）コア作用物質を表わし、nはPEGサブユニットの数を表わし、各腕について変動する可能性があり標準的には1、2、3、4、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、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、又は50であり、mは腕の数を表わし、2からコア作用物質上の付着部位の最大数Zの範囲内にある。各分岐は同じか又は異なるものであり得、例えばエーテル及び／又はエステルで終結され得る。腕の数mは、3～100以上の範囲であり得、末端ヒドロキシル基のうちの1つ以上のものがインスリン化合物の残りにカップリングされ得

40

50

、そうでなければ化学的修飾に付され得る。

【0051】

その他の分枝PEGは、式 $(CH_3O-PEG)_p R-Z$ によって表わされるものを含み、ここでPは2又は3に等しく、Rはリジン又はグリセロールといったような中心コアを表わし、Zは容易な化学的活性化に付されるカルボキシルといったような基を表わす。さらにもう1つの分枝形態であるペンダントPEGは、PEG鎖の端部ではなく、又はそれに加えてPEG主鎖に沿ってカルボキシルといった反応基を有する。分岐したPEGは、Lが連結基でありXが活性化された末端基である式 $PEG(-LCHX_2)_n$ により表わされ得る。

【0052】

7. 2. 3 糖部分

本書に記述されている修飾部分は、糖部分を含むことができる。一般に、該糖部分は、少なくとも1つのサッカロース基の炭水化物産物である。代表的な糖部分としては、グリセロール部分、単糖、2糖、3糖及びオリゴ糖そして多糖類例えばでんぷん、グリコーゲン、セルロース及び多糖類樹脂が含まれるが、これらに制限されるわけではない。特定の単糖類には、 C_6 以上の（好ましくは $C_6 \sim C_8$ ）糖例えばグルコース、フルクトース、マンノース、ガラクトース、リボース及びセドヘプツロースが含まれ、2糖及び3糖類には、スクロース、セロビオース、マルトース、ラクトース及びラフィノースといったような2つ又は3つの単糖類単位（好ましくは $C_5 \sim C_8$ ）を有する部分が含まれる。糖部分を用いた複合は、その開示全体が本発明に参照として援用されている米国特許出願第5, 681, 811号明細書、5, 438, 040号明細書及び5, 359, 030号明細書の中で記述されている。

【0053】

7. 2. 4 ポリソルベート部分

修飾部分は1つ以上のポリソルベート部分を含み得る。例としては、ソルビタンエステル及び、ポリオキシエチレンで誘導体化されたポリソルベートが含まれる。ポリソルベート部分を用いた複合は、その開示全体が本発明に参照として援用されている米国特許出願第5, 681, 811号明細書、5, 438, 040号明細書及び5, 359, 030号明細書の中で記述されている。

【0054】

7. 2. 5. 生体適合性ある水溶性ポリカチオン部分

一部の実施形態においては、生体適合性ある水溶性ポリカチオン重合体を使用することができる。生体適合性ある水溶性ポリカチオン重合体としては、例えば、ペンダント基として付着したプロトン化複素環を有するあらゆる修飾部分が含まれる。この文脈において「水溶性」というのは、修飾部分全体が、 $20 \sim 37^\circ C$ の温度で、緩衝生理食塩水又は共溶媒としての少量の添加有機溶媒を伴う緩衝生理食塩水といったような水溶液中で可溶であることを意味している。一部の実施形態では、修飾部分自体は、水溶液自体の中では十分に可溶ではないが、PEG鎖といったような水溶性重合体とのグラフト化により溶解状態になる。例としては、ポリ(D-Lys)、ポリ(オルニチン)、ポリ(Arg)又はポリ(ヒスチジン)を含む天然又は合成アミノ酸又はアミノ酸混合物のその他の正荷電ポリアミノ酸及びポリ-L-Lysなどの修飾部分側鎖又はMMD主鎖のいずれかの上にアミン基を有するポリアミン、及び非ペプチドポリアミン例えばポリ(アミノスチレン)、ポリ(アミノアクリラート)、ポリ(N-メチルアミノアクリラート)、ポリ(N-エチルアミノアクリラート)、ポリ(N, N-ジメチルアミノアクリラート)、ポリ(N, N-ジエチルアミノアクリラート)、ポリ(アミノメタクリラート)、ポリ(N-メチルアミノメタクリラート)、ポリ(N-エチルアミノメタクリラート)、ポリ(N, N-ジメチルアミノメタクリラート)、ポリ(N, N-ジエチルアミノメタクリラート)、ポリ(エチレンイミン)、第4級アミンの重合体例えばポリ(N, N, N-トリメチルアミノアクリラートクロリド)、ポリ(メタクリルアミドプロピルトリメチルアンモニウムクロリド)及びキトサンといった天然又は合成多糖類が含まれる。

【0055】

7. 2. 6 その他の親水性部分

修飾部分は同様に、その他の親水性重合体も含み得る。例としてはポリ（オキシエチル化ポリオール）例えばポリ（オキシエチル化グリセロール）、ポリ（オキシエチル化ソルビトール）、及びポリ（オキシエチル化グルコース）；ポリ（ビニルアルコール）（「PVA」）；デキストラン；炭水化物ベースの重合体などが含まれる。重合体は、直鎖又は分岐鎖の上述の重合体の単量体に基づく単独重合体、又はランダム若しくはブロック共重合体及び三元重合体であり得る。

【0056】

適切な付加的な重合体の特定の例としては、ポリ（オキサゾリン）、二官能性ポリ（アクリロイルモルホリン）（「PACM」）及びポリ（ビニルピロリドン）（「PVP」）が含まれるが、これらに制限されるわけではない。PVP及びポリ（オキサゾリン）は当該技術分野において周知の重合体であり、その調製は当業者には容易に明らかとなる。PACM及びその合成及び使用は、その開示全体が本発明に参照として援用されている米国特許第5,629,384号明細書及び米国特許第5,631,322号明細書において記述されている。

【0057】

7. 2. 7 生体接着性ポリアニオン部分

ある種の親水性重合体は、潜在的に有用な生体接着性特性を有すると思われる。かかる重合体の例は、マチオヴィツ（Mathowitz）らに対する米国特許第6,197,346号明細書中などで見い出される。カルボキシル基を含むこれらの重合体（例えば、ポリ（アクリル酸））は生体接着性を示し、本書で記述されているインスリン化合物とも容易に複合される。ポリ（ラクチド-コ-グリコリド）、ポリ無水物、及びポリオルトエステルといったような、分解時点でカルボン酸基を曝露する急速生体内崩壊性重合体が、同様に、生体接着性重合体でもある。これらの重合体は、インスリン化合物を消化管に送達するのに使用可能である。重合体が分解するにつれて、それらはカルボン酸基を曝露してそれらが消化管に強く接着できるようにすることができ、又インスリン化合物複合体の送達を助けることができる。

【0058】

7. 2. 8 親油性部分

一部の実施形態においては、修飾部分は1つ以上の親油性部分を含んでいる。親油性部分は、アルキル部分、アルケニル部分、アルキニル部分、アリール部分、アリールアルキル部分、アルキルアリール部分、脂肪酸部分、アダマンタンチル、及びコレステリルならびに親油性重合体及び／又はオリゴマを含めた（ただしこれらに制限されるわけではない）当業者であれば理解できるようなさまざまな親油性部分であり得る。

【0059】

アルキル部分は、飽和又は不飽和、直鎖、分枝又は環状炭化水素鎖であり得る。一部の実施形態においては、該アルキル部分は、1、2、3、4、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、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50個以上の炭素原子を有する。例としては、飽和、直鎖アルキル部分、例えばメチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペンタデシル、ヘキサデシル、オクタデシル、ノナデシル及びエイコシル；飽和、分枝アルキル部分例えば、イソプロピル、sec-ブチル、tert-ブチル、2-メチルブチル、tert-ペンチル、2-メチルペンチル、3-メチルペンチル、2-エチルヘキシル、2-プロピルペンチル及び、ビニル、アリル、1-ブテニル、2-ブテニル、エチニル、1-プロピニル及び2-プロピニルを含む（ただしこれらに制限されるわけではない。）上述の飽和アルキル部分から誘導された不飽和アルキル部分が含まれる。その他の実施形態では、アルキル部分は低級アル

10

20

30

40

50

キル部分である。さらにその他の実施形態においては、アルキル部分は、 $C_1 \sim C_3$ の低級アルキル部分である。一部の実施形態においては、修飾部分は特定のアルキル部分で構成されておらず、又は特定の低級アルキル部分で構成されておらず、又は特定のアルカン部分で構成されておらず、又は特定の低級アルカンで構成されていない。

【0060】

アルキル基は、未置換であるか又は1つ以上の置換基で置換されるかのいずれかであり得、かかる置換基は好ましくは、複合体の合成方法と干渉もせず、又複合体の生物活性を除去もしない。潜在的に干渉する官能基は、その官能基を非干渉性にするべく保護基で適切に遮断され得る。各置換基は任意には、付加的な非干渉性置換基と置換され得る。「非干渉性」という用語は、いずれかの反応を本発明のプロセスに従って実施する実現可能性を無くさないものとして置換基を特徴づけする。

10

【0061】

親油性部分は、天然又は合成の飽和又は不飽和の、直鎖又は分枝の脂肪酸部分といったような脂肪酸部分であり得る。一部の実施形態においては、脂肪酸部分は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24個以上の炭素原子を有する。一部の実施形態では、修飾部分は特定の脂肪酸部分で構成されず、又は特定の2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24個以上の炭素原子を有する脂肪酸部分で構成されない。

【0062】

20

修飾部分がアリール環を含む場合、この環は、分子内でカルバメート部分と反応しその加水分解を助けることができるような形で位置づけされる求核官能基（例えばOH又はSH）で官能化され得る。一部の実施形態においては、該求核基は、インビボで加水分解されるか又はその他の形で分解される能力をもつ保護基で保護され、その結果該保護基が脱保護された時点で、複合体の加水分解及び結果としての親インスリン化合物の放出が容易になる。

【0063】

適切な修飾部分のその他の例としては、 $-C(CH_2OH)_3$ ； $-CH(CH_2OH)_2$ ； $-C(CH_3)_3$ ； $-CH(CH_3)_2$ が含まれる。

【0064】

30

7. 2. 9. 両親媒性部分

一部の実施形態においては、修飾部分は両親媒性部分を含んでいる。数多くの重合体及びオリゴマが両親媒性である。これらは往々にして、直鎖、分岐又はグラフト重合体又は共重合体といったような重合体及び／又はオリゴマの形をしている可能性のある、親水性及び親油性部分を含むブロック共重合体、分岐共重合体又はグラフト共重合体である。

【0065】

両親媒性修飾部分は、本書で記述されている親油性及び親水性部分のいずれかの組合せを含み得る。かかる修飾部分は標準的に、往々にしてこの修飾部分の末端端部にある例えばハロ、ヒドロキシ、アミン、チオール、スルホン酸、カルボン酸、イソシアナート、エポキシ、エステルなどといった少なくとも1つの反応性官能基を含んでいる。これらの反応性官能基は、親油性直鎖又は分岐鎖アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル又はアルキルアリール基、又は親油性重合体又はオリゴマを付着するために使用され得、かくして修飾部分の親油性を増大させる（そして、これらを一般的に両親媒性にする）。

40

【0066】

親油基は、例えば、モノ又はジカルボン酸から誘導され得、又該当する場合には、無水物又は酸塩化物といったようなカルボン酸の反応性等価物から誘導され得る。親油基のための適切な前駆体の例としては、酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸、イソ酪酸、トリメチル酢酸、カプロン酸、カプリル酸、ヘプタン酸、カプリン酸、ペラルゴン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、ベヘン酸、リグノセリン酸、セラト酸

50

(ceratic acid)、モンタン酸、イソステアリン酸、イソノナン酸、2-エチルヘキサン酸、オレイン酸、リシノール酸、リノール酸、リノレン酸、エルカ酸、大豆脂肪酸、亜麻仁脂肪酸、脱水ヒマシ油脂肪酸、トール油脂肪酸、油桐脂肪酸、ヒマワリ脂肪酸、紅花脂肪酸、アクリル酸、メタクリル酸、無水マレイン酸、無水オルトフタル酸、テレフタル酸、イソフタル酸、アジピン酸、アゼライン酸、セバシン酸、無水テトラヒドロフタル酸、無水ヘキサヒドロフタル酸、コハク酸及びポリオレフェインカルボン酸がある。

【0067】

末端親油基は等価である必要はない。すなわち、結果としての共重合体は、同じ又は異なるものである末端親油基を含み得る。親油基は、以上で定義されているように2つ以上のモノ又はジ官能性アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、アリールアルキル又はアルキルアリール基から誘導され得る。

10

【0068】

7. 2. 10 P A G-アルキル修飾部分

修飾部分は、1つ以上の直鎖又は分枝P A G部分及び／又は2つ以上の直鎖又は分枝、置換又は未置換アルキル部分を有する直鎖又は分枝重合体部分であり得る。あるケースでは、かかる分子は両親媒性とみなされる。しかしながらP A G及びアルキル部分は、かかる部分をさらに親油性の又はさらに親水性のものにするべく変動し得る。一部の実施形態では、修飾部分は特定のアルキル部分で構成されておらず、又その他の実施形態では修飾部分は特定のアルカン部分で構成されていない。

20

【0069】

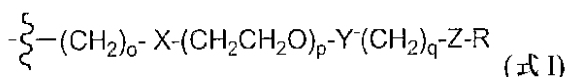
一部の実施形態におけるP A G部分は、直鎖又は分枝形状に配置された1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25個のP A Gサブユニットを含む。一部の実施形態におけるP A G部分はP E G、P P G及び／又はP B Gサブユニットを含む。一部の実施形態におけるアルキル部分は、好ましくは2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20個の炭素原子を有する。アルキル部分は、好ましくはアルカン部分である。修飾部分は $-OCH_3$ といったようなキャッピング部分を含み得る。さらに、修飾部分はピバロイル基といったような疎水基を含み得る。

30

【0070】

一の実施形態において、修飾部分は、

【化4】



という式を有し、式中、o、p及びqは独立して0、1、2、3、4、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、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、又は50であり、o、p及びqのうち少なくとも1つは少なくとも2である。X、Y及びZは独立して $-C-$ 、 $-O-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、及び $-C(O)NH-$ の中から選択され、RはH又はアルキル、好ましくは低級アルキル、より好ましくはメチルである。変数o、p及びqは好ましくは、親水性又は両親媒性の修飾部分を生成するように選択され、好ましくは、親水性又は両親媒性のインスリン化合物複合体、好ましくはモノ複合体、ジ複合体又はトリ複合体を生成するべくインスリン化合物との関係において選択される。基礎インスリン化合物維持のために使用されるべきインスリン化合物複合体のための1つの好ましい実施形態においては、該インスリン化合物に近位のP A G及びインスリン化合物に遠位のアルキル部

40

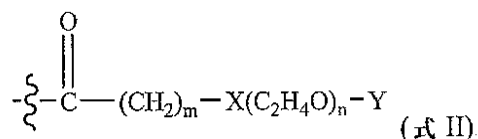
50

分を生成するように o、p 及び q が選択されている。代替的には、O、P 及び Q は、インスリン化合物に遠位の P A G 及びインスリンに近位のアルキルを生成するべく選択可能である。一の変形実施形態においては、R はピバロイル基又はアルキルピバロイル基である。

【0071】

関係する実施形態においては、修飾部分は

【化5】



10

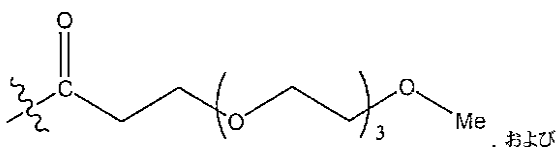
という式を有し、ここで式中 m は 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は 25 であり、n は 2～100、好ましくは 2～50、より好ましくは 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 又は 25 であり、X は ---C--- 、 ---O--- 、 ---C(O)--- 、 ---NH--- 、 ---NHC(O)--- 又は ---C(O)NH--- であり、Y は低級アルキル又は ---H である。X は好ましくは O であり、Y は好ましくは ---CH_3 である。一部のケースでは、カルボニル基 (---C(O)---) は不在であってよく、 $\text{---(CH}_2\text{)---}$ 部分は、ヒドロキシ基又は遊離カルボン酸基といったようなアミノ酸上の利用可能な基にカップリングされ得る。

20

【0072】

好ましい実施形態においては、修飾部分は

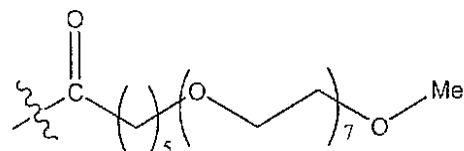
【化6】



(直前の修飾部分が B 2 9 にあるヒトインスリンにカップリングされている場合、結果としてのモノ複合体は I N 1 0 5 と呼ばれる)、及び

30

【化7】



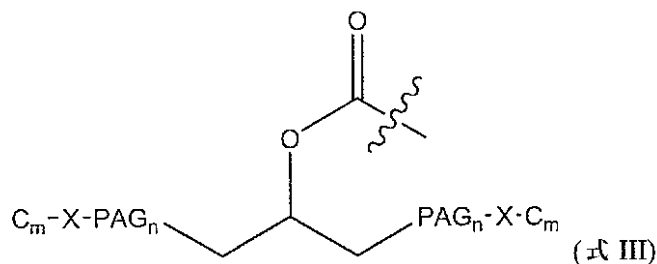
(直前の修飾部分が B 2 9 でヒトインスリンにカップリングされている場合、結果としてのモノ複合体は H I M 2 と呼ばれる)、
から選択された構造を有する。以上の部分のいずれかを、例えば A 1、B 1 又は B 2 9 などの求核残基においてヒトインスリンにカップリングさせることができる。一部のケースでは、カルボニル基 (---C(O)---) は不在であるか又はアルキル部分、好ましくは低級アルキル部分と交換してもよく、 $\text{---(CH}_2\text{)---}$ 部分は、ヒドロキシ基又は遊離カルボン酸基といったようなアミノ酸上の利用可能な基にカップリングされ得る。

40

【0073】

もう 1 つの実施形態においては、修飾部分は、

【化 8】

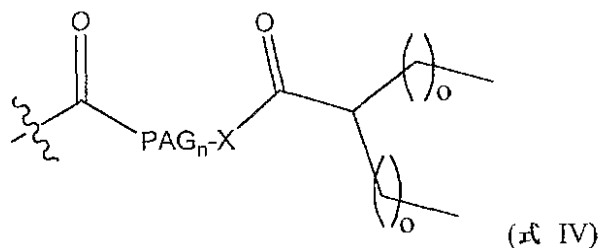


という式を有し、各々のCは独立して選択され、m個の炭素をもつアルキル部分であり、mは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20であり；各PAGは独立して選択され、n個のサブユニットを有するPAG部分であり、nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25であり；各々のXは、独立して選択され、PAGをCにカップリングさせる連結基であり、好ましくは-C-、-O-、-C(O)-、-NH-、-NHC(O)-又は-C(O)NH-である。一部の実施形態においては、C_m-X部分は不在であり、PAG_n部分は-OH部分又は-OCH₃部分で終結される。例えば、PAGは、PEG、PPG及び／又はPBGサブユニットを含む1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個のPAGサブユニットを有するメトキシ終端PAG又はヒドロキシ終端PAGであり得る。一部のケースでは、カルボニル基(-C(O)-)を、ヒドロキシ基又は遊離カルボン酸基といったようなアミノ酸上の利用可能な基にカップリングされ得るアルキル部分、好ましくは低級アルキル部分で交換することができる。

【0074】

修飾部分は、例えば

【化 9】

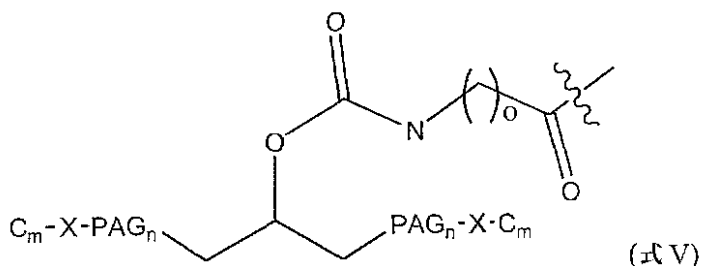


という式を有することができ、ここで各々のCは独立して選択され、m個の炭素をもつアルキル部分であり、mは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20であり；各PAGは独立して選択され、n個のサブユニットを有するPAG部分であり、nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25であり；Xは、-O-又は-NH-であり；各々のOは、独立して選択され1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14又は15である。例えば、PAGは、PEG、PPG及び／又はPBGサブユニットを含む1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個のPAGサブユニットを有し得る。一部のケースでは、付着点に近位のカルボニル基(-C(O)-)は不在であるか、そうでなければ、アルキル部分、好ましくは低級アルキル部分と交換してもよく、-(CH₂)-部分は、ヒドロキシ基又は遊離カルボン酸基といったようなアミノ酸上の利用可能な基にカップリングされ得る。

【0075】

修飾部分は、例えば、

【化 10】

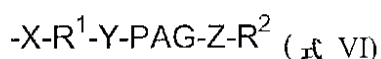


という式を有することができ、各々のCは独立して選択され、m個の炭素をもつアルキル部分であり、mは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20であり；各PAGは独立して選択され、n個のサブユニットを有するPAG部分であり、nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25であり；各々のXは、独立して選択され、PAGをCにカップリングさせる連結基であり、好ましくは-C-、-O-、-C(O)-、-NH-、-NHC(O)-、又は-C(O)NH-であり、各々のOは独立して選択され、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14又は15である。一部の実施形態においては、Cm-X部分は不在であり、PAG_n部分は-OH部分又は-OCH₃部分で終結される。例えば、PAGは、PEG、PPG及び／又はPBGサブユニットを含む1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個のPAGサブユニットを有するメトキシ末端PAG又はヒドロキシ末端PAGであり得る。一部のケースでは、付着点に近位のカルボニル基(-C(O)-)は不在であり得、-(CH₂)-部分は、ヒドロキシ基又は遊離カルボン酸基といったようなアミノ酸上の利用可能な基にカップリングされ得る。

【0076】

もう1つの実施形態においては、修飾部分は、

【化 11】



という式を有してよく、式中、

- X、Y、及びZは、独立して選択された連結基であり、各々は任意に存在し、Xが存在する場合それは共有結合によりインスリン化合物にカップリングされており、
- R¹及びR²のうちの少なくとも1つが存在し、それは低級アルキルであり、任意にはカルボニル基を含み、
- R²は-CH₃、-H、トシレートといったようなキャッピング基であり、そうでなければ活性化基であり、
- PAGは、1つ以上のアルカレングリコール部分を取込み（すなわちオキシアルカレン部分）、任意には-S-、-O-、-N-、及び-C(O)-からなる群から選択された1つ以上の付加的部分を取込む直鎖又は分枝炭素鎖であり、
- 修飾部分は、最大3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25個の重原子を有する。

【0077】

本発明の実施形態においては、X、Y及びZのうちのいずれか1つ又は複数のものが不在であってよい。さらに、X、Y及び／又はZが存在する場合、それらは独立して-C(O)-、-O-、-S-、-C-及び-N-の中から選択され得る。一実施形態では、Zは-C(O)-である。もう1つの実施形態では、Zは存在しない。

【0078】

一部の実施形態において、 R^1 は低級アルキルであり、 R^2 は存在しない。その他の実施形態においては、 R^2 は低級アルキルであり、 R^1 は存在しない。

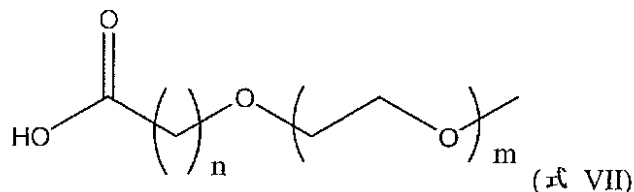
【0079】

もう1つの実施形態においては、該修飾部分は、 $-C-$ 、 $-C-$ 、 $-O-$ 、 $=O$ 、 $-S-$ 、 $-N-$ 、 $-Si-$ からなる群から選択された3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25個の原子の主鎖をもつ直鎖又は分枝の置換炭素鎖部分を含み得る。重原子は標準的には1つ以上の炭素原子及び、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N-$ 及び $=O$ からなる群から選択された1つ以上の非炭素重原子を含むことになる。炭素原子及び非炭素重原子は標準的には、各非炭素重原子あたり少なくとも1個の炭素原子、好ましくは各非炭素重原子あたり少なくとも2個の炭素原子、より好ましくは各非炭素重原子あたり少なくとも3個の炭素原子という比率で存在する。炭素原子及び酸素原子は標準的には各酸素原子あたり少なくとも1個の炭素原子、好ましくは各酸素原子あたり少なくとも2個の炭素原子、より好ましくは各酸素原子あたり少なくとも3個の炭素原子という比率で存在する。修飾部分は、分枝又は直鎖 C_{1-6} 、分枝又は直鎖、又はカルボニルといった1つ以上のキャッピング基を含み得る。修飾部分は標準的には水素を含み、水素のうちの1つ以上のものは、（重原子であるものの上記式中では重原子として計数すべきでない）フッ素で置換され得る。修飾部分は、一部のケースでは特定の未置換アルキル部分を除外し得る。修飾部分は例えば、アミノ酸上の利用可能な基、例えばアミノ基、ヒドロキシル基又はカルボン酸基ポリペプチドに対して、例えばカルバメート、カルボナート、エーテル、エステル、アミドといったような連結基、又は第2級アミン基又はジスルフィド結合によってカップリングされ得る。連結基内の分子は修飾部分の一部として計数される。好ましい実施形態においては、修飾部分の分子量はHIM2修飾部分の分子量より小さい。

【0080】

本発明は、

【化12】

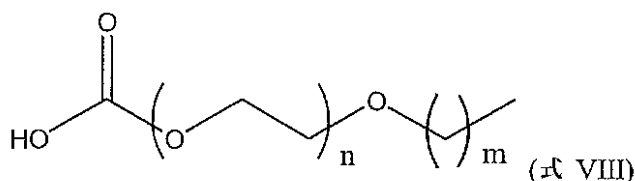


（なお式中、 n は、1、2、3又は4であり m は1、2、3、4又は5である）
という式をもつ修飾部分を含む。

【0081】

本発明は、

【化13】

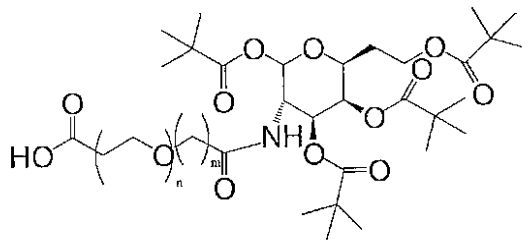


（なお式中、 n は、1、2、3、4又は5であり m は1、2、3又は4である）
という式をもつ修飾部分を含む。

【0082】

本発明は、

【化 1 4】



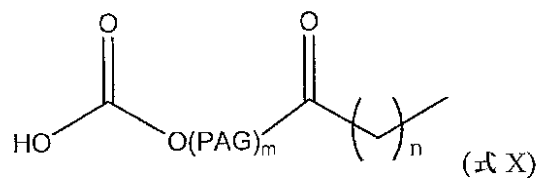
(式 IX)

という式を有し、式中、 m が1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20であり、 n が1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20である、修飾部分を含む。

【0083】

本発明は、

【化 1 5】



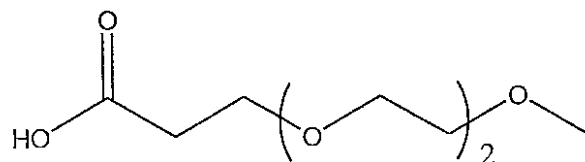
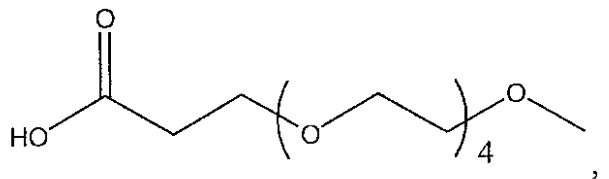
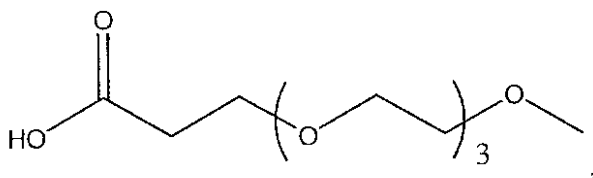
(式 X)

という式を有し、式中PAGが m 個のサブユニットを有するPAG部分であり、 m が1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20であり、 n が1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20である、修飾部分をも含んでいる。

【0084】

その他の好ましい修飾部分は、

【化 1 6】



10

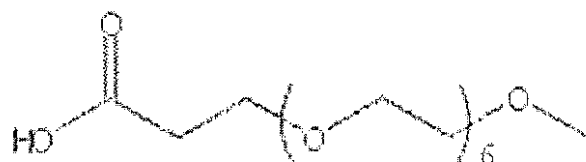
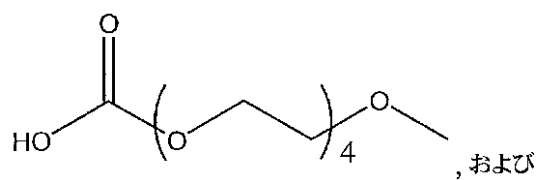
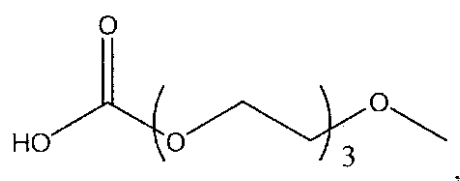
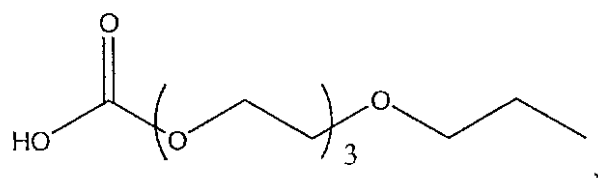
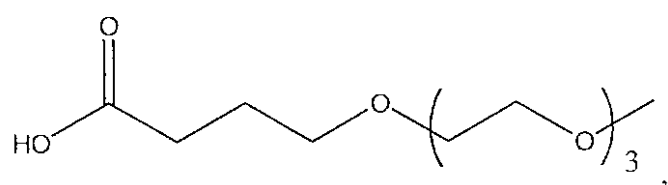
20

30

40

50

【化 1 7】

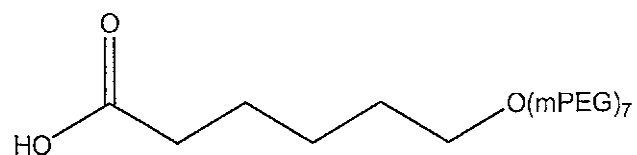


を含む

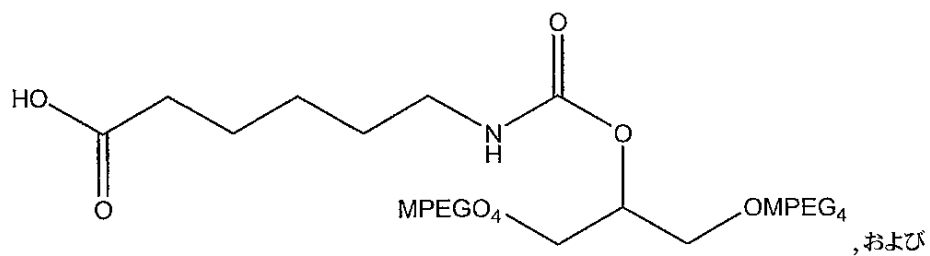
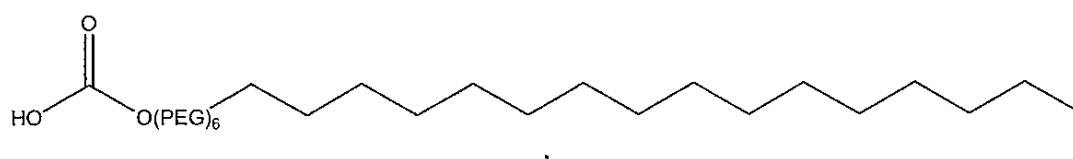
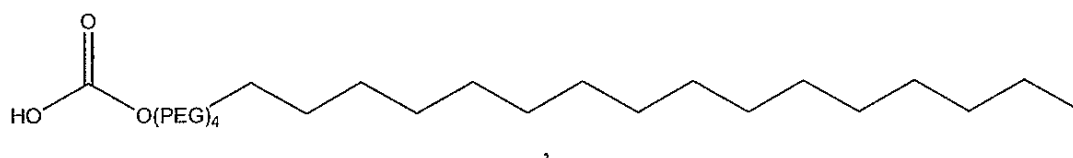
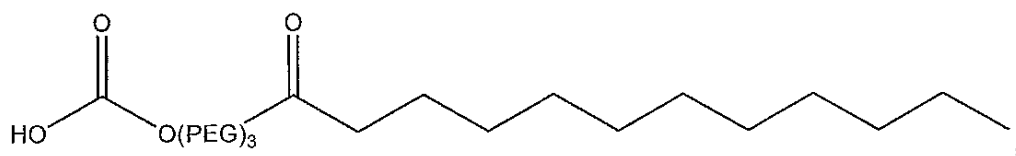
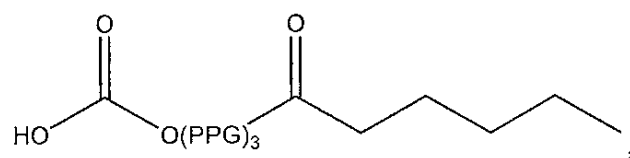
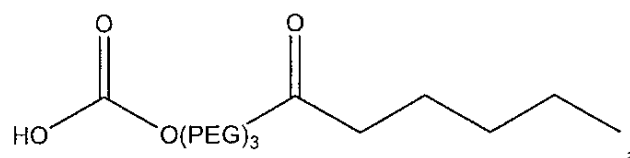
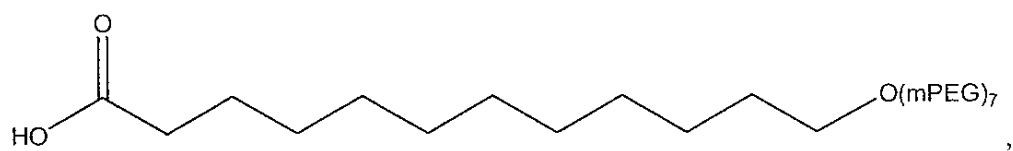
【 0 0 8 5 】

以下の修飾部分は、基礎インスリン化合物交換投薬計画において使用するために特に好ましいものであり得る。

【化 1 8】



【化 1 9】



10

20

30

40

[illegible]

10

【化 2 1】

40

[illegible]

20

30

40

[illegible]

20

40

[illegible]

[illegible]

40

[illegible]

[illegible]

なお式中、Rは—H、—OH、—CH₂OH、—CH(OH)₂、—C(O)OH、—CH₂C(O)OH又は活性化部分例えばカルボジイミド、混合無水物又はN—ヒドロキシスクシンイミド、又はキャッピング基である。本発明は同様に、タンパク質又はペプチド、好ましくはインスリン化合物に付着したこのような部分をも含む。以下では、特定の複合戦略についてより詳細に論述する。これらの修飾部分のうち、好ましい部分は、インスリン化合物を対応する未複合インスリン化合物よりも低い親油性及び／又は高い親水性を有するものにするものである。本発明はさらに1つ以上のカルボニル基、好ましくは1、2、3、4又は5個のカルボニル基を含むこのような修飾部分を含んでおり、このカルボニル基は、該修飾部分内に挿入されてもよいし又はカルボニルで—O—又は—CH₂—を交換することもできる。さらに、—CH₂—又は—CH₃部分のうちのいずれかを例えば、同じ又は異なるものであり得る1、2、3、4又は5個のPAGサブユニットを有するPAG鎖又は—OH又は低級アルキルで置換することもできる。好ましくはRは、各—O—が最も近い—O—から少なくとも2個の炭素だけ分離されるような形で選択される。本発明は同様に、2つ以上の部分がリジンといったような分岐部分に付着している分枝修飾部分をも含む。

本発明の実施形態に従った複合体の親水性／親油性といったような薬学的特性は例えば、PAG単量体の数、アルキル鎖のタイプ及び長さ、PAG－ペプチド連結の性質及び複合部位の数を増減させることによって、修飾部分の親油性及び親水性部分を調整することによって変動させることができる。修飾部分－ペプチド連結の正確な性質は、それが生理学的pHで又は血漿中での加水分解に対し敏感でかつ／又は安定しているような形で変動可能である。本発明は同様に、ポリペプチド、好ましくはインスリン化合物に対してカッ

プリングされた上述の修飾部分のいずれかをも含む。好ましくは、修飾部分は、ポリペプチドを例えば少なくとも1.05、1.25、1.5、1.75、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、又は15という乗数だけ対応する未複合ポリペプチドより大きい溶解度をもつものにする。本発明の修飾部分は、例えば、利用可能なあらゆる付着点においてヒトインスリンといったようなインスリン化合物にカップリングされ得る。好ましい付着点は、求核残基例えばA1、B1及び／又はB29である。

【0088】

さらには、本発明の1つの態様が、カルボン酸形態での、式VII及びVIIIの部分といったような（ただしこれらに制限されるわけではない）新規の修飾部分を含むことがわかるだろう。さらに、修飾部分がカルボキシル基を含む場合、それを混合無水物に転換させ、アミド結合を含有する複合体を作り上げるべくペプチドのアミノ基と反応させることができる。もう1つの手順においては、カルボキシル基を水溶性カルボジイミドで処理し、ペプチドと反応させて、アミド結合を含有する複合体を生成することができる。その結果、本発明は、式VII及びVIIIの修飾部分の活性化された形態及びカルボジイミド、混合無水物又はN-ヒドロキシスクシンイミドといったような本発明のその他の新規のオリゴマといったような、本書で提示された新規の部分の活性化された形態を含んでいる。

【0089】

一部のケースでは、修飾部分は、アミノ酸又はC末端にカップリングされた2つ以上の一連のアミノ酸、又はポリペプチドの側鎖を介してポリペプチドに対してカップリングされ得る。例えば、1つの実施形態においては、修飾部分は、Thrの-OH又は-C(O)OHでカップリングされ、mm修飾されたThrは、カルボキシ末端でポリペプチドにカップリングされる。例えば、一実施形態においては、修飾部分は、Thrの-OH又は-C(O)OHでカップリングされ、修飾されたThrはdes-Thrインスリン化合物のB29アミノ酸（例えばヒトインスリンのためのB29Lys）にカップリングされる。もう1つの例では、mmは、インスリン化合物B鎖から末端オクタペプチドのThrの-OH又は-C(O)OHでカップリングされ、mm修飾されたオクタペプチドは、des-オクタインスリン化合物のB22アミノ酸にカップリングされる。その他の変形形態は、本明細書に照らして当業者には明白となるであろう。

【0090】

7.2.11 塩形成部分

一部の実施形態においては、修飾部分は塩形成部分を含む。塩形成部分は、カルボキシル酸及びアンモニウムを含め（ただし、これらに制限されるわけではない。）当業者であれば理解できる通り、さまざまな適切な塩形成部分であり得る。修飾部分が塩形成部分を含んでいる一部の実施形態においては、インスリン化合物複合体は塩形態で提供される。これらの実施形態では、インスリン化合物複合体は、例えばクロロ、ブロモ、ヨード、ホスファート、アセタート、カルボナート、スルファート、トシレート及びメシレートといった陰イオン、又はナトリウム、カリウム、カルシウム、リチウム及びアンモニウムといった陽イオンを含めて（ただし、これらに制限されるわけではない。）、当業者であれば理解できる通りの適切な薬学的に許容可能な対イオンと会合させられる。

【0091】

修飾部分の以上の例は、例示を目的とするものであり、いかなる形であれ制限的なものとしてみなされるべきではない。当業者であれば、本書に開示され請求されている化学的複合機序の限界内で、特定の機能性を達成するのに適した複合用部分が可能であるということ認識することだろう。従って、本書で開示されている原理に従って、付加的な部分を選択し使用することができる。

【0092】

7.3 複合戦略、

例えばインビボ分解を受ける可能性が低く従って血漿半減期が増大している複合体を生成するために、修飾部分との複合度、分子上の複合部位の選択及び修飾部分の選択といったような因子を変動させることができる。例えば、修飾部分の会合を容易にするのに適した適切な付着（すなわち修飾部分複合）部位においてインスリン化合物構造上の1、2、3、4、5個以上の部位に修飾部分を含むようにインスリン化合物を修飾させることが可能である。一例を挙げると、かかる適切な複合部位は、リジンアミノ酸残基といったようなアミノ酸残基を含み得る。

【0093】

一部の実施形態においては、インスリン化合物複合体はモノ複合体である。その他の実施形態においては、インスリン化合物複合体は、ジ複合体、トリ複合体、テトラ複合体、ペンタ複合体などといったようなマルチ複合体である。インスリン化合物上の修飾部分の数は、インスリン化合物上の複合部位の数によってのみ制限される。さらにその他の実施形態においては、インスリン化合物複合体はモノ複合体、ジ複合体、トリ複合体、テトラ複合体及び／又はペンタ複合体の混合物である。

10

【0094】

好ましい複合戦略は、親インスリン化合物の生物活性の一部分又は全てを関連づける複合体を生み出すような戦略である。

【0095】

好ましい付着部位には、A1N末端、B1N末端、及びB29リジン側鎖が含まれる。B29モノ複合体及びB1、B29ジ複合体がきわめて好ましい。もう1つの好ましい付着点は、インスリン化合物のCペプチド構成要素又はリーダーペプチド構成要素上のアミノ官能基である。

20

【0096】

インスリン化合物に対し1つ以上の修飾部分（すなわち単一の又は複数の修飾部分構造）をカップリングすることができる。複数の中の修飾部分は好ましくは同じものである。ただし、複数の中の修飾部分が互いに異なるものであり得る、又は代替的には、複数の中の修飾部分の一部分が同じであり、一部分が異なるものであり得る、ということも理解すべきである。複数の修飾部分がインスリン化合物にカップリングされている場合、加水分解型結合でインスリン化合物に対し1つ以上の修飾部分をカップリングさせ、非加水分解型結合でインスリン化合物に対し1つ以上の修飾部分をカップリングさせることが好ましい可能性がある。代替的には、インスリン化合物に対し該複数の修飾部分をカップリングする結合は全て、加水分解型であり得るものの、例えば1つ以上の修飾部分が体内で加水分解によりインスリン化合物から比較的急速に除去され得かつ1つ以上の該修飾部分が体内で加水分解によりインスリン化合物からより低速で除去されるような形でさまざまな度合の加水分解性を有する可能性もある。

30

【0097】

7. 3. 1 インスリン化合物に対する修飾部分のカップリング

修飾部分は、好ましくはインスリン化合物に共有結合によりカップリングされる。修飾部分上の2つ以上の部分が、インスリン化合物に対し共有結合によってカップリングされ得る。カップリングは、加水分解型又は非加水分解型結合又はこれら2つの混合（すなわち異なる複合部位での異なる結合）を利用し得る。

40

【0098】

一部の実施形態では、インスリン化合物は、加水分解型結合（例えばエステル、カーボネート又は加水分解型カルバメート結合）を用いて修飾部分にカップリングされる。加水分解型カップリングの使用により、プロドラッグとして作用するインスリン化合物複合体が提供されることになる。プロドラッグアプローチは、修飾部分複合部位がインスリン化合物の結合領域内にある場合といったような、インスリン化合物-修飾部分複合体が不活性である（すなわち、複合体にインスリン化合物の一次的作用機序を通して体に影響を及ぼす能力が欠如している）場合に、望ましい可能性がある。加水分解型カップリングの使用は同様に、活性薬物を提供するために1つ以上の修飾部分とそのそれぞれのインスリン

50

化合物－修飾部分複合体から分割されるにつれて一定の与えられた時限全体にわたりインスリン化合物を投与する、時間放出又は制御放出効果を提供することもできる。

【0099】

その他の実施形態においては、インスリン化合物は、非加水分解型結合（例えば非加水分解型カルバメート、アミド又はエーテル結合）を利用して修飾部分にカップリングされる。非加水分解型結合の使用は、例えば投与後少なくとも2時間という長い時間血流内を治療上有意な量のインスリン化合物複合体が循環できるようにすることが望まれる場合に、好ましい可能性がある。インスリン化合物を非加水分解式に修飾部分に共有結合によりカップリングするのに使用される結合は、標準的に共有結合、エステル部分、カーボナート部分、カルバメート部分、アミド部分及び第2級アミン部分からなる群から選択される。

10

【0100】

修飾部分は、求核ヒドロキシル官能基及び／又はアミノ官能基を含めた（ただし、これらに制限されるわけではない。）さまざまな求核残基においてインスリン化合物にカップリングされ得る。求核ヒドロキシル官能基は、例えば、セリン及び／又はチロシン残基において見い出され、求核アミノ官能基は例えばヒスチジン及び／又はLys残基において及び／又はインスリン化合物のA又はB鎖の2つ以上のN末端において見い出され得る。修飾部分がナトリウム利尿ペプチドのN末端にカップリングされる場合、カップリングは好ましくは第2級アミンを形成する。

【0101】

修飾部分は、例えば、チオエステル、チオエーテル又はスルホナート結合を形成することにより、遊離-SH基においてインスリン化合物にカップリングされ得る。

20

【0102】

修飾部分は、2つ以上のアミノ基を介してインスリン化合物にカップリングされ得る。ヒトインスリンにおける例は、A1、B1及びB29にアミノ基を含んでいる。一の実施形態においては、インスリン化合物上の単一のアミノ基に対し単一の修飾部分がカップリングされる。もう1つの実施形態においては、インスリン化合物上の異なるアミノ基に対し2つの修飾部分が各々結びつけられる。2つのアミノ基にカップリングされた2つの修飾部分が存在する場合、好ましい配置はB1及びB29におけるカップリングである。多数の重合体が存在する場合、重合体は全て同じであってよく、そうでなければ、重合体のうちの1つ以上のものがその他のものと異なっていてよい。インスリン化合物に対する重合体のカップリングのさまざまな方法及びタイプが、その開示全体が本発明に参照として援用されている01年6月04日付けの「ポリアルキレングリコールを含むインスリン化合物複合体の混合物、その使用及びその製造方法」という題の米国特許出願第09/873,899号明細書の中で記述されている。

30

【0103】

さらにもう1つの実施形態においては、修飾部分の一部が加水分解される部分的プロドラッグアプローチを使用することができる。例えば、親油性構成要素がインビボで加水分解してマイクロペグ化複合体を生成する親水性及び親油性構成要素をもつ修飾部分について記述している、（その開示全体が本発明に参照として援用されている）エクウライブらに対する米国特許第6,309,633号明細書を参照のこと。

40

【0104】

7. 3. 2 修飾部分の選択及びインスリン化合物複合体及びその錯体の特性

修飾部分は、インスリン化合物複合体及びその錯体に対し所望の属性を提供するように選択され得る。好ましい修飾部分は、該インスリン化合物を、この修飾部分の不在下でのインスリン化合物の水溶解度に比べ水溶液中でより可溶なものにする、好ましくは水溶液中で親インスリン化合物（すなわち対応する未複合インスリン化合物）よりも少なくとも1.05、1.25、1.5、1.75、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5又は15倍の溶解度を有するも

50

のにするように選択される。例えば未錯化未変性ヒトインスリンは、約7.4のpHで最高18mg/mlの溶解度を有する。発明者らは、驚くべきことに、少なくとも1.05、1.25、1.5、1.75、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、又は15の乗数だけヒトインスリンよりも大きい溶解度を有するヒトインスリン複合体を錯化する方法を発見した。

【0105】

ある種の実施形態においては、修飾部分は、約4～約8の範囲内のpH、好ましくは約5～約7.5の範囲内のpH、理想的には約7.4のpHで1g/L、2g/L、3g/L、4g/L、5g/L、20g/L、50g/L、100g/Lさらには150g/Lを上回る水溶解度を有するインスリン化合物複合体を提供するように選択される。

10

【0106】

当該技術分野は、対応する未複合インスリン化合物といったような科学的に許容可能な対照よりも哺乳動物においてより高い経口生物学的利用能を有するものであり得る。その他の実施形態においては、インスリン化合物複合体は、対応する未複合インスリン化合物といったような科学的に許容可能な対照よりもヒトにおいてより高い経口生物学的利用能を有する。一部の実施形態では、例えば複合体の血漿レベルにより測定されるようなインスリン化合物複合体の吸収は、未複合インスリン化合物対照の吸収よりも少なくとも1.5、2、2.5、3、3.5又は4倍高い。

【0107】

20

本発明の一部の態様では、修飾部分は、インスリン化合物複合体に対応する未複合インスリン化合物よりも高い溶解度を有するものにするように選択されるものの、その他の態様では、修飾部分は同様に又は代替的に、インスリン化合物複合体に対応する未複合インスリン化合物以上の親水性をもつものにするように選択され得る、ということがわかるだろう。さらに、修飾部分は、インスリン化合物複合体に対応する未複合インスリン化合物よりも両親媒性の高いものにするように選択され得る。

【0108】

一部の実施形態では、カチオンーインスリン化合物複合体錯体は、(a) 対応する未錯化インスリン化合物複合体、(b) 対応する未錯化かつ未複合インスリン化合物、及び/又は(c) 対応する錯化され、かつ、未複合のインスリン化合物以上の水溶性を有している。

30

【0109】

好ましい実施形態においては、インスリン化合物複合体の水溶性は、 Zn^{++} を添加することによって低減される。一部の実施形態では、修飾部分は、インスリン化合物複合体に対応する未複合インスリン化合物以上の溶解度を有するものにするように選択されており、インスリン化合物複合体の水溶性は亜鉛の添加によって低減される。その他の実施形態においては、修飾部分は、インスリン化合物複合体に対応する未複合インスリン化合物以上の溶解度を有するものにするように選択されており、インスリン化合物複合体の水溶性は亜鉛添加により低減され、カチオン錯体の水溶性は、インスリン化合物の水溶性よりも大きい。もう1つの態様においては、インスリン化合物複合体は、脂肪酸アシル化インスリン化合物であり、カチオンは亜鉛であり、インスリン化合物複合体の水溶性は亜鉛添加により低減される。さらにもう1つの実施形態においては、インスリン化合物複合体は、対応する未複合インスリン化合物以上の水溶性をもつ脂肪酸アシル化インスリン化合物であり、カチオンは亜鉛であり、インスリン化合物複合体の水溶性は亜鉛の添加により低減される。

40

【0110】

ある好ましい実施形態においては、対応する親インスリン化合物と比べたインスリン化合物複合体の親油性は1以下である。対応する親インスリン化合物に比べたインスリン化合物複合体の相対的親和性(k_{rel})は、例えば、40℃での定組成溶離によるLichrosorb RP18(5µm、250×4mm)高性能液体クロマトグラフィカラ

50

ム上で相対的親油性が測定される場合、 $k_{rel} = (t_{conjugate} - t_0) / (t_{human} - t_0)$ の通りに決定され得る。以下の混合物を溶離剤として使用できる；すなわち、10%アセトニトリルを含むpH7.3の0.1Mのリン酸ナトリウム緩衝液、及び水中の50%アセトニトリル。空隙時間(t_0)は、0.1mMの硝酸ナトリウムを注入することにより識別される。ヒトインスリンについての保持時間は、(c)(i)及び(c)(ii)の混合物間の割当てを変動させることにより少なくとも $2t_0$ に調整される。好ましくは、これらの実施形態において、相対的親油性は1に等しいが1未満か又は実質的に1より小さい。好ましい実施形態においては、インスリン化合物はヒトインスリンであり、相対的親油性は1未満である。好ましくは、相対的親和性は、0.99、0.98、0.97、0.96、0.95、0.94、0.93、0.92、0.91又は0.90未満である。インスリン及びインスリン複合体の溶解度及び／又は親油性を決定するための技術についての論述は、その開示全体が本発明に参照として援用されている1998年5月12日付けのハレラント(Hareland)らに対して発行された、「アシル化インスリン」という題の米国特許第5,750,499号明細書の中に記されている。

10

【0111】

一実施形態においては、相対的親油性は上述の通りであり、修飾部分は5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17又は18個の炭素を有する炭素鎖であり、ここで炭素鎖は、中に挿入された2、3、4、5、6、7、8、9又は10個のオキシ基を含む。もう1つの実施形態においては、相対的親油性は上述の通りであり、修飾部分は5、6、7、8、9又は10個の炭素を有する炭素鎖であり、ここで炭素鎖は中に挿入された2、3又は4個のオキシ基を含む。関連する実施形態においては、相対的親油性は上述の通りであり、修飾部分は2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個のポリアルカレングリコール単位を含む。もう1つの関連実施形態においては、相対的親和性は上述の通りであり、修飾部分は、1、2又は3個のポリエチレングリコール単位及び1、2又は3個のポリプロピレングリコール単位を含む。

20

【0112】

7.4. 金属カチオン構成要素及び錯体の特性

カチオンーインスリン化合物複合体錯体は金属カチオンを含む。カチオン構成要素として使用するための適切な金属カチオンとしては、インスリン化合物複合体と錯化、凝集又は結晶化する能力をもつあらゆる金属カチオンが含まれる。金属カチオンは、インスリン化合物複合体に対し錯化されることが好ましい。単一の又は多数のカチオンを使用することができる。カチオンは好ましくはインスリン化合物複合体に対する有意な酸化性をもたない。すなわち錯体がその意図された目的のために役に立たなくなるまでの酸化性をもたない。

30

【0113】

一部の実施形態においては、金属カチオンは生体適合性をもつ。金属カチオンは、注入部位における有意な免疫反応といったような、レシピエントの体に対する過度に有意な有害効果を示さない場合に、生体適合性を有する。しかしながら、一部の状況においては、毒性及びその他の有害な効果の危険性よりもカチオンーインスリン化合物複合体組成物の利点の方が勝っている可能性があり、従ってかかる状況下ではこれらの危険性を受諾できるかもしれない。

40

【0114】

生物学的に活性な作用物質を安定化させるための金属カチオンの妥当性及び必要とされる生物学的に活性な作用物質に対する金属カチオンの比率は、粒度削減及び／又はカプセル封入の前及び後に金属カチオンで安定化された生物学的に活性な作用物質の粒子に対しポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、逆相クロマトグラフィ及びHPLC分析といったようなさまざまな安定性試験を実施することによって、当業者により決定され得る。

【0115】

50

金属カチオン構成要素は適切には、1つ以上の1価、2価又は3価の金属カチオン又はその組合せを含む。好ましい実施形態においては、金属カチオンは、I I 群又は遷移金属カチオンである。適切な2価のカチオンの例としては、 Zn^{++} 、 Mn^{++} 、 Ca^{++} 、 Fe^{++} 、 Ni^{++} 、 Cu^{++} 、 Co^{++} 及び／又は Mg^{++} を含む。1価のカチオンが含まれている場合、それは好ましくは Na^{+} 、 Li^{+} 又は K^{+} である。カチオンは好ましくは、塩化物又は酢酸塩といったような塩として添加され、最も好ましくは $ZnCl_2$ 及び $ZnAc$ である。

【0116】

インスリン化合物複合体対カチオンのモル比は、標準的には約1：1～約1：100の間、好ましくは約1：2～約1：12の間、より好ましくは約1：2～約1：7の間、又は約1：2、1：3、1：4、1：5、1：6又は1：7の間である。特定の実施形態においては、 Zn^{++} はカチオン構成要素として用いられ、それは、約1：1～約1：100、好ましくは約1：2～約1：12、そしてより好ましくは約1：2～約1：7又は約1：2、1：3、1：4、1：5、1：6又は1：7の亜鉛カチオン構成要素対インスリン化合物複合体モル比で提供される。

10

【0117】

カチオン構成要素は、好ましくは約90%超が単一カチオン、例えば Zn^{++} である。好ましくは、カチオンは約95%、99%又は99.9%超が Zn^{++} である。

【0118】

好ましくは、キモトリプシン分解に対する錯化インスリン化合物複合体の耐性は、対応する未錯化インスリン化合物複合体のキモトリプシン分解よりも大きい。好ましくは、キモトリプシン分解に対する錯化インスリン化合物複合体の耐性は、対応する錯化された、ただし未複合のインスリン化合物のキモトリプシン分解よりも大きい。

20

【0119】

錯化インスリン化合物複合体は対応する未複合インスリン化合物複合体といったような科学的に許容可能な対照よりも哺乳動物においてより高い経口生物学的利用能を有し得る。その他の実施形態では、錯化インスリン化合物複合体は、対応する未錯化インスリン化合物複合体といったような科学的に許容可能な対照よりもヒトにおいてより高い経口生物学的利用能を有する。一部の実施形態では、例えば複合体の血漿レベルにより測定されるような錯化インスリン化合物複合体の吸収は、未錯化インスリン化合物複合体の吸収よりも少なくとも1.5、2、2.5、3、3.5、又は4倍高い。

30

【0120】

錯化インスリン化合物複合体は、錯化された未複合のインスリン化合物といったような科学的に許容可能な対照よりも哺乳動物においてより高い経口生物学的利用能を有し得る。その他の実施形態では、錯化インスリン化合物複合体は、対応する錯化されたただし未複合のインスリン化合物といったような科学的に許容可能な対照よりもヒトにおいてより高い経口生物学的利用能を有する。一部の実施形態では、例えば複合体の血漿レベルにより測定されるような錯化インスリン化合物複合体の吸収は、錯化された、ただし未複合のインスリン化合物の吸収よりも少なくとも1.5、2、2.5、3、3.5、又は4倍高い。

40

【0121】

7.5 錯化剤

一部の実施形態では、カチオンーインスリン化合物複合体組成物は、1つ以上の錯化剤を含む。本発明において使用するのに適した錯化剤の例としては、プロタミン、スルフェン、グロビンタンパク質、スペルミン、スペルミジン、アルブミン、アミノ酸、カルボン酸、プロカチオン重合体化合物、カチオンポリペプチド、アニオンポリペプチド、ヌクレオチド及びアンチセンスが含まれる。その開示全体が本発明に参照として援用されているブランジェ、J.、「*Galenics of Insulin compound*」、Springer-Verlag、Berlin Heidelberg (1987年)を参照のこと。組成物を安定化するため錯化剤の妥当性は、本開示に照らして当業者によ

50

り決定され得る。一部の実施形態においては、カチオンーインスリン化合物複合体組成物は、特異的に錯化剤を排除しているか又は実質的にこれを含んでいない。

【0122】

好ましい錯化剤はプロタミンである。固体形態では、プロタミンは好ましくは約3：1～約1：3のインスリン化合物対プロタミンモル比、より好ましくは約2：1～約1：2のモル比、理想的には約1：1のモル比で存在することになる。一部の実施形態では、カチオンーインスリン化合物複合体組成物は、特定のプロタミンを排除しているか又はこれを実質的に全く含んでいない。

【0123】

例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリントレオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、アスパラギン、グルタミン酸及びヒスチジン、並びにジグリシンといったオリゴペプチドといったアミノ酸を錯化剤として使用することもできる。

10

【0124】

カルボン酸も同様に、錯化剤として使用するのに適している。例としては、酢酸、及びヒドロキシカルボン酸、例えば、クエン酸、3-ヒドロキシブチル酸及び乳酸が含まれる。

【0125】

7. 6. 安定化剤

一部の実施形態では、カチオンーインスリン化合物複合体組成物は1つ以上の安定化剤を含んでいる。好ましい安定化剤としてはフェノール化合物及び芳香族化合物が含まれる。好ましいフェノール化合物は、フェノール、m-クレゾール及びm-パラベン又はその混合物である。安定化剤は、安定化剤の不在である対応するカチオンーインスリン化合物複合体組成物といったような科学的に許容可能な対照と比べてカチオンーインスリン化合物複合体組成物の安定性を改善するあらゆる量で提供することができる。

20

【0126】

7. 7. 錯体の態様

錯体は、カチオンーインスリン化合物複合体の実質的に純粋な粉末、又はその他の薬学的に許容可能な構成要素と共にカチオンーインスリン化合物複合体固体を含む粉末といった乾燥固体として提供され得る。錯体は同様に、水性又は有機媒質中に溶解した状態でかつ／又はかかる媒質中の未溶解固体として、提供されてもよい。

30

【0127】

7. 7. 1. 固体組成物

カチオンーインスリン化合物複合体錯体は固体として提供され得る。該固体は、例えば乾燥状態にあってもよく、又水溶液、有機溶媒、エマルジョン、マイクロエマルジョン又はその他の非乾燥形態で未溶解の状態にあってもよい。

【0128】

一の実施形態においては、カチオンーインスリン化合物複合体錯体は純粋な加工済み固体組成物として提供される。純粋な加工された固体組成物の中で、インスリン化合物複合体対カチオンのモル比は標準的に約3：4～約3：0.5（インスリン化合物複合体：カチオン）、約3：3.5～約3：1、又理想的には約3：1である。

40

【0129】

加工済み純粋固体T型組成物（カチオン、インスリン化合物複合体を伴い、プロタミンは伴わない）の中で、インスリン化合物複合体対カチオンのモル比は、標準的に約3：4～約3：0.5（インスリン化合物複合体：カチオン）、約3：3.5～約3：1、又は理想的には約3：1である。加工済み純粋な固体T型プロタミン組成物（カチオン、インスリン化合物複合体及びプロタミンを伴う）の中では、インスリン化合物複合体対カチオンのモル比は、標準的に約3：6～約3：0.5（インスリン化合物複合体：カチオン）、約3：5～約3：1又理想的には約3：2である。

【0130】

50

加工済み純粋固体R型 (l e n t e) 組成物 (カチオン、インスリン化合物及び安定化合物 (例えばフェノール化合物) を伴い、プロタミンは伴わない) の中で、インスリン化合物複合体対カチオンのモル比は、標準的に約 3 : 4. 5 ~ 約 3 : 0. 9、好ましくは約 3 : 3. 9 ~ 約 3 : 2. 4 である。加工済み純粋な固体R型 (u l t r a l e n t e) 組成物 (カチオン、インスリン化合物及び安定化合物 (例えばフェノール化合物) を伴い、プロタミンは伴わない) の中では、インスリン化合物複合体対カチオンのモル比は、標準的に約 3 : 1. 2 ~ 約 3 : 4. 5 超、好ましくは約 3 : 9 ~ 約 3 : 4. 8、より好ましくは約 3 : 6 ~ 約 3 : 5. 4 の範囲内にあり得る。加工済み純粋固体R型プロタミン組成物 (カチオン、インスリン化合物及び安定化合物 (例えばフェノール化合物) 及びプロタミンを伴う) の中では、インスリン化合物複合体対カチオンのモル比は標準的に約 3 : 1. 2 ~ 約 3 : 3、好ましくは約 3 : 9 ~ 約 3 : 4. 5、より好ましくは約 3 : 6. 9 ~ 約 3 : 5. 4 の範囲内であり得る。

10

【0131】

1 価のカチオン、例えば Na^+ については、固体は約 3 : 6 ~ 約 3 : 3 のインスリン化合物複合体対カチオン比を有するものと予想されることになる。

【0132】

本発明の固体組成物は、例えば、本発明のインスリン化合物複合体及び／又はカチオンーインスリン化合物複合体錯体を含む粉末といったような組成物を含み得る。好ましくは、固体組成物は、薬学的に許容可能なレベルの純度、すなわちヒトの体内で使用するための該組成物の妥当性を受容し難いほどに低減させることになるような汚染物質が無いレベルで提供される。

20

【0133】

一部の実施形態においては、カチオンーインスリン化合物複合体構成要素が約 90 % 超、好ましくは約 95 % 超、より好ましくは約 99 % 超結晶性である組成物が提供される。その他の実施形態においては、カチオンーインスリン化合物複合体構成要素が約 90 % 超、好ましくは約 95 % 超、より好ましくは約 99 % 超の非晶質固体である組成物が提供されている。

【0134】

さらにその他の実施形態では、カチオンーインスリン化合物複合体構成要素が、非晶質固体と結晶性固体の混合物中に存在する組成物が提供されている。例えば、非晶質固体対結晶性固体の比率は約 1 : 10 ~ 約 10 : 1 又は約 1 : 9 ~ 約 9 : 1、又は約 1 : 8 ~ 約 8 : 1、又は約 1 : 7 ~ 約 7 : 1、又は約 1 : 6 ~ 約 6 : 1、又は約 1 : 5 ~ 約 5 : 1、又は約 1 : 4 ~ 約 4 : 1、又は約 1 : 3 ~ 約 3 : 1、又は約 1 : 2 ~ 約 2 : 1 又は約 1 : 1 であり得る。

30

【0135】

さらに、未変性インスリン化合物を含む固体とインスリン化合物複合体を含む固体、又は1つのインスリン化合物複合体を含む固体と異なるインスリン化合物複合体を含む固体といったように異なるインスリン化合物を有するカチオンーインスリン化合物固体の混合物を用いて、組成物を提供することができる。

【0136】

40

さらに、固体のタイプ及びインスリン化合物／インスリン化合物複合体構成要素は全て変動し得る。例えば、非晶質インスリン化合物複合体及び未変性インスリン化合物を用いてZnーインスリン化合物結晶を含む組成物を提供することができ、そうでなければ結晶性Znーインスリン化合物複合体及び未変性インスリン化合物を用いた非晶質Znーインスリン化合物固体を含む組成物を提供することができる。溶解プロファイル及び／又は薬物動態プロファイルの変動といったような物理的特性の変動を達成するためにかかる混合物を使用することができる。

【0137】

固体の平均粒度は好ましくは、約 0. 1 ~ 約 100 ミクロン、より好ましくは 1 ~ 50 ミクロン、なお一層好ましくは 1 ~ 25 ミクロン、理想的には 1 ~ 15 ミクロンの範囲内

50

である。微結晶化条件、噴霧乾燥、摩砕、真空乾燥、凍結乾燥などにより小さな粒度を得ることが可能である。

【0138】

1つの実施形態においては、組成物は、乾燥された時点で、約96%w/w超のインスリン化合物複合体及び約0.05、0.1、0.15又は0.2～約4%w/wの亜鉛を含有する。もう1つの実施形態では、該組成物は、乾燥された時点で約91%w/wのインスリン化合物複合体、約0.05、0.1、0.15、又は0.2～約4%w/wの亜鉛及び約0.2～約5%w/wのフェノールを含有する。さらにもう1つの実施形態においては、該組成物は、乾燥された時点で、約82%w/w超のインスリン化合物複合体、約0.05、0.1、0.15又は0.2～約4%w/wの亜鉛、約0.2～約14%w/wのプロタミンを含有する。さらにもう1つの実施形態においては、組成物は、乾燥された時点で約71%w/wのインスリン化合物複合体、約0.05、0.1、0.15又は0.2～約4%w/wの亜鉛、約0.2～約14%w/wのプロタミン、及び約0.2～約15%w/wのフェノールを含有する。

10

【0139】

もう1つの実施形態においては、該組成物は、乾燥された時点で約0.1～約2%w/wの Zn^{++} 、及び約0.08～約1%w/wのフェノール、好ましくは約0.5～約1.3%w/wの Zn^{++} 及び約0.1～約0.7%w/wのフェノール、より好ましくは1以上から約3.5%w/wまでの Zn^{++} 、約0.1～約3%w/wのフェノール、さらに一層好ましくは1.3以上から約2.2%w/wまでの Zn^{++} 、そして約0.4～約2%w/wのフェノールを含む。

20

【0140】

錯体は、lente型の調製物の形で提供可能である。例えば、好ましい乾燥lente型調製物中では、Znは約0.1～約2%w/wの範囲の量で提供され、フェノールは約0.08～約1%w/wの範囲の量で存在し、残りの%w/wはインスリン化合物複合体である。理想的には、乾燥したlente型調製物のためには、Znは約0.5～約1.3%w/wの範囲の量で提供され、フェノールは、約0.1～約0.7%w/wの範囲内の量で存在し、残りの%w/wはインスリン化合物複合体である。

【0141】

Ultralente型の調製物の形で錯体を提供することが可能である。例えば、好ましい乾燥されたultralente型の調製物中では、Znは、1以上から約3.5%w/wの範囲の量で提供され、フェノールは約0.1～約3%w/wの範囲の量で存在し、残りの%w/wはインスリン化合物複合体である。理想的には乾燥されたultralente型調製物のためには、Znは1.3以上から約2.2%w/wまでの範囲の量で提供され、フェノールは、約0.4～約2%w/wの範囲の量で存在し、残りの%w/wはインスリン化合物複合体である。

30

【0142】

7.7.2 液体組成物

カチオン-インスリン化合物複合体錯体は、液体の未溶解構成要素として提供され得る。例えば、液体は、沈殿物としてのカチオン-インスリン化合物複合体を含む水溶液であってよく、そうでなければカチオン-インスリン化合物複合体を、懸濁液、エマルジョン又はマイクロエマルジョンの構成要素として提供することもできる。液体は、同様に未溶解構成要素と共に、溶解した構成要素又は錯体を含むこともできる。

40

【0143】

7.7.3 混合物及び共結晶

本発明の組成物は、例えば、錯体混合物、固体混合物、ハイブリッド錯体及び共結晶を含み得る。

【0144】

かくして、例えば、本発明は、2つ以上のインスリン化合物複合体及び／又は未複合インスリン化合物を含む組成物を提供する。さらに、組成物が固体を含む場合、固体は異な

50

る形態を有し得る。かくして、例えば、1つの固体は結晶性であり得、もう1つの固体は非晶質固体であり得る。他の場所で指摘されているとおり、該固体は、乾燥された形状で提供されてもよいし、又は液体混合物の固体構成要素として提供されてもよい。好ましい実施形態においては、本発明の混合物は2つ以上の異なるインスリン化合物複合体を含み、異なるインスリン化合物複合体は異なる溶解度を有する。1つの実施形態においては、錯体のうちの一方は親油性インスリン化合物複合体を含み、もう1つの錯体は親水性のインスリン化合物複合体を含む。さらにもう1つの実施形態においては、錯体は、1つ以上の錯体が約1～約4時間の循環半減期を有し、2つ以上の錯体が第1の錯体循環半減期よりも著しく長い循環半減期をもつ異なるインスリン化合物複合体を含み得る。関連する実施形態においては、1つの錯体は急速作用型プロファイルを有し、もう1つの錯体は中～長時間作用型プロファイルを有する。さらに、1つの錯体は基礎インスリン化合物制御に適したプロファイルを有することができ、もう1つの錯体は食後グルコース制御に適したプロファイルを有する。好ましい混合物は、H I M 2とインスリンの混合物、H I M 2とI N 1 0 5の混合物、I N 1 0 5とインスリン化合物の混合物、I N 1 0 5及び脂肪酸アシル化インスリンの混合物、H I M 2と脂肪酸アシル化インスリンの混合物である。適切な脂肪酸アシル化インスリンについては、その開示全体が本発明に参照として援用されている以下の米国特許の中で記述されている；「血液グルコース制御のための不溶性組成物」という題の米国特許第6, 531, 448号明細書、03年3月11日発行；「イプシロンアミノ基の選択的アシル化」という題の米国特許第R E 37, 971号明細書、03年1月28日発行；「不溶性インスリン組成物」という題の米国特許第6, 465, 426号明細書、02年10月15日発行；「脂肪酸アシル化インスリン類似体」という題の米国特許第6, 444, 641号明細書、02年9月3日発行；「アシル化インスリンの投与方法」という題の米国特許第6, 335, 316号明細書、02年1月1日発行；「不溶性インスリン組成物」という題の米国特許第6, 268, 335号明細書、01年7月31日発行；「アシル化インスリンの投与方法」という題の米国特許第6, 051, 551号明細書、00年4月18日発行；「アシル化インスリン類似体」という題の米国特許第5, 922, 675号明細書、99年7月13日発行；「アシル化タンパク質粉末の調製」という題の米国特許第5, 700, 904号明細書、97年12月23日発行；「付与されたアシル化インスリン類似体」という題の米国特許第5, 693, 609号明細書、97年12月2日発行；「イプシロンアミノ基の選択的アシル化」という題の米国特許第5, 646, 242号明細書、97年7月8日；「脂肪酸アシル化タンパク質のゲル化削減」という題の米国特許第5, 631, 347号明細書、97年5月20日発行；「ペプチドのアシル化方法及び新規のアシル化剤」という題の米国特許第6, 451, 974号明細書、02年9月17日発行；「アシル化インスリン」という題の米国特許第6, 011, 007号明細書、00年1月4日発行；98年5月12日に付与された「アシル化インスリン」という題の米国特許第5, 750, 497号明細書；「選択的アシル化方法」という題の米国特許第5, 905, 140号明細書、1999年5月18日発行；「インスリン誘導體」という題の米国特許第6, 620, 780号明細書、2003年9月16日発行；「インスリン誘導體」という題の米国特許第6, 251, 856号明細書、2001年1月26日発行；「肺送達用の安定な濃縮インスリン調製物」という題の米国特許第6, 211, 144号明細書、2001年4月3日発行；「肺インスリン結晶」という題の米国特許第6, 310, 038号明細書、2001年10月30日発行；及び、「安定化されたインスリン組成物」という題の米国特許第6, 174, 856号明細書、2001年1月16日発行。特に好ましいのは、ヒトインスリンのL y s (B 2 9) に共有結合した12、13、14、15又は16炭素脂肪酸を有するモノ脂肪酸アシル化インスリンである。

【0145】

1つの実施形態においては、本発明は2つの異なるインスリン化合物及び／又はインスリン化合物複合体を有する共結晶を提供する。好ましくは、共結晶は、実質的に均質な溶解、単一のインビボ溶解曲線及び／又は単一ピークの薬力学プロファイルといった特徴の

10

20

30

40

50

うちの1つ以上のものを示す。好ましい共結晶は、H I M 2 とインスリンの共結晶、H I M 2 と I N 1 0 5 の共結晶、I N 1 0 5 とインスリン化合物の共結晶である。

【0146】

1つの実施形態においては、共結晶はヒトインスリンを含み、ヒトインスリンとの共結晶化は、インスリン化合物複合体の対応する結晶の溶解度に比べて結晶の溶解度を低減させる。もう1つの実施形態においては、共結晶はヒトインスリンを含み、ヒトインスリンとの共結晶化は、インスリン化合物複合体の対応する結晶の溶解度に比べて該結晶の溶解度を低減させる。

【0147】

1つの実施形態においては、共結晶は急速作用型、急速排泄型及び／又は高効能インスリン化合物複合体及び長時間作用型、低速排泄型及び／又は低効能インスリン化合物複合体を含む。好ましくは共結晶は、食後グルコース制御又は基礎インスリン化合物オーバーナイト制御に適したPK／PDプロファイルを有する。

【0148】

もう1つの実施形態においては、本発明は、ヒトインスリン又はリスプロインスリンと共にインスリン化合物複合体が含まれている混合物又は共結晶を提供する。本発明の混合物は2つの異なるインスリン化合物複合体を含み得る。混合物はインスリン化合物複合体及び未複合インスリン化合物を含み得る。混合物は異なるインスリン化合物を伴う異なるインスリン化合物複合体を含み得る。

【0149】

さらに、本発明は2つの異なるインスリン化合物複合体及び／又はインスリン化合物複合体と未複合インスリン化合物を有する錯体を提供する。本発明は、2個、3個又はそれ以上の異なるインスリン化合物複合体のハイブリッド共結晶を提供する。本発明は、未複合インスリン化合物を伴うインスリン化合物複合体を有する錯体を提供する。本発明は、2つ以上の異なる親水性インスリン化合物複合体；2つ以上の異なる疎水性インスリン化合物複合体；2つ以上の異なる両親媒性インスリン化合物複合体；親水性インスリン化合物複合体及び親油性インスリン化合物複合体；親水性インスリン化合物複合体及び未複合インスリン化合物；H I M 2 と未複合インスリン化合物；I N 1 0 5 と未複合インスリン化合物；H I M 2 と I N 1 0 5 ；H I M とインスリン化合物及びI N 1 0 5 ；及び以上の要素のその他の組合せを伴う共結晶を提供する。その他の場所で言及されているように、錯体は乾燥した固体として、溶液中の溶解した錯体及び／又は溶液中の未溶解錯体として提供され得る。例えば長時間プロファイルを有する錯体又は共結晶を提供するべく、さまざまな組合せを利用することができる。

【0150】

7. 8. 発明の錯体の溶解度

好ましくは、約7. 4のpHでのカチオンーインスリン化合物複合体錯体の水溶解度は、未錯化インスリン化合物複合体の水溶解度の約1／15、1／14、1／13、1／12、1／11、1／10、1／9、1／8、1／7、1／6、1／5倍から約0. 1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10倍未満までである。上述の上限及び下限のあらゆる組合せが本発明の範囲内に入る。ただし、好ましい範囲は約1／15倍から5倍未満まで、より好ましくは約1／10倍～約2倍であり、理想は約1／10倍から0倍未満までである。本発明の特に驚くべき態様においては、約7. 4のpHでの溶液中のカチオンーインスリン化合物複合体の水溶解度は、往々にして約7. 4のpHでの溶液中のインスリン化合物複合体の水溶解度より実質的に低い。しかしながら、一部の実施形態においては、約7. 4のpHでのカチオンーインスリン化合物複合体の水溶解度は約7. 4のpHでの溶液中のインスリン化合物複合体の水溶解度と同じであるか、それより大きい又はそれより実質的に大きいであり得る。

【0151】

1つの驚くべき実施形態においては、約7. 4のpHでのカチオンーインスリン化合物複合体錯体の水溶解度は、約7. 4のpHでの対応する未錯化インスリン化合物複合体の

溶解度よりも実質的に低く、カチオンーインスリン化合物複合体錯体は、約 5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、又は 6.9 に始まり約 7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8 又は 8.9 で終る pH 範囲全体を通して水溶液中で約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120 又は 130 g/L 超で可溶状態にとどまる。さらにもう 1 つの実施形態では約 7.4 の pH でのカチオンーインスリン化合物複合体錯体の水溶解度は、約 7.4 の pH での溶液中の対応するインスリン化合物複合体の溶解度よりも実質的に低く、カチオンーインスリン化合物複合体錯体は、約 5.8～約 8.5 の pH 範囲、好ましくは約 6.5～約 8 の pH 範囲、より好ましくは約 6.9～約 7.8 の pH 範囲全体を通して水溶液中で約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120 又は 130 g/L 超で可溶状態にとどまる。[質問：g/L 溶解度は、錯体の重量又はインスリン化合物複合体の重量を用いて測定されるのか？]

【0152】

好ましくは、本発明のインスリン化合物複合体は、インスリン化合物複合体の濃度が約 0.5 mg/ml～約 50 mg/ml、好ましくは約 5 mg/ml～約 30 mg/ml、より好ましくは約 15 mg/ml～約 30 mg/ml である場合、PI+/-約 2.5 に等しい pH で水溶液中で結晶を生成するように選択され、結晶は、カチオンが、好ましい Z^{++} である場合、インスリン化合物複合体に対するカチオン約 3、4 又は 5 % w/w で発生し始める。好ましい結晶は約 4.1、4.2、4.3 又は 4.4～約 5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7 又は 5.8 の範囲の pH、好ましくは約 4 から 6.5 未満までの pH、好ましくは約 4 から 5.8 未満まで、好ましくは約 4.2 から約 5.5 まで、より好ましくは約 4.4 から約 5.2 までの pH で水溶液中でプロタミン無しのモノ複合体について存在する。好ましくは、結晶は約 3.5 から 5.8 未満まで、好ましくは約 3.8 から約 5.5 まで、より好ましくは約 4.0 から約 5.2 までの pH でプロタミン無しのジ複合体について存在する。好ましくは、結晶は約 3 から 5.5 未満まで、好ましくは約 3.3 から約 5 まで、より好ましくは約 3.8～約 4.8 の pH でプロタミン無しのトリ複合体について存在する。

【0153】

7.8.1 R 型の錯体

好ましくは、約 7.4 の pH におけるインスリン化合物複合体の R 型 Z_n 錯体の水溶解度は、約 10～約 150 g/L、より好ましくは約 20～約 130 g/L、より好ましくは約 30～約 110 g/L、より好ましくは約 35～約 60 g/L の範囲をもつ。

【0154】

好ましくは、約 7.4 の pH でのプロタミンを伴うインスリン化合物複合体の R 型 Z_n 錯体の水溶解度は、約 10～約 110 g/L、好ましくは約 20～約 85 g/L、より好ましくは約 30～約 70 g/L の範囲を有する。

【0155】

7.8.2 T 型錯体

好ましくは、約 7.4 の pH でのインスリン化合物複合体の T 型 Z_n 錯体の水溶解度は、約 30～約 175 g/L、より好ましくは約 50～約 160 g/L、より好ましくは約 70～約 150 g/L の範囲を有する。

【0156】

好ましくは、約 7.4 の pH でのプロタミンを伴うインスリン化合物複合体の T 型 Z_n 錯体の水溶解度は、約 10～約 150 g/L、より好ましくは約 20～約 130 g/L、より好ましくは約 30～約 110 g/L、より好ましくは約 35～約 60 g/L の範囲を有する。

10

20

30

40

50

【0157】

7. 8. 3. NPH型錯体

好ましくは約7. 4のpHでのインスリン化合物複合体のNPH型錯体の水溶解度は、約1～約150 g/L、より好ましくは約5～約120 g/L、さらに一層好ましくは約10～約90 g/Lの範囲を有する。

【0158】

7. 9 薬学的特性

カチオンとのインスリン化合物複合体の錯化は、一般に、対応する未錯化インスリン化合物複合体といったような科学的に許容可能な対照に比べて改善されたインスリン化合物複合体の薬学的特性を結果としてもたらす。

10

【0159】

一部のケースでは、錯化されたインスリン化合物複合体は、対応する未錯化インスリン化合物複合体といったような科学的に許容可能な対照と比べて長時間の又はその他の形で改変されたpKプロファイルを示すことになる。あるケースでは、pKプロファイルはリスプロ様のプロファイルを示すことになる。pKプロファイルは、例えばマウス、ラット、イヌ又はヒトにおける標準的インビボ実験を用いて査定することができる。カチオンーインスリン化合物複合体錯体の属性を査定するための本書で記述されている検定は、本発明の1つの態様である。

【0160】

錯体は、改善された化学的安定性を示し得る。血漿の存在、プロテアーゼの存在、肝臓ホモジネートの存在、酸性条件の存在及び塩基性条件の存在といったようなさまざまな検定条件に錯体を曝露することによって、さまざまな安定性属性を査定することが可能である。これらの検定条件のうちのいずれか2つ以上のものにおける錯化インスリン化合物複合体の安定性が同じ条件での未錯化インスリン化合物複合体の安定性よりも大きい場合に、未錯化インスリン化合物複合体に比した安定性が改善されている。酸性環境において安定性を決定するための好ましい検定には、少なくとも2時間pH2の溶液に対し錯化インスリン化合物複合体を曝露することを含み、ここで対応する未錯化インスリン化合物複合体といったような科学的に許容可能な対照に比した錯化インスリン化合物複合体の分解の減少が安定性改善の指標である。安定性をテストするには、インビボ検定も使用することができる。例えば、対照の消化管に対する曝露及び適切な対照との比較により、錯化インスリン化合物複合体の安定性をテストすることができる。

20

30

【0161】

7. 10 製造方法

本発明は同様に、本書で記述されているカチオンーインスリン化合物複合体組成物の製造方法をも提供している。該方法には一般に、固体を形成するべく本書に記述されているような1つ以上のカチオンと本書に記述されているような1つ以上のインスリン化合物複合体を接触させるステップを含んでいる。

【0162】

Zn^{++} といったような2価のカチオンについては、約2 mg/mlから約50 mg/mlの範囲のインスリン化合物濃度をもつ水溶液中の組成物を作るのに用いられるインスリン化合物複合体対カチオンのモル比は、標準的に約1:15（インスリン化合物複合体:カチオン）～約1:0.4、好ましくは約1:9～約1:2の範囲であり得る。

40

【0163】

上述の水溶液条件下でT型固体（カチオン及びインスリン化合物複合体を伴いプロタミンを伴わない）を作るためには、インスリン化合物複合体対カチオンのモル比は好ましくは約1:1.5～1:3、理想的には約1:2である。上述の水溶液条件下でR型固体（カチオン、インスリン化合物及び安定化化合物（例えばフェノール化合物）を伴いプロタミンを伴わない）を作るためには、インスリン化合物複合体対カチオンのモル比は、好ましくは約1:4～1:9、好ましくは約1:7～約1:9、理想的には約1:8である。

【0164】

50

上述の水溶液条件でT型プロタミン固体（カチオン及びインスリン化合物複合体及びプロタミンを伴う）を作るためには、インスリン化合物複合体対カチオンのモル比は好ましくは約1：1.5～1：9、理想的には約1：2である。上述の水溶液条件下でR型プロタミン固体（カチオン、インスリン化合物及び安定化合物（例えばフェノール化合物）及びプロタミン）を作るためには、インスリン化合物複合体対カチオンのモル比は約1：2～1：15、好ましくは約1：7～約1：9、理想的には約1：8である。

【0165】

インスリン化合物複合体は、好ましくは、2超から約100 g/Lまで、好ましくは約3、4、5、6、7、8、9又は10から約40 g/Lまで、より好ましくは、約10から約30 g/Lまでの範囲内の濃度を達成するように計算される量で、緩衝液に添加される。

10

【0166】

カチオンが2価（例えば Zn^{++} 、 Ca^{++} ）である場合、それは、好ましくは約0.04～約10 g/L、好ましくは約0.1～約5 g/L、より好ましくは約0.2～約4 g/Lの範囲内の濃度を達成するように計算された量で添加される。T型結晶又はT型プロタミン結晶については、カチオン濃度は好ましくは約0.04～約1 g/L、より好ましくは約0.1～約0.3 g/Lの範囲内にある。R型結晶又はR型プロタミン結晶については、カチオン濃度は好ましくは約1～約5 g/L、より好ましくは約1.5～約4 g/Lの範囲内にある。

【0167】

20

カチオンが一価である場合、それは好ましくは、約0.08～約40 g/L、好ましくは約0.4～約20 g/L、より好ましくは約0.8～約16 g/Lの範囲内の濃度を達成するように計算された量で添加される。

【0168】

該方法はさらに、カチオン及びインスリン化合物複合体と安定化剤を組合わせるステップを含み得る。好ましい安定化剤については以上で記述されている。使用される場合、該安定化剤は、この安定化剤の不在下で同じ試薬及び反応条件を用いて達成されるよりも高い固体形成度を提供するのに十分な量で添加される。安定化剤がフェノール化合物（例えばフェノール、m-クレゾール、m-パラベン）である場合、それは、約10～約50 % w/w、より好ましくは約20～約40 % w/w、さらに一層好ましくは約25～約35 % w/wの範囲の量で添加され得る。より好ましい実施形態においては、安定化剤はフェノール化合物（例えばフェノール、m-クレゾール、m-パラベン）であり、約0.01～約10 % w/w、より好ましくは0.01～約5 % w/w、さらに一層好ましくは0.01～約1 % w/wの範囲の量で添加され得る。かくして、一実施形態においては、該方法には、カチオン-インスリン化合物複合体組成物を生み出すために水溶液中でインスリン化合物複合体、カチオン及び安定化剤を組合せることを含み、ここで該組合せは可溶化された錯体及び／又は結晶性又は非晶質固体を生み出すことができる。

30

【0169】

該方法はさらに、カチオン及びインスリン化合物複合体と組合せられるプロタミンといった錯化剤の使用をも含んでいてよく、又任意には安定化剤をも含む。

40

【0170】

約5～約8の範囲内のpHを有する水溶液中で固体を調製するためには、プロタミンは、インスリン化合物複合体との関係において約4～約45 % w/w（プロタミン/インスリン化合物）、好ましくは約8～約25 % w/w、より好ましくは約9～約20 % w/w、理想的には約10～約12 % w/wの量で提供される。T型固体のためには、好ましいpH範囲は約5～約6、より好ましくは約5～約5.5、より一層好ましくは約5.1～約5.3、理想的には約5.2である。R型固体については、好ましいpH範囲は、約6～約7、より好ましくは約6.2～約6.8、さらに一層好ましくは約6.4～約6.6、理想的には約6.5である。

【0171】

50

発明者らは、驚くべきことに、フェノールといったような安定化剤の不在下でT型錯体をプロタミンT型錯体に転換できるということを発見した。T型錯体は、フェノールの不在下で水溶液中のインスリン化合物分子とZnを錯化することによって作られる。次にT型錯体をプロタミンT型錯体に転換させるためにプロタミンが添加される。量及びpH範囲は上述の通りである。

【0172】

かくして、1つの実施形態においては、該方法には、カチオンーインスリン化合物複合体組成物を生み出すべく水溶液中でインスリン化合物複合体、カチオン及び錯化剤を組み合わせることを含み、ここで該組合せは、可溶化された錯体及び／又は結晶性又は非晶質固体を生み出し得る。もう1つの実施形態では、該方法には、カチオンーインスリン化合物複合体組成物を生み出すべく水溶液中でインスリン化合物複合体、カチオン、錯化剤及び安定化剤を組み合わせることを含み、ここで該組合せは、可溶化された錯体及び／又は結晶性又は非晶質固体を生み出し得る。

10

【0173】

一部の実施形態では、組成物は防腐剤を含むことができる。適切な防腐剤の例としては、ベンジルアルコール、P-ヒドロキシ安息香酸エステル、グリセロールが含まれる。フェノール、m-クレゾール及びm-パラベンといったような安定化剤を防腐剤として使用することもできる。抗菌有効性を増強させるために、グリセロール及びフェノールが合わせて添加される。

【0174】

固体を調製する上で有用なその他の構成要素には、NaCl、グリセロール及び単糖類といったような等張作用物質が含まれる。

20

【0175】

カチオンインスリン化合物複合体固体は標準的に比較的迅速に形成可能である。例えば、固体形成は3日以内、往々にして24時間以内で完了する。結晶形成を改善させるため反応を減速させることが一部のケースで望まれる。

【0176】

本発明の一実施形態においては、固体は、固体の沈殿を誘発するための温度の低下を必要とすることなく、室温(25℃)で形成される。例えば、R型及びT型結晶については室温が有効である。固体形成のための温度は約0°〜約40℃、好ましくは約17〜約30℃、より好ましくは約22〜約27℃、理想的には約25℃である。

30

【0177】

一実施形態においては、該方法には、結晶性又は非晶質固体を提供するためインスリン化合物複合体及び金属カチオンを水溶液中で組合せるステップが含まれている。カチオンが添加されることになるインスリン化合物複合体を含有する水溶液は、好ましくはインスリン化合物複合体のpI+/-約1.5、好ましくはpI+/-約1、より好ましくはpI+/-約0.75の範囲内のpHをもつ緩衝溶液である。これらの範囲は同様にT型、R型及びプロタミン錯体にもあてはまる。しかしながら、中性プロタミン錯体(NPH型)については、好ましいpHは約7〜約8.5であり、より好ましくは約7.5〜約8である。ひとたび金属カチオンが添加された時点で、pHはわずかに変化する可能性があり、上述のpH範囲を目安としてpHを調製することができる。フェノール化合物を用いると、軽微なpH変化があり得、酸又は塩基を用いて好ましい範囲に調整することができる。

40

【0178】

インスリン化合物複合体のpI値は標準的に、約7未満、好ましくは約6未満、より好ましくは約5.5未満のpHを必要とする。中性修飾部分を伴うヒトインスリンモノ複合体は標準的に約4.75+/-0.25のpI範囲を有する。ヒトインスリンジ複合体についてはpI範囲は標準的に4.25+/-0.25である。ヒトインスリントリ複合体については、pI範囲は標準的に3.5+/-0.25である。

【0179】

50

適切な緩衝液系の例としては、酢酸アンモニウム緩衝液、リン酸ナトリウム緩衝液、トリス緩衝液、リン酸ナトリウムと酢酸アンモニウムの混合物、酢酸ナトリウム緩衝液、酢酸ナトリウムと酢酸アンモニウムの混合物及びクエン酸緩衝液及び同じくエタノール及び／又はアセトニトリル〔B〕（例えば、約1：1～約10：1のA：Bの百分率比で）をも含む上述の緩衝液系〔A〕のいずれかが含まれる。カチオンーインスリン化合物複合体固体が、エタノール又はアセトニトリルといったような有機溶媒を含有する水性混合物の中で形成され得るということは、本発明の驚くべき態様である。

【0180】

本発明の1つの独自の特長は、有用なカチオンーインスリン化合物複合体錯体を提供することに加えて、本発明は同様に、製造プロセス中の未複合インスリン化合物からカチオンーインスリン化合物複合体を分離する方法をも提供している。このプロセスでは、カチオンーインスリン化合物複合体を溶液から沈殿させることができ、可溶化された未複合インスリン化合物を例えばろ過により除去することができる。この特長により、インスリン化合物複合体の製造における2つのステップ、すなわち濃縮ステップと凍結乾燥ステップが削除される。

10

【0181】

遠心分離及び／又はろ過とそれに続く洗浄（例えばエタノール／水での）及び凍結乾燥又は真空乾燥といったような標準的な技術を用いて、加工済み純粋固体組成物を形成させ得る。フェノール及び／又はカチオン含有量を調整するために多数回の洗浄を使用することができる。

20

【0182】

7. 11 処方

既知の技術に従って薬学的担体に入った形で投与するために錯体を処方し得る。例えば、薬学的剤形の選択、製作及び使用に関するその教示についてその開示全体が本発明に参照として援用されている、アルフォンソ（Alfonso）R. ジェナーロ（Gennaro）、「Remington: The Science and Practice of Pharmacy」、Lippincott Williams & Wilkins Publishers（2003年6月）、及びハワード（Howard）C. アンセル（Ansel）、「Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems」、Lippincott Williams & Wilkins Publishers、第7版（1999年10月）を参照のこと。

30

【0183】

標準的には非晶質固体又は結晶性固体の形をした錯体を薬学的に許容可能な担体と組み合わせることができる。担体は、薬学組成物中のその他のあらゆる成分と適合性があるという意味で許容可能でなくてはならず、活性成分により提供される利点に関して、対象にとって過度に有害であってはならない。担体は固体又は液体、又は両方であり得る。それは好ましくは、例えば錠剤といったような一回服用量処方物として処方される。単位剤形は、例えば約0.01又は0.5重量%～約95重量%又は99重量%のカチオンーインスリン化合物錯体を含有し得る。薬学組成物は、任意には1つ以上の副成分を内含する構成要素を含めた（ただしこれに制限されるわけではない）周知の薬学的技術のいずれかによって調製可能である。

40

【0184】

適切な薬学組成物の例としては、経口、直腸、吸入（例えばエアゾルを介した）、口腔（例えば舌下）、腔内、非経口（例えば皮下、筋内、皮内、関節内、胸腔内、腹腔内、大脳内、動脈内又は静脈内）、局所、粘膜表面（気道表面を含む）、鼻腔表面及び経皮投与用に作られたものが含まれる。任意の与えられた例における最も適切な経路は、治療されている身体条件の性質及び重症度及び使用されている特定のカチオンーインスリン化合物錯体の性質により左右されることになる。好ましい経口組成物は、対象による摂取用に調製された組成物である。理想的には、経口組成物は、胃の中の通過を切り抜ける又は実質

50

的に切抜けるようにそして活性成分の送達のため腸内で完全に又は実質的に完全に溶解するように調製される。適切な経皮系の例としては、超音波、イオン導入及びパッチ送達系が含まれる。

【0185】

1つの態様においては、本発明は、1つ以上の飽和又は不飽和C₄、C₅、C₆、C₇、C₈、C₉又はC₁₀脂肪酸及び／又はかかる脂肪酸の塩を含む脂肪酸組成物を提供する。好ましい脂肪酸は、カプリル、カプリン、ミリスチン及びラウリン酸である。好ましい脂肪酸塩は、カプリル、カプリン、ミリスチン及びラウリン酸のナトリウム塩である。

【0186】

好ましい脂肪酸組成物は、単一の脂肪酸又は単一の脂肪酸塩を含み、その他の脂肪酸又は脂肪酸塩を実質的な量を含んでいない。本発明の1つの態様においては、組成物の脂肪酸含有量は、約90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.5、99.6、99.7、99.8又は99.9%w/w超の単一脂肪酸である。もう1つの実施形態においては、組成物の脂肪酸含有量は、約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、又は3.0%w/wを下限とし約3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、10.1、10.2、10.3、10.4、10.5、10.6、10.7、10.8、10.9、11.0、11.1、11.2、11.3、11.4、11.5、11.6、11.7、11.8、11.9又は12.0%w/wを上限とする範囲内にある。さらにもう1つの実施形態においては、組成物の脂肪酸含有量は、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、又は3.0%w/wを下限とし3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、10.1、10.2、10.3、10.4、10.5、10.6、10.7、10.8、10.9、11.0、11.1、11.2、11.3、11.4、11.5、11.6、11.7、11.8、11.9又は12.0%w/wを上限とする範囲内にあり、組成物の脂肪酸含有量は約90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.5、99.6、99.7、99.8又は99.9%w/w超の単一脂肪酸である。

【0187】

これらの処方物の活性構成要素は、複合又は未複合、錯化又は未錯化タンパク質及び／又はペプチドを内含し得る。好ましいタンパク質及び／又はペプチドは、本書に記述されているものである。好ましい複合体は、本書で記述されているものである。好ましい錯体は、本書で記述されているものである。好ましい経口組成物は、対象による摂取用に調製された組成物である。理想的には、経口組成物は、胃の中の通過を切り抜ける又は実質的

10

20

30

40

50

に切り抜けるように、かつ活性成分の送達のため腸内で完全に又は実質的に完全に溶解するように調製される。一部のケースでは、処方では腸溶コーティングを含み、一部のケースでは、処方では特定の腸溶コーティングを排除することになる。組成物は好ましくは、錠剤、硬カプセル又は軟カプセルとして提供されるが、本書に記述されるその他の形態も適切である。

【0188】

本発明の脂肪酸組成物は、脂肪酸アシル化インスリンを含み得る。適切な脂肪酸アシル化インスリンの例は、その開示全体が本発明に参照として援用されている以下の米国特許の中で記述されている；すなわち「血液グルコースを制御するための不溶性組成物」という題の米国特許第6, 531, 448号明細書、03年3月11日発行；「イプシロンアミノ基の選択的アシル化」という題の再発行米国特許第RE 37, 971号明細書、03年1月28日発行；「不溶性インスリン組成物」という題の米国特許第6, 465, 426号明細書、02年10月15日発行；「脂肪酸アシル化インスリン類似体」という題の米国特許第6, 444, 641号明細書、02年9月3日発行；「アシル化インスリンの投与方法」という題の米国特許第6, 335, 316号明細書、02年1月1日発行；「不溶性インスリン組成物」という題の米国特許第6, 268, 335号明細書、01年1月31日発行；「アシル化インスリンの投与方法」という題の米国特許第6, 051, 551号明細書、00年4月18日発行；「アシル化インスリン類似体」という題の米国特許第5, 922, 675号明細書、99年7月13日発行；「アシル化タンパク質粉末の調製」という題の米国特許第5, 700, 904号明細書、97年12月23日発行；「アシル化インスリン類似体、付与された」という題の米国特許第5, 693, 609号明細書、97年12月2日発行；「イプシロンアミノ基の選択的アシル化」という題の米国特許第5, 646, 242号明細書、97年7月8日発行；「脂肪酸アシル化タンパク質のゲル化低減」という題の米国特許第5, 631, 347号明細書、97年5月20日発行；「ペプチドのアシル化方法及び新規のアシル化剤」という題の米国特許第6, 451, 974号明細書、02年9月17日発行；「アシル化インスリン」という題の米国特許第6, 011, 007号明細書、00年1月4日発行；98年5月12日に付与された「アシル化インスリン」という題の米国特許第5, 750, 497号明細書；「選択的アシル化方法」という題の米国特許第5, 905, 140号明細書、1999年5月18日発行；「インスリン誘導體」という題の米国特許第6, 620, 780号明細書、2003年9月16日発行；「インスリン誘導體」という題の米国特許第6, 251, 856号明細書、2001年1月26日発行；「肺送達のための安定な濃縮インスリン調製物」という題の米国特許第6, 211, 144号明細書、2001年4月3日発行；「肺インスリン結晶」という題の米国特許第6, 310, 038号明細書、2001年10月30日発行；及び「安定化されたインスリン組成物」という題の米国特許第6, 174, 856号明細書、2001年1月16日発行。特に好ましいのはヒトインスリンのLys (B29) に共有結合した12、13、14、15又は16炭素脂肪酸を有するモノ脂肪酸アシル化インスリンである。

【0189】

経口投与に適した薬学組成物は、各々、粉末又は顆粒として；水性、又は非水性液体中の溶液又は懸濁液として；又は水中油又は油中水型エマルジョンとして、インスリン化合物複合体の混合物を予め定められた量だけ含有しているカプセル、カシエ剤、口中錠又は錠剤といったような個別単位の形で提示され得る。かかる処方物は、インスリン化合物複合体の混合物と適切な担体（上述の通りの1つ以上の副成分を含有し得るもの）を会合させるステップを含む任意の適切な薬学的方法によって調製可能である。処方物は、固体の懸濁液、錯化されたカチオン-インスリン化合物複合体、未錯化活性成分（例えば未変性インスリン化合物、インスリン化合物複合体）及びそれらの混合物を含み得る。

【0190】

一般に、本発明の薬学組成物は、液体又は固体担体又はその両方と錯体を均質かつ密に混和させ次に必要とあらば結果として得られた混合物を整形するステップにより調製され

10

20

30

40

50

る。例えば、任意には、1つ以上の副成分と共にインスリン化合物複合体の混合物を含有する粉末又は顆粒を圧縮又は成形することにより錠剤を調製することができる。適切な機械の中で、任意には結合剤、滑沢剤、不活性希釈剤及び／又は表面活性剤／分散剤と混合した粉末又は顆粒といったような自由に流動する形の混合物を適切な機械の中で圧縮することにより、圧縮錠剤を調製することが可能である。不活性液体結合剤で加湿した粉末化組成物を適切な機械の中で成形することにより、湿式錠剤を作ることができる。

【0191】

口腔（舌下）投与に適した薬学組成物には、通常スクロース及びアカシア又はトラガントである着香された基剤内にインスリン化合物複合体の混合物を含む口中錠；及びゼラチン及びグリセリン又はスクロース及びアカシアといったような活性基剤中のインスリン化合物複合体の混合物を含むトローチが含まれる。適切な処方物の例は、米国特許出願公開第20030229022号明細書（「薬学処方物」）；同第20030236192号明細書（「持続放出型組成物の放出プロファイルの修正方法」）；同第20030096011号明細書（「不安定な作用物質のサブミクロン粒子の生成方法及びその使用」）；同第20020037309号明細書（「重合体系持続放出型組成物の調製プロセス」）；同第20030118660号明細書（「残留溶媒抽出方法及びそれにより生成される微小粒子」）；並びに米国特許第6,180,141号明細書（「活性主成分担体としての複合ゲル微小粒子」）；同第6,737,045号明細書（「肺送達インスリン化合物のための方法及び組成物」）；同第6,730,334号明細書（「薬物送達ビヒクルとしての多腕ブロック共重合体」）；同第6,685,967号（「インスリン化合物の肺送達のための方法及び組成物」）；同第6,630,169号明細書（「微粒子送達システム及び使用方法」）；同第6,589,560号明細書（「安定なガラス状態粉末処方物」）；同第6,592,904号明細書（「分散性巨大分子組成物及びその調製及び使用方法」）；同第6,582,728号明細書（「吸入可能な乾燥粉末を生成するための巨大分子の噴霧乾燥」）；同第6,565,885号明細書（「薬学組成物スプレー乾燥方法」）；同第6,546,929号明細書（「乾燥粉末分散器具及びその使用方法」）；同第6,543,448号明細書（「乾燥粉末医薬品を分散させるための器具及び方法」）；同第6,518,239号明細書（「改良された分散性を有する乾燥粉末組成物」）；同第6,514,496号明細書（「分散性抗体組成物及びその調製並びに使用方法」）；同第6,509,006号明細書（「エアゾル化された医薬品の肺送達のための装置、組成物及び方法」）；同第6,433,040号明細書（「安定化された生物活性調製物及び使用方法」）；同第6,423,344号明細書（「分散性巨大分子組成物及びその調製及び使用方法」）；同第6,372,258号明細書（「薬物及び疎水性アミノ酸のスプレー乾燥方法」）；同第6,309,671号明細書（「安定なガラス状態粉末処方物」）；同第6,309,623号明細書（「用量計測式吸入器で使用するための安定化された調製物」）；同第6,294,204号明細書（「形態学的に均一なマイクロカプセルを生成する方法及び当該方法によって生成されたマイクロカプセル」）；同第6,267,155号明細書（「粉末充填システム、器具及び方法」）；同第6,258,341号明細書（「安定なガラス状態粉末処方物」）；同第6,182,712号明細書（「動力充填器具及びその使用方法」）；同第6,165,463号明細書（「分散性抗体組成物及びその調製及び使用方法」）；同第6,138,668号明細書（「エアゾル化された医薬品を送達するための方法及び装置」）；同第6,103,270号明細書（「分散性微細粒子を処理するための方法及びシステム」）；同第6,089,228号明細書（「乾燥粉末医薬品を分散させるための器具及び方法」）；同第6,080,721号明細書（「副甲状腺ホルモンの活性フラグメントの肺送達」）；同第6,051,256号明細書（「分散性巨大分子組成物及びその調製及び使用方法」）；同第6,019,968号明細書（「分散性抗体組成物及びその調製及び使用方法」）；同第5,997,848号明細書（「インスリン化合物の肺送達のための方法及び組成物」）；同第5,993,783号明細書（「乾燥粉末アルファ1-抗トリプシンの肺投与のための方法及び器具」）；同第5,922,354号明細書（「分散性微細粉末を加工するための方法及びシ

10

20

30

40

50

ステム」)；同第5，826，633号明細書(「粉末充填システム、器具及び方法」)；同第5，814，607号明細書(「副甲状腺ホルモンの活性フラグメントの肺送達」)；同第5，785，049号明細書(「乾燥粉末医薬品の分散のための方法及び器具」)；同第5，780，014号明細書(「乾燥粉末アルファ1抗トリプシンの肺投与のための方法及び器具」)；同第5，775，320号明細書(「エアゾル化された医薬品を送達するための方法及び装置」)；同第5，740，794号明細書(「乾燥粉末医薬品の分散のための器具及び方法」)；同第5，654，007号明細書(「分散性微細粉末を加工するための方法及びシステム」)；同第5，607，915号明細書(「副甲状腺ホルモンの活性フラグメントの肺送達」)；同第5，458，135号明細書(「エアゾル化された医薬品を送達するための方法及び装置」)；同第6，602，952号明細書(「キットサン及びポリ(エチレングリコール)又は関連重合体から誘導されたヒドロゲル」)；及び同第5，932，462号明細書(「分子及び表面にカップリングするための多腕、単官能性重合体」)の中に見出すことができる。さらに、適切な持続放出処方物は、その開示全体が本発明に参照として援用されている、99年10月19日に発行された「持続放出型薬学調製物」という題の、カーディナル・ヘルス(Cardinal Health)の米国特許第5，968，554号明細書中に記述されている。適切な微小粒子処方物は、03年10月30日に公開された「微小粒子の形成及び単離に有用な方法及び製品」という題の、スフェリック社(Spherics, Inc)の国際特許出願公開第2003-049，701号パンフレット中に記述されている。適切な生物接着性処方物は、04年5月6日に公開された「強化された胃内保持を伴う生物接着性薬物送達システム」という題の、スフェリック社の国際特許出願公開第2003-051，304号パンフレット中に記述されている。

10

20

【0192】

非経口投与に適した本発明の実施形態に従った薬学組成物は、錯体の無菌水性及び非水性注射溶液を含み、かかる調製物は、好ましくは、意図されたレシピエントの血液と等張である。これらの調製物は、該組成物を意図されたレシピエントの血液と等張にする溶質、酸化防止剤、緩衝液及び静菌剤を含有し得る。水性及び非水性無菌懸濁液は、懸濁剤及び増粘剤を含み得る。組成物は、例えば密封されたアンプル及びバイアルびんといった一回服用量又は多数回服用量容器に入った体裁をとり、使用直前に例えば生理食塩水又は注射用蒸留水といった無菌液体担体を添加するだけでよいフリーズドライ(凍結乾燥)条件で保管され得る。前述した種類の無菌粉末、顆粒及び錠剤から即席注射容器及び懸濁液を調製することができる。例えば、密封された容器内の単位剤形の形での錯体混合物を伴う注射可能な安定した無菌組成物を提供することができる。錯体混合物は、対象の体内への注射のために適した液体組成物を形成するべく適切な薬学的に許容可能な担体で戻すことのできる凍結乾燥物の形で提供可能である。非経口単位剤形は標準的に約1マイクログラム～約10mgの錯体混合物を含む。錯体を実質的に不水溶性である場合、生理学的に許容可能なものである充分な量の乳化剤を、水性担体内で錯体を乳化させるのに充分な量で利用することができる。このような1つの有用な乳化剤が、ホスファチジルコリンである。

30

【0193】

経口投与のための固体剤形には標準的に約2mg～約500mg、好ましくは約10mg～約250mg、理想的には約20mg～約110mgの錯体が含まれている。

40

【0194】

直腸投与に適した薬学組成物は、好ましくは一回服用量座薬としての体裁をとる。これらは、例えばカカオバターといった1つ以上の従来の固体担体と錯体を混和すること、そして次に結果としての混合物を整形することによって調製可能である。

【0195】

皮膚に対する局所施用に適した薬学組成物は、軟こう、クリーム、ローション、ペースト、ジェル、スプレー、エアゾル又はオイルの形をとる。使用可能な担体としては、ワセリン、ラノリン、PEG、アルコール、経皮浸透増強剤、及びそれらの2つ以上の組合せ

50

が含まれる。

【0196】

経皮投与に適した薬学組成物は、長時間にわたりレシipientの表皮と密に接触した状態にとどまるように適合された個別パッチとしての体裁をとり得る。経皮投与に適した組成物は同様にイオン導入（例えばPharmaceutical Research 3（6）：318（1986年）参照）により送達することもでき、標準的にインスリン化合物複合体の混合物の任意に緩衝させた水溶液の形をとることもできる。適切な処方物は、クエン酸塩又はビス／トリス緩衝液（pH6）又はエタノール／水を含み、0.1～0.2Mの活性成分を含有する。

【0197】

好ましい実施形態においては、錯体は、その開示全体が本発明に参照として援用される、オパウェール（Opawale）らにより03年8月13日に出願された米国仮特許出願第60／494,821号明細書に記述されている通りの固体脂肪酸処方物の構成要素として投与される。

【0198】

ある実施形態においては、インスリン化合物複合体は、固体を形成するのに必要とされるカチオン及び／又はその他の構成要素とは別に提供可能である。例えば、インスリン化合物複合体は乾燥した固体として提供し、カチオン、安定化剤、防腐剤及び／又はその他の構成要素を含む緩衝溶液を別に提供し、かくしてユーザーがカチオンーインスリン化合物複合体錯体を生成すべく別々の構成要素を組合せることができるようにすることが可能である。

【0199】

7.12 治療方法

カチオンーインスリン化合物複合体組成物及びその処方物は、（外来源からのインスリン化合物の投与が無い状態で対象が提供する量と比べて）循環するインスリン化合物の量を増大させることで所望の治療的又は生理学的効果が生み出される身体条件の治療において有用である。例えば、治療対象身体条件はI型又はII型糖尿病、前糖尿病及び／又は代謝症候群であり得る。1つの実施形態においては、組成物は糖尿病の症候を軽減させるために投与される。もう1つの実施形態においては、組成物は、糖尿病の発症を防止又は遅延させるために前糖尿病の対象に対して投与される。

【0200】

本発明の方法による投与のためのカチオンーインスリン化合物複合体組成物の有効量は、混合物によって及び対象によって幾分か変動することになり、対象の年令及び身体条件、送達経路及び治療される身体条件といった要因により左右されることとなる。かかる投薬量は当業者にとって既知の日常的な薬理学的手順に従って決定され得る。

【0201】

一般的提案として、全ての重量がインスリン化合物複合体混合物の重量に基づいて計算されているものとして、約0.025～約10mg/kgの活性成分（すなわち複合体）の経口投薬量が治療的効力を有することになる。より好ましい範囲は約0.06～約1mg/kgであり、さらに一層好ましい範囲は約0.125～約0.5mg/kgである。

【0202】

非経口投薬量は標準的に約0.5μg/kg～約0.5mg/kgの範囲であり、ここで全ての重量はインスリン化合物複合体混合物の重量に基づいて計算されている。より好ましい範囲は約1μg/kg～約100μg/kgである。

【0203】

投与の頻度は、通常一日1回、2回又は3回又は該身体条件を制御するのに必要なだけの回数である。代替的には、カチオンーインスリン化合物複合体組成物を連続輸液により投与することができる。治療持続時間は、治療されているインスリン化合物欠乏症のタイプによって異なり、対象の寿命の続く限りであり得る。錯体は例えば食前0～30分以内に投与され得る。例えば錯体は就寝前0～2時間以内に投与され得る。

【0204】

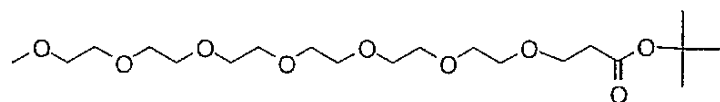
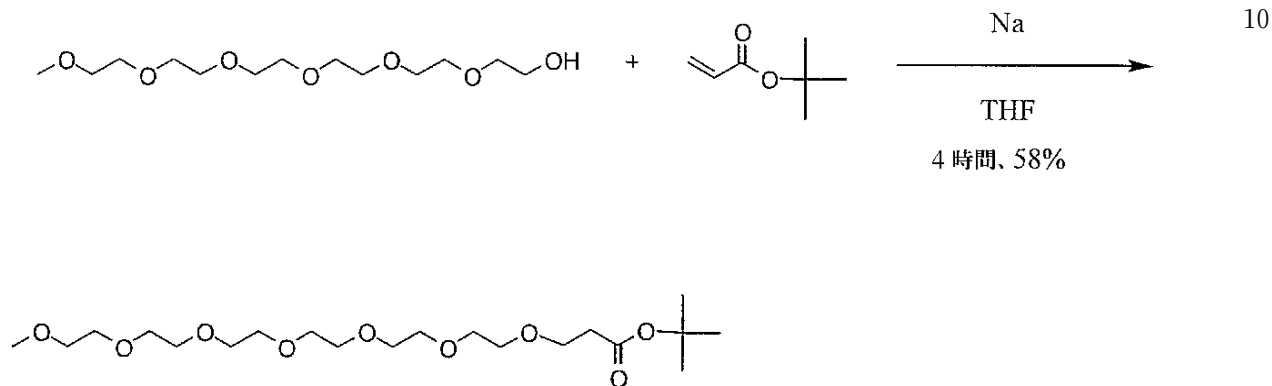
8. 合成実施例

以下の実施例は、本発明を例示し、かつ説明する目的で提示されている。

【0205】

8. 1 保護されたMPEG₆C₃オリゴマ(3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-メトキシ-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ]-エトキシ]-エトキシ]-エトキシ}-プロピオン酸tert-ブチルエステル)の合成

【化28】

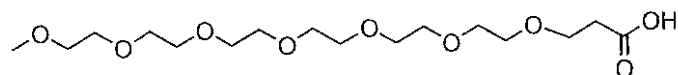
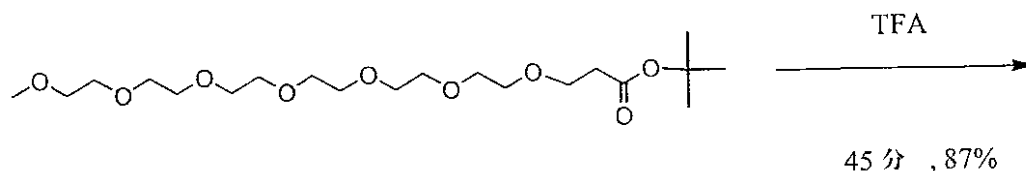


乾燥THF(10mL)中でメチルヘキサエチレングリコール(1.0g、3.37mmol)及びアクリル酸tert-ブチル(0.216g、1.69mmol)を溶解させた。溶液に対しナトリウム金属(0.4mg、0.016mmol)を添加した。室温で4時間攪拌した後、反応混合物を1MのHCl(15mL)の添加により急冷した。急冷した反応混合物を次にCH₂Cl₂(1×50mL、1×25mL)で抽出した。有機層を乾燥させ(MgSO₄)、濃縮した。シリカゲルクロマトグラフィ(溶離剤は酢酸エチル)での精製の後、油として生成物を得た(0.832g、58%)。

【0206】

8. 2 MPEG₆C₃オリゴマ酸(3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-メトキシ-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ]-エトキシ]-エトキシ]-エトキシ}-プロピオン酸)の合成

【化29】



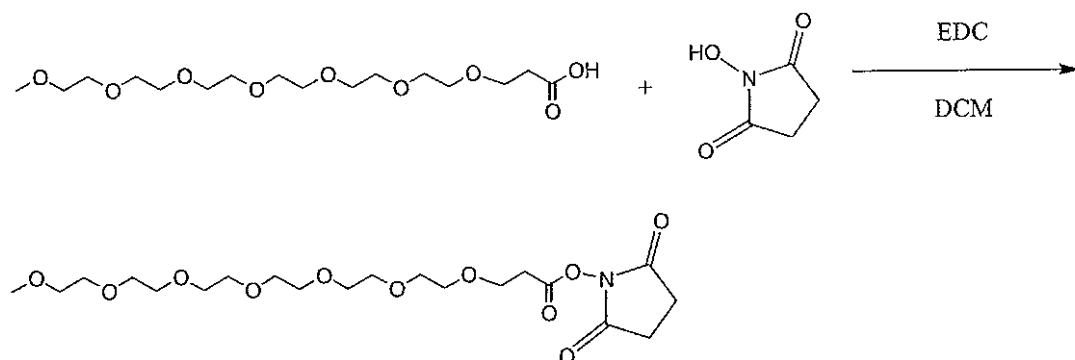
tert-ブチルエステル(0.165g、0.0389mmol)をトリフルオロ酢酸(2.0mL)中で、室温で攪拌することによって脱保護させた。次に一定重量(0.125g、87%)になるまで含有量を濃縮させた。

【0207】

8. 3 MPEG₆C₃オリゴマ(3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-メトキシ-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ]-エトキシ]-エトキシ]-エトキシ}-プロピ

オン酸 2, 5-ジオキソ-ピロリジン-1-イルエステル) の合成

【化 30】



10

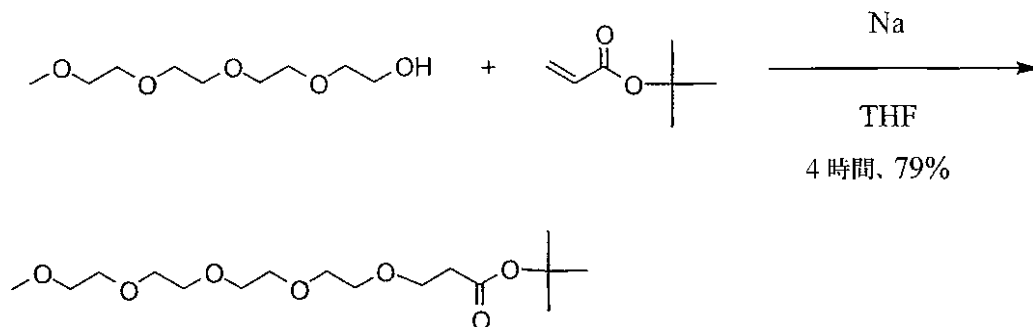
乾燥 CH_2Cl_2 (15 mL) 中で酸 (0.660 g、1.79 mmol) 及び N-ヒドロキシスクシニミド (0.2278 g、1.97 mmol) を溶解させた。エチルジメチルアミノプロピルカルボジイミド塩酸塩 (EDC、0.343 g、1.79 mmol) を添加した。一晚室温で攪拌した後、反応混合物を CH_2Cl_2 で希釈し、水 (2 × 45 mL) で洗浄した。有機層を乾燥させ (MgSO_4)、一定の重量まで濃縮した。生成物は油であった (0.441 g、53%)。

【0208】

20

8. 4 保護された MPEG_4C_3 オリゴマ (3-(2-{2-[2-(2-メトキシ-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ}-プロピオン酸 tert-ブチルエステル) の合成

【化 31】



4 時間、79%

30

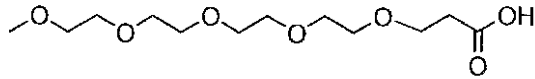
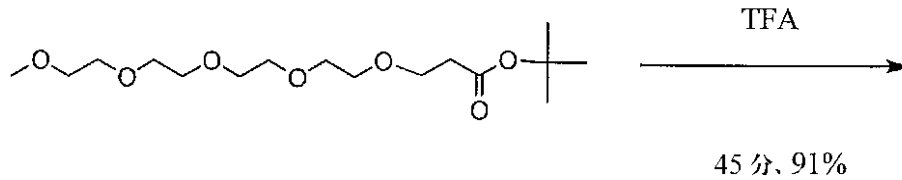
乾燥 THF (10 mL) 中でメチルテトラエチレングリコール (1.0 g、4.80 mmol) 及びアクリル酸 tert-ブチル (0.308 g、2.40 mmol) を溶解させた。溶液に対しナトリウム金属 (0.6 mg、0.024 mmol) を添加した。室温で 4 時間攪拌した後、反応混合物を 1 M の HCl (15 mL) の添加により急冷した。急冷した反応混合物を次に CH_2Cl_2 (1 × 50 mL、1 × 25 mL) で抽出した。有機層を乾燥させ (MgSO_4)、濃縮した。シリカゲルクロマトグラフィ (溶離剤は酢酸エチル) での精製の後、油として生成物を得た (1.28 g、79%)。

【0209】

40

8. 5 MPEG_6C_3 オリゴマー酸 (3-(2-{2-[2-(2-メトキシ-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ}-プロピオン酸) の合成

【化 3 2】



10

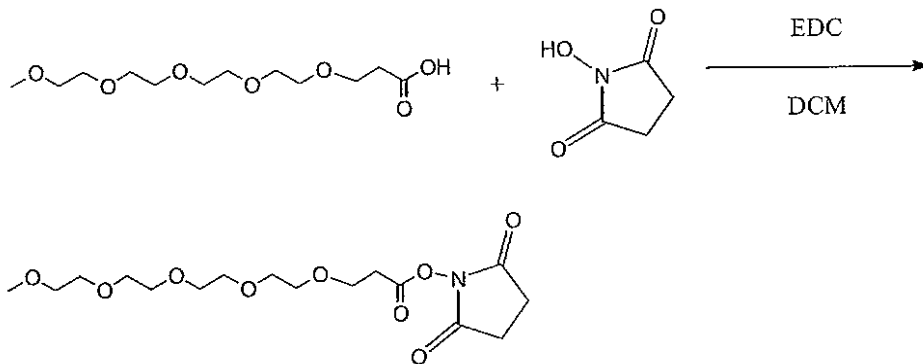
tert-ブチルエステル (1 g、3.42 mmol) をトリフルオロ酢酸 (6.0 mL) 中で室温で攪拌することによって脱保護させた。次に一定重量 (0.87 g、91%) になるまで含有量を濃縮させた。

【0210】

8.6 MPEG₄C₃オリゴマ (3-(2-{2-[2-(2-メトキシエトキシ)-エトキシ]-エトキシ}-エトキシ)-プロピオン酸2,5-ジオキソピロリジン-1-イルエステル) の合成

【化 3 3】

20



30

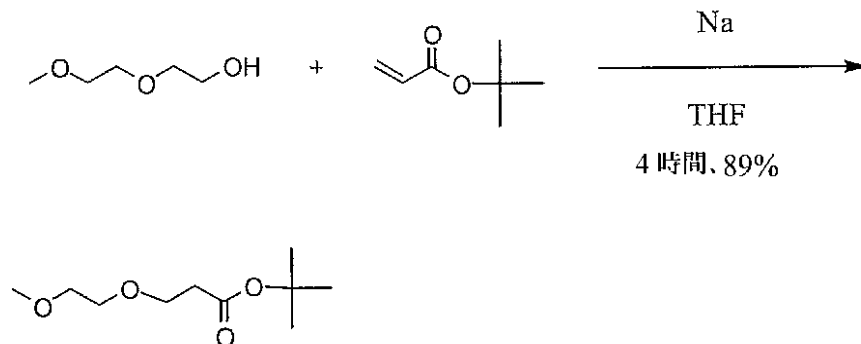
乾燥CH₂Cl₂ (20 mL) 中で酸 (0.6 g、2.14 mmol) 及びN-ヒドロキシスクシニミド (0.271 g、2.35 mmol) を溶解させた。エチルジメチルアミノプロピルカルボジイミド塩酸塩 (EDC、0.409 g、2.14 mmol) を添加した。一晚室温で攪拌した後、反応混合物をCH₂Cl₂で希釈し、水 (2×45 mL) で洗浄した。有機層を乾燥させ (MgSO₄)、一定の重量まで濃縮した。生成物は油であった (0.563 g、69%)。

【0211】

8.7 保護されたMPEG₄C₃オリゴマ (3-(2-メトキシエトキシ)-プロピオン酸tert-ブチルエステル) の合成

40

【化 3 4】



10

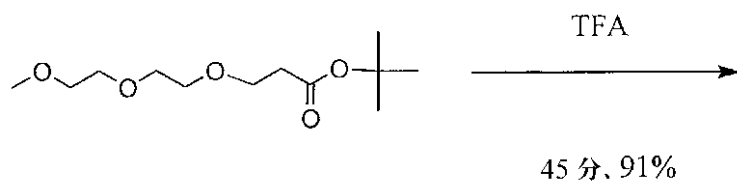
乾燥 THF (20 mL) 中でメチルテトラエチレングリコール (5.0 g、41.6 mmol) 及びアクリル酸 tert-ブチル (2.66 g、20.8 mmol) を溶解させた。溶液に対しナトリウム金属 (0.47 mg、20.8 mmol) を添加した。室温で 4 時間攪拌した後、反応混合物を 1 M の HCl (30 mL) の添加により急冷した。急冷した反応混合物を次に CH_2Cl_2 (1×100 mL、1×50 mL) で抽出した。有機層を乾燥させ (MgSO_4)、濃縮した。シリカゲルクロマトグラフィ (溶離剤は酢酸エチル) での精製の後、油として生成物を得た (7.5 g、89%)。

【0212】

8. 8 MP EG₆C₃ オリゴマ酸 (3-[2-(2-メトキシ-エトキシ)-エトキシ]-プロピオン酸) の合成

20

【化 3 5】



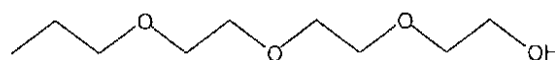
30

tert-ブチルエステル (1 g、4.90 mmol) をトリフルオロ酢酸 (6.0 mL) 中で、室温で攪拌することによって脱保護させた。次に一定重量 (0.652 g、89%) になるまで含有量を濃縮させた。

【0213】

8. 9 2-[2-(2-プロポキシ-エトキシ)-エトキシ]-エタノール (1) の合成

【化 3 6】



40

トリエチレングリコール (19.5 g、0.13 mol) をテトラヒドロフラン (150 mL) 中で溶解させ、水素化ナトリウム (2.60 g、0.065 mol) を 0.5 時間にわたり分量添加し、反応をさらに 1 時間攪拌した。その後、テトラヒドロフラン (30 mL) 中に溶解させた 1-ブロモプロパノール (8.0 g、0.065 mol) を添加用漏斗を介した滴下により添加し、反応を室温で一晩攪拌した。粗反応混合物をセライト

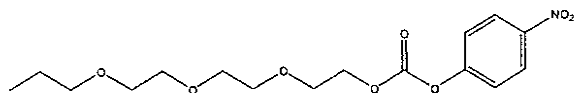
50

を通してろ過し、 CH_2Cl_2 で洗浄し、蒸発乾固させた。結果としての油を CH_2Cl_2 (250 mL) 中で溶解させ、飽和 NaCl (250 mL)、 H_2O (250 mL) で洗浄し、 MgSO_4 で乾燥させ、蒸発乾固させた。カラムクロマトグラフィ (シリカ、酢酸エチル) により、黄色がかった油である1を得た (2.24 g、18%収量)。

【0214】

8.10 炭酸4-ニトロフェニルエステル2-[2-(2-プロポキシエトキシ)-エトキシ]-エチルエステルの合成

【化37】



10

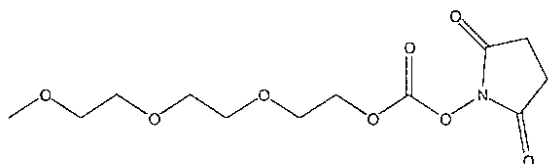
CH_2Cl_2 (20 mL) 中に4-ニトロクロロホルマート (3.45 g、17.1 mmol) 及び1 (2.2 g、11.4 mmol) を溶解させた。10分間攪拌した後、TEA (2.1 mL、15 mmol) を添加し反応を室温で一晩攪拌した。粗反応を、 CH_2Cl_2 (50 mL) で希釈し、1Mの HCl (50 mL)、 H_2O (50 mL) で洗浄し、 MgSO_4 で乾燥させ、蒸発乾固させた。カラムクロマトグラフィ (シリカ、酢酸エチル/ヘキサン、3:2) により、黄色がかった油である2を得た (2.57 g、63%収量)。

20

【0215】

8.11 炭酸2,5-ジオキソピロリジン-1-イルエステル2-[2-(2-メトキシエトキシ)-エトキシ]-エチルエステルの合成

【化38】



30

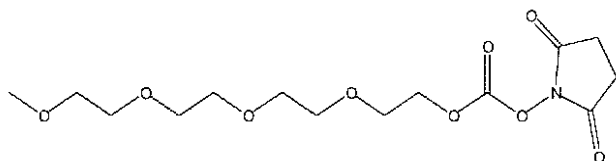
トリエチレングリコールモノメチルエーテル (1.0 g、6.1 mmol) 及びN,N'-ジスクシニミジルカルボナート (1.87 g、7.3 mmol) をアセトニトリル (10 mL) 中に溶解させた。次にトリエチルアミン (1.3 mL、9.15 mmol) を添加し、室温で反応を一晩攪拌した。粗反応を蒸発乾固させ、飽和 NaHCO_3 (50 mL) 中に溶解させ、酢酸エチル (2×50 mL) で洗浄し、 MgSO_4 で乾燥させ、蒸発乾固させた。カラムクロマトグラフィ (シリカ、酢酸エチル) により、透明油である1を得た (0.367 g、20%収量)。

【0216】

8.12 炭酸2,5-ジオキソピロリジン-1-イルエステル2-{2-[2-(2-メトキシエトキシ)-エトキシ]-エトキシ}-エチルエステル(1)の合成

40

【化39】



トリエチレングリコールモノメチルエーテル (1.0 g、4.8 mmol) 及びN,N'-ジスクシニミジルカルボナート (1.48 g、5.8 mmol) をアセトニトリル (10 mL) 中に溶解させた。次にトリエチルアミン (1.0 mL、7.2 mmol) を添

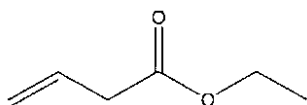
50

加し、室温で反応を一晩攪拌した。粗反応を蒸発乾固させ、飽和 NaHCO_3 (30 mL) 中に溶解させ、酢酸エチル (2×30 mL) で洗浄し、 MgSO_4 で乾燥させ、蒸発乾固させた。カラムクロマトグラフィ (シリカ、酢酸エチル/MeOH、20:1) により、透明油である1を得た (0.462 g、28%収量)。

【0217】

8. 13 ブト-3-エン酸エチルエステルの合成

【化40】



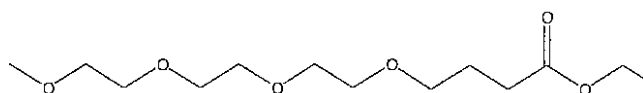
10

ビニル酢酸 (10.0 g、0.12 mol) をエタノール (200 mL) 中に溶解させ、濃硫酸 (0.75 mL、0.014 mol) を添加した。反応を4時間加熱還流した。粗反応を酢酸エチル (200 mL) で希釈し、 H_2O (200 mL)、飽和 NaHCO_3 (200 mL) で洗浄し、 MgSO_4 で乾燥させ、蒸発乾固させ、透明な油である1を得た (3.17 g、23%)。

【0218】

8. 14 4- {2- [2- (2-メトキシ-エトキシ) -エトキシ] -エトキシ} -酪酸エチルエステルの合成

【化41】



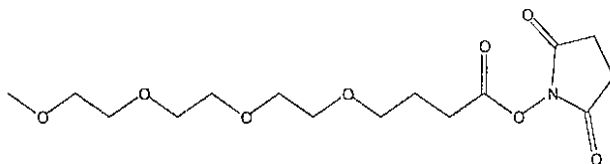
20

トリエチレングリコールモノメチルエーテル (4.27 g、0.026 mol) 及びブト-3-エン酸エステル (1.5 g、0.013 mol) をテトラヒドロフラン (10 mL) 中で溶解させた。次に塊の Na° (0.030 g、0.013 mol) を添加し、反応を4時間攪拌した。粗反応を1Mの HCl (20 mL) で急冷し、酢酸エチルで洗浄した (3×20 mL)。有機層を組合せ、 H_2O (2×10 mL) で洗浄し、 MgSO_4 で乾燥させ、蒸発乾固させて黄色がかった油として2を得た (1.07 g、30%収量)。

【0219】

8. 15 4- {2- [2- (2-メトキシ-エトキシ) -エトキシ] -エトキシ} -酪酸の合成

【化42】



30

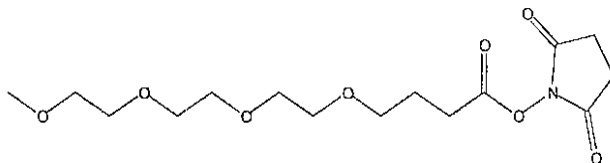
40

4- {2- [2- (2-メトキシ-エトキシ) -エトキシ] エトキシ} -酪酸エチルエステル (1.07 g、4.0 mmol) を1Mの MaOH (10 mL) 中に溶解させ、反応を2時間攪拌した。粗反応をインスリン化合物複合体 (40 mL) で希釈し、濃 HCl で最高pH2まで酸性化させ、 CH_2Cl_2 (2×50 mL) で洗浄し、 MgSO_4 で乾燥させ、蒸発乾固させて透明な油である3を得た (0.945 g、94%収量)。

【0220】

8. 16 4- {2- [2- (2-メトキシ-エトキシ) -エトキシ] -エトキシ} -酪酸2, 5-ジオキソ-ピロリジン-1-イルエステルの合成

【化 4 3】



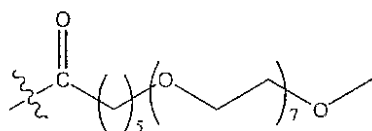
N-ヒドロキシスクシニミド（0.55 g、4.8 mmol）及びEDCI（1.15 g、6.0 mmol）を CH_2Cl_2 （7 mL）中に溶解させた。次に、 CH_2Cl_2 （2 mL）中に溶解させた4-〔2-〔2-（2-メトキシエトキシ）-エトキシ〕-エトキシ〕-酪酸（0.940 g、3.8 mmol）を添加した。反応を室温で一晩攪拌した。粗反応を CH_2Cl_2 （21 mL）で希釈し、1 MのHCl（30 mL）、 H_2O （30 mL）で洗浄し、 MgSO_4 で乾燥させ、蒸発乾固させた。カラムクロマトグラフィ（シリカ、酢酸エチル）により、透明油である4を得た（0.556 g、43%収量）。

【0221】

9 錯体の調製

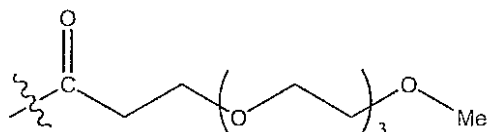
インスリン化合物複合体の亜鉛錯体の調製のための方法が調査された。インスリン化合物及びインスリン化合物類似体の錯化／結晶化に使用される公表済みの方法にとって例外的なものである新しい方法が、HIM2の亜鉛錯体を作るために開発された。HIM2は

【化 4 4】



という構造を有しB29にカップリングされた修飾部分を伴うヒトインスリンモノ複合体である。

【化 4 5】



という構造を有しB29にカップリングされた修飾部分を伴うヒトインスリンモノ複合体であるIN105を用いて、さらなる錯体が調製された。

【0222】

該方法は、インスリン化合物複合体固体の「T型」及び「R型」そして「プロタミン」カチオン錯体という3つの主要なタイプを提供した。

【0223】

9.1 T型固体の調製と分析

9.1.1 HIM2のT型Zn錯体（2 g/L）の調製試行

10%のHClを用いて最高3の最終pHを有する、約2 g/LのHIM2溶液を調製した。以上の溶液の10 mLのアリコート（20 mgのタンパク質）に対し、0.25 Mという最終濃度に至るまで氷酢酸を添加した。2% w/wの ZnCl_2 溶液20（又は40） μL を試料に添加した。濃水酸化アンモニウムを用いてpHを5.1（又は5.5）に調整した。室温（又は+5℃）で15分間溶液を攪拌し、その後一日室温（又は+5℃

）に放置して固体を形成させた。反応を室温（又は＋５℃）に一日放置させた後、結晶又は沈殿は全く形成しなかった。「安定な亜鉛インスリン化合物類似体結晶の調製」という題の米国特許第５，５０４，１８８号明細書の実施例２を参照のこと。

【０２２４】

９．１．２ HIM2のT型Zn錯体（濃度１０g／L）

１０％のHClを用いて最高３の最終pHを有する約１０g／LのHIM2溶液を調製した。以上の溶液の１０mL（１００mgのタンパク質）アリコートに対し、０．２５Mという最終濃度に至るまで水酢酸を添加した。１０％w／wのZnCl₂溶液４０μLを試料に添加した。濃水酸化アンモニウムを用いてpHを５．２０に調整した。＋５℃で１５分間溶液を攪拌し、その後５日間＋５℃に放置して固体を形成させた。

10

【０２２５】

反応混合物を遠心分離管に移し、１０分間２０００RPMで遠心分離させた。溶液を傾瀉し、固体を５mLの低温DI（脱イオン）水で洗浄した。この溶液を１０分間２０００RPMで遠心分離してから水を傾瀉し、さらなる５mLの低温DI水で固体を洗浄した。ここでも又、試料を約２０００RPMで約１０分間遠心分離してからH₂Oを傾瀉した。試料を５mLの２００プールの低温EtOHで洗浄し、１０分間２０００RPMで遠心分離してからEtOHを傾瀉した。試料を凍結乾燥機の中で乾燥させて白色固体を得た。

【０２２６】

９．１．３ HIM2のT型Zn錯体（濃度２０g／L）

１０％のHClを用いて最高３の最終pHを有する約２０g／LのHIM2溶液を調製した。以上の溶液の１０mL（２００mgのタンパク質）アリコートに対し、０．２５Mという最終濃度に至るまで水酢酸を添加した。１０％w／wのZnCl₂溶液８０μLを試料に添加した。濃水酸化アンモニウムを用いてpHを５．３７に調整した。＋５℃で１５分間溶液を攪拌し、その後４日間＋５℃に放置して固体を形成させた。

20

【０２２７】

反応混合物を遠心分離管に移し、２０分間２６００RPMで遠心分離させた。溶液を傾瀉し、固体を５mLの低温DI（脱イオン）水で洗浄した。この溶液を２０分間２６００RPMで遠心分離してから水を傾瀉し、さらなる５mLの低温DI水で固体を洗浄した。ここでも又、試料を約２６００RPMで約２０分間遠心分離してからH₂Oを傾瀉した。試料を５mLの２００プールの低温EtOHで洗浄し、２０分間２６００RPMで遠心分離してからEtOHを傾瀉した。試料を凍結乾燥機の中で乾燥させて白色固体を得た。

30

【０２２８】

９．１．４ HIM2のT型Zn錯体（濃度３０g／L）

１０％のHClを用いて最高３の最終pHを有する約３０g／LのHIM2溶液を調製した。以上の溶液の５０mL（１．５gのタンパク質）アリコートに対し、０．２５Mという最終濃度に至るまで水酢酸を添加した。１０％w／wのZnCl₂溶液６００μLを試料に添加した。濃水酸化アンモニウムを用いてpHを５．３４に調整した。溶液を５日間＋５℃に放置して固体を形成させた。

【０２２９】

反応混合物を遠心分離管に移し、１５分間２８００RPMで遠心分離させた。溶液を傾瀉し、固体を１０mLの低温DI（脱イオン）水で洗浄し、各洗浄毎に遠心分離し、水を傾瀉した。次に、試料を１０mLの２００プールの低温EtOHで３回洗浄した。それを１５分間２８００RPMで遠心分離し、各洗浄後に傾瀉した。試料を凍結乾燥機の中で乾燥させて白色固体を得た。

40

【０２３０】

図１及び２は、２４時間成長させた結晶を示すZeiss Axiovert顕微鏡を用いて撮影した顕微鏡写真である。図１では、結晶サイズは長さが約１１．３μMであり、直径約５．３μMである。図２では、左側の結晶のサイズは、長さが約１５．１μMであり、直径約５．９μMであり、右側の結晶のサイズは長さ約９．１μMであり、直径約５．３μMである。図３は、５日間成長させた結晶を示すZeiss Axiovert

50

顕微鏡を用いて撮影した顕微鏡写真である。1つの態様では、本発明は、図1、2又は3に示されている形態を有する結晶を含んでいる。

【0231】

9. 1. 5 HIM2のT型Zn錯体（濃度50g/L）

10%のHClを用いて最高3の最終pHとなるように約50g/LのHIM2溶液を調製した。以上の溶液の10mLアリコートに対し、0.25Mという最終濃度に至るまで氷酢酸を添加した。10%ZnCl₂溶液200μLを試料に添加した。濃水酸化アンモニウムを用いてpHを5.23に調整した。+5℃で15分間溶液を攪拌し、4日間+5℃に放置して固体形成を発生させた。

【0232】

反応混合物を遠心分離管に移し、20分間2600RPMで遠心分離させた。溶液を傾瀉し、固体を5mLの低温DIH₂Oで洗浄した。この溶液を20分間2600RPMで遠心分離してからH₂Oを傾瀉し、さらなる5mLの低温DIH₂Oで固体を洗浄した。ここでも又、試料を約2600RPMで約20分間遠心分離してからH₂Oを傾瀉した。試料を5mLの200プールの低温EtOHで洗浄し、20分間2600RPMで遠心分離してからEtOHを傾瀉した。試料を凍結乾燥機の中で3日間乾燥させた。

【0233】

9. 1. 6 HIM2のT型Zn錯体（1gスケール）

10%のHClを用いて最高3の最終pHとなるまで約10g/LのHIM2溶液を調製した。以上の溶液の50mL（500mgのタンパク質）アリコートに対し、0.25Mという最終濃度に至るまで氷酢酸を添加した。10%のZnCl₂溶液200μLを試料に添加した。濃水酸化アンモニウムを用いてpHを5.49に調整した。+5℃で15分間溶液を攪拌し、その後7日間+5℃に放置して固体形成を発生させた。

【0234】

反応混合物を遠心分離管に移し、20分間2600RPMで遠心分離させた。溶液を傾瀉し、固体を10mLの低温DIH₂Oで洗浄した。この溶液を20分間2600RPMで遠心分離してからH₂Oを傾瀉した。さらに2回水洗浄を繰り返した。次に、試料を10mLの200プールの低温EtOHで洗浄し、20分間2600RPMで遠心分離してからEtOHを傾瀉した。さらに2回EtOHでの洗浄を同じ要領で実施してから、試料を凍結乾燥機上に置いて4日間乾燥させた。

【0235】

9. 1. 7 中性pHでのHIM2のT型Zn錯体（5gスケール）

10%のHClを用いて最高3の最終pHとなるまで約10g/LのHIM2溶液を調製した。試料に2ミリリットルの10%ZnCl₂溶液を添加した。濃水酸化アンモニウムを用いてpHを7.05に調整した。溶液を一晩室温で攪拌して固体形成を発生させた。

【0236】

350mL入りの微細フリット（4.5～5μm）ディスク型漏斗（Chem Glass CG1402-28、直径90mm）に対し、複数の部分に分けて乳状のZn-HIM2反応混合物（500mL）を添加した。約4～6時間真空を適用しながら、枝付きフラスコ内にろ液を収集した。1つの選択肢として、ろ塊を100mLの低温1%ZnCl₂で洗浄し、別々にろ液を収集することができる。ろ塊を100mLの氷冷水で洗浄し、ろ液を再度収集した。ろ過を同様にさらに100mLの氷冷100%エタノールで洗浄し、ろ液を再度収集した。ろ塊の最終洗浄液は100mLの新鮮氷冷水であり、最終ろ液を収集した。ろ塊を真空下で乾燥させかつ／又は12～18時間空気乾燥させた。乾燥の後、ろ塊を漏斗からこそげ取り、秤量し、HPLCを介して水分／タンパク質含有量を測定した。さまざまな洗浄ステップから収集されたるろ液を同様に、プロセス中の喪失Zn-HIM2の濃度を判定する目的でHPLCを用いて分析した。ろ過により2.5%w/wのZn含有量が生み出され、全体的収量は98%であった。

【0237】

9. 1. 8 中性 pHでのH I M 2のT型Z n錯体（5 0 0 m gスケール）

1 0 %のH C lを用いて最高3の最終p Hとなるまで約1 0 g / LのH I M 2溶液を調製した。試料に2 0 0 μ Lの1 0 % Z n C l₂溶液を添加した。濃水酸化アンモニウムを用いてp Hを7. 0 6に調整した。溶液を1 5分間+ 5で、その後2日間+ 5℃に放置して固体形成を発生させた。

【0 2 3 8】

反応混合物を遠心分離管に移し、1 5分間2 8 0 0 R P Mで遠心分離させた。溶液を傾瀉し、固体を1 0 m Lの低温D I H₂ Oで洗浄した。この溶液を1 5分間2 8 0 0 R P Mで遠心分離してからH₂ Oを傾瀉した。さらに2回水洗浄を繰り返した。その後、試料を1 0 m Lの2 0 0 プルーフの低温E t O Hで洗浄し、2 0分間2 6 0 0 R P Mで遠心分離してからE t O Hを傾瀉した。さらに2回のE t O H洗浄を同じ要領で行なってから、凍結乾燥機上に試料を置いて2日間乾燥させた。

【0 2 3 9】

【表 1】

9.1.9 T型固体組成物についての結果

反応	観察結果	溶解度(mg/mL)	% w/w Zn
9.1.1	固体形成無し	該当無し	該当無し
9.1.2	白色固体	NEM	NEM
9.1.3	白色固体	NEM	NEM
9.1.4	白色固体	NEM	0.53
9.1.5	白色固体	146	0.66
9.1.6	白色固体	109	0.55
9.1.7	白色固体	ND	2.50
9.1.8	白色固体	ND	1.63

NEM = 材料不充分

ND = データ無し

【0 2 4 0】

9. 2 R型固体の調製及び分析

9. 2. 1 2 g / Lのフェノールを用いたH I M 2のR型Z n錯体

氷酢酸を用いて最高3の最終p Hとなるまで約2 g / LのH I M 2溶液を調製した。上述の溶液の1 0 m Lアリコートに対して3 3マイクロリットルの液化フェノールを添加した。濃水酸化アンモニウムを用いてp Hを5. 8 9に調整した。1 6 0 μ Lの1 0 % w / wのZ n C l₂溶液を試料に添加した。1 5分間室温で溶液を攪拌し、次に室温に3日間放置してさらに多くの沈殿物を形成させた。

【0 2 4 1】

反応混合物を遠心分離管に移し、1 5分間3 4 0 0 R P Mで遠心分離させた。上清を傾瀉し、固体を5 m Lの低温D I 水で洗浄した。この溶液を1 5分間3 2 0 0 R P Mで遠心分離してからH₂ Oを傾瀉した。次に、試料を5 m Lの2 0 0 プルーフの低温E t O Hで洗浄し、1 5分間3 2 0 0 R P Mで遠心分離してからE t O Hを傾瀉した。再び試料を5 m Lの低温E t O Hで洗浄したが、遠心分離はしなかった。固体を管の底面に沈降させ、次にこれを高速真空内に入れて乾燥させた。

【0 2 4 2】

9. 2. 2 2 0 g / LでのH I M 2のR型Z n錯体の調製

1 0 %のH C lを用いて最高3の最終p Hとなるまで約2 0 g / LのH I M 2溶液を調製した。上述の溶液の1 0 m Lアリコートに対して6 6マイクロリットルの液化フェノールを添加した。濃水酸化アンモニウムを用いてp Hを6. 4 3に調整した。3 2 0 μ Lの1 0 % w / wのZ n C l₂溶液を試料に添加した。1 5分間室温で溶液を攪拌し、次に室温に4日間放置してさらに多くの沈殿物を形成させた。

【0243】

反応混合物を遠心分離管に移し、20分間2600RPMで遠心分離させた。溶液を傾瀉し、固体を5mLの低温DIH₂Oで洗浄した。この溶液を20分間2600RPMで遠心分離してからH₂Oを傾瀉し、固体をさらに5mLの低温DIH₂Oで洗浄した。ここでも又、試料を20分間2600RPMで遠心分離してから、H₂Oを傾瀉した。試料を5mLの200プルーフの低温EtOHで洗浄し、20分間2600RPMで遠心分離してからEtOHを傾瀉した。試料を3日間凍結乾燥させた。

【0244】

9. 2. 3 30g/LでのHIM2のR型Zn錯体の調製

10%のHClを用いて最高3の最終pHとなるまで約30g/LのHIM2溶液を調製した。上述の溶液の10mLアリコートに対して99マイクロリットルの液化フェノールを添加した。濃水酸化アンモニウムを用いてpHを6.47に調整した。次に480μLの10%w/wのZnCl₂溶液を試料に添加した。15分間室温で溶液を攪拌し、次に室温に4日間放置してさらに多くの沈殿物を形成させた。

10

【0245】

反応混合物を遠心分離管に移し、20分間2600RPMで遠心分離させた。溶液を傾瀉し、固体を5mLの低温DIH₂Oで洗浄した。この溶液を20分間2600RPMで遠心分離してからH₂Oを傾瀉し、固体をさらに5mLの低温DIH₂Oで洗浄した。ここでも又、試料を20分間2600RPMで遠心分離してから、H₂Oを傾瀉した。試料を5mLの200プルーフの低温EtOHで洗浄し、20分間2600RPMで遠心分離してからEtOHを傾瀉した。試料を3日間凍結乾燥させた。

20

【0246】

図4は、4日間成長させた固体を示す。写真はZeiss Axiovert顕微鏡を用いて撮影したものである。結晶の平均長は約9.7μmである。

【0247】

9. 2. 4 50g/LでのHIM2のR型Zn錯体の調製

10%のHClを用いて最高3の最終pHとなるまで約50g/LのHIM2溶液を調製した。上述の溶液の10mLアリコートに対して165マイクロリットルの液化フェノールを添加した。濃水酸化アンモニウムを用いてpHを6.82に調整した。800μLの10%のZnCl₂溶液を試料に添加した。15分間室温で溶液を攪拌し、次に室温に4日間放置してさらに多くの沈殿物を形成させた。

30

【0248】

反応混合物を遠心分離管に移し、20分間2600RPMで遠心分離させた。溶液を傾瀉し、固体を5mLの低温DIH₂Oで洗浄した。この溶液を20分間2600RPMで遠心分離してからH₂Oを傾瀉し、固体をさらに5mLの低温DIH₂Oで洗浄した。ここでも又、試料を20分間2600RPMで遠心分離してから、H₂Oを傾瀉した。試料を5mLの200プルーフの低温EtOHで洗浄し、20分間2600RPMで遠心分離してからEtOHを傾瀉した。試料を3日間凍結乾燥させた。

【0249】

9. 2. 5 1gスケールでのHIM2のR型Zn錯体の調製

10%のHClを用いて最高3の最終pHとなるまで約10g/LのHIM2溶液を調製した。上述の溶液の50mLアリコートに対して165マイクロリットルの液化フェノールを添加した。濃水酸化アンモニウムを用いてpHを6.42に調整した。800μLの10%のZnCl₂溶液を試料に添加した。15分間室温で溶液を攪拌し、次に室温に7日間放置してさらに多くの沈殿物を形成させた。

40

【0250】

反応混合物を遠心分離管に移し、20分間2600RPMで遠心分離させた。溶液を傾瀉し、固体を10mLの低温DIH₂Oで洗浄した。この溶液を20分間2600RPMで遠心分離してからH₂Oを傾瀉した。さらに2回の水洗浄を同じ要領で行った。試料を10mLの200プルーフの低温EtOHで洗浄し、20分間2600RPMで遠心分離

50

してから E t O H を傾瀉した。さらに 2 回の E t O H 洗浄を同じ要領で実施してから試料を凍結乾燥機上に 4 日間置いた。

【0251】

9. 2. 6 5 g スケールでの H I M 2 の R 型 Z n 錯体

10 % の H C l を用いて最高 3 の最終 p H となるまで約 10 g / L の H I M 2 溶液を調製した。上述の溶液 450 m L に対して 500 マイクロリットルの液化フェノールを添加した。濃水酸化アンモニウムを用いて p H を 7. 1 に調整した。800 μ L の 10 % の Z n C l ₂ 溶液を試料に添加した。15 分間室温で溶液を攪拌し、次に室温に一晩放置してさらに多くの沈殿物を形成させた。

【0252】

以上で実施した反応を 3 回のろ過試行に分割した。試行 1 では、反応混合物を、微細フリット漏斗を通してろ過し、その後 1 % の Z n C l ₂ 溶液で洗浄した。材料を真空ろ過を介して一晩乾燥させた。第 2 の試行は、同様にろ紙も含んでいる中度フリットフィルター上でろ過した。次に物質をエタノールと水で洗浄し、一晩真空ろ過を介して乾燥させた。最終的に第 3 の試行を微細フリット漏斗を通してろ過し、1 % の Z n C l ₂ 溶液で洗浄し、同じくエタノールと水でも洗浄した。この材料を一晩、真空ろ過下でも乾燥させた。

【0253】

【表 2】

	試行1(微細フリット、 ZnCl ₂ 洗浄、 H ₂ O/EtOH洗浄無し)	試行2(ろ紙、 中度フリット、 EtOH/H ₂ O洗浄)	試行3(微細フリット、 EtOH/H ₂ O 洗浄)
収量	74%	93%	58%
w/w% Zn	1.99	2.83	2.06%
w/w% フェノール	0.033	0.45	1.28

【0254】

9. 2. 7. 中性 p H での H I M 2 の R 型 Z n 錯体

10 % の H C l を用いて最高 3 の最終 p H となるまで約 10 g / L の H I M 2 溶液を調製した。上述の溶液 50 m L に対して 165 マイクロリットルの液化フェノールを添加した。次に 200 マイクロリットルの 10 % の Z n C l ₂ 溶液を試料に添加した。濃水酸化アンモニウムを用いて p H を 7. 18 に調製した。溶液を 2 日間室温に放置して沈殿物を形成させた。

【0255】

反応混合物を遠心分離管に移し、20 分間 2800 R P M で遠心分離した。しかしながら、材料は最初管の底面に沈降しなかったため、約 2 時間遠心分離した。溶液を傾瀉し、固体を 5 m L の低温 D I H ₂ O で洗浄した。この溶液を 60 分間 2800 R P M で遠心分離してから、H ₂ O を傾瀉した。さらに 2 回水洗浄を繰り返した。その後、試料を 5 m L の 200 プルーフの低温 E t O H で洗浄し、60 分間 2800 R P M で遠心分離してから E t O H を傾瀉した。さらに 2 回 E t O H 洗浄を同じ要領で実施した。材料は、3 回目の E t O H 洗浄の後濁っており一晩冷蔵庫内に置いて反応をさらに沈降させた。溶媒を傾瀉し、材料を 2 日間凍結乾燥機上に置いた。

【0256】

【表 3】

9.2.8. R型固体組成物についての結果

反応	観察結果	溶解度(mg/mL)	% w/w Zn	フェノール
9.2.1	白色固体	NEM	NEM	NEM
9.2.2	白色固体	44.75	1.21	0.097
9.2.3	白色固体	50.49	1.74	0.41
9.2.4	白色固体	36.24	2.32	0.52
9.2.5	白色固体	47.7	1.06	0.16
9.2.6	白色固体	ND	以上参照	以上参照
9.2.7	白色固体	ND	1.74	1.62

NEM = 材料不十分

ND = データ無し

10

【0257】

9. 3. プロタミン固体の調製及び分析

9. 3. 1. 酸性 pH でのプロタミンを用いた H I M 2 の T 型 Z n 錯体の調製

10%の H C l を用いて最高 3 の最終 pH を有していた H I M 2 の 10 g / L の原液に対してプロタミンを添加した。以上の溶液の 10 mL アリコート (100 mg のタンパク質) に対し 0.25 M という最終濃度に至るまで氷酢酸を添加した。10%の Z n C l₂ 溶液 200 マイクロリットルを試料に添加した。濃水酸化アンモニウムを用いて pH を最

20

高 5 に調整した。+5℃で 15 分間溶液を攪拌し、その後 2 日間 +5℃で放置して固体形成を発生させた。

【0258】

反応混合物を遠心分離管に移し、20 分間 2600 RPM で遠心分離させた。溶液を傾瀉し、固体を 10 mL の低温 D I H₂ O で洗浄した。この溶液を 20 分間 2600 RPM で遠心分離してから H₂ O を傾瀉した。さらに 2 回の H₂ O 洗浄を同じ要領で行なった。その後、試料を 10 mL の 200 プルーフの低温 E t O H で洗浄し、20 分間 2600 RPM で遠心分離してから E t O H を傾瀉した。同じ要領でさらに 2 回 E t O H 洗浄を実施してから、試料を 2 日間凍結乾燥機上に置いた。

【0259】

9. 3. 2 中性 pH でのプロタミンを用いた H I M 2 の T 型 Z n 錯体の調製

10%の H C l を用いて最高 3 の最終 pH になるまで約 30 g / L の H I M 溶液を調製した。以上の溶液の 50 mL アリコート (1.5 g のタンパク質) に対し、1 ミリリットルの氷酢酸を添加した。600 マイクロリットルの 10% Z n C l₂ 溶液を反応に添加し、その後 225 ミリigram のプロタミンを添加した。濃水酸化アンモニウムを用いて pH を 6.95 に調整し反応を 2 日間 +5℃に放置して固体形成を発生させた。

【0260】

反応混合物を遠心分離管に移し、20 分間 2600 RPM で遠心分離した。溶液を傾瀉し、固体を 10 mL の低温 D I H₂ O で洗浄した。この溶液を 20 分間 2600 RPM で遠心分離してから H₂ O を傾瀉した。さらに 2 回の H₂ O 洗浄を同じ要領で行なった。次に試料を 10 mL の 200 プルーフの低温 E t O H で洗浄し、20 分間 2600 RPM で遠心分離してから E t O H を傾瀉した。同じ要領でさらに 2 回 E t O H 洗浄を実施してから試料を 3 日間凍結乾燥機上に置いた。

40

【0261】

9. 3. 3 酸性 pH でのプロタミンを用いた H I M 2 の R 型 Z n 錯体の調製

10%の H C l を用いて最高 3 の最終 pH になるまで約 10 g / L の H I M 2 溶液を調製した。以上の溶液の 150 mL アリコート (1.5 g のタンパク質) に対し、液化フェノール (2.48 mL) を添加した。反応の pH を濃水酸化アンモニウムを用いて最高 6.57 に調整した。12 マイクロリットルの 10% Z n C l₂ 溶液を反応に添加し、その後 225 ミリigram のプロタミンを添加した。反応混合物を 15 分間室温で攪拌してから

50

、室温に2日間放置して固体形成を発生させた。

【0262】

反応混合物を遠心分離管に移し、15分間2800RPMで遠心分離した。溶液を傾瀉し、固体を50mLの低温DIH₂Oで洗浄した。この溶液を15分間2800RPMで遠心分離してからH₂Oを傾瀉した。さらに2回のH₂O洗浄を同じ要領で行なった。次に試料を10mLの200プルーフの低温EtOHで洗浄し、15分間2800RPMで遠心分離してからEtOHを傾瀉した。同じ要領でさらに2回EtOH洗浄を実施してから試料を2日間凍結乾燥機上に置いた。

【0263】

9. 3. 4 中性pHでのプロタミンを用いたHIM2のR型Zn錯体の調製

10

10%のHClを用いて最高3の最終pHとなるまで、約10g/LのHIM2溶液を調製した。150mLの反応に対し液化フェノール(495mL)を添加した。次に600ミリリットルの10%ZnCl₂溶液を反応に添加し、その後75mgのプロタミンを添加した。濃水酸化アンモニウムを用いてpHを7.01に調整した。反応を室温に3日間放置して固体を形成させた。

【0264】

反応混合物を遠心分離管に移し、15分間2800RPMで遠心分離させた。溶液を傾瀉し、固体を50mLの低温DIH₂Oで洗浄した。この溶液を15分間2800RPMで遠心分離してからH₂Oを傾瀉した。さらに2回のH₂O洗浄を同じ要領で行なった。その後、試料を50mLの200プルーフの低温EtOHで洗浄し、15分間2800RPMで遠心分離してからEtOHを傾瀉した。同じ要領でさらに2回EtOH洗浄を実施してから、試料を2日間凍結乾燥機上に置いた。

20

【0265】

【表4】

9.3.5 プロタミン固体組成物についての結果

反応	観察結果	溶解度(mg/mL)	% w/w Zn	フェノール
9.3.1	白色固体	ND	0.66	該当無し
9.3.2	白色固体	ND	2.47	該当無し
9.3.3	白色固体	36.78	1.22	9.87
9.3.4	白色固体	NEM	NEM	NEM

30

NEM=材料不充分

ND= データ無し

【0266】

9. 4 インスリン化合物ジ複合体錯体の調製及び分析

9. 4. 1 A1及びB29インスリン化合物ジ複合体でのT型Zn錯体

ヒトインスリン(DICON-1)のB29及びA1にカップリングされた修飾部分-C(O)(CH₂)₅(OCH₂CH₂)₇OCH₃を有するインスリン化合物ジ複合体を、約10g/Lで溶液に添加し、10%のHClを用いて最終pH3.15になるように調製した。以上の溶液の3.75mLアリコートに対し、0.25Mという最終濃度まで氷酢酸を添加した。その後15μLの10%ZnCl₂溶液を試料に添加した。濃水酸化アンモニウムを用いてpHを4.90に調整した。+5℃で15分間溶液を攪拌し、次に+5℃に6日間放置して、固体を形成させた(白色固体を生成した)。

40

【0267】

9. 4. 2 A1及びB29インスリン化合物ジ複合体でのR型Zn錯体

DICON-1を約10g/Lで溶液に添加し、10%HClを用いて最終pH3.15になるように調製した。以上の溶液の3.75mLアリコートに対して約12μLの液化フェノールを添加した。濃水酸化アンモニウムを用いてpHを5.75に調整した。60μLの10%ZnCl₂溶液を試料に添加した。溶液を室温で15分間攪拌し、次に6

50

日間室温に放置して、より多くの沈殿物を形成させた（白色固体を生成した）。

【0268】

反応混合物を遠心分離管に移し、20分間2600RPMで遠心分離した。溶液を傾瀉し、固体を5mLの低温DIH₂Oで洗浄した。この溶液を20分間2600RPMで遠心分離してからH₂Oを傾瀉し、さらに5mLの低温DIH₂Oで固体を洗浄した。再び試料を2600RPMで20分間遠心分離してからH₂Oを傾瀉した。試料を5mLの200プールの低温EtOHで洗浄し、20分間2600RPMで遠心分離してからEtOHを傾瀉した。試料を6日間凍結乾燥させた。

【0269】

9. 4. 3 ジ複合体B1、B29（10mg/mL）

10

DICON-1を約10g/Lで溶液に添加し、33μLの液化フェノールを添加した。濃水酸化アンモニウムを用いてpHを5.34に調整した。その後160μLの10%ZnCl₂溶液を試料に添加した。溶液を2週間室温に放置して固体形成を発生させた（白色固体を生成した）。

【0270】

反応混合物を遠心分離管に移し、15分間2800RPMで遠心分離した。溶液を傾瀉し、固体を5mLの低温DIH₂Oで3回洗浄した。溶液を15分間2800RPMで遠心分離し、各洗浄後に傾瀉した。その後、試料を5mLの200プールの低温EtOHで3回洗浄した。再び試料を15分間2600RPMで遠心分離し、各洗浄後に傾瀉した。試料を2日間凍結乾燥させた。

20

【0271】

9. 4. 4 ジ複合体B1、B29（20mg/mL）

DICON-1を約20g/Lで溶液に添加し、66μLの液化フェノールを添加した。濃水酸化アンモニウムを用いてpHを7.65に調整した。その後320μLの10%ZnCl₂溶液を試料に添加した。溶液を2週間室温に放置して固体形成を発生させた（白色固体を生成した）。

【0272】

反応混合物を遠心分離管に移し、15分間2800RPMで遠心分離した。溶液を傾瀉し、固体を5mLの低温DIH₂Oで3回洗浄した。溶液を15分間2800RPMで遠心分離し、各洗浄後に傾瀉した。その後、試料を5mLの200プールの低温EtOHで3回洗浄した。再び試料を15分間2600RPMで遠心分離し、各洗浄後に傾瀉した。試料を2日間凍結乾燥させた。

30

【0273】

9. 5 T型IN105固体の調製及び分析

9. 5. 1 IN105モノ複合体のT型Zn錯体（濃度10g/L）

10%のHClを用いて最高3の最終pHをもつIN105溶液を約10g/L（100mg）で調製した。50μLの10%w/wZnCl₂溶液を試料に添加した。濃水酸化アンモニウムを用いてpHを7.52に調整した。濁った溶液を攪拌し、次に5日間室温に放置して固体を形成させた。

【0274】

40

反応混合物を遠心分離管に移し、15分間2900RPMで遠心分離した。溶液を傾瀉し、固体を10mLの低温DI水で3回洗浄した。この溶液を10分間2900RPMで遠心分離してから、水を傾瀉し、固体を低温DI水のもう1つの分量で洗浄した。その後試料を10mLの200プールの低温EtOHで3回洗浄し、10分間2900RPMで遠心分離してからEtOHを傾瀉した。試料を真空乾燥させて白色固体（90mg）を得た。

【0275】

9. 5. 2 IN105モノ複合体のT型Zn錯体（1gスケール）

10%のHClを用いて最高3の最終pHとなるように、約10g/L（1g）のIN105溶液を調製した。試料に対し500μLの10%ZnCl₂溶液を添加した。濃水

50

酸化アンモニウムを用いてpHを最高7.4に調整した。濁った溶液を15分間攪拌し、次に室温に最高2日間放置してからろ過した。

【0276】

反応混合物を、ハウスバキューム下で焼結ガラス漏斗（微細）を通してろ過した。ろ過した材料の入った焼結ガラス漏斗を一晩ガラス乾燥機内で真空下に置き、結果として白色微細粉末（900mg）を得た。

【0277】

9.5.3 中性pHでのIN105モノ複合体のT型Zn錯体（5gスケール）

10%のHClを用いて最高3の最終pHとなるように、約10g/LのIN105溶液（5g、ロット#Nobex 040706L）を調製した。試料に対し2mLの10%ZnCl₂溶液を添加した。濃水酸化アンモニウムを用いてpHを最高7.4に調整した。次に、濁った溶液を一晩室温に放置して、ろ過の前に固体を形成させた。

【0278】

以上で実施された反応を、50mLの遠心分離管4本に分割し、最初に3200RPMで合計2時間遠心分離した。次に材料を20分間9000RPMで遠心分離に付し、一晩5℃で保管した。上清を傾瀉し、固体を各管から10mLの低温DIH₂Oで洗浄した。管を逆さにし最高1時間3200RPMで遠心分離してから、H₂Oを傾瀉し、固体をさらに10mLの低温DIH₂Oで洗浄した。再び、試料を最高1時間3200RPMで遠心分離してからH₂Oを傾瀉した。試料を10mLの200プルーフの低温EtOHで2回洗浄し、1時間3200RPMで遠心分離してからEtOHを傾瀉した。2日間試料を真空乾燥させて、白色粉末1.64g（ロット#Nobex 040730L-A）を得た。

【0279】

【表5】

9.5.4 T型IN105固体組成物についての結果

反応	観察結果	0.1Mリン酸緩衝液、 約7.4のpH中の 溶解度(mg/mL)	% w/w Zn
9.5.1	溶解度	80-85	0.0
9.5.2	溶解度	10-20	1.67
9.5.3	溶解度	ND	1.88

【0280】

9.6 R型IN105固体の調製及び分析

9.6.1 中性pHでのフェノールを用いたIN105複合体でのR型Zn錯体

10%のHClを用いて最高3の最終pHとなるように、約10g/L（500mg）のIN105溶液を調製した。以上の溶液に対し200μLの10%ZnCl₂溶液及び165μLの液化フェノールを添加した。濃水酸化アンモニウムを用いてpHを7.37に調整した。濁った溶液を室温に最高2日間放置して固体を形成させてからろ過した。

【0281】

反応混合物を、ハウスバキューム下で焼結ガラス漏斗（微細）を通してろ過した。ろ過した材料の入った焼結ガラス漏斗を一晩ガラスデシケータ内で真空下に置き、結果として白色微細粉末（440mg）を得た。

【0282】

9.6.2 スケール5gでのIN105複合体のR型Zn錯体

10%のHClを用いて最高3の最終pHとなるように、約10g/LのIN105溶液（4.2g、ロット#Nobex 040706L）を調製した。以上の溶液に対し1.5mLの液化フェノール及び1.8mLの10%ZnCl₂溶液を添加した。濃水酸化アンモニウムを用いてpHを最高7.4に調整した。強く濁った溶液を一晩室温に放置し

て、より多くの沈殿物を形成させた。

【0283】

以上で実施された反応を、50 mLの遠心分離管4本に分割し、最初に3200 RPMで2時間遠心分離した。次に材料を20分間9000 RPMで遠心分離に付し、朝まで5℃で保管した。上清を傾瀉し、固体を各管から10 mLの低温DIH₂Oで洗浄した。管を逆さにし最高1時間3200 RPMで遠心分離してから、H₂Oを傾瀉し、固体をさらに10 mLの低温DIH₂Oで洗浄した。再び、試料を最高1時間3200 RPMで遠心分離してからH₂Oを傾瀉した。試料を10 mLの200プルーフの低温EtOHで2回洗浄し、1時間3200 RPMで遠心分離してからEtOHを傾瀉した。2日間試料を真空乾燥させて、白色粉末2.34 gを得た。

10

【0284】

【表6】

9.6.3 R型IN105固体組成物についての結果

反応	観察結果	溶解度(mg/mL)*	% w/w Zn	% w/w フェノール
9.6.1	白色固体	ND	1.85	2.37
9.6.2	白色固体	10-25	1.71	2.66

ND= データ無し

* pH約7.4のリン酸緩衝液中

20

【0285】

9.7 プロタミンIN105固体の調製及び分析

9.7.1 酸性pHでのプロタミンを用いたIN105モノ複合体のR型Zn錯体の調製

10%のHClを用いて最高3の最終pHとなるように、約10 g/LのIN105溶液を調製する。以上の溶液の15 mLアリコート(150 mgのタンパク質)に対し、液化フェノール(248 µL)を添加する。反応のpHを最高6.50まで、濃水酸化アンモニウムで調整する。1マイクロリットルの10%ZnCl₂溶液を反応に添加し、その後22.5ミリigramのプロタミンを添加する。反応混合物を15分間室温で攪拌してから、2日間室温に放置して固体形成を発生させる。

30

【0286】

反応混合物を遠心分離管に移し、15分間2800 RPMで遠心分離する。溶液を傾瀉し、固体を5 mLの低温DIH₂Oで洗浄する。この溶液を、15分間2800 RPMで遠心分離してから、H₂Oを傾瀉する。同じ要領でさらに2回H₂O洗浄を行なう。その後試料を10 mLの200プルーフの低温EtOHで洗浄し、15分間2800 RPMで遠心分離してからEtOHを傾瀉する。さらに同じ要領で2回EtOH洗浄を実施してから、試料を2日にわたり真空乾燥させる。

【0287】

9.7.2 中性pHでのプロタミンを用いたIN105複合体のR型Zn錯体の調製

10%のHClを用いて最高3の最終pHとなるように、約10 g/LのIN105溶液を調製する。15 mLの溶液に対し、液化フェノール(49.5 µL)を添加する。その後、60マイクロリットルの10%ZnCl₂溶液を反応に添加し、その後7.5 mgのプロタミンを添加する。pHを7.00まで、濃水酸化アンモニウムで調整する。反応を3日間室温に放置して固体を形成させる。

40

【0288】

反応混合物を遠心分離管に移し、15分間2800 RPMで遠心分離する。溶液を傾瀉し、固体を5.0 mLの低温DIH₂Oで洗浄した。この溶液を、15分間2800 RPMで遠心分離してから、H₂Oを傾瀉する。同じ要領でさらに2回H₂O洗浄を行なう。その後試料を5.0 mLの200プルーフの低温EtOHで洗浄し、15分間2800 RPMで遠心分離してからEtOHを傾瀉する。さらに同じ要領で2回EtOH洗浄を実施し

50

てから、試料を2日にわたり真空乾燥させる。

【0289】

9. 7. 3 IN105のR型結晶性Zn錯体の調製

25%の有機物質を含有する粗製の15mg/mLのIN105溶液のpHを、1MのHClを用いて3.47に調整した。40～60℃の水浴中で固体フェノールを融解させ、0.218mLを反応フラスコに加えた。その後、反応に対し0.4mLの4%酸性化ZnCl₂水溶液を添加した。溶液のpHを、6.6という最終pHに1MのNaOHを用いて調整した。pHを調整しながら、10mLのアリコートを次のpH値で引き抜いた：4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.2、6.4及び6.6。攪拌することなく試料を24時間放置した。顕微鏡で針状結晶が観察された。

10

【0290】

9. 7. 4 30%の有機物を含有するIN105のR型結晶性Zn錯体の調製

MPEG₃プロピオニルインスリン化合物の新鮮な15mg/mL溶液を、250mMの酢酸アンモニウム緩衝液中で調製し、1MのHClを用いてpHを2.81に調整した。溶液に対して液化フェノール0.040mLと95%のEtOH4.25mLを添加した。その後0.400mLの4%酸性化ZnCl₂溶液を反応混合物に添加した。50%のNH₄OHを用い、以下の所望のpHの各々で1mLのアリコートを引抜きながら、3.7～5.4まで溶液のpHを調整した：4.0、4.2、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4。試料を24時間攪拌無しで放置した。24時間後に撮影した顕微鏡写真は、4.0～5.2のpH範囲から針状結晶を示した（図5参照）。

20

【0291】

9. 7. 5 100mMの酢酸アンモニウム緩衝液中のIN105のR型結晶性Zn錯体の調製（EtOH30、20及び10%）

100mMの酢酸アンモニウム緩衝液中でMPEG₃プロピオニルインスリン化合物の新鮮な15mg/mL溶液を調製し、5MのHClでpHを2.8に調整した。溶液に対して液化フェノール、0.040mL及び95%のEtOH、4.25mLを添加した。その後、0.400mLの4%の酸性化ZnCl₂溶液を反応混合物に添加した。5MのNH₄OHを用い、以下の所望のpHの各々で0.5mLのアリコートを引抜きながら、2.9～5.6まで溶液のpHを調整した：4.2、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6。試料を24時間攪拌無しで放置した。24時間後に撮影した顕微鏡写真は、4.4～4.8のpH範囲から針状結晶を示した。

30

【0292】

100mMの酢酸アンモニウム緩衝液中でMPEG₃プロピオニルインスリン化合物の新鮮な15mg/mL溶液を調製し、5MのHClでpHを2.8に調整した。溶液に対して液化フェノール、0.040mL及び95%のEtOH、2.25mLを添加した。その後、0.400mLの4%の酸性化ZnCl₂溶液を反応混合物に添加した。5MのNH₄OHを用い、以下の所望のpHの各々で0.5mLのアリコートを引抜きながら、2.9～5.6まで溶液のpHを調整した：4.2、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6。試料を24時間攪拌無しで放置した。24時間後に撮影した顕微鏡写真は、4.8～5.4のpH範囲から円状結晶を示した。

40

【0293】

100mMの酢酸アンモニウム緩衝液中でMPEG₃プロピオニルインスリン化合物の新鮮な15mg/mL溶液を調製し、5MのHClでpHを2.8に調整した。溶液に対して液化フェノール、0.040mL及び95%のEtOH、1.15mLを添加した。その後、0.400mLの4%の酸性化ZnCl₂溶液を反応混合物に添加した。5MのNH₄OHを用い、以下の所望のpHの各々で0.5mLのアリコートを引抜きながら、2.8～5.6まで溶液のpHを調整した：4.2、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6。試料を24時間攪拌無しで放置した。24時間後に撮影した顕微鏡写真は、5.0～5.6のpH範囲から針状結晶を示した。

【0294】

50

9. 7. 6 0. 1 及び 0. 2 % のフェノールを用いた 2 0 % の有機物質中の I N 1 0 5 の R 型結晶性 Z n 錯体の調製

1 0 0 m M の酢酸アンモニウム緩衝液中で M P E G ₃ プロピオニルインスリン化合物の新鮮な 1 5 m g / m L 溶液を調製し、5 M の H C l で p H を 3. 0 に調整した。溶液に対して液化フェノール、0. 0 1 0 m L 及び 9 5 % の E t O H、2. 5 m L を添加した。その後、0. 4 0 0 m L の 4 % の酸性化 Z n C l ₂ 溶液を反応混合物に添加した。5 M の N H ₄ O H を用い、以下の所望の p H の各々で 0. 5 m L のアリコートを引き抜きながら、3. 2 ~ 5. 6 まで溶液の p H を調整した：4. 2、4. 4、4. 6、4. 8、5. 0、5. 2、5. 4、5. 6。試料を 2 4 時間攪拌無しで放置した。2 4 時間後に撮影した顕微鏡写真は、4. 4 ~ 5. 4 の p H 範囲から円状結晶を示した。

10

【0 2 9 5】

1 0 0 m M の酢酸アンモニウム緩衝液中で M P E G ₃ プロピオニルインスリン化合物の新鮮な 1 5 m g / m L 溶液を調製し、5 M の H C l で p H を 3. 0 に調整した。溶液に対して液化フェノール、0. 0 2 0 m L 及び 9 5 % の E t O H、2. 5 m L を添加した。その後、0. 4 0 0 m L の 4 % の酸性化 Z n C l ₂ 溶液を反応混合物に添加した。5 M の N H ₄ O H を用い、以下の所望の p H の各々で 0. 5 m L のアリコートを引き抜きながら、3. 3 ~ 5. 6 まで溶液の p H を調整した：4. 2、4. 4、4. 6、4. 8、5. 0、5. 2、5. 4、5. 6。試料を 2 4 時間攪拌無しで放置した。2 4 時間後に撮影した顕微鏡写真は、4. 4 ~ 5. 2 の p H 範囲から円状結晶を示した。

20

【0 2 9 6】

9. 7. 7 8. 0 グラムスケール、p H 4. 8 及び室温での I N 1 0 5 の R 型結晶型 Z n 錯体の調製

2 5 0 m M の酢酸アンモニウム緩衝液内で M P E G ₃ プロピオニルインスリン化合物の新鮮な 1 5 m g / m L 溶液を調製し、5 M の H C l を用いて p H を 2. 0 に調整した。溶液に対して液化フェノール 2. 1 3 m L 及び 9 5 % の E t O H 2 2 5 m L を添加した。その後、4 % の酸性化された Z n C l ₂ 溶液 2 1. 3 m L を反応混合物に添加した。5 M の N H ₄ O H を用いて、溶液の p H を 4. 8 に調整した。溶液を 2 4 時間攪拌無しで放置してから、結晶を収獲した。T = 0 顕微鏡写真で針状結晶を観察した。

【0 2 9 7】

2 5 0 m L 入り遠心分離管 6 本に反応混合物を分割することによって、結晶を収獲した。管を 1 0 ° C で 8 分間 1 0, 0 0 0 R P M で回転させてから、上清を傾瀉した。その後、各管に対して 1 0 m L の低温 H ₂ O を添加してから、6 本を 2 本に統合した。遠心分離プロセスを冷水でもう 1 度そして低温 E t O H でさらに 2 度繰り返した。その後、結晶を 2 日間卓上型凍結乾燥機で乾燥させた。この手順により、出発材料との関係において 9 3 % の収量 (w / w) が生成された。

30

【0 2 9 8】

9. 7. 8 1. 5 グラムスケール、p H 4. 8 及び室温での I N 1 0 5 の R 型結晶性 Z n 錯体の調製

p H 7. 5 の 2 5 0 m M の酢酸アンモニウム 1 0 0 m L 中に 1. 5 2 g の固体 I N 1 0 5 を溶解させることにより、M P E G ₃ プロピオニルインスリン化合物 (I N 1 0 5) の新鮮な溶液を調製した。5 M の H C l / 5 M の N H ₄ O H を用いて溶液を p H 2. 8 に調整した。4 0 ~ 6 0 ° C の温水浴中で固体フェノールを融解させた。反応フラスコに対して、4 0 0 µ L の融解フェノール及び 4 2. 5 m L の 9 5 % E t O H を添加した。次に 4 m L の 4 % 酸性化水性 Z n C l ₂ を反応フラスコに添加した。その後、結果としての溶液を、5 M の N H ₄ O H を用いて p H 4. 8 に調整した。その後、結晶が収獲される前に 4 8 時間攪拌せずに反応を放置した。顕微鏡を介し、2 1 時間後に針状結晶形成が観察された。

40

【0 2 9 9】

反応スラリーを 5 0 m L 入り遠心分離管 4 本に分割することにより、結晶を収獲した。最初管を 8 分間 1 0 0 0 R P M で回転させた。その後、上清を傾瀉した。各管内の結晶を

50

、氷冷H₂Oの5mLアリコートで1回洗浄し、次に8分間3000RPMで回転させた。その後、上清を傾瀉した。まず氷冷H₂Oの5mLアリコートで1回そして次に氷冷EtOHの5mLアリコートで1回、洗浄／回転手順を繰り返した。その後結晶を一晩真空デシケータ内で乾燥させた。この手順により、出発材料との関係において73%の収量(w/w)が生成された。

【0300】

9. 7. 9 スケール1.5グラム、pH4.4及び室温でのIN105のR型結晶性Zn錯体の調製

pH7.5の250mMの酢酸アンモニウム100mL中に1.50gの固体IN105を溶解させることにより、MP EG3プロピオニルインスリン化合物(IN105)の新鮮な溶液を調製した。5MのHClを用いて溶液をpH2.6に調整した。40～60℃の温水浴中で固体フェノールを融解させた。反応フラスコに対して、400μLの融解フェノール及び42.5mLの95%EtOHを添加した。次に4mLの4%酸性化水性ZnCl₂を反応フラスコに添加した。その後、結果としての溶液を、5MのNH₄OHを用いてpH4.4に調整した。その後、結晶が収獲される前に22時間攪拌せずに反応を放置した。顕微鏡を介し、2時間後に針状結晶形成及び沈殿物の混合物が観察された。反応混合物は21時間後顕微鏡を介して完全に結晶性であるように思われた。

10

【0301】

反応スラリーを250mL入り遠心分離管1本に移すことにより、結晶を収獲した。最初管を8分間10,000RPMで回転させた。その後、上清を傾瀉した。結晶を、氷冷H₂Oの20mLアリコートで1回洗浄し、次に8分間10,000RPMで回転させた。その後、上清を傾瀉した。まず氷冷H₂Oの20mLアリコートで1回、次に氷冷EtOHの20mLアリコートで2回、そして最後に氷冷H₂Oの20mLアリコートで1回洗浄／回転手順を繰り返した。その後結晶を一晩真空デシケータ内で乾燥させた。この手順により、出発材料との関係において67%の収量(w/w)が生成された。

20

【0302】

9. 7. 10 スケール8.0グラム、pH4.8及び室温でのIN105のR型結晶性Zn錯体の調製

pH7.5の250mMの酢酸アンモニウム533mL中に7.98gの固体IN105を溶解させることにより、MP EG3プロピオニルインスリン化合物(IN105)の新鮮な溶液を調製した。5MのHClを用いて溶液をpH2.4に調整した。40～60℃の温水浴中で固体フェノールを融解させた。反応フラスコに対して、2.13mLの融解フェノール及び225mLの95%EtOHを添加した。次に21.3mLの4%酸性化水性ZnCl₂を反応フラスコに添加した。その後、結果としての溶液を、5MのNH₄OHを用いてpH4.8に調整した。その後、結晶が収獲される前に21時間攪拌せずに反応を放置した。反応混合物は、顕微鏡を介し2時間後に完全に結晶性であるように思われた。

30

【0303】

反応スラリーを250mL入り遠心分離管6本に分割することにより、結晶を収獲した。最初管を8分間10,000RPMで回転させた。その後、上清を傾瀉した。各管内の結晶を、氷冷H₂Oの10mLアリコートで1回洗浄し、次に8分間10,000RPMで回転させた。その後、上清を傾瀉した。まず氷冷H₂Oの10mLアリコートで1回、次に氷冷EtOHの10mLアリコートで2回、そして最後に氷冷H₂Oの10mLアリコートで1回洗浄／回転手順を繰り返した。その後結晶を2日間真空デシケータ内で乾燥させた。この手順により、出発材料との関係において87%の収量(w/w)が生成された。

40

【0304】

9. 7. 11 10.0グラムスケール、pH4.8及び室温でのIN105のR型結晶性Zn錯体の調製

pH7.5の250mMの酢酸アンモニウム670mL中に10.06gの固体IN1

50

05を溶解させることにより、MPEG3プロピオニルインスリン化合物（IN105）の新鮮な溶液を調製した。5MのHClを用いて溶液をpH2.6に調整した。40～60℃の温水浴中で固体フェノールを融解させた。反応フラスコに対して、2.7mLの融解フェノール及び285mLの95%EtOHを添加した。次に27mLの4%酸性化水性ZnCl₂を反応フラスコに添加した。その後、結果としての溶液を、5MのNH₄OHを用いてpH4.8に調整した。その後、結晶が収獲される前に21時間攪拌せずに反応を放置した。反応混合物は、顕微鏡を介し205時間後に完全に結晶性であるように思われた。

【0305】

反応スラリーを250mL入り遠心分離管6本に分割することにより、結晶を収獲した。最初管を10℃で8分間10,000RPMで回転させた。その後、上清を傾瀉した。各管内の結晶を、氷冷H₂Oの10mLアリコートで1回洗浄し、250mL入りの遠心分離管2本に統合し、次に10℃で8分間10,000RPMで回転させた。その後、上清を傾瀉した。まず氷冷H₂Oの30mLアリコートで1回、次に氷冷EtOHの30mLアリコートで2回、そして最後に氷冷H₂Oの30mLアリコートで1回洗浄／回転手順を繰り返した。その後結晶を3日間ベンチトップ凍結乾燥機内で乾燥させた。この手順により、出発材料との関係において89%の収量（w/w）が生成された。

【0306】

9.8 有機溶媒を用いたHIM2の結晶性Zn錯体の調製と分析

9.8.1 HIM2のR型Zn錯体の調製

250mMの酢酸アンモニウム緩衝液中でHIM2の新鮮な15mg/mL溶液を調製し、5MのHClを用いてpHを2.95に調整した。溶液に対して液化フェノール40μL、及び95%のEtOH3.5mLを添加した。その後、反応混合物に対して4%の酸性化ZnCl₂溶液600μLを添加した。5MのNH₄OHを用い、以下の所望のpHの各々で500μLのアリコートを引き抜きながら、溶液のpHを3.14から6.0に調整した：4.2、4.4（図6A参照）、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4（図6B参照）、5.6、5.8、6.0。24時間攪拌せずに試料を放置した。24時間後に撮影した顕微鏡写真は、pH4.4で針状結晶を示した。4.6～6.0のpH範囲は、さまざまな形状及びサイズの大きい結晶性様の固体を示している。

【0307】

250mMの酢酸アンモニウム緩衝液中でHIM2の新鮮な15mg/mL溶液を調製し、5MのHClを用いてpHを2.95に調整した。溶液に対して液化フェノール40μL、及び95%のEtOH3.5mLを添加した。その後、反応混合物に対して4%の酸性化ZnCl₂溶液400μLを添加した。5MのNH₄OHを用い、以下の所望のpHの各々で500μLのアリコートを引き抜きながら、溶液のpHを3.22から6.0に調整した：4.2、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2（図7A参照）、5.4、5.6、5.8、6.0。24時間攪拌せずに試料を放置した。24時間後に撮影した顕微鏡写真は、pH4.2～6.0でさまざまな形状及びサイズの結晶性様の固体を示している。

【0308】

250mMの酢酸アンモニウム緩衝液中でHIM2の新鮮な15mg/mL溶液を調製し、5MのHClを用いてpHを2.95に調整した。溶液に対して液化フェノール40μL、及び95%のEtOH3.5mLを添加した。その後、反応混合物に対して4%の酸性化ZnCl₂溶液200μLを添加した。5MのNH₄OHを用い、以下の所望のpHの各々で500μLのアリコートを引き抜きながら、溶液のpHを3.19から6.0に調整した：4.2、4.4、4.6、4.8、5.0（図7B参照）、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0。24時間攪拌せずに試料を放置した。24時間後に撮影した顕微鏡写真は、pH4.4～4.6でさまざまな形状及びサイズの結晶性様の固体を示した。4.8～5.8のpH範囲は、より均質な針状結晶を示している。

【0309】

250 mMの酢酸アンモニウム緩衝液中でHIM2の新鮮な15 mg/mL溶液を調製し、5 MのHClを用いてpHを2.95に調整した。溶液に対して液化フェノール40 μ L、及び95%のEtOH2.6 mLを添加した。その後、反応混合物に対して4%の酸性化ZnCl₂溶液600 μ Lを添加した。5 MのNH₄OHを用い、以下の所望のpHの各々で500 μ Lのアリコートを引き抜きながら、溶液のpHを3.04から6.0に調整した：4.2、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4（図8A参照）、5.6、5.8、6.0。24時間攪拌せずに試料を放置した。24時間後に撮影した顕微鏡写真は、pH4.6～5.4で平坦な雪片様の結晶を示した。

【0310】

250 mMの酢酸アンモニウム緩衝液中でHIM2の新鮮な15 mg/mL溶液を調製し、5 MのHClを用いてpHを2.95に調整した。溶液に対して液化フェノール40 μ L、及び95%のEtOH2.6 mLを添加した。その後、反応混合物に対して4%の酸性化ZnCl₂溶液400 μ Lを添加した。5 MのNH₄OHを用い、以下の所望のpHの各々で500 μ Lのアリコートを引き抜きながら、溶液のpHを3.05から6.0に調整した：4.2、4.4、4.6、4.8、5.0（図8B参照）、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0。24時間攪拌せずに試料を放置した。24時間後に撮影した顕微鏡写真は、pH5.0で針状結晶を、pH5.2で結晶様固体を、そしてpH5.4で平坦な雪片様の結晶を示した。

【0311】

Rxn6 250 mMの酢酸アンモニウム緩衝液中でHIM2の新鮮な15 mg/mL溶液を調製し、5 MのHClを用いてpHを2.95に調整した。溶液に対して液化フェノール40 μ L、及び95%のEtOH2.6 mLを添加した。その後、反応混合物に対して4%の酸性化ZnCl₂溶液200 μ Lを添加した。5 MのNH₄OHを用い、以下の所望のpHの各々で500 μ Lのアリコートを引き抜きながら、溶液のpHを3.09から6.0に調整した：4.2、4.4、4.6、4.8（図9A参照）、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0。24時間攪拌せずに試料を放置した。24時間後に撮影した顕微鏡写真は、pH4.8～5.6で針状結晶及び結晶様固体を示した。

【0312】

250 mMの酢酸アンモニウム緩衝液中でHIM2の新鮮な15 mg/mL溶液を調製し、5 MのHClを用いてpHを2.76に調整した。溶液に対して液化フェノール40 μ L、及び95%のEtOH4.25 mLを添加した。その後、反応混合物に対して4%の酸性化ZnCl₂溶液250 μ Lを添加した。5 MのNH₄OHを用い、以下の所望のpHの各々で500 μ Lのアリコートを引き抜きながら、溶液のpHを2.97から5.8に調整した：4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8。24時間攪拌せずに試料を放置した。24時間後に撮影した顕微鏡写真は、pH4.6～5.8で結晶様沈殿を示した。

【0313】

250 mMの酢酸アンモニウム緩衝液中でHIM2の新鮮な15 mg/mL溶液を調製し、5 MのHClを用いてpHを2.76に調整した。溶液に対して液化フェノール40 μ L、及び95%のEtOH4.25 mLを添加した。その後、反応混合物に対して4%の酸性化ZnCl₂溶液200 μ Lを添加した。5 MのNH₄OHを用い、以下の所望のpHの各々で500 μ Lのアリコートを引き抜きながら、溶液のpHを3.06から5.8に調整した：4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4（図9B参照）、5.6、5.8。24時間攪拌せずに試料を放置した。24時間後に撮影した顕微鏡写真は、pH4.6～5.6で結晶様沈殿を示した。

【0314】

250 mMの酢酸アンモニウム緩衝液中でHIM2の新鮮な15 mg/mL溶液を調製し、5 MのHClを用いてpHを2.76に調整した。溶液に対して液化フェノール40 μ L、及び95%のEtOH4.25 mLを添加した。その後、反応混合物に対して4%の酸性化ZnCl₂溶液150 μ Lを添加した。5 MのNH₄OHを用い、以下の所望の

pHの各々で500 μ Lのアリコートを引き抜きながら、溶液のpHを3.09から5.8に調整した：4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8。24時間攪拌せずに試料を放置した。24時間後に撮影した顕微鏡写真は、pH5.0～5.2で、さまざまな形状及びサイズの結晶を示した。

【0315】

250mMの酢酸アンモニウム緩衝液中でHIM2の新鮮な15mg/mL溶液を調製し、5MのHClを用いてpHを2.76に調整した。溶液に対して液化フェノール40 μ L、及び95%のEtOH4.25mLを添加した。その後、反応混合物に対して4%の酸性化ZnCl₂溶液100 μ Lを添加した。5MのNH₄OHを用い、以下の所望のpHの各々で500 μ Lのアリコートを引き抜きながら、溶液のpHを3.09から5.8に調整した：4.4、4.6、4.8、5.0（図10A参照）、5.2、5.4（図10B参照）、5.6、5.8。24時間攪拌せずに試料を放置した。24時間後に撮影した顕微鏡写真は、pH5.0で針状結晶を示し、5.2～5.6でさまざまな形状及びサイズの大きい結晶性材料を示した。

10

【0316】

250mMの酢酸アンモニウム緩衝液中でHIM2の新鮮な15mg/mL溶液を調製し、5MのHClを用いてpHを2.76に調整した。溶液に対して液化フェノール20 μ L、及び95%のEtOH4.25mLを添加した。その後、反応混合物に対して4%の酸性化ZnCl₂溶液250 μ Lを添加した。5MのNH₄OHを用い、以下の所望のpHの各々で500 μ Lのアリコートを引き抜きながら、溶液のpHを3.08から5.8に調整した：4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8。24時間攪拌せずに試料を放置した。24時間後に撮影した顕微鏡写真は、pH4.8～5.8で結晶様沈殿を示した。

20

【0317】

250mMの酢酸アンモニウム緩衝液中でHIM2の新鮮な15mg/mL溶液を調製し、5MのHClを用いてpHを2.76に調整した。溶液に対して液化フェノール20 μ L、及び95%のEtOH4.25mLを添加した。その後、反応混合物に対して4%の酸性化ZnCl₂溶液200 μ Lを添加した。5MのNH₄OHを用い、以下の所望のpHの各々で500 μ Lのアリコートを引き抜きながら、溶液のpHを3.05から5.8に調整した：4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8。24時間攪拌せずに試料を放置した。24時間後に撮影した顕微鏡写真は、非常に小さい結晶様固体を示した。

30

【0318】

250mMの酢酸アンモニウム緩衝液中でHIM2の新鮮な15mg/mL溶液を調製し、5MのHClを用いてpHを2.76に調整した。溶液に対して液化フェノール20 μ L、及び95%のEtOH4.25mLを添加した。その後、反応混合物に対して4%の酸性化ZnCl₂溶液200 μ Lを添加した。5MのNH₄OHを用い、以下の所望のpHの各々で500 μ Lのアリコートを引き抜きながら、溶液のpHを3.05から5.8に調整した：4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8。24時間攪拌せずに試料を放置した。24時間後に撮影した顕微鏡写真は、非常に小さい結晶様固体を示した。

40

【0319】

250mMの酢酸アンモニウム緩衝液中でHIM2の新鮮な15mg/mL溶液を調製し、5MのHClを用いてpHを2.76に調整した。溶液に対して液化フェノール20 μ L、及び95%のEtOH4.25mLを添加した。その後、反応混合物に対して4%の酸性化ZnCl₂溶液100 μ Lを添加した。5MのNH₄OHを用い、以下の所望のpHの各々で500 μ Lのアリコートを引き抜きながら、溶液のpHを3.06から5.8に調整した：4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8。24時間攪拌せずに試料を放置した。24時間後に撮影した顕微鏡写真は、非常に小さい結晶様固体を示した。

50

【0320】

9. 9 亜鉛を用いたHIM2及びIN105の共結晶

9. 9. 1 HIM2及びIN105のR型共結晶化Zn錯体の調製

9. 9. 2 50:50 (HIM2:IN105)

pH7.5の250mMの酢酸アンモニウム4mL中に37.3mgのHIM2と36.4mgのIN105を溶解させることにより、HIM2及びIN105の新鮮な溶液を調製した。5MのHClを用いて、溶液をpH2.84に調整した。40～60℃の温水浴中で固体フェノールを融解させた。反応フラスコに16μLの融解フェノールと1.75mLの95%EtOHを添加した。その後、反応フラスコに対し、4%の酸性化水性ZnCl₂80μLを加えた。次に、5MのNH₄OHを用い、以下の所望のpHの各々において0.500mLのアリコートを引き抜きながら、溶液のpHを3.19～5.60に調整した：4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4及び5.6。試料を4時間攪拌せずに放置した。4時間後に撮影した顕微鏡写真は4.4～5.6のpH範囲でさまざまなサイズ及び形状の結晶を示している。

10

【0321】

pH7.5の250mMの酢酸アンモニウム4mL中に37.1mgのHIM2と35.9mgのIN105を溶解させることにより、HIM2及びIN105の新鮮な溶液を調製した。5MのHClを用いて、溶液をpH3.03に調整した。40～60℃の温水浴中で固体フェノールを融解させた。反応フラスコに16μLの融解フェノールと1.75mLの95%EtOHを添加した。その後、反応フラスコに対し、4%の酸性化水性ZnCl₂40μLを加えた。次に、5MのNH₄OHを用い、以下の所望のpHの各々において0.500mLのアリコートを引き抜きながら、溶液のpHを3.38～5.60に調整した：4.4、4.6、4.8、5.0（図11A参照）、5.2（図11B参照）、5.4及び5.6（図12A参照）。試料を4時間攪拌せずに放置した。4時間後に撮影した顕微鏡写真は4.6～5.6のpH範囲でほとんどが短い針状結晶を示している。

20

【0322】

9. 9. 3 70:30 (HIM2:IN105)

pH7.5の250mMの酢酸アンモニウム4mL中に53.4mgのHIM2と23.2mgのIN105を溶解させることにより、HIM2及びIN105の新鮮な溶液を調製した。5MのHClを用いて、溶液をpH2.62に調整した。40～60℃の温水浴中で固体フェノールを融解させた。反応フラスコに16μLの融解フェノールと1.75mLの95%EtOHを添加した。その後、反応フラスコに対し、4%の酸性化水性ZnCl₂80μLを加えた。次に、5MのNH₄OHを用い、以下の所望のpHの各々において0.500mLのアリコートを引き抜きながら、溶液のpHを3.02～5.60に調整した：4.4、4.6、4.8、5.0、5.2（図12B参照）、5.4及び5.6。試料を1時間攪拌せずに放置した。1時間後に撮影した顕微鏡写真は4.4～5.6のpH範囲でさまざまなサイズ及び形状の結晶様沈殿を示している。

30

【0323】

pH7.5の250mMの酢酸アンモニウム4mL中に53.6mgのHIM2と24.5mgのIN105を溶解させることにより、HIM2及びIN105の新鮮な溶液を調製した。5MのHClを用いて、溶液をpH2.89に調整した。40～60℃の温水浴中で固体フェノールを融解させた。反応フラスコに16μLの融解フェノールと1.75mLの95%EtOHを添加した。その後、反応フラスコに対し、4%の酸性化水性ZnCl₂40μLを加えた。次に、5MのNH₄OHを用い、以下の所望のpHの各々において0.500mLのアリコートを引き抜きながら、溶液のpHを3.28～5.60に調整した：4.4、4.6、4.8、5.0、5.2（図13A参照）、5.4及び5.6。試料を1時間攪拌せずに放置した。1時間後に撮影した顕微鏡写真はほとんどが4.6～4.8のpH範囲からさまざまなサイズ及び形状の結晶様沈殿を、そして5.0～5.4のpH範囲で数多くの短い針状結晶を示している。

40

50

【0324】

9. 9. 4 30 : 70 (HIM2 : IN105)

pH 7. 5 の 250 mM の酢酸アンモニウム 4 mL 中に 23. 3 mg の HIM2 と 54. 7 mg の IN105 を溶解させることにより、HIM2 及び IN105 の新鮮な溶液を調製した。5 M の HCl を用いて、溶液を pH 2. 84 に調整した。40 ~ 60 °C の温水浴中で固体フェノールを融解させた。反応フラスコに 16 µL の融解フェノールと 1. 75 mL の 95 % EtOH を添加した。その後、反応フラスコに対し、4 % の酸性化水性 ZnCl₂ 80 µL を加えた。次に、5 M の NH₄OH を用い、以下の所望の pH の各々において 0. 500 mL のアリコートを引き抜きながら、溶液の pH を 3. 27 ~ 5. 60 に調整した：4. 4、4. 6、4. 8、5. 0、5. 2、5. 4 及び 5. 6。試料を 1 時間攪拌せずに放置した。1 時間後に撮影した顕微鏡写真は 4. 4 ~ 5. 0 の pH 範囲でさまざまなサイズ及び形状の結晶様沈殿を、そして 5. 2 ~ 5. 6 の pH 範囲で僅かな針状結晶を示している。

10

【0325】

pH 7. 5 の 250 mM の酢酸アンモニウム 4 mL 中に 24. 8 mg の HIM2 と 54. 9 mg の IN105 を溶解させることにより、HIM2 及び IN105 の新鮮な溶液を調製した。5 M の HCl を用いて、溶液を pH 3. 09 に調整した。40 ~ 60 °C の温水浴中で固体フェノールを融解させた。反応フラスコに 16 µL の融解フェノールと 1. 75 mL の 95 % EtOH を添加した。その後、反応フラスコに対し、4 % の酸性化水性 ZnCl₂ 40 µL を加えた。次に、5 M の NH₄OH を用い、以下の所望の pH の各々において 0. 500 mL のアリコートを引き抜きながら、溶液の pH を 3. 47 ~ 5. 60 に調整した：4. 4、4. 6、4. 8、5. 0、5. 2、5. 4 及び 5. 6 (図 13B 参照)。試料を 1 時間攪拌せずに放置した。1 時間後に撮影した顕微鏡写真はほとんどが 4. 4 ~ 5. 0 の pH 範囲からさまざまな円形サイズの結晶様沈殿をそして 5. 2 ~ 5. 6 の pH 範囲でさまざまな形状及びサイズの結晶を示している。

20

【0326】

9. 9. 5 HIM2 及び IN105 の R 型共結晶化 Zn 錯体の調製

9. 9. 6 50 : 50 (HIM2 : IN105)

pH 7. 5 の 250 mM の酢酸アンモニウム 4 mL 中に 37. 4 mg の HIM2 と 35. 9 mg の IN105 を溶解させることにより、HIM2 及び IN105 の新鮮な溶液を調製した。5 M の HCl を用いて、溶液を pH 2. 60 に調整した。40 ~ 60 °C の温水浴中で固体フェノールを融解させた。反応フラスコに 16 µL の融解フェノールと 1. 75 mL の 95 % EtOH を添加した。その後、反応フラスコに対し、4 % の酸性化水性 ZnCl₂ 40 µL を加えた。次に、5 M の NH₄OH を用い、以下の所望の pH の各々において 0. 500 mL のアリコートを引き抜きながら、溶液の pH を 2. 15 ~ 5. 60 に調整した：4. 4、4. 6、4. 8、5. 0、5. 2、5. 4 及び 5. 6。試料を 24 時間攪拌せずに放置した。24 時間後に撮影した顕微鏡写真は pH = 4. 6 ~ 5. 6 でさまざまな形状及びサイズの結晶固体を示した。

30

【0327】

9. 9. 7 70 : 30 (HIM2 : IN105)

pH 7. 5 の 250 mM の酢酸アンモニウム 4 mL 中に 57. 0 mg の HIM2 と 24. 5 mg の IN105 を溶解させることにより、HIM2 及び IN105 の新鮮な溶液を調製した。5 M の HCl を用いて、溶液を pH 2. 43 に調整した。40 ~ 60 °C の温水浴中で固体フェノールを融解させた。反応フラスコに 16 µL の融解フェノールと 1. 75 mL の 95 % EtOH を添加した。その後、反応フラスコに対し、4 % の酸性化水性 ZnCl₂ 40 µL を加えた。次に、5 M の NH₄OH を用い、以下の所望の pH の各々において 0. 500 mL のアリコートを引き抜きながら、溶液の pH を 2. 92 ~ 5. 60 に調整した：4. 4、4. 6 (図 14A 参照)、4. 8、5. 0、5. 2、5. 4 及び 5. 6。試料を 24 時間攪拌せずに放置した。24 時間後に撮影した顕微鏡写真は pH 5. 0 ~ 5. 2 の pH 範囲で針状結晶を示した。

40

50

【0328】

9. 9. 8 30 : 70 (HIM2 : IN105)

pH 7. 5 の 250 mM の酢酸アンモニウム 4 mL 中に 24. 1 mg の HIM2 と 53. 8 mg の IN105 を溶解させることにより、HIM2 及び IN105 の新鮮な溶液を調製した。5 M の HCl を用いて、溶液を pH 2. 35 に調整した。40 ~ 60 °C の温水浴中で固体フェノールを融解させた。反応フラスコに 16 µL の融解フェノールと 1. 75 mL の 95 % EtOH を添加した。その後、反応フラスコに対し、4 % の酸性化水性 ZnCl₂ 40 µL を加えた。次に、5 M の NH₄OH を用い、以下の所望の pH の各々において 0. 500 mL のアリコートを引き抜きながら、溶液の pH を 2. 60 ~ 5. 60 に調整した：4. 4、4. 6、4. 8、5. 0 (図 14 B 参照)、5. 2、5. 4 及び 5. 6。試料を 24 時間攪拌せずに放置した。24 時間後に撮影した顕微鏡写真は pH 5. 0 ~ 5. 2 の pH 範囲で針状結晶を示した。

10

【0329】

9. 9. 9 HIM2 及びヒトインスリンの R 型共結晶化 Zn 錯体の調製

9. 9. 10 50 : 50 (HIM2 : インスリン)

pH 7. 5 の 250 mM の酢酸アンモニウム 4 mL 中に 39. 2 mg の HIM2 と 36. 7 mg のインスリンを溶解させることにより、HIM2 及びインスリンの新鮮な溶液を調製した。5 M の HCl を用いて、溶液を pH 2. 53 に調整した。40 ~ 60 °C の温水浴中で固体フェノールを融解させた。反応フラスコに 16 µL の融解フェノールと 1. 75 mL の 95 % EtOH を添加した。その後、反応フラスコに対し、4 % の酸性化水性 ZnCl₂ 40 µL を加えた。次に、5 M の NH₄OH を用い、以下の所望の pH の各々において 0. 500 mL のアリコートを引き抜きながら、溶液の pH を 2. 82 ~ 5. 60 に調整した：4. 4、4. 6、4. 8、5. 0、5. 2 (図 15 A 参照)、5. 4 及び 5. 6。試料を 24 時間攪拌せずに放置した。24 時間後に撮影した顕微鏡写真は pH 5. 2 及び 5. 4 でさまざまな形状及びサイズの結晶様の固体を示した。数多くの小さい針状結晶が pH 5. 6 で観察された。

20

【0330】

9. 9. 11 70 : 30 (HIM2 : インスリン)

pH 7. 5 の 250 mM の酢酸アンモニウム 4 mL 中に 56. 5 mg の HIM2 と 20. 2 mg のインスリンを溶解させることにより、HIM2 及びインスリンの新鮮な溶液を調製した。5 M の HCl を用いて、溶液を pH 3. 23 に調整した。40 ~ 60 °C の温水浴中で固体フェノールを融解させた。反応フラスコに 16 µL の融解フェノールと 1. 75 mL の 95 % EtOH を添加した。その後、反応フラスコに対し、4 % の酸性化水性 ZnCl₂ 40 µL を加えた。次に、5 M の NH₄OH を用い、以下の所望の pH の各々において 0. 500 mL のアリコートを引き抜きながら、溶液の pH を 2. 82 ~ 5. 60 に調整した：4. 4、4. 6、4. 8、5. 0、5. 2、5. 4 及び 5. 6。試料を 24 時間攪拌せずに放置した。24 時間後に撮影した顕微鏡写真は pH 5. 2 及び 5. 6 でさまざまな形状及びサイズの結晶様の固体を示した。

30

【0331】

9. 9. 12 30 : 70 (HIM2 : インスリン)

pH 7. 5 の 250 mM の酢酸アンモニウム 4 mL 中に 21. 8 mg の HIM2 と 49. 2 mg のインスリンを溶解させることにより、HIM2 及びインスリンの新鮮な溶液を調製した。5 M の HCl を用いて、溶液を pH 3. 23 に調整した。40 ~ 60 °C の温水浴中で固体フェノールを融解させた。反応フラスコに 16 µL の融解フェノールと 1. 75 mL の 95 % EtOH を添加した。その後、反応フラスコに対し、4 % の酸性化水性 ZnCl₂ 40 µL を加えた。次に、5 M の NH₄OH を用い、以下の所望の pH の各々において 0. 500 mL のアリコートを引き抜きながら、溶液の pH を 2. 93 ~ 5. 60 に調整した：4. 4、4. 6、4. 8、5. 0、5. 2、5. 4 (図 15 B 参照) 及び 5. 6。試料を 24 時間攪拌せずに放置した。24 時間後に撮影した顕微鏡写真は pH 4. 8 で平坦な雪片様の結晶を示した。pH 5. 0 では、針状及び雪片様の結晶の混合が存在

40

50

した。pH 5.2～5.6では数多くの小さい針状結晶が観察された。

【0332】

10 Zn錯体の水溶解度

1 mL入りの円錐形反応バイアルびんに、0.1 Mのリン酸緩衝生理食塩水（PBS、ろ過済み、pH = 7.4）200マイクロリットルを添加した。このバイアルびんに対して、飽和が観察されるまでゆっくりと少量の試料を添加した。定期的に溶液をボルテックス処理した。飽和時点で、バイアルびんを小さい遠心分離管の中に置き、室温で3分間2000 RPMで遠心分離した。遠心分離の後、上清から10 μ Lの試料を取り出し、490 μ Lの緩衝液（0.1 MのPBS）中で希釈した。HPLCを介してこの希釈試料を分析してその濃度を判定した。

10

【0333】

【表7】

複合体	溶解度	Zn	フェノール
IN105	約26mg/mL	該当無し	該当無し
ZnIN105	15mg/mL - 20mg/mL	0.44%	0.76%
ZnIN105	約24mg/mL	0.61%	1.11%
ZnIN105	15mg/mL - 20mg/mL	0.63%	1.04%

【0334】

20

11 Zn IN105錯体のためのインビトロ酵素耐性例

インスリン化合物複合体（IN105）を10 mMのリン酸ナトリウム緩衝液（pH 約7.4）内に供給し、その濃度をHPLCにより判定した（最高0.6 mg/mLで親と複合体間の等モル比較を行なうことができるように溶液を緩衝液で希釈する）。最高7.53 U/mLの濃度まで1 mMのHCl中で、凍結乾燥されたキモトリプシン酵素を再懸濁させた。試料管に、各試料の1.53 mLアリコートを加え、対照管内に0.850 mLを加えた。試料は、1試料につき4本の対照管と共にデュプリケートにてテストした。アリコートを37℃で15分間サーモミキサー内でインキュベートした。その後、17 μ Lのキモトリプシン酵素を各々の試料管に加えた。各々の対照管に1 mMのHCl 5 μ Lを加えた。添加直後に、試料及び対照管から200 μ Lを取り出し、先に遠心分離管内にアリコートとして引き抜いた1%のTFA 50 μ Lの中に入れた。この試料をT = 0として用いた。

30

【0335】

以下の間隔でインスリン化合物（Zn無し）、IN105（Zn無し）及びインスリン化合物（速効型インスリン化合物）についてのサンプリング手順を反復した：0、2、5、8、12、15及び30分。対照手順は以下の間隔で反復した：0、8、15、30分。T型及びR型の試料については、手順を以下の間隔で反復した：0、12、40及び60分。HPLCを介して分析を行なうことができるまで、-20℃で試料を保管した。各消化物についてそれぞれのT = 0分に対して分解百分率を判定するためにHPLCを実施した。残留百分率の自然対数と時間の関係をプロットし、各消化物について線形回帰を実施した。t_{1/2}：-0.693/勾配という等式を用いて半減期を計算した。

40

【0336】

【表 8】

0.6mg/mlのタンパク質における結果

試料	T 半減期	亜鉛含有量	フェノール含有量
インスリン化合物 (亜鉛含まず)	4.9 分	0.0	--
IN105 (亜鉛含まず)	12.5分	0.0	--
IN105 (亜鉛含まず)	11.1分	0.0	--
インスリン化合物、USP (即効型インスリン化合物)	11.6分	0.3 to 1% w/w	---
IN105 (R型亜鉛錯体)	55.3分	1.85 % w/w	2.37 % w/w
IN105 (T型亜鉛錯体)	54.8分	1.88 % w/w	---

10

【0 3 3 7】

1 2. 処方物例

1 2. 1 液体処方物例

1 2. 1. 1 R 6 型 Z n - H I M 2 緩衝液研究のための緩衝溶液

20

【0 3 3 8】

【表 9】

構成要素	1mL 溶液中の量
第二リン酸ナトリウム	1.88 mg
インスリン構成要素	3.7 mg (100 units)
グリセロール	16.0 mg
フェノール(又は m-クレゾール)	3.0 mg
亜鉛	0.037mg (1 % w/w のインスリン)*
pH	7.4 to 7.8**

30

* 亜鉛HIM2固体中の亜鉛含有量に基づくべきものである、塩化亜鉛を添加することによる、3.7mg/mlインスリンあたり0.037mg/mlへの亜鉛量の調整

** pHは、HCl10%及び/又は水酸化ナトリウム10%を用いて調整可能である

【0 3 3 9】

1 2. 1. 2 カプリン酸／ラウリン酸処方物経口液体希釈剤の調製

所要滅菌水体积の約60%を適切な容器内に移した。容器にトロメタミン、トロラミン、無水クエン酸及び水酸化ナトリウムペレットを容器に加え、溶解するまで十分に混合した。温度を21～25℃（又は室温）に調整し、液体のpHを測定した。1Nの水酸化ナトリウム又は1Nの塩酸を用いて必要に応じてpHを7.7～7.9に調整した。その後、ホットプレート上で温めることにより温度を45～50℃に調整し、この温度を維持した。次に温溶液にカプリン酸を添加し、カプリン酸が溶解するまで混合した。温度を21～25℃（又は室温）に調整し、液体のpHを測定した。必要に応じて、1Nの水酸化ナトリウム又は1Nの塩酸を用いてpHを7.7～7.9に調整した。次に5分間溶液を混合した。所要体積の100%に等しくなるよう滅菌水を適当な量だけ添加し、十分に混合した。

40

【0 3 4 0】

【表 1 0】

構成要素	百分率 (%w/v)
トロメタミン	4.24
トロラミン	5.22
無水クエン酸	6.72
水酸化ナトリウムペレット	1.88
カプリン酸	0.50
ラウリン酸	0.50
水酸化ナトリウム、1N	pH 7.7-7.9への調整に必要な量
塩酸、1N	pH 7.7-7.9への調整に必要な量
滅菌水	所要体積まで希釈

10

【0 3 4 1】

投薬研究用に適切な濃度を達成するのに必要な量で、I N 1 0 5、H I M 2 又は Z n H I M 2 を検量し、例えば（タンパク質の）1 m g の I N 1 0 5 を検量し、1 m L の処方物と組合わせて、処方物中 1 m g / m L の I N 1 0 5 を生成した。

【0 3 4 2】

1 2 . 1 . 3 オレイン酸／カプリン酸／ラウリン酸／コール酸塩処方物経口液体希釈剤の調製

20

下表に示した構成要素を有する R 型 Z n H I M 2 の経口液体処方物を調製した：

【0 3 4 3】

【表 1 1】

構成要素	百分率(%w/v)
トロメタミン	4.24
トロラミン	5.22
無水クエン酸	6.72
水酸化ナトリウムペレット	1.88
コール酸ナトリウム	3.00
オレイン酸	1.00
カプリン酸	0.50
ラウリン酸	0.50
スクラロース溶液、25%	0.80
ストロベリー着香料	0.40
水酸化ナトリウム、1N	pH 7.7-7.9への調整に必要な量
塩酸、1N	pH 7.7-7.9への調整に必要な量
無菌水	所要体積へ希釈

30

40

【0 3 4 4】

1 m g / m L タンパク質当量の R 型 Z n H I M 2 (Z n H I M 2 - R) を含有するように、経口液体試料を調製した。冷凍庫 (- 2 0 ° C) から Z n H I M 2 - R を取り出し、デシケーター内に置き、室温に戻した。Z n H I M 2 - R の 1 m g / m L のタンパク質当量を以下の通り経口液体希釈溶液中で調製した。6 . 4 m g の Z n H I M 2 - R を秤量した。その後、容器に 5 . 0 m L の経口液体希釈物を移し、穏やかに旋回させて混合した。溶液が溶解するのに約 4 5 分かかった。結果として得た溶液は懸濁液（濁った外観）であった。投薬の前に、溶液を穏やかに 6 0 秒間旋回させて、溶液が均質な溶液であることを確認した。Z n H I M 2 - R については、タンパク質含有量は 7 8 . 6 %、1 m g / m L タンパク質当量、数量 = 5 m L であった。Z n H I M 2 - R の量 = (1 m g / m L) / (0 .

50

786) } \times (5.0 \text{ mL}) = 6.4 \text{ mg}。ZnHIM2-R濃度 = (6.4 \text{ mg}) / (5.0 \text{ mL}) = 1.28 \text{ mg/mL} (タンパク質含有量について調整された 1 \text{ mg/mL} 当量)。

【0345】

12.1.4 カプリン酸液体処方物の調製

所要滅菌水体積の約 60% を適切な容器内に移した。容器にトロメタミン、トロラミン、無水クエン酸及び水酸化ナトリウムペレットを容器に加え、溶解するまで十分に混合した。温度を 21~25℃ (又は室温) に調整し、液体の pH を測定した。1 N の水酸化ナトリウム又は 1 N の塩酸を用いて必要に応じて pH を 7.7~7.9 に調整し、この温度を維持した。その後、ホットプレート上で温めることにより温度を 45~50℃ に調整した。次に温溶液にカプリン酸を添加し、カプリン酸が溶解するまで混合した。温度を 21~25℃ (又は室温) に調整し、液体の pH を測定した。必要に応じて、1 N の水酸化ナトリウム又は 1 N の塩酸を用いて pH を 7.7~7.9 に調整した。次に 5 分間溶液を混合した。所要体積の 100% に等しくなるよう滅菌水を適当な量だけ添加し、十分に混合した。

【0346】

【表 12】

構成要素	% w/v
トロメタミン	4.24
トロラミン	5.22
無水クエン酸	6.72
水酸化ナトリウムペレット	1.88
カプリン酸	0.9, 1.5, 3.0 又は 6.0
水酸化ナトリウム, 1N	pH調整に必要な量
塩酸, 1N	pH調整に必要な量
滅菌水	所要体積まで希釈

【0347】

投薬研究用に適切な濃度を達成するのに必要な量で、1 N 105 を検量し、例えば (タンパク質の) 1 \text{ mg} の 1 N 105 を検量し、1 \text{ mL} の処方物と組合わせて、処方物中 1 \text{ mg/mL} の 1 N 105 を生成した。

【0348】

12.1.5 リン酸緩衝液液体処方物中のカプリン酸塩及び/又はラウリン酸塩

pH 7.8 又は 8.2 の 100 \text{ mM} のリン酸ナトリウム緩衝液の調製。1 L 入りフラスコに 1.17 \text{ g} のモノナトリウムリン酸塩一水和物 1.17 \text{ g} を移した。約 500 \text{ mL} の滅菌水を添加し、溶解するまで十分に混合した。次に 24.58 \text{ g} の第 2 リン酸ナトリウム七水化物 24.58 \text{ g} を添加し、溶解するまで充分混合した。滅菌水で、体積まで希釈し、十分に混合した。0.22 \mu\text{m} のフィルターを通してろ過した。1 N の HCl 又は 1 N の NaOH で 7.8 又は 8.2 に pH を調整した。

【0349】

1 N 105 のためには、pH 7.8 又は 8.2 の適切な体積のリン酸緩衝液の 60% を適当な容器に移した。次に、最終溶液の 3% w/v を生成するように計算した量のカプリン酸を添加し、溶解するまで充分混合した。その後 1 N の HCl 又は 1 N の NaOH で pH を 7.8 又は 8.2 に調整した。pH 7.8 又は 8.2 のリン酸緩衝液で適切な体積 (例えば 100 \text{ mL}) まで希釈した。

【0350】

【表 1 3】

構成要素	% w/v
カプリン酸ナトリウム	3.0
100 mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.8又は 8.2	100%充分量

【0 3 5 1】

BN-054については、適当な容器内でpH 7.8の100 mMのリン酸ナトリウム緩衝液400グラムを計量した。9.7グラムのカプリン酸ナトリウムと11.1グラムのラウリン酸ナトリウムを添加し、溶解するまで十分に混合した。500グラムの正味重量に等しくなるように適切な量のpH 7.8の100 mMのリン酸ナトリウム緩衝液を添加した。

10

【0 3 5 2】

【表 1 4】

構成要素	% w/w
カプリン酸ナトリウム	1.94
ラウリン酸ナトリウム	2.22
100 mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.8	100%充分量

20

【0 3 5 3】

12.1.6 アルギニン又はトロラミンを用いた液体処方物

pH 7.8の100 mMのリン酸ナトリウム緩衝液の調製。1 L入りフラスコに1.17グラムのモノナトリウムリン酸塩一水和物1.17グラムを移した。約500 mLの滅菌水を添加し、溶解するまで十分に混合した。次に24.58グラムの第2リン酸ナトリウム七水化物24.58グラムを添加し、溶解するまで充分混合した。滅菌水で、容積まで希釈し、十分に混合した。0.22 µmのフィルターを通してろ過した。1 NのHCl又は1 NのNaOHで7.8にpHを調整した。

30

【0 3 5 4】

適当な容器内に適切な体積のpH 7.8のリン酸緩衝液の60%を移した。容器に（下表に記されている通りの）適切な量のアルギニン又はトロラミンを加え、溶解するまで充分混合した。その後最終溶液の3% w/vを生成するように計算した量のカプリン酸塩を加えて、溶解するまで充分混合した。次に、1 NのHCl又は1 NのNaOHを用いてpHを7.8に調整した。pH 7.8のリン酸緩衝液で適切な体積（例えば100 mL）まで希釈した。

【0 3 5 5】

【表 1 5】

構成要素	% w/v
カプリン酸ナトリウム	3.0
アルギニン又はトロラミン	0.4 又は 1.2
100 mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.8	100%充分量

40

【0 3 5 6】

投薬研究用に適切な濃度を達成するのに必要な量で、IN105を検量し、例えば（タンパク質の）1 mgのIN105を検量し、1 mLの処方物と組合わせて、処方物中1 mg/mLのIN105を生成した。

【0 3 5 7】

50

12. 1. 7 カプリル酸を用いた液体処方物

所要滅菌水体積の約60%を適切な容器内に移した。容器にトロメタミン、トロラミン、無水クエン酸及び水酸化ナトリウムペレットを容器に加え、溶解するまで十分に混合した。温度を21～25℃（又は室温）に調整し、液体のpHを測定した。1Nの水酸化ナトリウム又は1Nの塩酸を用いて必要に応じてpHを7.7～7.9に調整した。その後、ホットプレート上で温めることにより温度を45～50℃に調整し、この温度を維持した。次に温溶液にカプリル酸を添加し、カプリル酸が溶解するまで混合した。温度を21～25℃（又は室温）に調整し、液体のpHを測定した。必要に応じて、1Nの水酸化ナトリウム又は1Nの塩酸を用いてpHを7.7～7.9に調整した。次に5分間溶液を混合した。所要体積の100%に等しくなるよう滅菌水を適当な量だけ添加し、十分に混合した。

【0358】

【表16】

構成要素	% w/v
トロメタミン	4.24
トロラミン	5.22
無水クエン酸	6.72
水酸化ナトリウムペレット	1.88
カプリル酸	3.0
水酸化ナトリウム、1N	pH調整に必要な量
塩酸、1N	pH調整に必要な量
滅菌水	所要体積まで

【0359】

投薬研究用に適切な濃度を達成するのに必要な量で、1N105を検量し、例えば（タンパク質の）1mgの1N105を検量し、1mLの処方物と組合わせて、処方物中1mg/mLの1N105を生成した。

【0360】

12. 1. 8 リノール酸を用いた液体処方物

pH7.8の100mMのリン酸ナトリウム緩衝液の調製。1L入りフラスコに1.17グラムのモノナトリウムリン酸塩一水和物1.17グラムを移した。約500mLの滅菌水を添加し、溶解するまで十分に混合した。次に24.58グラムの第2リン酸ナトリウム七水化物24.58グラムを添加し、溶解するまで充分混合した。滅菌水で、容積まで希釈し、十分に混合した。0.22µmのフィルターを通してろ過した。1NのHCl又は1NのNaOHで7.8にpHを調整した。

【0361】

適当な容器内に適切な体積のpH7.8のリン酸緩衝液の60%を移した。その後最終溶液の3%w/vを生成するように計算した量のリノール酸ナトリウムを加えて、溶解するまで充分混合した。次に、1NのHCl又は1NのNaOHを用いてpHを7.8に調整した。pH7.8のリン酸緩衝液で適切な体積（例えば100mL）まで希釈した。

【0362】

【表17】

構成要素	% w/v
リノール酸ナトリウム塩	3.0
100 mM リン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.8	100%充分量

10

20

30

40

50

【0363】

12. 1. 9 カプリン酸／ラウリン酸液体処方物の調製

所要滅菌水体积の約60%を適切な容器内に移した。容器にトロメタミン、トロラミン、無水クエン酸及び水酸化ナトリウムペレットを容器に加え、溶解するまで十分に混合した。温度を21～25℃（又は室温）に調整し、液体のpHを測定した。1Nの水酸化ナトリウム又は1Nの塩酸を用いて必要に応じてpHを7.7～7.9に調整し。その後、ホットプレート上で温めることにより温度を45～50℃に調整し、この温度を維持した。次に温溶液にカプリン酸及び／又はラウリン酸を添加し、カプリン酸及び／又はラウリン酸が溶解するまで混合した。温度を21～25℃（又は室温）に調整し、液体のpHを測定した。必要に応じて、1Nの水酸化ナトリウム又は1Nの塩酸を用いてpHを7.7～7.9に調整した。次に5分間溶液を混合した。所要体積の100%に等しくなるよう滅菌水を適量だけ添加し、十分に混合した。

10

【0364】

【表18】

構成要素	% w/v
トロメタミン	4.24
トロラミン	5.22
無水クエン酸	6.72
水酸化ナトリウムペレット	1.88
カプリン酸	0, 0.1 又は0.9
ラウリン酸	0, 0.9 又は0.1
水酸化ナトリウム, 1N	pH調整に必要な量
塩酸, 1N	pH調整に必要な量
滅菌水	所要体積まで

20

【0365】

投薬研究用に適切な濃度を達成するのに必要な量で、1N105を検量し、例えば（タンパク質の）1mgの1N105を検量し、1mLの処方物と組合わせて、処方物中1mg/mLの1N105を生成した。

30

【0366】

12. 2. 固体投薬処方物例

12. 2. 1 Nobex-1N105-[854]-を用いたカプリン酸塩／ラウリン酸塩固体投薬処方物の調製及び溶解プロファイル

計量紙片（weigh paper）上に約58mgのカプリン酸ナトリウム、57mgのラウリン酸ナトリウム、286mgのマンニトール、30mgのでんぷんグリコール酸ナトリウム及び6mg（タンパク質）のNobex-1N105を移し、徹底的に配合する。配合物をプレスに移し、約350psiで圧縮して錠剤を形成する。

【0367】

【表 19】

**1錠あたり 58mg カプリン酸塩及び 57mg のラウリン酸塩の
固体剤形(錠剤)処方物Nobex-IN105-[854]**

構成要素	錠剤1個あたりのmg
カプリン酸ナトリウム	58
ラウリン酸ナトリウム	57
マンニトール	286
Explotab (でんぷんグリコール酸ナトリウム)	30
Nobex-IN105 (タンパク質)	6

10

【0368】

USP器具2溶解ユニットを用いて、溶解テストを実施した。媒質は水で、パドル速度は50rpm、媒質体積は500mLであった。勾配系を用いてHPLCにより溶解試料を分析した。移動相は、0.1%のTFAを伴う水（移動相A）及び0.1%のTFAを伴うアセトニトリル（移動相B）であった。利用された勾配は以下の通りであった：0分、100%移動相A；11分、65%移動相A；15分、20%移動相A；16分、20%移動相A；17分、100%移動相A。波長は214nmであり、カラムはC18（150×2mm）であった。以下の表及びグラフは、6mgのZn-IN105（タンパク質）、286mgのマンニトール、58mgのカプリン酸ナトリウム、57mgのラウリン酸ナトリウム及び30mgのでんぷんグリコール酸ナトリウム（Explotab）を含有するNobex-Zn-IN105錠剤処方物[854]の溶解テストのために得た溶解データについて要約している。

20

【0369】

【表 20】

**Nobex-Zn-IN105錠剤[854]の
溶解プロファイル用データ要約 (IN105溶解%)**

サンプリング時間 (分)	容器1 (溶解%)	容器2 (溶解%)	平均 (溶解%)
5	71	72	72
10	86	94	90
15	87	96	92
30	89	96	93
45	90	96	93
60	87	96	92

30

40

【0370】

【表 2 1】

Nobex-Zn-IN105 錠剤[854]の溶解プロファイル用データ要約 (カプリル酸塩溶解%)

サンプリング時間 (分)	容器1 (溶解%)	容器2 (溶解%)	平均 (溶解%)
5	98	93	96
10	102	104	103
15	101	104	103
30	102	105	104
45	102	104	103
60	102	105	104

10

【0 3 7 1】

【表 2 2】

Nobex-IN105 錠剤 [854] の溶解プロファイル用データ要約 (ラウリン酸塩溶解%)

サンプリング時間 (分)	容器1(溶解%)	容器2(溶解%)	平均(溶解%)
5	72	75	74
10	90	89	90
15	91	90	91
30	88	91	90
45	89	91	90
60	91	90	91

20

【0 3 7 2】

1 2 . 2 . 2 錠剤 1 個あたり 1 4 3 m g のカプリル酸塩及び 1 4 0 m g のラウリン酸塩の固体剤形（錠剤）処方物調製

処方物 N o b e x - I N 1 0 5 - [8 5 6] の調製

計量紙片上に約 1 4 3 m g のカプリル酸ナトリウム、1 4 0 m g のラウリン酸ナトリウム、1 5 0 m g のマンニトール、3 0 m g のでんぶんグリコール酸ナトリウム及び 6 m g （タンパク質）の N o b e x - I N 1 0 5 を移し、徹底的に配合する。配合物をプレスに移し、約 3 5 0 p s i で圧縮して錠剤を形成する。

30

【0 3 7 3】

【表 2 3】

**1錠あたり143mgのカプリル酸塩及び140mgのラウリン酸塩の
固体剤形(錠剤)処方物Nobex-IN105-[856]**

構成要素	錠剤1個あたりのmg
カプリル酸ナトリウム	143
ラウリン酸ナトリウム	140
マンニトール	150
Explotab (でんぶんグリコール酸ナトリウム)	30
Nobex-IN105 (タンパク質)	6

40

【0 3 7 4】

U S P 器具 2 溶解ユニットを用いて、溶解テストを実施した。媒質は水で、パドル速度は 5 0 r p m、媒質体積は 5 0 0 m L であった。勾配系を用いて H P L C により溶解試料を分析した。移動相は、0 . 1 % の T F A を伴う水（移動相 A）及び 0 . 1 % の T F A を

50

伴うアセトニトリル（移動相B）であった。利用された勾配は以下の通りであった：0分、100%移動相A；11分、65%移動相A；15分、20%移動相A；16分、20%移動相A；17分、100%移動相A。波長は214nmであり、カラムはC18（150×2mm）であった。以下の表及びグラフは、6mgのZn-IN105（タンパク質）、150mgのマンニトール、143mgのカプリン酸ナトリウム、140mgのラウリン酸ナトリウム及び30mgのでんぷんグリコール酸ナトリウム（ExploTab）を含有するNobex-Zn-IN105錠剤の溶解テストのために得た溶解データについて要約している。

【0375】

【表24】

10

Nobex-Zn-IN105錠剤 [856] の溶解プロファイル用データ要約(IN105溶解%)

サンプリング時間 (分)	容器1 (溶解%)	容器2 (溶解%)	平均 (溶解%)
5	43	31	37
10	66	53	60
15	81	72	77
30	98	97	98
45	98	99	99
60	96	98	97

20

【0376】

【表25】

Nobex-Zn-IN105錠剤 [856] の溶解プロファイル用データ要約(カプリル酸塩溶解%)

サンプリング時間 (分)	容器1 (溶解%)	容器2 (溶解%)	平均 (溶解%)
5	36	32	34
10	68	57	63
15	89	79	84
30	105	103	104
45	105	103	104
60	105	104	105

30

【0377】

【表26】

Nobex-Zn-IN105錠剤 [856] の溶解プロファイル用データ要約(ラウリン酸塩溶解%)

サンプリング時間 (分)	容器1 (溶解%)	容器2 (溶解%)	平均 (溶解%)
5	35	25	30
10	61	44	53
15	74	61	68
30	93	88	91
45	93	91	92
60	93	92	93

40

【0378】

50

12. 2. 3 錠剤1個あたり143mgのカプリン酸塩の固体剤形（錠剤）処方物調製
処方物Nobex-IN105-[856]の調製

計量紙片上に約143mgのカプリン酸ナトリウム、150mgのマニトール、30mgのでんぷんグリコール酸ナトリウム及び6mg（タンパク質）のNobex-IN105を移し、徹底的に配合する。配合物をプレスに移し、約350psiで圧縮して錠剤を形成する。

【0379】

【表27】

1錠あたり143mgのカプリン酸塩の固体剤形（錠剤）処方物Nobex-IN105-[859]

構成要素	錠剤1個あたりのmg
カプリン酸ナトリウム	143
マニトール	150
Explotab（でんぷんグリコール酸ナトリウム）	30
Nobex-IN105（タンパク質）	6

10

【0380】

USP器具2溶解ユニットを用いて、溶解テストを実施した。媒質は水で、パドル速度は50rpm、媒質体積は500mLであった。勾配系を用いてHPLCにより溶解試料を分析した。移動相は、0.1%のTFAを伴う水（移動相A）及び0.1%のTFAを伴うアセトニトリル（移動相B）であった。利用された勾配は以下の通りであった：0分、100%移動相A；11分、65%移動相A；15分、20%移動相A；16分、20%移動相A；17分、100%移動相A。波長は214nmであり、カラムはC18（150×2mm）であった。以下の表及びグラフは、6mgのZn-IN105（タンパク質）、150mgのマニトール、143mgのカプリン酸ナトリウム、及び30mgのでんぷんグリコール酸ナトリウム（Explotab）を含有するNobex-Zn-IN105錠剤の溶解テストのために得た溶解データについて要約している。

20

【0381】

【表28】

Nobex-Zn-IN105錠剤[859]の溶解プロファイル用データ要約(IN105溶解%)

サンプリング時間 (分)	容器1 (溶解%)	容器2 (溶解%)	平均 (溶解%)
5	11	26	19
10	63	58	61
15	84	80	82
30	86	88	87
45	88	88	88
60	87	89	88

30

【0382】

40

【表 29】

Nobex-Zn-IN105錠剤[859]の溶解プロファイル用データ要約(カプリル酸塩溶解%)

サンプリング時間 (分)	容器1 (溶解%)	容器2 (溶解%)	平均 (溶解%)
5	61	43	52
10	93	72	83
15	99	95	97
30	99	100	100
45	99	100	100
60	99	100	100

10

【0383】

12. 2. 4 錠剤1個あたり286mgのカプリル酸塩の固体剤形(錠剤)処方物調製
処方物Nobex-IN105-[860]の調製

計量紙片上に約286mgのカプリル酸ナトリウム、150mgのマニトール、30mgの
でんぶんグリコール酸ナトリウム及び6mg(タンパク質)のNobex-IN105
を移し、徹底的に配合する。配合物をプレスに移し、約350psiで圧縮して錠剤
を形成する。

【0384】

20

【表30】

錠あたり286mgカプリル酸塩の固体剤形(錠剤)処方物Nobex-IN105-[860]

構成要素	錠剤1個あたりのmg
カプリル酸ナトリウム	286
マニトール	150
Explotab(でんぶんグリコール酸ナトリウム)	30
Nobex-IN105(タンパク質)	6

【0385】

30

USP器具2溶解ユニットを用いて、溶解テストを実施した。媒質は水で、パドル速度
は50rpm、媒質体積は500mLであった。勾配系を用いてHPLCにより溶解試料
を分析した。移動相は、0.1%のTFAを伴う水(移動相A)及び0.1%のTFAを
伴うアセトニトリル(移動相B)であった。利用された勾配は以下の通りであった：0分
、100%移動相A；11分、65%移動相A；15分、20%移動相A；16分、20
%移動相A；17分、100%移動相A。波長は214nmであり、カラムはC18(1
50×2mm)であった。以下の表及びグラフは、6mgのZn-IN105(タンパク
質)、150mgのマニトール、286mgのカプリル酸ナトリウム、及び30mgの
でんぶんグリコール酸ナトリウム(Explotab)を含有するNobex-Zn-IN
105錠剤の溶解テストのために得た溶解データについて要約している。

40

【0386】

【表 3 1】

Nobex-Zn-IN105錠剤[860]の溶解プロファイル用データ要約(IN105溶解%)

サンプリング時間 (分)	容器1 (溶解%)	容器2 (溶解%)	平均 (溶解%)
5	28	19	24
10	53	44	49
15	70	68	69
30	92	90	91
45	92	92	92
60	92	93	93

10

【0 3 8 7】

【表 3 2】

Nobex-Zn-IN105錠剤[860]の溶解プロファイル用データ要約(カプリル酸塩溶解%)

サンプリング時間 (分)	容器1 (溶解%)	容器2 (溶解%)	平均 (溶解%)
5	29	35	32
10	52	66	59
15	70	84	77
30	99	99	99
45	99	99	99
60	99	100	100

20

【0 3 8 8】

1 2. 2. 5 錠剤 1 個あたり 1 0 0 m g のカプリル酸塩の固体剤形（錠剤）処方物調製
処方物 N o b e x - I N 1 0 5 - [8 6 1] の調製

計量紙片上に約 1 0 0 m g のカプリル酸ナトリウム、1 5 0 m g のマンニトール、2 5
m g のでんぶんグリコール酸ナトリウム及び 6 m g （タンパク質）の N o b e x - I N 1
0 5 を移し、徹底的に配合する。配合物をプレスに移し、約 3 5 0 p s i で圧縮して錠剤
を形成する。

30

【0 3 8 9】

【表 3 3】

1錠あたり100mgのカプリル酸塩の固体剤形(錠剤)処方物Nobex-IN105-[861]

構成要素	錠剤1個あたりのmg
カプリル酸ナトリウム	100
マンニトール	150
Explotab (でんぶんグリコール酸ナトリウム)	25
Nobex-IN105 (タンパク質)	6

40

【0 3 9 0】

U S P 器具 2 溶解ユニットを用いて、溶解テストを実施した。媒質は水で、パドル速度
は 5 0 r p m、媒質体積は 5 0 0 m L であった。勾配系を用いて H P L C により溶解試料
を分析した。移動相は、0. 1 % の T F A を伴う水（移動相 A）及び 0. 1 % の T F A を
伴うアセトニトリル（移動相 B）であった。利用された勾配は以下の通りであった：0 分
、1 0 0 % 移動相 A；1 1 分、6 5 % 移動相 A；1 5 分、2 0 % 移動相 A；1 6 分、2 0

50

%移動相A；17分、100%移動相A。波長は214nmであり、カラムはC18（150×2mm）であった。以下の表及びグラフは、6mgのZn-IN105（タンパク質）、150mgのマンニトール、100mgのカプリン酸ナトリウム及び25mgのでんぶんグリコール酸ナトリウム（Explotab）を含有するNobex-Zn-IN105錠剤の溶解テストのために得た溶解データについて要約している。

【0391】

【表34】

Nobex-Zn-IN105-[861]の溶解プロファイル用データ要約(IN105溶解%)

サンプリング時間 (分)	容器1(溶解%)	容器2(溶解%)	平均(溶解%)
5	77	41	59
10	94	84	89
15	96	90	93
30	95	91	93
45	95	91	93
60	97	89	93

10

【0392】

【表35】

Nobex-Zn-IN105錠剤[861]の溶解プロファイル用データ要約(カプリン酸塩溶解%)

サンプリング時間 (分)	容器1(溶解%)	容器2(溶解%)	平均(溶解%)
5	97	77	87
10	101	99	100
15	101	103	102
30	101	103	102
45	101	104	103
60	101	104	103

20

【0393】

12.2.6 錠剤1個あたり150mgのカプリン酸塩の固体剤形（錠剤）処方物調製
処方物Nobex-IN105-[862]の調製

計量紙片上に約150mgのカプリン酸ナトリウム、150mgのマンニトール、25mgのクロスカルメロースナトリウム及び6mg（タンパク質）のNobex-IN105を移し、徹底的に配合する。配合物をプレスに移し、約350psiで圧縮して錠剤を形成する。

【0394】

【表36】

1錠あたり150mgのカプリン酸塩の固体剤形（錠剤）処方物Nobex-IN105-[862]

構成要素	錠剤1個あたりのmg
カプリン酸ナトリウム	150
マンニトール	150
Explotab (でんぶんグリコール酸ナトリウム)	25
Nobex-IN105 (タンパク質)	6

40

【0395】

USP器具2溶解ユニットを用いて、溶解テストを実施した。媒質は水で、パドル速度は50rpm、媒質体積は500mLであった。勾配系を用いてHPLCにより溶解試料

50

を分析した。移動相は、0.1%のTFAを伴う水（移動相A）及び0.1%のTFAを伴うアセトニトリル（移動相B）であった。利用された勾配は以下の通りであった：0分、100%移動相A；11分、65%移動相A；15分、20%移動相A；16分、20%移動相A；17分、100%移動相A。波長は214nmであり、カラムはC18（150×2mm）であった。以下の表及びグラフは、6mgのZn-IN105（タンパク質）、150mgのマニトール、150mgのカプリン酸ナトリウム、及び25mgのクロスカルメロースナトリウム（ExploTab）を含有するNobex-Zn-IN105錠剤の溶解テストのために得た溶解データについて要約している。

【0396】

【表37】

10

Nobex-Zn-IN105錠剤[862]の溶解プロファイル用データ要約(IN105溶解%)

サンプリング時間 (分)	容器1(溶解%)	容器2(溶解%)	平均(溶解%)
5	76	41	59
10	93	87	90
15	95	99	97
30	96	98	97
45	97	98	98
60	98	97	98

20

【0397】

【表38】

Nobex-Zn-IN105錠剤[862]の溶解プロファイル用データ要約(カプリン酸塩溶解%)

サンプリング時間 (分)	容器1(溶解%)	容器2(溶解%)	平均(溶解%)
5	84	51	68
10	98	88	93
15	98	97	98
30	98	98	98
45	98	98	98
60	98	98	98

30

【0398】

1.3 インビトロ酵素耐性例

インスリン化合物複合体（HIM2）を10mMのリン酸ナトリウム緩衝液（pH約7.4）内に供給し、その濃度をHPLCにより判定する（最高0.6mg/mLで親と複合体間の等モル比較を行なうことができるように溶液を緩衝液で希釈する）。7.53U/mLの濃度まで1mMのHCl中で、凍結乾燥されたキモトリプシン酵素を再懸濁させた。試料管に、各試料の1.53mLアリコートを加え、対照管内に0.850mLを加えた。試料は、1試料につき4本の対照管と共にデュプリケートにてテストした。アリコートを37℃で15分間サーモミキサー内でインキュベートした。その後、17μLのキモトリプシン酵素を各々の試料管に加えた。各々の対照管に1mMのHCl5μLを加えた。添加直後に、試料及び対照管から200μLを取り出し、先に遠心分離管内にアリコートとして引き抜いた1%のTFA50μLの中に入れた。この試料をT=0として用いた。

40

【0399】

以下の間隔でインスリン化合物（Zn無し）、HIM（Zn無し）及びインスリン（速効型インスリン化合物）についてのサンプリング手順を反復した：0、2、5、8、12、15及び30分。対照手順は以下の間隔で反復した：0、8、15、30分。T型及びR型の試料については、手順を以下の間隔で反復した：0、12、40及び60分。HP

50

LCを介して分析を行なうことができるまで、 -20°C で試料を保管した。各消化物についてそれぞれの $T=0$ 分に対して分解百分率を判定するためにHPLCを実施した。残留百分率の自然対数と時間の関係をプロットし、各消化物について線形回帰を実施した。 $t_{1/2}:-0.693/\text{勾配}$ という等式を用いて半減期を計算した。

【0400】

【表39】

0.6mg/mlのタンパク質における結果

試料	T半減期	亜鉛含有量	フェノール含有量
インスリン (亜鉛含まず)	7-9 分	--	--
HIM2 (亜鉛含まず)	12-15分	--	--
インスリン、USP (速効型インスリン化合物)	26-29分	0.3 ~ 1% w/w	---
HIM2 (R-型亜鉛錯体)	51-78分	1.1% w/w	0.1 ~ 0.25% w/w
HIM2 (T-型亜鉛錯体)	51分	0.55 % w/w	---
HIM2 (R-型亜鉛・プロタミン錯体)	95-120分	2.0 ~ 2.1% w/w	5.3 ~ 6.2% w/w
DICON-1 (R-型亜鉛錯体)	24-26分	ND	ND

【0401】

【表40】

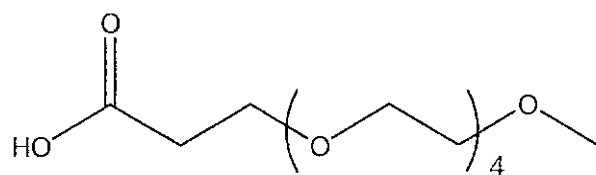
0.3mg/mlのタンパク質における結果

試料	T 半減期	亜鉛含有量	フェノール含有量
インスリン (亜鉛含まず)	4-5分	--	--
HIM2 (亜鉛含まず)	7-9分	--	--
インスリン、USP (速効型インシュリン化合物)	7-8分	0.4 ~ 1% w/w	---
HIM2 (R-型亜鉛錯体)	19-21分	1.1% w/w	0.1 ~ 0.25% w/w
HIM2 (T-型亜鉛錯体)	12-15分	0.55 % w/w	---

【0402】

14. インビトロ例

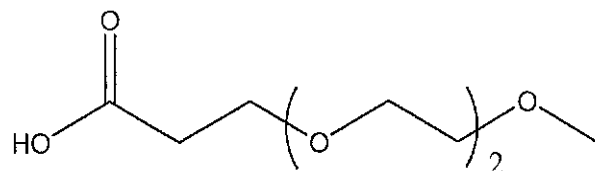
【化 4 7】



B 2 9 モノ複合体、I N - 1 8 7 :

10

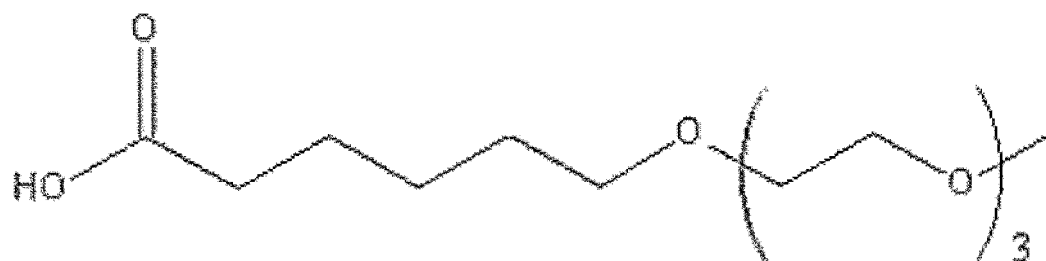
【化 4 8】



B 2 9 モノ複合体、I N - 1 7 8 :

20

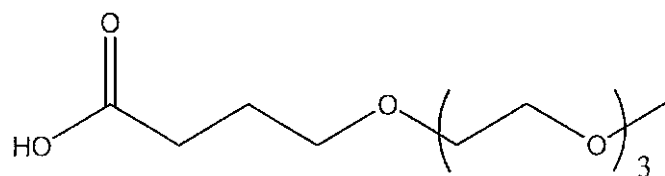
【化 4 9】



30

B 2 9 モノ複合体、I N - 1 9 0 :

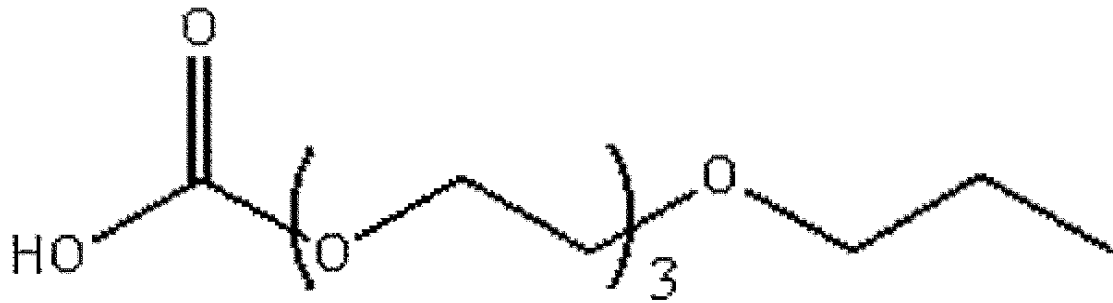
【化 5 0】



40

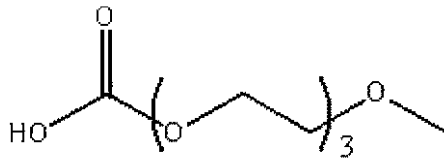
B 2 9 モノ複合体、I N - 1 9 6 :

【化 5 1】



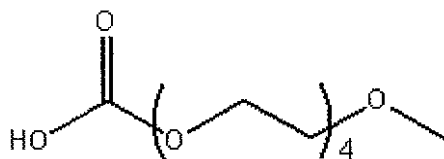
10

B 2 9 モノ 複 合 体、I N - 1 9 1 :
【化 5 2】



20

B 2 9 モノ 複 合 体、I N - 1 8 9 :
【化 5 3】



30

【0 4 0 6】

1 4 . 2 イヌクランプ研究

1 4 . 2 . 1 初期H I M 2 研究

大腿動脈内にカテーテルを設置することによって、イヌ（ $n = 3$ 又は 6 ）を外科的に準備した（イソフルラン麻酔）。動物を $16 \sim 17$ 日間回復させ、その後一晩断食させ、意識ある状態で研究した。 60 分の平衡期間後に、 20 分の統制期間があり、その後口から薬物を与えた。実施例に示されている通りに調製した緩衝溶液中で $Zn^{++} - H I M 2 R$ 型インスリン化合物をテストした。「誤り！出典不明」。さらに、実施例に示されている通りに調製したカプリン酸及びラウリン酸を含有する経口液体処方物中の R 型及び $N P H$ 型錯体をテストした。「誤り！出典不明」。

40

【0 4 0 7】

3 つのテスト試料全てを 1 用量レベルのみでテストした（用量レベルを以前の実験結果に基づいて同定した）。血漿グルコースレベルを次に、 4 時間脚の静脈を通して $D - 20$ の輸液により正常血糖値でクランプした。グルコース、インスリン化合物及び $C -$ ペプチ

50

ドの測定のため 20、0、5、10、20、30、45、90、120、180 及び 240 分で血液試料 (4 ml) を採取した。血漿グルコースレベルをクランプするために必要なだけ、動脈血試料を得た。各実験において合計 72 ml の血液を採取した。

【0408】

次の測定を実施した：グルコース輸液速度、インスリン化合物濃度、C-ペプチド濃度、及び血漿 C-ペプチドレベル (内生的インスリン化合物放出の推定を可能にするため)。正常血糖を維持するのに必要なグルコース輸液速度は、インスリン化合物作用指数を提供する。

【0409】

実験に従って、カテーテルの自由端部を皮下に埋め、2 週間イヌを回復させてから、異なるテスト品を使用するもう 1 つの研究を行なった。投薬する上で動物を無作為化し、合計 3 回使用した。イヌの合計数は 6 であった。

【0410】

図 25 及び 26 は結果を示している。

【0411】

14.2.2 初期 IN105 研究

乾燥重量に基づいて 34% のタンパク質、46% の炭水化物、14.5% の脂肪及び 5.5% の繊維という規定食での給餌を受けていた一晩断食済みの意識ある雑種犬 6 頭について研究を行なった。各動物には、実験のおよそ 3 週間前に、別途記述されている通り (1)、大腿動脈内にサイラスティックカテーテルを挿入した。実験当日にカテーテルを局所麻酔下でその皮下嚢状腔から除去した。テスト品; Nobex-IN105 (ロット # KJ-173-095 & KJ-173-116) は 1.0 mg/ml の濃度で経口脂肪酸処方物 (Nobex-IN-[753]-040422) の形で提供された。各々のイヌは、0.25 mg/kg の経口用量の Nobex-IN105 (1.0 mg/ml、0.25 ml/kg 投薬体積) を受けた。t=0 で Nobex-IN105 を与え、正常血糖値を維持するべく橈側皮静脈を通してグルコース (D-20) を輸液した。前述の通り (1) インスリン及びグルコースを測定するため動脈血液試料を抜き取った。実験を完了した後、初期外科処置の間そうであったように、動脈カテーテルを皮下に埋めた。

【0412】

実験中、1 匹のイヌが投薬後直ぐに嘔吐し、用量のうちの一部分しか投与されなかった。従って、この実験からの結果は、このイヌから得たデータを伴ったものと伴わないもので報告された。

【0413】

動脈血漿インスリンレベルは、Nobex-IN105 の経口投与後、異常値を (経口-2i) を含めて、6 匹のイヌ全てにおいて上昇した。平均動脈インスリンは、 $6.0 \pm 1.4 \mu\text{U/ml}$ ($6.3 \pm 1.7 \mu\text{U/ml}$ 、 $n=5$) から投与から 10 分後の $109.4 \pm 31.4 \mu\text{U/ml}$ ($127.8 \pm 30.1 \mu\text{U/ml}$ 、 $n=5$) のピークまで上昇し、その後降下して、150 分後までに全てのイヌは基線インスリンレベルまで戻った (図 27 及び 28)。

【0414】

正常血糖値はグリコース輸液により維持された。正常血糖値を維持するために必要とされるグルコース輸液速度は、動脈インスリンの上昇がより大きいものである動物において最大であった (図 27 及び 28)。グルコース輸注速度曲線下平均面積 (AUC₀₋₂₄₀) は、 $578.5 \pm 144.5 \text{ mg/kg/分}$ ($669.4 \pm 137.7 \text{ mg/kg/分}$ 、 $n=5$) であった。

【0415】

14.2.3 固体処方物

グルコースクランプモデルを用いた処方物スクリーニング研究を、乾燥重量に基づいて 34% のタンパク質、46% の炭水化物、14.5% の脂肪及び 5.5% の繊維という規定食での給餌を受けていた一晩断食済みの意識ある雑種犬について実施した。各動物に

は、実験のおよそ3週間前に別途記述されている通り（参考文献1）、大腿動脈内にサイラスティックカテーテルを挿入した。実験当日にカテーテルを局所麻酔下でその皮下嚢状腔から除去した。テスト品は、異なる液体処方物の形での1.0 mg/mLのZn IN 105又はカプセル又は錠剤1個あたり5～6 mgのIN 105を含有していた。全ての実験における各々のイヌは、 $t = 0$ で一回目そして $t = 120$ 分で2回目という連続2回、約0.25 mg/kgの異なる経口液体用量又は5又は6 mgのIN 105を含有するカプセル又は錠剤を受けた。正常血糖値を維持するべく橈側皮静脈を通してグルコース（D-20）を輸注した。一部のケースでは、効果が120分を超えて持続した場合、投薬後研究時間を延長した。前述の通り（参考文献1）、インスリン、グルコース及びC-ペプチドの測定のために、動脈血液試料を抜き取った。実験完了後、動脈カテーテルを皮下組織内に置き直した。

10

【0416】

溶液及び固体剤形の両方の処方物は、異なるレベルの脂肪酸、緩衝液、希釈剤及び崩壊剤を用いて調製された。変数を最小限におさえるため、液体及び固体処方物は、一貫したレベルのIN 105及び各々の賦形剤（カプリン、ラウリン、カプリル、ミリスチン、リノール酸）を含有し、かくして脂肪酸含有量、緩衝液、希釈剤（マンニトール又は微晶質セルロース及び／又は崩壊剤（ExploTab）の相対量のみを変動させた。グルコース輸注速度及びIN 105吸収（血漿インスリン免疫反応性）データを評価し、各々の投薬された処方物と比較した。

【0417】

20

最初に、より容易に固体剤形に転換されると思われる液体処方物へと最適化済み液体処方物（参考文献2）を単純化し洗練するために、実験を行なった。これは、遊離脂肪酸を対応するナトリウム塩で置換すること（例えばカプリン酸ナトリウムにより置換されたカプリン酸）、ならびに必要でなくなったとみなされた緩衝液構成要素（クエン酸、トロラミン、トロメタミン、水酸化ナトリウム）を除去することにより、実施された。さらに、リノール酸、カプリル酸及びミリスチン酸といったその他の脂肪酸及びアミノ酸、アルギニンの効果を、IN 105の吸収に対するその効果について検討した。

【0418】

実験毎に1～2匹のイヌを用いた初期プロトタイプスクリーンの後、処方物と個々の動物の間の可変性及び一貫性をより良く判定するべく、わずかなプロトタイプ処方物を選択し、付加的なイヌにおいてテストした。

30

【0419】

IN 105の溶解プロファイル及び脂肪酸含有量を評価するため、1つの溶解方法を開発し、さまざまな候補処方物について、溶解研究を実施した。

【0420】

結果

初期実験では、付加的な賦形剤無くリン酸緩衝液中の3% w/vのカプリン酸ナトリウム塩が投与されたイヌは、トロラミン／クエン酸／トロメタミン／水酸化ナトリウム緩衝液中の3% w/vのカプリン酸を含有する最適化された液体処方物と比べ類似の応答を示した（図29-30）。このことは、脂肪酸形態のナトリウム塩が酸形態に匹敵する形の挙動を示すこと、そして付加的な緩衝液構成要素が該処方に寄与しなかったことを実証した。

40

【0421】

3%のカプリン酸塩を3%のカプリル酸又は3%のリノール酸で置換する代替的脂肪酸を評価する別の研究においては、いずれの代替案も有意な効果を示さなかった。カプリル酸を使用すると低～中レベルのグルコースが必要となるが、一方リノール酸を使用しても、いかなるグルコース輸注の必要性も結果としてもたらされず、効果の欠如を示唆した。両方の処方物共、比較的低レベルの動脈インスリンを示した。アルギニンを含む液体処方物は、相対的にGIR又はIN 105レベルに対する利点を全く示さなかった。

【0422】

50

一次研究では、Carver プレスを用いて手で圧縮された錠剤及び硬カプセル内に充てんされた粉末配合物の両方として、固体処方物を評価した。57 mg のカプリン酸塩／57 mg のラウリン酸塩と6 mg のIN105（インスリン当量、0.25 mg/kg）の粉末配合物であるカプセルは、最高120分の第1回投薬においては有意な効果を全く示さず、第2回投薬では、IN105吸収と同時にGIRで有意な効果が見られ、ここで0から120分までレベルが基線よりもはるかに高かった。これらのデータは、カプセル剤形においてIN105の応答が可變的にではあるものの潜在的に遅延されるということを示唆している。溶解は錠剤に比べカプセルでわずかに遅延されたが、インビトロ／インビボの相関関係はほとんど又は全く存在しない可能性がある。

【0423】

10

初期プロトタイプ錠剤スクリーニング研究では143 mg のラウリン酸塩を伴って又は伴わずに143 mg のカプリン酸塩と共に6 mg のIN105及び150 mg のマンニトール、30 mg のでんぷんグリコール酸ナトリウムを含有する錠剤は、54 mg のカプリン酸塩又は／又は54 mg のラウリン酸塩を伴う同じ錠剤に比べ著しく高いGIR及びIN105吸収を示した（図31、32及び33）。このことは、カプリン酸塩及びラウリン酸塩のレベル増大に対してより高いGIR及びIN105レベルの適正な用量応答を示唆している。表は、IN105充てんカプセルに対する早期の一貫性あるGIR応答を示した。さらに、IN105錠剤は、投薬を受けた全てのイヌにおいてインスリンの動脈血漿上昇を示した。

【0424】

20

一連の最終的研究においては、3つのプロトタイプ錠剤処方物（処方物[856]は143 mg のカプリン酸塩及び140 mg のラウリン酸塩を含有し、[860]は286 mg のカプリン酸塩を含有し、[862]は150 mg のカプリン酸塩を含有していた）を5匹のイヌ（各処方物について3匹の異なるイヌ）における評価のために選択して、効能の一貫性を査定した（図34～37）。動脈血漿インスリンレベルは、150 mg 又は280 mg のカプリン酸塩又は143 mg / 140 mg のカプリン酸塩／ラウリン酸塩のいずれかを含み錠剤の形で処方された6 mg（インスリン当量）のIN105の投与の後に対応するGIR応答を伴って、3匹全てのイヌにおいて18種全ての用量で（各々イヌ3匹×3錠剤×3用量）上昇した（図31～32及び38～42）。C-ペプチドレベル（ng/ml）は、150 mg 及び280 mg のカプリン酸塩錠剤（平均（n=2））で、第1回投薬中0.30±0.05～0.22±0.02そして第2回投薬で0.1±0.05～0.02±0.0の初期レベルからの低下を示し、140 mg / 140 mg のカプリン酸塩／ラウリン酸塩錠剤では、第1回投薬中0.21±0.05～0.05±0.02そして0.18±0.05～0.18±0.01の低下を示した。これは、外因性IN105インスリンの結果としての膵臓からのCペプチド分泌の抑制を表わしている。

【0425】

30

IN105の3つのプロトタイプ錠剤処方物全てが、日数の違いを含めイヌ内及びイヌ間毎にかつ用量間で一貫性あるIN105吸収レベル及び結果としてのグルコース輸注速度を示した。

【0426】

40

6匹のイヌから成るセットを用いた最終的研究の間に、1匹のイヌ（イヌ#3）は、全ての液体及び固体投薬量でより低い応答を経験した。より精確に結果を代表するように、イヌ#3からの結果を伴って及び伴わずにデータを提示した。完全な用量を受けなかった（強制飼養不良、嘔吐など）又は内因性インスリンを有していたイヌからのデータは削除した。

【0427】

溶解研究：錠剤及びカプセルの代表的試料を溶解テスト（上述）に付した。

【0428】

論述

これらの研究は、経口送達された6 mg のIN105（約0.25 mg/kgを含有し

50

かつ崩壊剤でんぷんグリコール酸ナトリウム及びマンニトールを伴うラウリン酸ナトリウム塩又はカプリン酸塩を含有するプロトタイプ I N 1 0 5 錠剤が、正常血糖を保つのにグルコース輸注を必要とする動脈血漿インスリンの有意でかつ一貫性ある上昇を結果としてもたらしたということを実証している。

【0429】

これらのプロトタイプ錠剤は、カプリン酸塩又はラウリン酸塩を匹敵するレベルで含む液体処方物と少なくとも同じ位良好でかつそれよりも優れている可能性のある I N 1 0 5 レベル及び G I R 速度を結果としてもたらした。プロトタイプ錠剤形態は、経口液体処方物の吸収プロファイルを維持する。選択されたプロトタイプ錠剤処方物の相対的経口バイオポテンシー（例えば 280mg 及び 150mg のカプリン酸塩を含む錠剤、 $n=6$ 、G I R についての A U C = 496 ± 117 及び 500 ± 275 ）は、液体処方物（例えば 3% w/v のカプリン酸の液体処方物、 $n=5$ 、G I R についての A U C = 182 ± 92 及び 198 ± 119 ）よりも優れていると思われる。

【0430】

データは、マンニトール及び崩壊剤、でんぷんグリコール酸ナトリウムと共に唯一の脂肪酸としてカプリン酸ナトリウムを含む錠剤が、臨床研究で使用するための固体剤形のさらなる開発において有用であると思われるということを示唆している。データは又、選択されたプロトタイプのカプリン酸塩錠剤形態（150mg 又は 286mg のいずれかでのカプリン酸ナトリウム）の形での I N 1 0 5 の経口投与の後のインスリンレベルが、両方の用量で、投薬後約 20 分前後での標準的 T m a x 及び約 59.0 ± 20.1 及び $62.9 \pm 25.4 \mu\text{U n i t s} / \text{m l}$ の C m a x を伴って定常的にピークに達したことをも示唆している。血漿インスリンレベルは、各用量の後、10～15 分間 C m a x レベル近くまで上昇した状態にとどまり、120 分間全体を通して基底レベルより高くとどまった。これらの錠剤を用いて正常血糖を維持するのに必要とされる G I R は、両方の用量で 30～40 分又はその前後で T m a x に達し、G I R C m a x は、 8.4 ± 1.99 及び $7.41 \pm 2.18 \text{ mg} / \text{kg} / \text{分}$ の平均に達した。錠剤剤形は、最適化された液体処方物に比べ正常血糖を維持するのにより高い G I R C m a x（ $7.4 \sim 8.4$ 対 $4.5 \sim 5.4$ ）を要し、より長い時間（100～120 分対 60～90 分）グルコース輸注を要した。

【0431】

履歴的 S Q 及び吸入インスリンの動脈血漿インスリンレベルと比べ、これらのプロトタイプ錠剤は、S Q 及び吸入送達に類似した最大インスリンレベルを提供し、吸入インスリンのものに匹敵するインスリンプロファイルと似ているように思われる（図 34～37）。

【0432】

プロトタイプ錠剤実験は、選択されたプロトタイプ錠剤が、錠剤プレスを用いて生産できる臨床処方物の生産に重点的に取組むための将来の開発を含めて I N 1 0 5 をさらに評価するための固体投薬量処方物として適しているということを示唆している。

【0433】

本明細書は、参照を容易にすることのみを目的とした主題を伴う節に分割されている。節及び主題見出しは、本発明の範囲を制限するように意図されたものではない。本書で記述されている実施形態は、本発明の数多くの態様及び属性を例示する目的をもつものであり、本発明の範囲を制限するように意図されたものではない。

【図面の簡単な説明】

【0434】

5 図面の簡単な説明

【図 1】本発明のさまざまな結晶性固体の顕微鏡写真を示す。本発明には、これらの図のいずれかに示された形態を有する結晶が含まれる。24 時間成長させた結晶である $30 \text{ g} / \text{L}$ 濃度の H I M 2 の T 型 Z n 錯体を示す Z e i s s A x i o v e r t 顕微鏡を用いて撮影した顕微鏡写真である。

【図 2】本発明のさまざまな結晶性固体の顕微鏡写真を示す。本発明には、これらの図の

いずれかに示された形態を有する結晶が含まれる。24時間成長させた結晶である30g/L濃度のHIM2のT型Zn錯体を示すZeiss Axiovert顕微鏡を用いて撮影した顕微鏡写真である。

【図3】本発明の結晶性固体の顕微鏡写真を示す。本発明には、この図に示された形態を有する結晶が含まれる。5日間成長させた結晶である、30g/L濃度のHIM2のT型Zn錯体を示すZeiss Axiovert顕微鏡を用いて撮影した顕微鏡写真である。

【図4】本発明の結晶性固体の顕微鏡写真を示す。本発明には、この図に示された形態を有する結晶が含まれる。4日間成長させた結晶である、30g/LでのHIM2のR型Zn錯体を示すZeiss Axiovert顕微鏡を用いて撮影した顕微鏡写真である。

【図5】本発明の結晶性固体の顕微鏡写真を示す。本発明には、この図に示された形態を有する結晶が含まれる。30%の有機物を含有するIN105のR型結晶性Zn錯体の顕微鏡写真を示す。

【図6A-10B】本発明のさまざまな結晶性固体の顕微鏡写真を示す。本発明には、これらの図のいずれかに示された形態を有する結晶が含まれる。有機溶媒を用いて作られたMIM2のさまざまなR型Zn錯体の顕微鏡写真を示す。

【図11A-14B】本発明のさまざまな結晶性固体の顕微鏡写真を示す。本発明には、これらの図のいずれかに示された形態を有する結晶が含まれる。HIM2及びIN105のさまざまなR型共結晶化Zn錯体の結晶の顕微鏡写真を示す。

【図15A-15B】本発明のさまざまな結晶性固体の顕微鏡写真を示す。本発明には、これらの図のいずれかに示された形態を有する結晶が含まれる。ヒトインスリン及びHIM2のさまざまなR型共結晶化Zn錯体の結晶の顕微鏡写真を示す。

【図16】HIM2及びZn-HIM2についてのマウス血液グルコース検定の結果を示す。HIM2についてのMBGAバイオポテンシープロファイルを示す。

【図17】HIM2及びZn-HIM2についてのマウス血液グルコース検定の結果を示す。ZnHIM2インスリン化合物生成物R型についてのMBGAバイオポテンシープロファイルを示す。

【図18】HIM2及びZn-HIM2についてのマウス血液グルコース検定の結果を示す。ZnHIM2インスリン化合物生成物T型についてのMBGAバイオポテンシープロファイルを示す。

【図19】HIM2及びZn-HIM2についてのマウス血液グルコース検定の結果を示す。プロタミンを伴うZnHIM2インスリン化合物生成物についてのMBGAバイオポテンシープロファイルを示す。

【図20】HIM2及びZn-HIM2についてのマウス血液グルコース検定の結果を示す。投薬後30分及び90分後のR型プロタミン錯体のグルコース低下効果を示す。

【図21-24】IN-186、IN-192、IN-190、IN-191、IN-189、IN-178、IN-193、IN-194、IN-185、IN-196及びIN-197についてのMBGAバイオポテンシープロファイルを示す。

【図25-26】本発明のZn-HIM2錯体についてのイヌクランプ研究の結果を示す。

【図27-28】本発明のZn-IN105錯体についてのイヌクランプ研究の結果を示す。

【図29-30】付加的な賦形剤を含まないリン酸緩衝液中の3%w/vのカプリン酸ナトリウム塩中のIN105を投薬したイヌについてのイヌクランプ研究の結果を示す。

【図31-33】143mgのラウリン酸塩を伴う又は伴わない、143mgのカプリン酸塩を伴う30mgのExlotab、6mgのIN105及び150mgのマニトールを含む錠剤を投薬したイヌについての、イヌクランプ研究の結果を示す。

【図34-37】プロトタイプ錠剤、150mg及び280mgのカプリン酸塩錠剤及び140mg/140mgのカプリン酸塩/ラウリン酸塩錠剤を投薬したイヌについてのイヌクランプ研究の結果を示す。

【図 1】

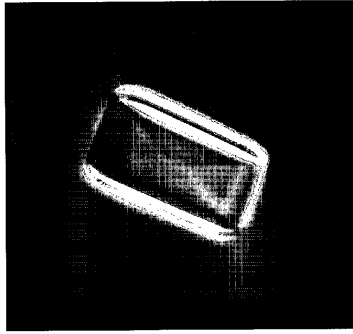


Figure 1

【図 3】

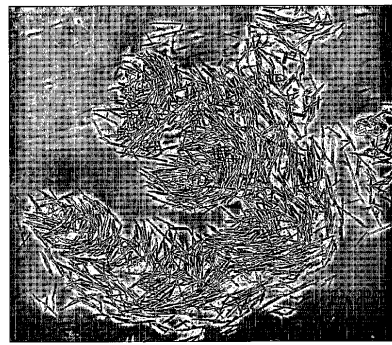


Figure 3

【図 2】

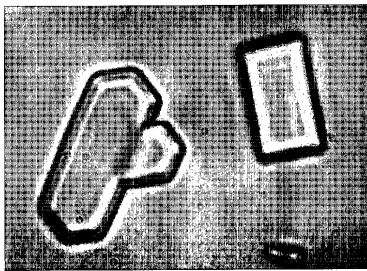


Figure 2

【図 4】

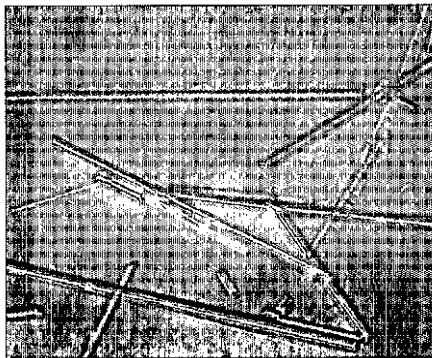


Figure 4

【図 5】

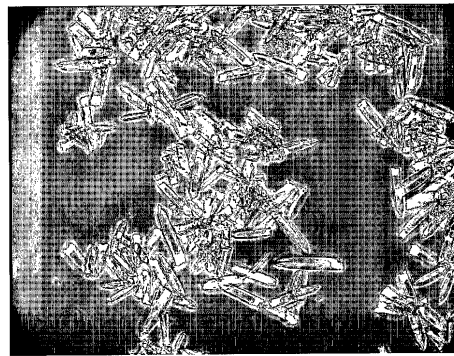


Figure 5

【図 6】

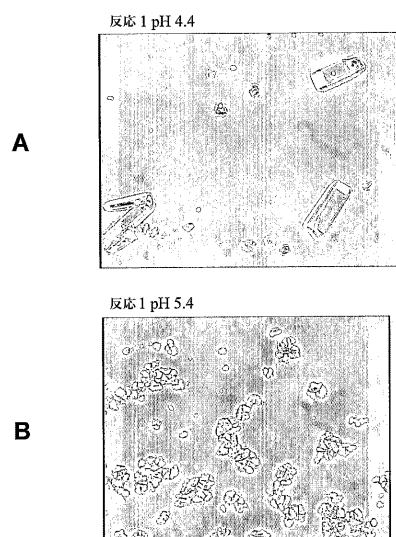


図 6

【図 7】

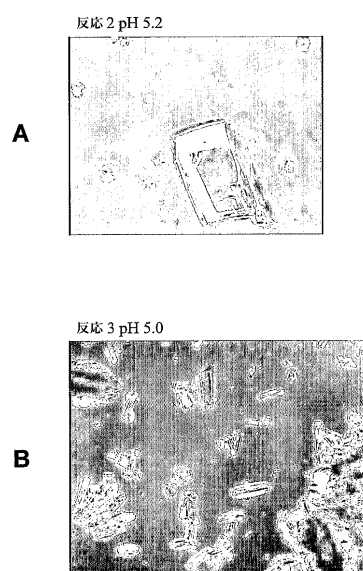


図 7

【図 8】

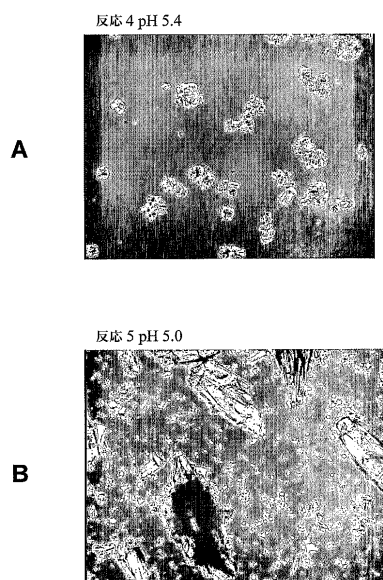


図 8

【図 9】

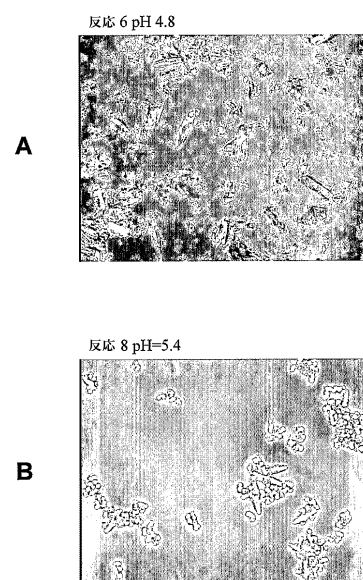


図 9

【図 1 0】

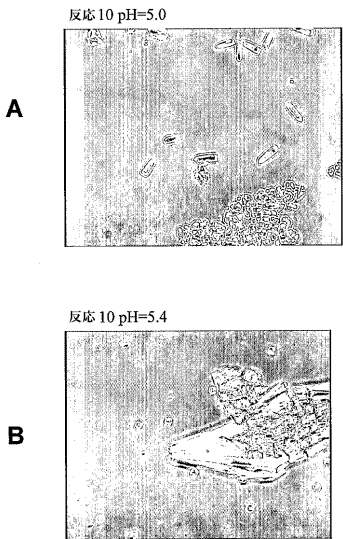


図 10

【図 1 1】

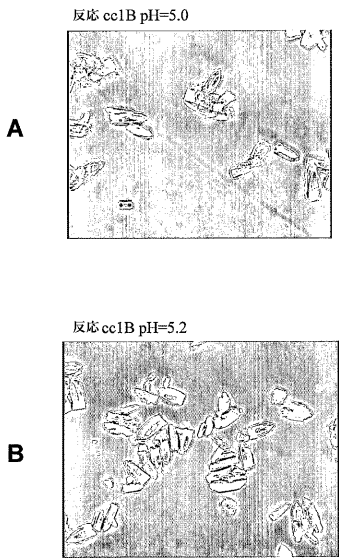


図 11

【図 1 2】

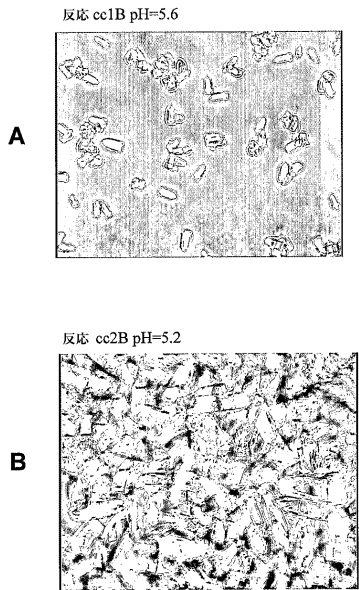


図 12

【図 1 3】

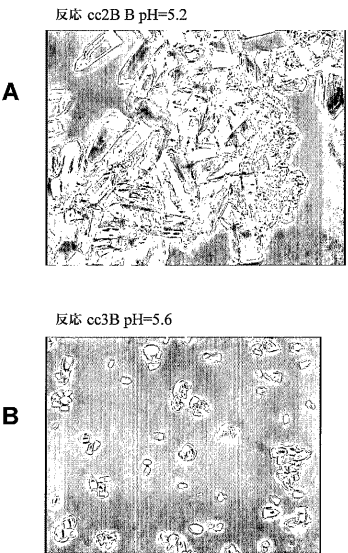


図 13

【図 14】

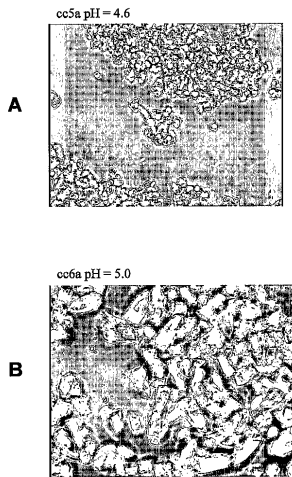


Figure 14

【図 15】

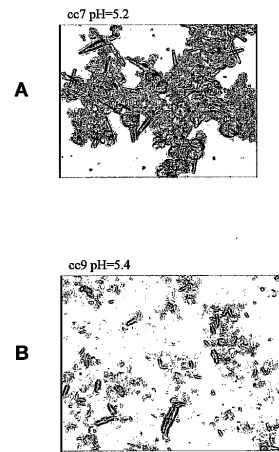


Figure 15

【図 16】

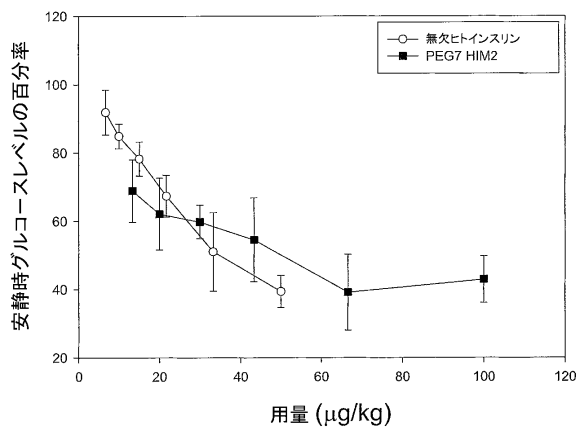


図 16

【図 17】

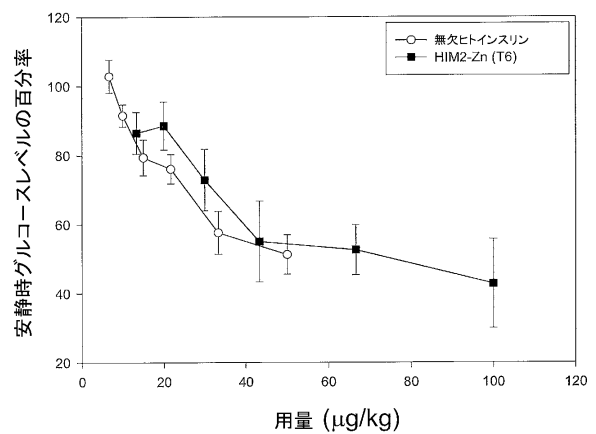


図 17

【図 18】

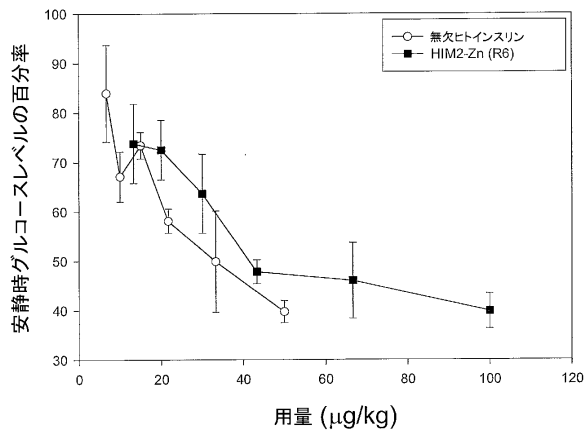


図 18

【図 19】

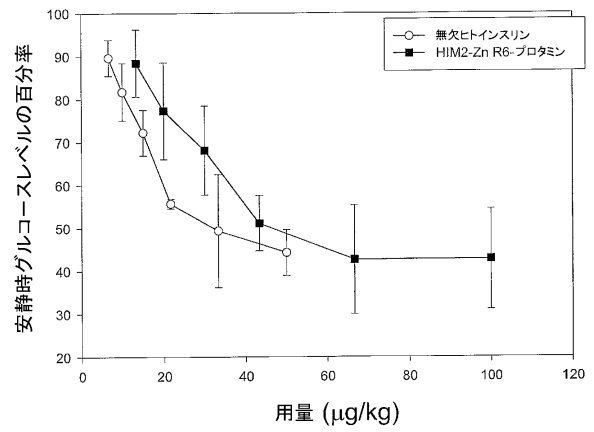


図 19

【図 20】

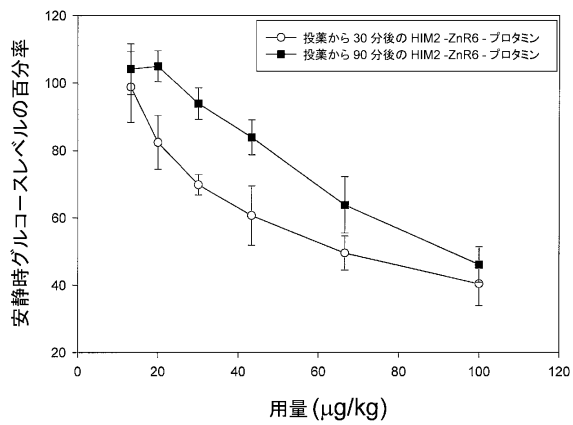


図 20

【図 21】

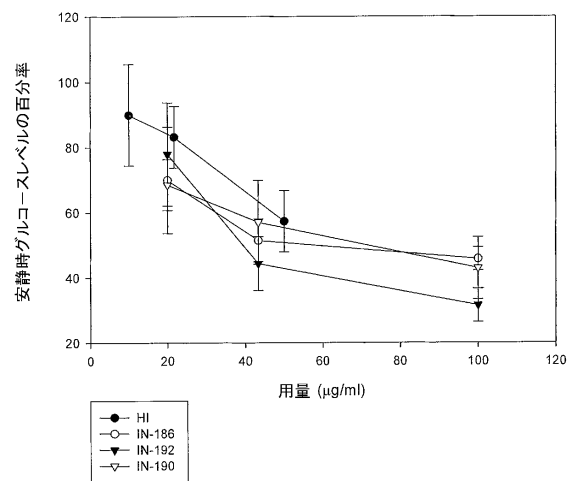


図 21

【図 2 2】

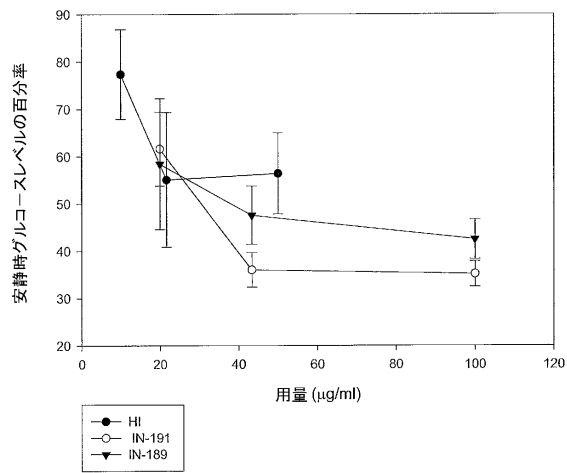


図 22

【図 2 3】

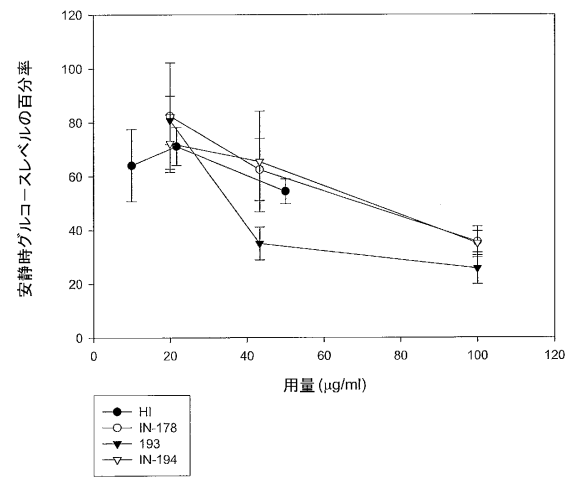


図 23

【図 2 4】

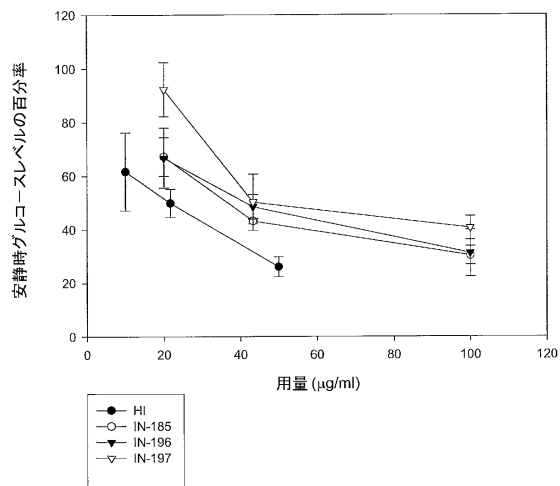


図 24

【図 2 5】

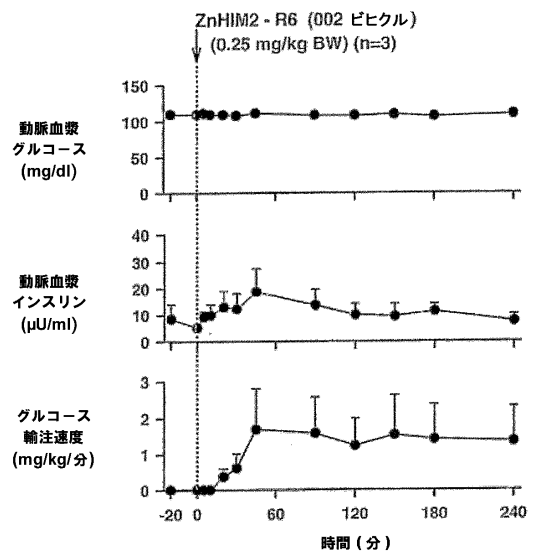


図 25

【図 26】

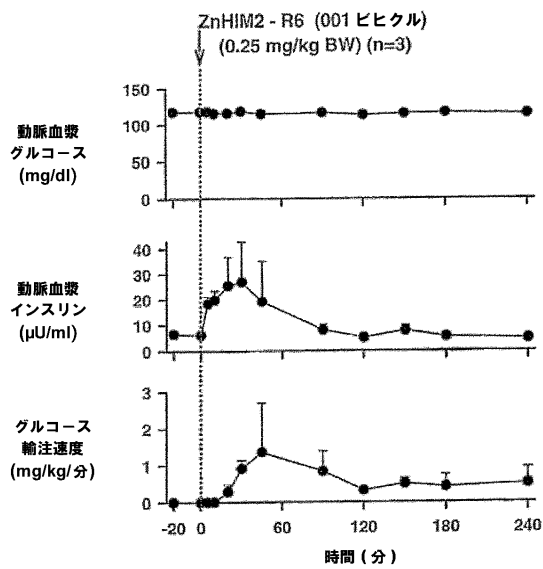


図 26

【図 27】

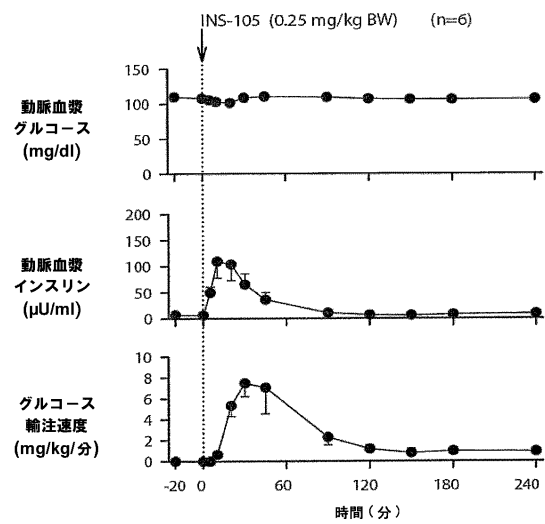


図 27

【図 28】

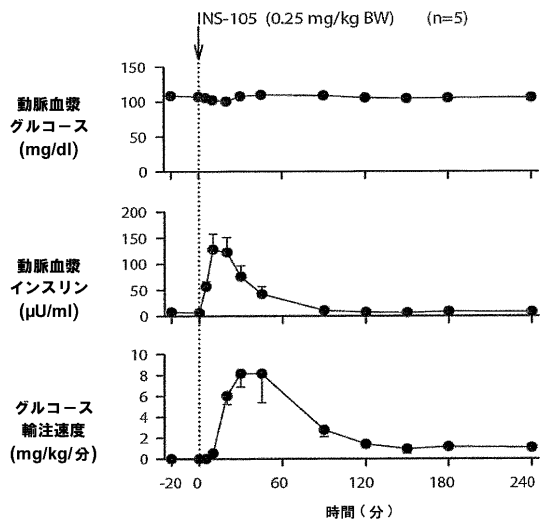


図 28

【図 29】

経口液体処方物 [820] 中の IN-105
処方物は 3.0% のカプリン酸塩を含有する
経口用量 0.25mg/kg
動脈血漿グルコース、グルコース輸注速度及び動脈血漿インスリン

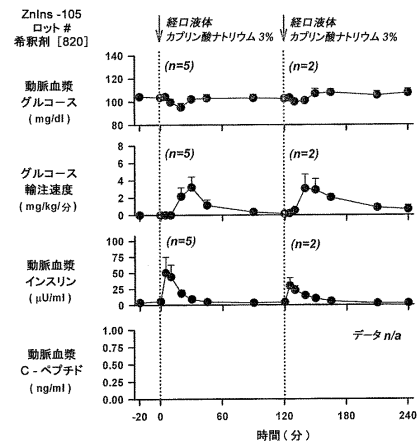


図 29

【図 30】

経口液体処方物 [820] 中の IN-105
処方物は 3.0% のカプリン酸塩を含有する
経口用量 0.25mg/kg
動脈血漿インスリン及びグルコース輸注速度についての曲線下面積

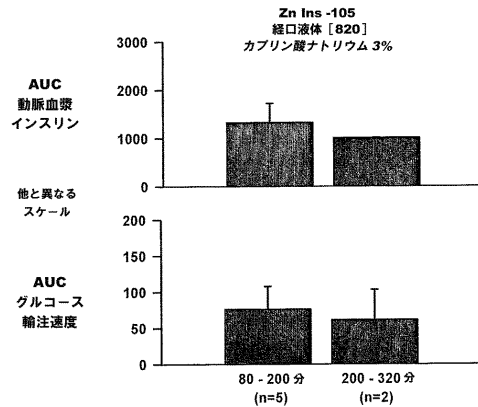


図 30

【図 31】

錠剤処方物 [856]
処方物は一錠あたり 143mg のカプリン酸塩と 140mg のラウリン酸塩を
含有する経口用量 0.25mg/kg
動脈血漿グルコース、グルコース輸注速度及び動脈血漿インスリン

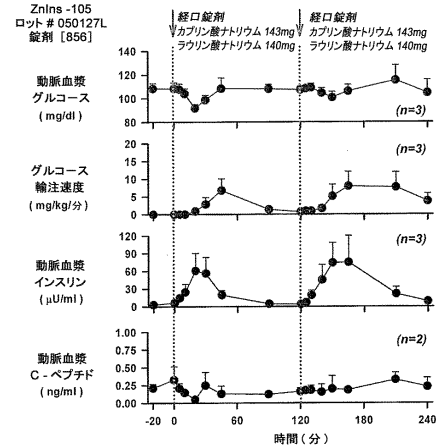


図 31

【図 32】

錠剤処方物 [856]
処方物は一錠あたり最高 140mg/140mg のカプリン酸塩とラウリン酸塩
を含有する経口用量 0.25mg/kg
動脈血漿インスリン及びグルコース輸注速度についての曲線下面積

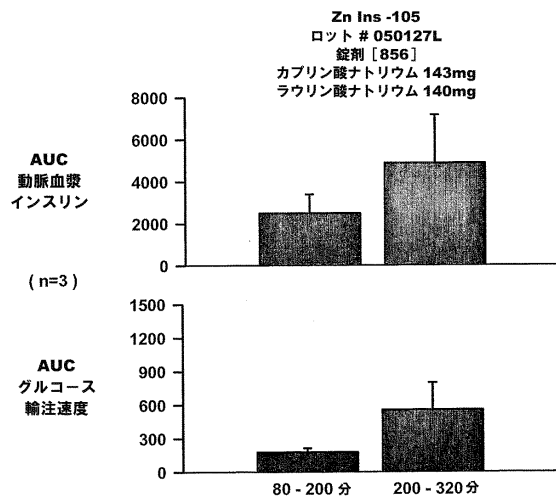


図 32

【図 33】

固体制剤 (錠剤) 処方物 [854]
処方物は一錠につき 58mg のカプリン酸塩及び 57mg のラウリン酸塩を含有する
経口用量 0.25mg/kg
動脈血漿グルコース、グルコース輸注速度、及び動脈血漿インスリン

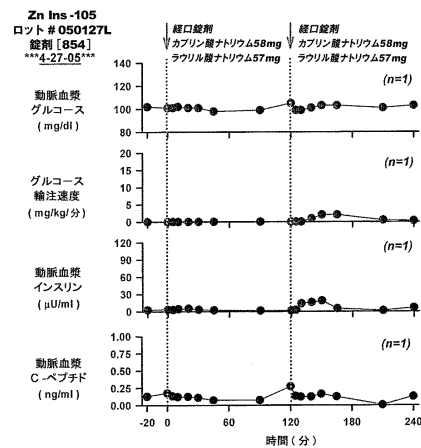


図 33

【図 3 4】

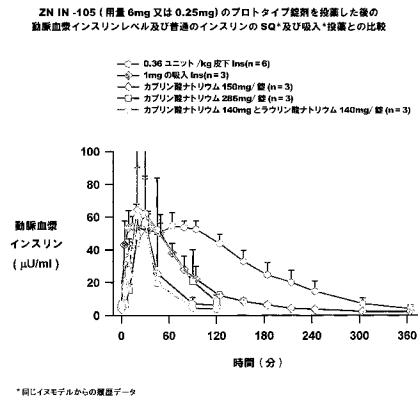


図 34

【図 3 5】

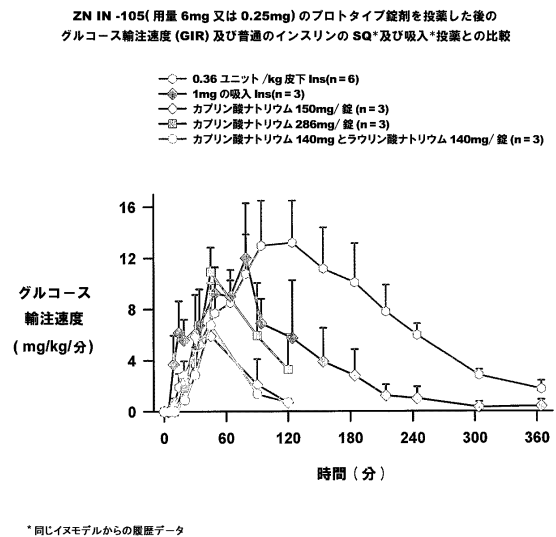


図 35

【図 3 6】

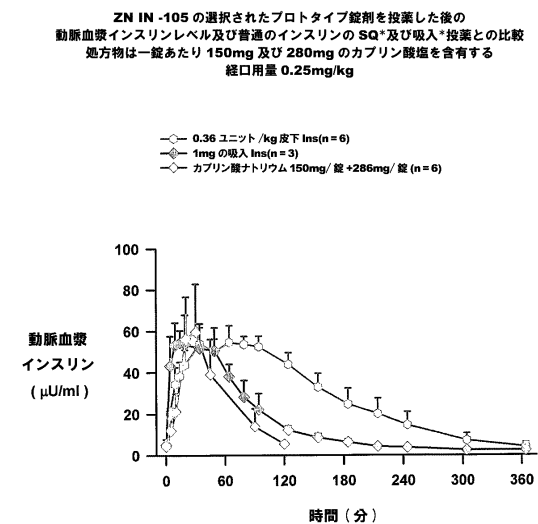


図 36

【図 3 7】

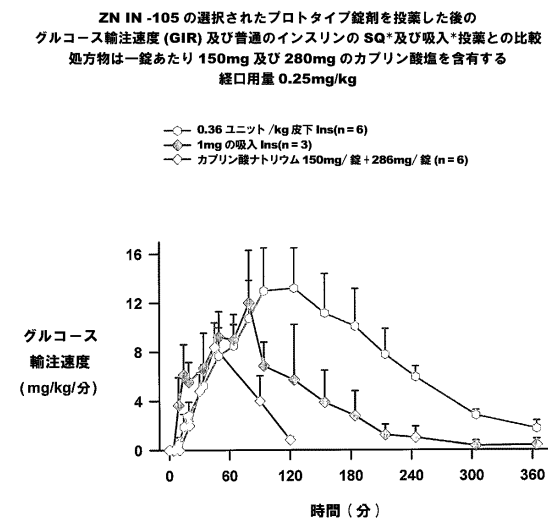


図 37

【図 38】

錠剤処方物[860]
処方物は一錠あたり 286mg のカプリン酸塩を含有する
経口用量 0.25mg/kg
動脈血漿グルコース、グルコース輸注速度、動脈血漿インスリン及び
動脈血漿 C-ペプチドレベル

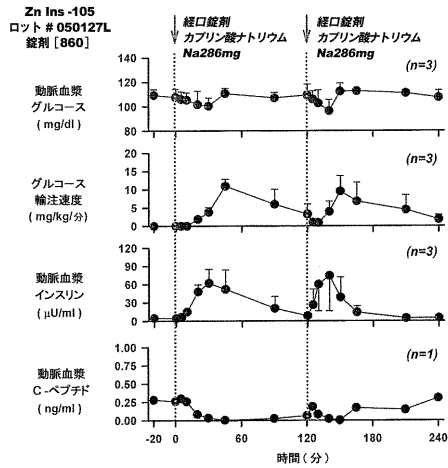


図 38

【図 39】

錠剤処方物 [860]
処方物は一錠あたり 286mg のカプリン酸塩を含有する
経口用量 0.25mg/kg
動脈血漿インスリン及びグルコース輸注速度についての曲線下面積

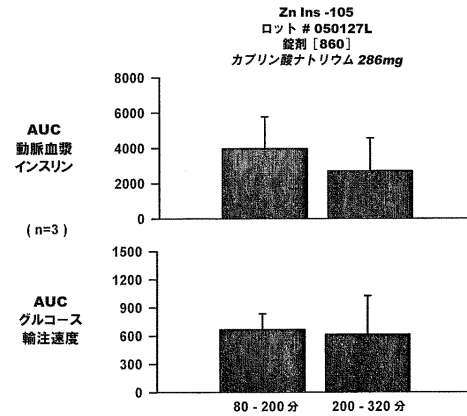


図 39

【図 40】

錠剤処方物 [862] / [859]
処方物は一錠あたり 150mg のカプリン酸塩を含有する
経口用量 0.25mg/kg
動脈血漿グルコース、グルコース輸注速度、動脈血漿インスリン及び
動脈血漿 C-ペプチドレベル

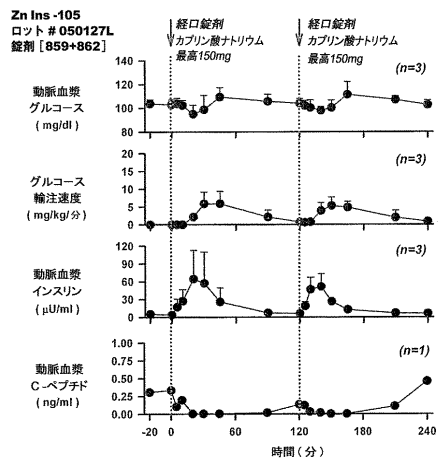


図 40

【図 41】

錠剤処方物 [862] 及び [859]
処方物は一錠あたり最高 150mg のカプリン酸塩を含有する
経口用量 0.25mg/kg
動脈血漿インスリン及びグルコース輸注速度についての曲線下面積

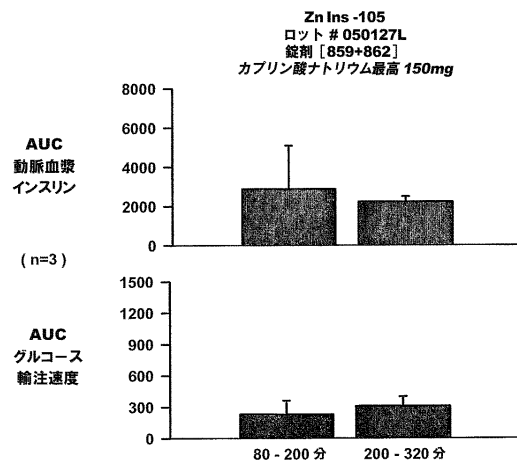


図 41

【図 4 2】

錠剤処方物 [856]
 処方物は一錠あたり最高 140mg/140mg のカプリン酸塩及びラウリン酸塩を含有する
 経口用量 0.25mg/kg
 動脈血漿インスリン及びグルコース輸注速度についての曲線下面積

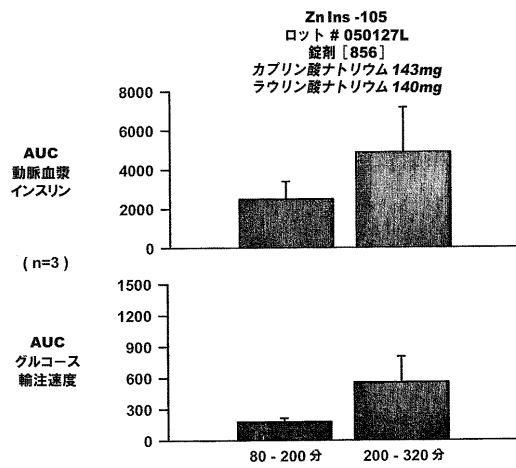


図 42

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	47/42	(2006.01)	A 6 1 K 47/42
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P 3/10
C 0 7 C	59/125	(2006.01)	C 0 7 C 59/125 E
C 0 7 C	69/96	(2006.01)	C 0 7 C 69/96 Z

(31)優先権主張番号 60/632,578
 (32)優先日 平成16年12月2日(2004.12.2)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/655,803
 (32)優先日 平成17年2月24日(2005.2.24)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/655,838
 (32)優先日 平成17年2月24日(2005.2.24)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 アガーウォル, ディティ
 アメリカ合衆国, ノースカロライナ州 2 7 6 1 4, ローリー, ストーンカッター コート 9 0 4
 (72)発明者 フェロ, ミシェル
 アメリカ合衆国, ノースカロライナ州 2 7 5 0 2, アペックス, サタ ローザ ドライブ 1 0 0 7
 (72)発明者 ケニース, ジェームス ディー.
 アメリカ合衆国, ノースカロライナ州 2 7 3 0 2, メバネ, ロング メドウ ドライブ 3 9 0 8
 (72)発明者 マルカー, ナブディープ, ビー.
 アメリカ合衆国, ノースカロライナ州 2 7 5 1 3, カリー, ベリック バレー レーン 8 3 1
 (72)発明者 ミラー, マーク, エー.
 アメリカ合衆国, ノースカロライナ州 2 7 6 0 6, ローリー, エーピーティー. 2 0 1, アベント リッジ ロード 1 8 2 0
 (72)発明者 パブリブ, レオ
 アメリカ合衆国, ノースカロライナ州 2 7 5 6 0, モリスビル, ウォルコット ウェイ 7 0 7
 (72)発明者 ポロウィ, カラン
 アメリカ合衆国, ノースカロライナ州 2 7 6 0 9, ローリー, メープル リッジ ロード 5 5 0 4
 (72)発明者 プスカシ, カラン
 アメリカ合衆国, ノースカロライナ州 2 7 8 8 2, スプリング ホープ, アンダーソン ロード 1 2 2 8 4
 (72)発明者 エクウィリベ, ノッチーリ, エヌ.
 アメリカ合衆国, ノースカロライナ州 2 7 5 1 1, カリー, コルツゲート ドライブ 2 1 6

審査官 名和 大輔

(56)参考文献 米国特許第0 5 5 0 4 1 8 8 (US, A)
 米国特許第0 5 5 3 4 4 8 8 (US, A)
 Adv.Drug Deliv.Rev.,1999,35(2-3),p.289-306

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/00-19/00
CAplus/BIOSIS/MEDLINE (STN)
WPI