(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0105979
(43) 공개일자 2016년09월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/28 (2006.01) *A61K 33/30* (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/28 (2013.01)
A61K 33/30 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7023293(분할)
(22) 출원일자(국제) 2011년05월09일
심사청구일자 2016년08월25일
(62) 원출원 특허 10-2012-7029547
원출원일자(국제) 2011년05월09일
심사청구일자 2015년01월21일
(85) 번역문제출일자 2016년08월25일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2011/057388
(87) 국제공개번호 WO 2011/141407
국제공개일자 2011년11월17일
(30) 우선권주장
10162368.4 2010년05월10일
유럽특허청(EPO)(EP)
61/333,497 2010년05월11일 미국(US)

(71) 출원인
노보 노르디스크 에이/에스
덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레
(72) 발명자
안드레슨 렌
덴마크 디케이-2760 말로브 미홀멘 53
한슨 로사 레베카 에리체
덴마크 디케이-2400 코벤하븐 흐비드킬데베제 41
제페슨 피
덴마크 디케이-2700 브론소제 바브네반겐 11
(74) 대리인
송봉식, 정삼영

전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **인슐린-아연 복합체의 제조 방법**

(57) 요 약

본 발명은 인슐린 유도체를 포함하는 약학적 제제의 제조 방법과 관련되고, 방법은 인슐린 유도체를 물에 용해시키는 단계, 용액의 pH를 7.2 이상의 pH로 조정하는 단계, 연속적으로 교반하는 동안 아연 용액을 첨가하는 단계, 및 pH를 제제의 목표 pH로 조정하는 단계를 포함한다.

(52) CPC특허분류
A61K 47/48 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

인슐린 유도체를 포함하는 약학적 제제의 제조 방법으로서, 방법은 인슐린 유도체를 물에 용해시키는 단계, 용액의 pH를 7.2 이상의 pH로 조정하는 단계, 연속적으로 교반하는 동안 아연 용액을 7분보다 긴 기간 동안 첨가하는 단계, 및 pH를 제제의 목표 pH로 조정하는 단계를 포함하고, 인슐린 유도체는 사람 인슐린 또는 그것의 유사체의 B쇄에 존재하는 Lys 잔기의 ε-아미노기에 부착된 측쇄를 갖고, 측쇄는 하기 일반식의 것인 인슐린 분자를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

-W-X-Y-Z

여기서 W는:

* 측쇄에 카르복시산기를 갖는 α-아미노산 잔기(여기서 잔기는 그것의 카르복시산기 중 하나와, 모인슐린의 B쇄에 존재하는 Lys 잔기의 ε-아미노기와 함께 아미드기를 형성한다);

* 아미드 카르보닐 결합을 통해 함께 연결된 2개, 3개 또는 4개의 α-아미노산 잔기로 구성된 쇄(이 쇄는 아미드 결합을 통해 모인슐린의 B쇄에 존재하는 Lys 잔기의 ε-아미노기에 연결되고, W의 아미노산 잔기는 W가 측쇄에 카르복시산기를 갖는 적어도 하나의 아미노산 잔기를 갖도록 중성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 및 측쇄에 카르복시산기를 갖는 아미노산 잔기의 군으로부터 선택된다); 또는

* X로부터 모인슐린의 B쇄에 존재하는 Lys 잔기의 ε-아미노기로의 공유결합이며;

X는:

* -CO-;

* -CH(COOH)CO-;

* -CO-N(CH_2COOH)CH_2CO-;

* -CO-N(CH_2COOH)$CH_2CON(CH_2COOH)CH_2CO$-;

* -CO-N(CH_2CH_2COOH)CH_2CH_2CO-;

* -CO-N(CH_2CH_2COOH)$CH_2CH_2CON(CH_2CH_2COOH)CH_2CH_2CO$-;

* -CO-NHCH(COOH)$(CH_2)_4NHCO$-;

* -CO-N(CH_2CH_2COOH)CH_2CO-; 또는

* -CO-N(CH_2COOH)CH_2CH_2CO- 이고, 이것은

a) W가 아미노산 잔기 또는 아미노산 잔기의 쇄일 때, 밑줄친 탄소로부터의 결합을 통해 W의 아미노기와 아미드 결합을 형성하거나, 또는

b) W가 공유 결합일 때, 밑줄친 카르보닐 탄소로부터의 결합을 통해 모인슐린의 B쇄에 존재하는 Lys 잔기의 ε-아미노기와 아미드 결합을 형성하며;

Y는:

* -$(CH_2)_m$-(여기서 m은 6 내지 32의 범위의 정수이다); 또는

* 1, 2 또는 3개의 -CH=CH-기 및 쇄에서 탄소 원자의 전체 수를 10 내지 32의 범위로 주기에 충분한 다수의 -CH_2-기를 포함하는 2가 탄화수소 쇄이며;

Z는:

* -COOH;

* -CO-Asp;

* -CO-Glu;

* -CO-Gly;

* -CO-Sar;

* $-CH(COOH)_2$;

* $-N(CH_2COOH)_2$;

* $-SO_3H$; 또는

* $-PO_3H$이다.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 물은 한가지 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 한가지 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제는 목표 pH가 조정된 후에 제제에 첨가되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 약학적으로 허용가능한 부형제는 페놀, m-크레솔, 글리세롤 및 염화나트륨으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 아연 용액의 가용성 인슐린 유도체에 대한 비율은 인슐린 유도체의 6개의 분자당 4.3개의 아연 원자 내지 인슐린 유도체의 6개의 분자당 12개의 아연 원자인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 목표 pH는 7.0 내지 7.8의 범위인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 아연 용액은 아세트산 아연을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 인슐린 유도체는 LysB29Nε-헥사데칸디오일-γ-Glu desB30 사람 인슐린인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 즉효 작용 인슐린이 제제에 추가로 첨가되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 즉효 작용 인슐린은 AspB28 사람 인슐린, LysB3 GluB29 사람 인슐린 및/또는 LysB28 ProB29 사람 인슐린으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항의 방법에 의해 얻어진 당뇨병 치료용 약학적 제제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 인슐린 및 아연을 포함하는 약학적 제제의 제조 방법, 이 방법에 의해 얻을 수 있는 약학적 제제, 및 당뇨병의 치료를 위한 제제의 사용에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인슐린은 췌장의 랑게르한스섬에서 생성되는 51개의 아미노산 펩티드 호르몬이다. 단량체로서 작용하는 이것의 주요 기능은 막관통 수용체에 결합하고 그것을 활성화함으로써 지방 및 근육 조직의 세포벽을 지나서 글루코스 분자의 수송을 용이하게 하는 것이다.

[0003] 인슐린의 제제는 보통 인슐린을 산성 조건 하에서 작은 부피의 물에 용해시킴으로써 제조된다. 그 다음 아연을 제제에 첨가하고, 이어서 중화시키고, 페놀 및 m-크레솔 같은 보존제를 첨가한다.

[0004] WO 2005/012347호는 음하전된 측쇄를 갖는 인슐린 유도체를 개시한다.

[0005] WO 2007/074133호는 아실화 인슐린 및 아실화 인슐린의 6개의 분자당 4개 이상의 아연 원자를 포함하는 가용성 약학적 제제를 개시한다.

[0006] 본 발명은 종래 기술의 문제들을 극복한다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 인슐린 유도체를 포함하는 약학적 제제의 제조 방법과 관련되고, 방법은 인슐린 유도체를 선택적으로 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 물에 용해시키고, 인슐린 유도체의 용액을 형성하는 단계, 용액의 pH를 7.2 이상의 pH로 조정하는 단계, 연속적으로 교반하는 동안 아연 용액을 첨가하는 단계, 및 pH를 제제의 목표 pH로 조정하는 단계를 포함하고, 인슐린 유도체는 모인슐린(parent insulin)의 B쇄에 존재하는 Lys 잔기의 ε-아미노기에 부착된 측쇄를 갖고, 측쇄는 하기 일반식의 것인 인슐린 분자를 포함한다:

[0008] -W-X-Y-Z.

[0009] 본 발명은 또한 이 방법에 의해 얻을 수 있는 제품 및 이 방법에 의해 얻을 수 있는 제품의 사용과 관련된다.

[0010] **정의**

[0011] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "약학적 제제"는 버퍼, 보존제 및 장성 조절제와 같은 약학적 부형제와 함께 활성 화합물 또는 그것의 염을 포함하는 제품을 의미하고, 상기 약학적 제제는 사람에게 상기 약학적 제제의 투여에 의해 질환 또는 장애의 심각성을 치료, 예방 또는 감소시키기에 유용하다. 따라서 약학적 제제는 또한 약학적 조성물로서 본 분야에 잘 알려져 있다.

[0012] "제제의 목표 pH"는 최종 약학적 제제에서 원하는 pH 값인 pH를 의미한다.

[0013] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "약학적으로 허용가능한"은 정상적인 약학적 적용에 적합한, 즉 환자 등에게 부작용을 일으키지 않는 것을 의미한다.

[0014] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "인슐린 유도체"는 화학적으로 변형된 모인슐린 또는 그것의 유사체를 의미하고, 여기서 변형(들)은 아미드, 탄수화물, 알킬기, 아실기, 에스테르, 페길화(PEGylation), 등의 부착의 형태이다. 한 예는 LysB29Nε-헥사데칸디오일-γ-Glu desB30 사람 인슐린이다.

[0015] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "사람 인슐린"은 구조 및 성질이 잘 알려진 사람 인슐린 호르몬을 의미한다. 사람 인슐린은 A-쇄 및 B-쇄라는 2개의 폴리펩티드 쇄를 갖는다. A-쇄는 21개의 아미노산 펩티드이고, B-쇄는 30개의 아미노산 펩티드이며, 두 쇄는 A-쇄의 7 위치에서의 시스테인 및 B-쇄의 7 위치에서의 시스테인 사이의 제 1 다리, 그리고 A-쇄의 20 위치에서의 시스테인 및 B-쇄의 19 위치에서의 시스테인 사이의 제 2 다리의 이황화 다리에 의해 연결된다. 제 3 다리는 A-쇄의 6 및 11 위치의 시스테인들 사이에 존재한다.

[0016] 인체에서, 호르몬은 구조, 프리펩티드-B-Arg Arg-C-Lys Arg-A에서 24개의 아미노산의 프리펩티드와 이어서 86개

의 아미노산을 함유하는 프로인슐린으로 구성된 단일-쇄 전구체 프로인슐린(프리프로인슐린)으로서 합성되고, 여기서 C는 31개의 아미노산의 연결 펩티드이다. Arg-Arg 및 Lys-Arg는 A 및 B쇄로부터 연결 펩티드의 절단을 위한 절단 부위이다.

[0017] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "인슐린 펩티드"는 인슐린 활성을 갖는 사람 인슐린 또는 유사체 또는 그것의 유도체 중 하나인 펩티드를 의미한다.

[0018] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "모인슐린"은 아미노산 서열의 어떤 변형이 거기에 적용되기 전의 인슐린을 의미한다고 의도된다.

[0019] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "인슐린 유사체"는 인슐린의 하나 이상의 아미노산 잔기가 다른 아미노산 잔기에 의해 치환되고, 및/또는 하나 이상의 아미노산 잔기가 인슐린으로부터 삭제되고, 및/또는 하나 이상의 아미노산 잔기가 인슐린에 부가되고, 및/또는 삽입되는 변형된 인슐린을 의미한다.

[0020] 한 구체예에서, 인슐린 유사체는 모인슐린에 대해 8개 미만의 변형(치환, 삭제, 부가(삽입 포함) 및 그것의 어떤 조합), 대안으로 모인슐린에 대해 7개 미만의 변형, 대안으로 모인슐린에 대해 6개 미만의 변형, 대안으로 모인슐린에 대해 5개 미만의 변형, 대안으로 모인슐린에 대해 4개 미만의 변형, 대안으로 모인슐린에 대해 3개 미만의 변형, 대안으로 모인슐린에 대해 2개 미만의 변형을 포함한다. 인슐린 유사체의 한 예는 AspB28 사람 인슐린이다.

[0021] 인슐린 분자에서의 변형은 쇄(A 또는 B), 위치, 및 본래의 아미노산 잔기를 치환하는 아미노산 잔기에 대한 1개 또는 3개 글자의 코드를 언급하여 표시된다.

[0022] "desB30" 또는 "B(1-29)"는 B30 아미노산을 결핍하는 천연 인슐린 B쇄 또는 그것의 유사체를 의미하고, "A(1-21)"은 천연 인슐린 A 쇄를 의미한다. 따라서, 예를 들어, A21Gly, B28Asp, desB30 사람 인슐린은 A 쇄에서 21 위치에서 아미노산이 글리신으로 치환되고, B쇄에서 28 위치에서 아미노산이 아스파르트산으로 치환되고, B쇄에서 30 위치에서 아미노산이 삭제된 사람 인슐린의 유사체이다.

[0023] 본원에서 "A1", "A2" 및 "A3" 등 같은 용어는 인슐린의 A 쇄에서 각각 1, 2 및 3 등의 위치 아미노산을 나타낸다(N-말단 단부로부터 셈). 마찬가지로, B1, B2 및 B3 등 같은 용어는 인슐린의 B쇄에서 각각 1, 2 및 3 등의 위치의 아미노산을 나타낸다(N-말단 단부로부터 셈). 아미노산에 대한 한 글자 코드를 사용하는, A21A, A21G 및 A21Q 같은 용어는 A21 위치에서의 아미노산이 각각 A, G 및 Q인 것을 지칭한다. 아미노산에 대한 3개 글자 코드를 사용하면, 대응하는 표현은 각각 A21Ala, A21Gly 및 A21Gln이다.

[0024] 본원에서 용어 "A(0)" 또는 "B(0)"은 각각 A1 또는 B1의 N-말단 방향의 아미노산의 위치를 나타낸다. 용어 A(-1) 또는 B(-1)은 각각 A(0) 또는 B(0)의 N-말단 방향으로 첫 번째 아미노산의 위치를 나타낸다. 따라서 A(-2) 및 B(-2)는 각각 A(-1) 및 B(-1)의 N-말단 방향의 아미노산의 위치를 나타내고, A(-3) 및 B(-3) 등은 각각 A(-2) 및 B(-2)의 N-말단 방향의 아미노산의 위치 등을 나타낸다.

[0025] 본원에서 용어 A(0) 또는 B(0)은 각각 A1 또는 B1의 N-말단 방향의 아미노산의 위치를 나타낸다. 용어 A(-1) 또는 B(-1)은 각각 A(0) 또는 B(0)의 N-말단 방향으로 첫 번째 아미노산의 위치를 나타낸다. 따라서 A(-2) 및 B(-2)는 각각 A(-1) 및 B(-1)의 N-말단 방향의 아미노산의 위치를 나타내고, A(-3) 및 B(-3) 등은 각각 A(-2) 및 B(-2)의 N-말단 방향의 아미노산의 위치 등을 나타낸다. 용어 A22 또는 B31은 각각 A21 또는 B30의 C-말단 방향의 아미노산의 위치를 나타낸다. 용어 A23 또는 B32는 각각 A22 또는 B31의 C-말단 방향으로 첫 번째 아미노산의 위치를 나타낸다. 따라서 A24 및 B33 등은 각각 A23 및 B32의 C-말단 방향의 아미노산의 위치를 나타낸다.

[0026] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "비둔화형"은 하나의 제제로 제제화된 경우, 즉효 작용 인슐린과 아실화 인슐린 모두, 즉효 인슐린과 아실화 인슐린을 분리된 제제로 투여할 때의 작용 프로파일과 동일한 또는 실질적으로 동일한 작용 프로파일을 갖는다는 것을 의미한다.

[0027] 본원에서, 용어 "아미노산 잔기"는 정식으로 히드록시기가 카르복실기로부터 제거된, 및/또는 정식으로 수소 원자가 아미노기로부터 제거된 아미노산이다.

[0028] hGlu는 호모글루탐산이다.

[0029] α-Asp는 $HNCH(CO)CH_2COOH$의 L-형태이다.

[0030] β-Asp는 $HNCH(COOH)CH_2CO-$의 L-형태이다.

[0031] α-Glu는 $HNCH(CO)CH_2CH_2COOH$의 L-형태이다.

[0032] γ-Glu는 $HNCH(COOH)CH_2CH_2CO-$의 L-형태이다.

[0033] α-hGlu는 $HNCH(CO)CH_2CH_2CH_2COOH$의 L-형태이다.

[0034] δ-hGlu는 $HNCH(COOH)CH_2CH_2CH_2CO-$의 L-형태이다.

[0035] β-Ala는 $NH-CH_2-CH_2-COOH$이다.

[0036] Sar는 사르코신(N-메틸글리신)이다.

[0037] 표현 "측쇄에서 카르복시산기를 갖는 아미노산 잔기"는 Asp, Glu 및 hGlu 같은 아미노산 잔기를 지명한다. 아미노산은 L- 또는 D-구조일 수 있다. 아무것도 명시되지 않으면, 아미노산 잔기는 L 구조인 것으로 이해된다.

[0038] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "질환의 치료"는 질환, 상태 또는 장애가 발생했던 환자의 관리 및 보살핌을 의미한다. 치료의 목적은 질환, 상태 또는 장애와 싸우는 것이다. 치료는 활성 화합물의 투여를 포함하여, 질환, 상태 또는 장애와 관련된 증상 또는 합병증을 완화시킬 뿐만 아니라, 질환, 상태 또는 장애를 없애거나 조절한다.

[0039] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "볼러스(bolus) 인슐린", "식사-관련 인슐린" 또는 "즉효 작용 인슐린"은 작용의 즉각적인 개시를 갖고, 식사 동안 및 후에 인슐린의 필요량을 포함하기에 적합한 인슐린 펩티드를 의미한다.

[0040] 용어 "당뇨병" 또는 "진성 당뇨병"은 타입 1 당뇨병, 타입 2 당뇨병, 임신성 당뇨병(임신 중에) 및 과혈당증을 야기하는 다른 상태를 포함한다. 용어는 췌장이 불충분한 양의 인슐린을 생성하거나, 또는 체세포가 인슐린에 적당하게 반응하지 못하여, 따라서 세포가 글루코스를 흡수하는 것을 방해하는 대사 장애에 사용된다. 그 결과, 글루코스는 혈액 중에 쌓인다.

[0041] 인슐린-의존 진성당뇨병(IDDM) 및 연소자 발증형 당뇨병으로도 불리는, 타입 1 당뇨병은 B-세포 파괴에 의해 야기되어, 보통 절대 인슐린 결핍을 이끈다.

[0042] 비인슐린-의존 진성당뇨병(NIDDM) 및 성인기 발증형 당뇨병으로도 알려진, 타입 2 당뇨병은 지배적인 인슐린 저항성, 따라서 관련 인슐린 결핍 및/또는 인슐린 저항성이 있는 지배적 인슐린 분비 결함과 관련된다.

[0043] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "버퍼"는 화학 반응으로 인해 달리 야기되거나 시간이 지남에 따라 변하는 조성물의 pH의 경향을 감소시키는 약학적 조성물의 화학 화합물을 의미한다. 버퍼는 인산나트륨, TRIS, 글리실글리신, 아세트산나트륨 및 시트르산나트륨과 같은 화학 물질을 포함한다.

[0044] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "보존제"는 약학적 제제에 첨가하여 미생물 활성(성장 및 대사)을 방지하거나 지연시키는 화학 화합물을 의미한다. 약학적으로 허용가능한 보존제의 예는 페놀, 메타크레솔(m-크레솔)과 페놀 및 m-크레솔의 혼합물이다.

[0045] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "등장제"는 삼투압이 사람 혈장의 그것에 가깝게 되도록 약학적 제제의 삼투압을 변형시키는 역할을 하는 약학적 제제로의 화학 화합물을 의미한다. 등장제는 염화나트륨, 글리세롤, 만니톨, 프로필렌 글리콜 등을 포함한다.

[0046] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "안정제"는 펩티드를 안정화하기 위해, 즉 보관 수명 및/또는 이러한 제제의 사용 시간을 증가시키기 위해 펩티드 함유 약학적 제제에 첨가하는 화학 물질을 의미한다. 약학적 제제에 사용되는 안정제의 예는 L-글리신, L-히스티딘, 아르기닌, 폴리에틸렌 글리콜, 및 카르복시메틸셀룰로스이다. 추가 페놀, 아연 이온 및 염화나트륨은 안정제로서 작용할 수 있다.

[0047] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "계면활성제"는 계면으로부터 인슐린, 인슐린 유사체 및 인슐린 유도체를 치환하거나 부분적으로 치환하는 방법에서 계면을 공기 및 소수성 표면으로 변형시키는 역할을 하는 약학적 제제의 화학 화합물을 의미한다. 다양한 종래의 계면활성제, 예를 들어 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르 및 알콜, 그리고 폴리옥시에틸렌 소르비톨 지방산 에스테르가 사용될 수 있다. 예는 폴리소르베이트 20이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 본 발명은 인슐린 유도체를 포함하는 약학적 제제의 제조 방법과 관련되고, 방법은 인슐린 유도체를 선택적으로

약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 물에 용해시키고, 인슐린 유도체의 용액을 형성하는 단계, 용액의 pH를 7.2 이상의 pH로 조정하는 단계, 연속적으로 교반하는 동안 아연 용액을 첨가하는 단계, 및 pH를 제제의 목표 pH로 조정하는 단계를 포함하고, 인슐린 유도체는 모인슐린의 B쇄에 존재하는 Lys 잔기의 ε-아미노기에 부착된 측쇄를 갖고, 측쇄는 하기 일반식의 것인 인슐린 분자를 포함한다:

[0049] -W-X-Y-Z

[0050] 여기서 W는:

[0051] * 측쇄에 카르복시산기를 갖는 α-아미노산 잔기(여기서 잔기는 그것의 카르복시산기 중 하나와, 모인슐린의 B쇄에 존재하는 Lys 잔기의 ε-아미노기와 함께 아미드기를 형성한다);

[0052] * 아미드 카르보닐 결합을 통해 함께 연결된 2개, 3개 또는 4개의 α-아미노산 잔기로 구성된 쇄(이 쇄는 아미드 결합을 통해 모인슐린의 B쇄에 존재하는 Lys 잔기의 ε-아미노기에 연결되고, W의 아미노산 잔기는 W가 측쇄에 카르복시산기를 갖는 적어도 하나의 아미노산 잔기를 갖도록 중성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 및 측쇄에 카르복시산기를 갖는 아미노산 잔기의 군으로부터 선택된다); 또는

[0053] * X로부터 모인슐린의 B쇄에 존재하는 Lys 잔기의 ε-아미노기로의 공유결합이며;

[0054] X는:

[0055] * -CO-;

[0056] * -CH(COOH)CO-;

[0057] * -CO-N(CH_2COOH)CH_2CO-;

[0058] * -CO-N(CH_2COOH)$CH_2CON(CH_2COOH)CH_2$CO-;

[0059] * -CO-N(CH_2CH_2COOH)CH_2CH_2CO-;

[0060] * -CO-N(CH_2CH_2COOH)$CH_2CH_2CON(CH_2CH_2COOH)CH_2CH_2$CO-;

[0061] * -CO-NHCH(COOH)$(CH_2)_4NH$CO-;

[0062] * -CO-N(CH_2CH_2COOH)CH_2CO-; 또는

[0063] * -CO-N(CH_2COOH)CH_2CH_2CO- 이고, 이것은

[0064] W가 아미노산 잔기 또는 아미노산 잔기의 쇄일 때, 밑줄친 탄소로부터의 결합을 통해 W의 아미노기와 아미드 결합을 형성하거나, 또는

[0065] W가 공유 결합일 때, 밑줄친 카르보닐 탄소로부터의 결합을 통해 모인슐린의 B쇄에 존재하는 Lys 잔기의 ε-아미노기와 아미드 결합을 형성하며;

[0066] Y는:

[0067] * -$(CH_2)_m$-(여기서 m은 6 내지 32의 범위의 정수이다); 또는

[0068] * 1, 2 또는 3개의 -CH=CH-기 및 쇄에서 탄소 원자의 전체 수를 10 내지 32의 범위로 주기에 충분한 다수의 -CH_2-기를 포함하는 2가 탄화수소 쇄이며;

[0069] Z는:

[0070] * -COOH;

[0071] * -CO-Asp;

[0072] * -CO-Glu;

[0073] * -CO-Gly;

[0074] * -CO-Sar;

[0075] * $-CH(COOH)_2$;

[0076] * $-N(CH_2COOH)_2$;

[0077] * $-SO_3H$; 또는

[0078] * $-PO_3H$ 및

[0079] 그것의 어떤 Zn^{2+}복합체이고, W가 공유 결합이고 X가 -CO-일 때면, Z는 -COOH가 아니다.

[0080] 본 발명자들은 놀랍게도, 인슐린 유도체를 포함하는 용액의 pH를 7.2 이상의 pH 값으로 높임으로써, 아연 용액이 첨가될 때, 실질적으로 인슐린 유도체의 침전이 없을 것이고, 이것은 침전물이 형성되지 않거나 침전물이 형성되면, 즉시 다시 가용화되는 것을 의미한다는 것을 발견하였다.

[0081] 용액에서의 인슐린 유도체의 침전은 용액의 육안 검사에 의해 관찰될 수 있다. 인슐린 유도체가 용액에서 침전하는 경우, 침전물은 용액을 맑지 않게 한다. 용액이 맑고 투명할 때, 침전 또는 실질적으로 인슐린 유도체의 침전은 존재하지 않는다.

[0082] 본 발명의 한 양태에서 인슐린 유도체가 용해되는 물은, 인슐린 유도체가 물에 용해될 때, 한가지 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함한다. 다양한 약학적으로 허용가능한 부형제, 예를 들어 페놀, m-크레솔, 글리세롤, 염화나트륨 및 선택적으로 TRIS 또는 포스페이트 버퍼는 물에 첨가되어 부형제의 수용액을 얻을 수 있고, 인슐린 유도체는 수용액에 용해된다.

[0083] 본 발명의 한 양태에서, 한가지 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제는 용액의 pH가 목표 pH로 조정되기 전에 인슐린 유도체의 수용액에 첨가된다. 본 발명의 한 양태에서, 약학적으로 허용가능한 부형제는 목표 pH가 조정된 후에 제제에 첨가된다.

[0084] 한 양태에서 약학적으로 허용가능한 부형제는 페놀, m-크레솔, 글리세롤 및 염화나트륨으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0085] 본 발명의 한 양태에서 목표 pH는 수용액의 pH 아래이고, 그곳에 아연 용액이 첨가된다. 본 발명의 한 양태에서 수용액의 pH는 아연 용액이 첨가될 때 7.4 이상으로 조절된다. 본 발명의 한 양태에서 수용액의 pH는 아연 용액이 첨가될 때 7.6 이상으로 조절된다. 본 발명의 한 양태에서 수용액의 pH는 아연 용액이 첨가될 때 7.8 이상으로 조절된다. 본 발명의 한 양태에서 수용액의 pH는 아연 용액이 첨가될 때 8.0 이상으로 조절된다.

[0086] 본 발명의 한 양태에서, 목표 pH는 7.0 내지 7.8의 범위이다. 한 양태에서, 목표 pH는 7.2 내지 7.8의 범위이다. 한 양태에서, 목표 pH는 7.4 내지 7.6의 범위이다.

[0087] 수용액의 pH가 7.4 이상으로 조절되는 본 발명의 한 양태에서, 인슐린 용액이 첨가되고, 그 다음 pH가 7.0-7.8의 범위의 목표 pH로 조절된다.

[0088] 수용액의 pH가 7.6 이상으로 조절되는 본 발명의 한 양태에서, 인슐린 용액이 첨가되고, 그 다음 pH가 7.0-7.8의 범위의 목표 pH로 조절된다.

[0089] 수용액의 pH가 7.8 이상으로 조절되는 본 발명의 한 양태에서, 인슐린 용액이 첨가되고, 그 다음 pH가 7.0-7.8의 범위의 목표 pH로 조절된다.

[0090] 수용액의 pH가 8.0 이상으로 조절되는 본 발명의 한 양태에서, 인슐린 용액이 첨가되고, 그 다음 pH가 7.0-7.8의 범위의 목표 pH로 조절된다.

[0091] 수용액의 pH가 7.2 이상으로 조절되는 본 발명의 한 양태에서, 인슐린 용액이 첨가되고, 그 다음 pH가 7.2-7.8의 범위의 목표 pH로 조절된다.

[0092] 수용액의 pH가 7.4 이상으로 조절되는 본 발명의 한 양태에서, 인슐린 용액이 첨가되고, 그 다음 pH가 7.2-7.8의 범위의 목표 pH로 조절된다.

[0093] 수용액의 pH가 7.6 이상으로 조절되는 본 발명의 한 양태에서, 인슐린 용액이 첨가되고, 그 다음 pH가 7.2-7.8의 범위의 목표 pH로 조절된다.

[0094] 수용액의 pH가 7.8 이상으로 조절되는 본 발명의 한 양태에서, 인슐린 용액이 첨가되고, 그 다음 pH가 7.2-

7.8의 범위의 목표 pH로 조절된다.

[0095] 수용액의 pH가 8.0 이상으로 조절되는 본 발명의 한 양태에서, 인슐린 용액이 첨가되고, 그 다음 pH가 7.2-7.8의 범위의 목표 pH로 조절된다.

[0096] 수용액의 pH가 7.2 이상으로 조절되는 본 발명의 한 양태에서, 인슐린 용액이 첨가되고, 그 다음 pH가 7.4-7.6의 범위의 목표 pH로 조절된다.

[0097] 수용액의 pH가 7.4 이상으로 조절되는 본 발명의 한 양태에서, 인슐린 용액이 첨가되고, 그 다음 pH가 7.4-7.6의 범위의 목표 pH로 조절된다.

[0098] 수용액의 pH가 7.6 이상으로 조절되는 본 발명의 한 양태에서, 인슐린 용액이 첨가되고, 그 다음 pH가 7.4-7.6의 범위의 목표 pH로 조절된다.

[0099] 수용액의 pH가 7.8 이상으로 조절되는 본 발명의 한 양태에서, 인슐린 용액이 첨가되고, 그 다음 pH가 7.4-7.6의 범위의 목표 pH로 조절된다.

[0100] 수용액의 pH가 8.0 이상으로 조절되는 본 발명의 한 양태에서, 인슐린 용액이 첨가되고, 그 다음 pH가 7.4-7.6의 범위의 목표 pH로 조절된다.

[0101] 다양한 산 및 염기는 수용액에서의 pH 조정을 위해 또는 목표 pH에 도달하기 위해 사용될 수 있다. 적합한 산의 예는 염산, 아세트산, 황산 및 인산이다. 적합한 염기의 예는 수산화나트륨, TRIS, 카보네이트 및 포스페이트이다. 한 구체예에서, TRIS, 카보네이트 및 포스페이트는 또한 버퍼로서 작용한다.

[0102] 본 발명의 한 양태에서 아연 용액은 1분보다 긴 기간 동안 수용액에 첨가된다. 본 발명의 한 양태에서 기간은 2분보다 길다. 본 발명의 한 양태에서 기간은 3분보다 길다. 본 발명의 한 양태에서 기간은 4분보다 길다. 본 발명의 한 양태에서 기간은 5분보다 길다. 본 발명의 한 양태에서 기간은 6분보다 길다. 본 발명의 한 양태에서 기간은 7분보다 길다.

[0103] 본 발명의 한 양태에서 아연 용액은 아세트산 아연을 포함한다. 한 양태에서, 아연 용액은 아세트산 아연, 염화 아연, 황산염 아연 및 글루콘산 아연으로 구성된 군으로부터 선택된다. 본 발명의 한 양태에서 아연 용액은 아세트산 아연이다.

[0104] 본 발명의 한 양태에서 아연 용액 및 가용성 인슐린 유도체의 비율은 인슐린 유도체의 6개의 분자당 4.3개의 아연 원자 내지 인슐린 유도체의 6개의 분자당 12개의 아연 원자이다. 본 발명의 한 양태에서 비율은 인슐린 유도체의 6개의 분자당 4.5 내지 12개의 아연 원자이다.

[0105] 본 발명의 한 양태에서 비율은 인슐린 유도체의 6개의 분자당 4.7 내지 12개의 아연 원자이다. 본 발명의 한 양태에서 비율은 인슐린 유도체의 6개의 분자당 4.9 내지 12개의 아연 원자이다. 본 발명의 한 양태에서 비율은 인슐린 유도체의 6개의 분자당 5.1 내지 12개의 아연 원자이다. 본 발명의 한 양태에서 비율은 인슐린 유도체의 6개의 분자당 5.3 내지 12개의 아연 원자이다. 본 발명의 한 양태에서 비율은 인슐린 유도체의 6개의 분자당 5.5 내지 12개의 아연 원자이다. 본 발명의 한 양태에서 비율은 인슐린 유도체의 6개의 분자당 5.7 내지 12개의 아연 원자이다. 본 발명의 한 양태에서 비율은 인슐린 유도체의 6개의 분자당 5.9 내지 11.5개의 아연 원자이다. 본 발명의 한 양태에서 비율은 인슐린 유도체의 6개의 분자당 6.1 내지 11.0개의 아연 원자이다. 본 발명의 한 양태에서 비율은 인슐린 유도체의 6개의 분자당 6.3 내지 10.5개의 아연 원자이다. 본 발명의 한 양태에서 비율은 인슐린 유도체의 6개의 분자당 6.5 내지 10.0개의 아연 원자이다.

[0106] 본 발명의 한 양태에서 인슐린 유도체는 LysB29Nε-헥사데칸디오일-γ-Glu desB30 사람 인슐린이다.

[0107] 본 발명의 한 양태에서 즉효 작용 인슐린이 제제에 첨가된다. 즉효 작용 인슐린은 AspB28 사람 인슐린, LysB3 GluB29 사람 인슐린 및/또는 LysB28 ProB29 사람 인슐린으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 본 발명의 한 양태에서 즉효 작용 인슐린은 AspB28 사람 인슐린(Insulin Aspart)이다.

[0108] 본 발명은 인슐린 유도체를 포함하는 약학적 제제의 제조 방법에 의해 얻을 수 있는 제품과 관련된다. 본 발명의 방법에 의해 얻을 수 있는 제품은 인슐린 아스파르트와 같은 즉효 작용 인슐린을 포함할 수 있고, 둔화가 일어나지 않는다.

[0109] 본 발명의 한 양태에서 당뇨병의 치료를 위해 인슐린 유도체를 포함하는 약학적 제제의 제조 방법에 의해 얻을 수 있는 제품의 사용이 제공된다.

[0110] 본 발명의 추가 양태에서 제제는, 페놀, o-크레솔, m-크레솔, p-크레솔, 메틸 p-히드록시벤조에이트, 프로필 p-히드록시벤조에이트, 2-페녹시에탄올, 부틸 p-히드록시벤조에이트, 2-페닐에탄올, 벤질 알콜, 클로로부탄올, 및 티오메로잘, 브로노폴, 벤조산, 이미두레아, 클로로헥시딘, 나트륨 데히드로아세테이트, 클로로크레솔, 에틸 p-히드록시벤조에이트, 벤즈에토늄 클로라이드, 클로르페네신(3p-클로르페녹시프로판-1,2-디올) 또는 그것의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택될 수 있는 약학적으로 허용가능한 보존제를 더 포함한다. 본 발명의 추가 양태에서 보존제는 0.1 mg/ml 내지 20 mg/ml의 농도로 존재한다. 본 발명의 추가 양태에서 보존제는 0.1 mg/ml 내지 5 mg/ml의 농도로 존재한다. 본 발명의 추가 양태에서 보존제는 5 mg/ml 내지 10 mg/ml의 농도로 존재한다. 본 발명의 추가 양태에서 보존제는 10 mg/ml 내지 20 mg/ml의 농도로 존재한다. 이들 특정 보존제의 각각의 하나는 본 발명의 선택적 양태를 구성한다. 약학적 조성물에서의 보존제의 사용은 당업자에게 잘 알려져 있다. 편의상 참고문헌은 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19th edition, 1995이다.

[0111] 본 발명의 추가 양태에서 제제는, 염(예를 들어 염화나트륨), 당 또는 당 알콜, 아미노산(예를 들어 글리신, L-히스티딘, 아르기닌, 리신, 이소류신, 아스파르트산, 트립토판, 트레오닌), 알디톨(예를 들어 글리세롤(글리세린), 1,2-프로판디올(프로필렌글리콜), 1,3-프로판디올, 1,3-부탄디올) 폴리에틸렌글리콜(예를 들어 PEG400), 또는 그것의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택될 수 있는 등장제를 더 포함한다. 예를 들어 프룩토스, 글루코스, 만노스, 소르보스, 자일로스, 말토스, 락토스, 수크로스, 트레할로스, 덱스트란, 풀룰란, 덱스트린, 시클로덱스트린, 가용성 녹말, 히드록시에틸 녹말 및 카르복시메틸셀룰로스-Na를 포함하는, 단당류, 이당류, 또는 다당류와 같은 어떤 당, 또는 수용성 글루칸이 사용될 수 있다. 한 양태에서 당 첨가제는 수크로스이다. 당 알콜은 적어도 하나의 -OH기를 갖는 C4-C8 탄화수소로서 정의되고, 예를 들어, 만니톨, 소르비톨, 이노시톨, 갈락티톨, 둘시톨, 자일리톨, 및 아라비톨을 포함한다. 한 양태에서 당 알콜 첨가제는 만니톨이다. 상기 언급한 당 또는 당 알콜은 개별적으로 또는 조합으로 사용될 수 있다. 당 또는 당 알콜이 액체 제제에서 가용성이고, 본 발명 방법을 사용하여 달성되는 안정화 효과에 불리하게 영향을 주지 않는 한, 사용된 양에 고정된 제한은 없다. 한 양태에서, 당 또는 당 알콜 농도는 약 1 mg/ml 내지 약 150 mg/ml이다. 본 발명의 추가 양태에서 등장제는 1 mg/ml 내지 50 mg/ml의 농도로 존재한다. 본 발명의 추가 양태에서 등장제는 1 mg/ml 내지 7 mg/ml의 농도로 존재한다. 본 발명의 추가 양태에서 등장제는 8 mg/ml 내지 24 mg/ml의 농도로 존재한다. 본 발명의 추가 양태에서 등장제는 25 mg/ml 내지 50 mg/ml의 농도로 존재한다. 이들 특정 등장제의 각각의 하나는 본 발명의 선택적 양태를 구성한다. 약학적 조성물에서의 등장제의 사용은 당업자에게 잘 알려져 있다. 편의상 참고문헌은 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19th edition, 1995이다.

[0112] 전형적인 등장제는 염화나트륨, 만니톨, 디메틸 술폰 및 글리세롤이고, 전형적인 보존제는 페놀, m-크레솔, 메틸 p-히드록시벤조에이트 및 벤질 알콜이다.

[0113] 적합한 버퍼의 예는 아세트산나트륨, 글리실글리신, HEPES(4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진에탄술폰산) 및 인산나트륨이다.

[0114] 본 발명의 제제는 인슐린에 민감한 상태의 치료에서 사용될 수 있다. 따라서, 그것은 타입 1 당뇨병, 타입 2 당뇨병 및 예를 들어 심각하게 부상당한 사람 및 대수술을 겪은 사람에게 때때로 보여지는 과혈당증의 치료에 사용될 수 있다. 어떤 환자의 최적 투여 수준은 사용되는 특정 인슐린 유도체의 효능, 나이, 체중, 신체 활동, 및 환자의 규정식을 포함하는 다양한 인자, 다른 약물과의 가능한 조합, 및 치료된 상태의 심각성에 의존할 것이다. 본 발명 제제의 매일 투여량은 알려진 인슐린 제제에서와 유사한 방식으로 당업자에 의해 각각 개별 환자를 위해 결정된다는 것이 권해진다.

[0115] 적당한 경우, 본 발명의 인슐린 유도체는 인슐린의 다른 타입, 예를 들어 더 즉효 작용의 시작이 있는 인슐린 유사체와의 혼합물에서 사용될 수 있다. 이러한 인슐린 유사체의 예는, 예를 들어 공보 EP 214826호(Novo Nordisk A/S), EP 375437호(Novo Nordisk A/S) 및 EP 383472호(Eli Lilly & Co.)를 갖는 유럽특허 출원에 기재된다.

[0116] 본 발명은 하기의 실시예에 의해 더 설명되지만, 보호 범위를 제한하는 것으로 해석되지 않는다.

[0117] 본 발명은 하기 단락으로 요약될 것이다:

[0118] 1. 인슐린 유도체를 포함하는 약학적 제제의 제조 방법으로서, 방법은 인슐린 유도체를 물에 용해시키는 단계, 용액의 pH를 7.2 이상의 pH로 조정하는 단계, 연속적으로 교반하는 동안 아연 용액을 첨가하는 단계 및 pH를 제제의 목표 pH로 조정하는 단계를 포함한다.

[0119] 2. 제 1 단락에 따른 방법으로서, 물은 한가지 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함한다.

[0120] 3. 제 1 단락에 따른 방법으로서, 한가지 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제는 목표 pH가 조정된 후에 제제에 첨가된다.

[0121] 4. 제 1 내지 제 3 단락에 따른 방법으로서, 약학적으로 허용가능한 부형제는 페놀, m-크레솔, 글리세롤 및 염화나트륨으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0122] 5. 제 1 내지 제 4 단락에 따른 방법으로서, 목표 pH는 물의 pH 아래이다.

[0123] 6. 제 1 내지 제 5 단락에 따른 방법으로서, 수용액의 pH는 아연 용액이 첨가될 때 7.4 이상으로 조정된다.

[0124] 7. 제 1 내지 제 6 단락에 따른 방법으로서, 수용액의 pH는 아연 용액이 첨가될 때 7.6 이상으로 조정된다.

[0125] 8. 제 1 내지 제 7 단락에 따른 방법으로서, 수용액의 pH는 아연 용액이 첨가될 때 7.8 이상으로 조정된다.

[0126] 9. 제 1 내지 제 8 단락에 따른 방법으로서, 수용액의 pH는 아연 용액이 첨가될 때 8.0 이상으로 조정된다.

[0127] 10. 제 1 내지 제 9 단락에 따른 방법으로서, 아연 용액은 1분보다 긴 기간 동안 첨가된다.

[0128] 11. 제 1 내지 제 10 단락에 따른 방법으로서, 기간은 2분보다 길거나, 3분보다 길거나, 4분보다 길거나, 5분보다 길거나, 6분보다 길거나, 또는 7분보다 길다.

[0129] 12. 제 1 내지 제 11 단락에 따른 방법으로서, 목표 pH는 7.0 내지 7.8의 범위이다.

[0130] 13. 제 1 내지 제 12 단락에 따른 방법으로서, 목표 pH는 7.2 내지 7.8의 범위이다.

[0131] 14. 제 1 내지 제 13 단락에 따른 방법으로서, 목표 pH는 7.4 내지 7.6의 범위이다.

[0132] 15. 제 1 내지 제 14 단락에 따른 방법으로서, 아연 용액은 아세트산 아연을 포함한다.

[0133] 16. 제 1 내지 제 15 단락에 따른 방법으로서, 아연 용액 및 가용성 인슐린 유도체의 비율은 인슐린 유도체의 6개의 분자당 4.3개의 아연 원자 내지 인슐린 유도체의 6개의 분자당 12개의 아연 원자, 인슐린 유도체의 6개의 분자당 4.5개 내지 12개의 아연 원자, 인슐린 유도체의 6개의 분자당 4.7개 내지 12개의 아연 원자, 인슐린 유도체의 6개의 분자당 4.9개 내지 12개의 아연 원자, 인슐린 유도체의 6개의 분자당 5.1개 내지 12개의 아연 원자, 인슐린 유도체의 6개의 분자당 5.3개 내지 12개의 아연 원자, 인슐린 유도체의 6개의 분자당 5.5개 내지 12개의 아연 원자, 인슐린 유도체의 6개의 분자당 5.7개 내지 12개의 아연 원자, 인슐린 유도체의 6개의 분자당 5.9개 내지 11.5개의 아연 원자, 인슐린 유도체의 6개의 분자당 6.1개 내지 11.0개의 아연 원자, 인슐린 유도체의 6개의 분자당 6.3개 내지 10.5개의 아연 원자, 또는 인슐린 유도체의 6개의 분자당 6.5개 내지 10.0개의 아연 원자이다.

[0134] 17. 제 1 내지 제 16 단락에 따른 방법으로서, 인슐린 유도체는 사람 인슐린 또는 그것의 유사체의 B쇄에 존재하는 Lys 잔기의 ε-아미노기에 부착된 측쇄를 갖고, 측쇄는 하기 일반식의 것인 인슐린 분자를 포함한다:

[0135] -W-X-Y-Z

[0136] 여기서 W는:

[0137] * 측쇄에 카르복시산기를 갖는 α-아미노산 잔기(잔기는 그것의 카르복시산기 중 하나와, 모인슐린의 B쇄에 존재하는 Lys 잔기의 ε-아미노기와 함께 아미드기를 형성한다);

[0138] * 아미드 카르보닐 결합을 통해 함께 연결된 2개, 3개 또는 4개의 α-아미노산 잔기로 구성된 쇄(이 쇄는 아미드 결합을 통해 모인슐린의 B쇄에 존재하는 Lys 잔기의 ε-아미노기에 연결되고, W의 아미노산 잔기는 중성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기, 및 W가 측쇄에 카르복시산기를 갖는 적어도 하나의 아미노산 잔기를 갖도록 측쇄에 카르복시산기를 갖는 아미노산 잔기의 군으로부터 선택된다); 또는

[0139] * X로부터 모인슐린의 B쇄에 존재하는 Lys 잔기의 ε-아미노기로의 공유결합이며;

[0140] X는:

[0141] * -CO-;

[0142] * -CH(COOH)CO-;

[0143] * -CO-N(CH_2COOH)CH_2CO-;

[0144] * -CO-N(CH_2COOH)$CH_2CON(CH_2COOH)CH_2$CO-;

[0145] * -CO-N(CH_2CH_2COOH)CH_2CH_2CO-;

[0146] * -CO-N(CH_2CH_2COOH)$CH_2CH_2CON(CH_2CH_2COOH)CH_2CH_2$CO-;

[0147] * -CO-NHCH(COOH)$(CH_2)_4$NHCO-;

[0148] * -CO-N(CH_2CH_2COOH)CH_2CO-; 또는

[0149] * -CO-N(CH_2COOH)CH_2CH_2CO- 이고, 이것은

[0150] a) W가 아미노산 잔기 또는 아미노산 잔기의 쇄일 때, 밑줄친 탄소로부터의 결합을 통해 W의 아미노기와 아미드 결합을 형성하거나, 또는

[0151] b) W가 공유 결합일 때, 밑줄친 카르보닐 탄소로부터의 결합을 통해 모인슐린의 B쇄에 존재하는 Lys 잔기의 ε-아미노기와 아미드 결합을 형성하며;

[0152] Y는:

[0153] * -$(CH_2)_m$-(여기서 m은 6 내지 32의 범위의 정수이다); 또는

[0154] * 1, 2 또는 3개의 -CH=CH-기 및 쇄에서 탄소 원자의 전체 수를 10 내지 32의 범위로 주기에 충분한 다수의 -CH_2-기를 포함하는 2가 탄화수소 쇄이며;

[0155] Z는:

[0156] * -COOH;

[0157] * -CO-Asp;

[0158] * -CO-Glu;

[0159] * -CO-Gly;

[0160] * -CO-Sar;

[0161] * -$CH(COOH)_2$;

[0162] * -$N(CH_2COOH)_2$;

[0163] * -SO_3H; 또는

[0164] * -PO_3H 및

[0165] 그것의 어떤 Zn^{2+}복합체이고, W가 공유 결합이고 X가 -CO-일 때면, Z는 -COOH가 아니다.

[0166] 18. 제 17 단락에 따른 방법으로서, W는 α-Asp, β-Asp, α-Glu, ɣ-Glu, α-hGlu 및 δ-hGlu로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0167] 19. 제 17 단락에 따른 방법으로서, W는 α-Asp-Gly; Gly-α-Asp; β-Asp-Gly; Gly-β-Asp; α-Glu-Gly; Gly-α-Glu; ɣ-Glu-Gly; Gly-ɣ-Glu; α-hGlu-Gly; Gly-α-hGlu; δ-hGlu-Gly; 및 Gly-δ-hGlu, α-Asp-α-Asp; α-Asp-α-Glu; α-Asp-α-hGlu; α-Asp-β-Asp; α-Asp-ɣ-Glu; α-Asp-δ-hGlu; β-Asp-α-Asp; β-Asp-α-Glu; β-Asp-α-hGlu; β-Asp-β-Asp; β-Asp-ɣ-Glu; β-Asp-δ-hGlu; α-Glu-α-Asp; α-Glu-α-Glu; α-Glu-α-hGlu; α-Glu-β-Asp; α-Glu-ɣ-Glu; α-Glu-δ-hGlu; ɣ-Glu-α-Asp; ɣ-Glu-α-Glu; ɣ-Glu-α-hGlu; ɣ-Glu-β-Asp; ɣ-Glu-ɣ-Glu; ɣ-Glu-δ-hGlu; α-hGlu-α-Asp; α-hGlu-α-Glu; α-hGlu-α-hGlu; α-hGlu-β-Asp; α-hGlu-ɣ-Glu; α-hGlu-δ-hGlu; δ-hGlu-α-Asp; δ-hGlu-α-Glu; δ-hGlu-α-hGlu; δ-hGlu-β-Asp; δ-hGlu-ɣ-Glu; 및 δ-hGlu-δ-hGlu로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0168] 20. 제 17 내지 제 19 단락에 따른 방법으로서, X는 -CO- 또는 -CH(COOH)CO-이다.

[0169] 21. 제 17 내지 제 20 단락에 따른 방법으로서, Y는 $-(CH_2)_m-$이고, 여기서 m은 6 내지 32, 8 내지 20, 12 내지 20, 또는 12 내지 16의 범위의 정수이다.

[0170] 22. 제 17 내지 제 21 단락에 따른 방법으로서, Z는 -COOH이다.

[0171] 23. 제 17, 제 18, 제 20, 제 21 및 제 22 단락에 따른 방법으로서, 인슐린 유도체는 LysB29Nε-헥사데칸디오일-γ-Glu desB30 사람 인슐린이다.

[0172] 24. 제 1 내지 제 23 단락에 따른 방법으로서, 즉효 작용 인슐린이 제제에 첨가된다.

[0173] 25. 제 1 내지 제 24 단락에 따른 방법으로서, 즉효 작용 인슐린은 AspB28 사람 인슐린, LysB3 GluB29 사람 인슐린 및/또는 LysB28 ProB29 사람 인슐린으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0174] 26. 제 25 단락에 따른 방법으로서, 즉효 작용 인슐린은 AspB28 사람 인슐린이다.

[0175] 27. 제 1 내지 제 26 단락에 따른 방법에 의해 얻을 수 있는 제품.

[0176] 28. 당뇨병의 치료를 위해 제 1 내지 제 27 단락에 따른 방법에 의해 얻을 수 있는 제품의 사용.

[0177] 한 양태에서 본 발명은 하기 단락으로 요약된다:

[0178] 1) 인슐린 유도체를 포함하는 약학적 제제의 제조 방법으로서, 방법은 인슐린 유도체를 물에 용해시키는 단계, 용액의 pH를 7.2 이상의 pH로 조정하는 단계, 연속적으로 교반하는 동안 아연 용액을 첨가하는 단계 및 pH를 제제의 목표 pH로 조정하는 단계를 포함한다.

[0179] 2) 제 1 단락에 따른 방법으로서, 물은 한가지 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함한다.

[0180] 3) 제 1 단락에 따른 방법으로서, 한가지 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제는 목표 pH가 조정된 후에 제제에 첨가된다.

[0181] 4) 제 1 내지 제 3 단락에 따른 방법으로서, 약학적으로 허용가능한 부형제는 페놀, m-크레솔, 글리세롤 및 염화나트륨으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0182] 5) 제 1 내지 제 4 단락에 따른 방법으로서, 목표 pH는 물의 pH 아래이다.

[0183] 6) 제 1 내지 제 5 단락에 따른 방법으로서, 수용액의 pH는 아연 용액이 첨가될 때 7.4 이상으로 조정된다.

[0184] 7) 제 1 내지 제 6 단락에 따른 방법으로서, 수용액의 pH는 아연 용액이 첨가될 때 7.6 이상으로 조정된다.

[0185] 8) 제 1 내지 제 7 단락에 따른 방법으로서, 수용액의 pH는 아연 용액이 첨가될 때 7.8 이상으로 조정된다.

[0186] 9) 제 1 내지 제 8 단락에 따른 방법으로서, 수용액의 pH는 아연 용액이 첨가될 때 8.0 이상으로 조정된다.

[0187] 10) 제 1 내지 제 9 단락에 따른 방법으로서, 아연 용액은 1분보다 긴 기간 동안 첨가된다.

[0188] 11) 제 1 내지 제 10 단락에 따른 방법으로서, 기간은 2분보다 길거나, 3분보다 길거나, 4분보다 길거나, 5분보다 길거나, 6분보다 길거나, 또는 7분보다 길다.

[0189] 12) 제 1 내지 제 11 단락에 따른 방법으로서, 목표 pH는 7.0 내지 7.8의 범위이다.

[0190] 13) 제 1 내지 제 12 단락에 따른 방법으로서, 목표 pH는 7.2 내지 7.8의 범위이다.

[0191] 14) 제 1 내지 제 13 단락에 따른 방법으로서, 목표 pH는 7.4 내지 7.6의 범위이다.

[0192] 15) 제 1 내지 제 14 단락에 따른 방법으로서, 아연 용액은 아세트산 아연을 포함한다.

[0193] 16) 제 1 내지 제 15 단락에 따른 방법으로서, 아연 용액 및 가용성 인슐린 유도체 사이의 비율은 인슐린 유도체의 6개의 분자당 4.3개의 아연 원자 내지 인슐린 유도체의 6개의 분자당 12개의 아연 원자이다.

[0194] 17) 제 1 내지 제 16 단락에 따른 방법으로서, 인슐린 유도체는 사람 인슐린 또는 그것의 유사체의 B쇄에 존재하는 Lys 잔기의 ε-아미노기에 부착된 측쇄를 갖고, 측쇄는 하기 일반식의 것인 인슐린 분자를 포함한다:

[0195] -W-X-Y-Z

[0196] 여기서 W는:

[0197] * 측쇄에 카르복시산기를 갖는 α-아미노산 잔기(여기서 잔기는 그것의 카르복시산기 중 하나와, 모인슐린의 B쇄에 존재하는 Lys 잔기의 ε-아미노기와 함께 아미드기를 형성한다);

[0198] * 아미드 카르보닐 결합을 통해 함께 연결된 2개, 3개 또는 4개의 α-아미노산 잔기로 구성된 쇄(이 쇄는 아미드 결합을 통해 모인슐린의 B쇄에 존재하는 Lys 잔기의 ε-아미노기에 연결되고, W의 아미노산 잔기는 중성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기, 및 W가 측쇄에 카르복시산기를 갖는 적어도 하나의 아미노산 잔기를 갖도록 측쇄에 카르복시산기를 갖는 아미노산 잔기의 군으로부터 선택된다); 또는

[0199] * X로부터 모인슐린의 B쇄에 존재하는 Lys 잔기의 ε-아미노기로의 공유결합이며;

[0200] X는:

[0201] * -CO-;

[0202] * -CH(COOH)CO-;

[0203] * -CO-N(CH_2COOH)CH_2CO-;

[0204] * -CO-N(CH_2COOH)$CH_2CON(CH_2COOH)CH_2$CO-;

[0205] * -CO-N(CH_2CH_2COOH)CH_2CH_2CO-;

[0206] * -CO-N(CH_2CH_2COOH)$CH_2CH_2CON(CH_2CH_2COOH)CH_2CH_2$CO-;

[0207] * -CO-NHCH(COOH)$(CH_2)_4$NHCO-;

[0208] * -CO-N(CH_2CH_2COOH)CH_2CO-; 또는

[0209] * -CO-N(CH_2COOH)CH_2CH_2CO- 이고, 이것은

[0210] a) W가 아미노산 잔기 또는 아미노산 잔기의 쇄일 때, 밑줄친 탄소로부터의 결합을 통해 W의 아미노기와 아미드 결합을 형성하거나, 또는

[0211] b) W가 공유 결합일 때, 밑줄친 카르보닐 탄소로부터의 결합을 통해 모인슐린의 B쇄에 존재하는 Lys 잔기의 ε-아미노기와 아미드 결합을 형성하며;

[0212] Y는:

[0213] * -$(CH_2)_m$-(여기서 m은 6 내지 32의 범위의 정수이다); 또는

[0214] * 1, 2 또는 3개의 -CH=CH-기 및 쇄에서 탄소 원자의 전체 수를 10 내지 32의 범위로 주기에 충분한 다수의 $-CH_2-$기를 포함하는 2가 탄화수소 쇄이며;

[0215] Z는:

[0216] * -COOH;

[0217] * -CO-Asp;

[0218] * -CO-Glu;

[0219] * -CO-Gly;

[0220] * -CO-Sar;

[0221] * $-CH(COOH)_2$;

[0222] * $-N(CH_2COOH)_2$;

[0223] * $-SO_3H$; 또는

[0224] * $-PO_3H$ 및

[0225] 그것의 어떤 Zn^{2+}복합체이고, W가 공유 결합이고 X가 -CO-일 때면, Z는 -COOH가 아니다.

[0226] 18) 제 17 단락에 따른 방법으로서, 인슐린 유도체는 LysB29Nε-헥사데칸디오일-γ-Glu desB30 사람 인슐린이다.

[0227] 19) 제 1 내지 제 18 단락에 따른 방법으로서, 즉효 작용 인슐린이 제제에 첨가된다.

[0228] 20) 제 1 내지 제 19 단락에 따른 방법으로서, 즉효 작용 인슐린은 AspB28 사람 인슐린, LysB3 GluB29 사람 인슐린 및/또는 LysB28 ProB29 사람 인슐린으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0229] 21) 제 1 내지 제 20 단락에 따른 방법에 의해 얻을 수 있는 제품.

[0230] 22) 당뇨병의 치료를 위해 제 1 내지 제 20 단락에 따른 방법에 의해 얻을 수 있는 제품의 사용.

[0231] 이로써 본원에 인용된 공보, 특허출원, 및 특허를 포함하는 모든 참고문헌은, 각 참고문헌이 개별적으로 그리고 구체적으로 참고에 의해 포함된다고 나타낸 것처럼, 그것들의 전체를 참고로 그리고 동일한 정도로 포함되고, 본원에 그것의 전체로(법에 의해 허용된 최대의 정도로) 제시된다.

[0232] 모든 주제 및 부제는 단지 편의를 위해 본원에 사용되고, 어떤 방법으로든 본 발명을 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0233] 본원에 제공된 어떤 및 모든 예제, 또는 예시적인 언어(예를 들어, "와 같은")의 사용은 단지 본 발명을 더 분명히 하는 것으로 의도되고, 청구되지 않는 한, 본 발명의 범위에 제한을 나타내지 않는다. 명세서의 언어는 본 발명의 실시에 본질적인 어떤 미청구된 요소를 나타낸다고 해석되어서는 안 된다.

[0234] 본원에 특허 문서의 인용 및 포함은 단지 편의를 위해 수행되고, 이러한 특허 명세서의 타당성, 특허 자격, 및/또는 시행 가능성의 어떤 견해도 반영하지 않는다.

[0235] 본 발명은, 준거법에 의해 허용된 바와 같이, 본원에 첨부된 청구범위에 열거된 주제의 모든 변형 및 등가물을 포함한다.

[0236] **실시예**

[0237] **실시예 1**

[0238] LysB29Nε-헥사데칸디오일-γ-Glu desB30 사람 인슐린, 600 nmol/ml(100U/ml)을 포함하는 제제의 제조 방법:

[0239] 0.6 mmol LysB29Nε-헥사데칸디오일-γ-Glu desB30 사람 인슐린을 300 ml의 물에 용해시키고, 16 mmol 페놀, 16 mmol *m*-크레솔 및 213 mmol 글리세롤을 함유하는 500 ml의 수용액과 혼합하였다. pH는 7.40으로 조정하고, 50 ml의 0.01 M 아세트산 아연을 적당한 속도에서 교반하는 동안 연동 펌프를 사용하여 연속적으로 첨가하였다. 첨가는 약 30분 이상 수행하였다. 아세트산 아연의 첨가 후, 주사를 위한 950 ml의 물을 첨가하고, pH를 7.60으로 조정하여, 최종적으로 물을 1 리터의 최종 부피가 되도록 첨가하였다.

[0240] **실시예 2**

[0241] LysB29Nε-헥사데칸디오일-γ-Glu desB30 사람 인슐린, 1200 nmol/ml(200U/ml)을 포함하는 제제의 제조 방법:

[0242] 1.2 mmol LysB29Nε-헥사데칸디오일-γ-Glu desB30 사람 인슐린을 300 ml의 물에 용해시키고, 16 mmol 페놀, 16 mmol *m*-크레솔 및 213 mmol 글리세롤을 함유하는 500 ml의 수용액과 혼합하였다. pH를 7.50으로 조정하고, 110 ml의 0.01 M 아세트산 아연을 적당한 속도에서 교반하는 동안 연동 펌프를 사용하여 연속적으로 첨가하였다. 첨가는 약 40분 이상 수행하였다. 아세트산 아연의 첨가 후, 주사를 위한 950 ml의 물을 첨가하고, pH를 7.60으로 조정하고, 최종적으로 물을 1 리터의 최종 부피가 되도록 첨가하였다.

[0243] **실시예 3**

[0244] LysB29Nε-헥사데칸디오일-γ-Glu desB30 사람 인슐린 및 인슐린 아스파르트 600 nmol/ml(U100/ml)을 포함하는 제제의 제조 방법:

[0245] **LysB29Nε-헥사데칸디오일-γ-Glu desB30 사람 인슐린 용액:** 0.42 mmol LysB29Nε-헥사데칸디오일-γ-Glu desB30 사람 인슐린을 210 ml의 물에 용해시키고, 11.2 mmol 페놀, 11.2 mmol *m*-크레솔, 7 mmol NaCl 및 144

mmol 글리세롤을 함유하는 350 ml의 수용액과 혼합하였다. pH를 7.40으로 조정하고, 32.9 ml의 0.01 M 아세트산 아연을 적당한 속도에서 교반하는 동안 연동 펌프를 사용하여 연속적으로 첨가하였다. 첨가는 약 30분 이상 수행하였다. 아세트산 아연의 첨가 후, 주사를 위한 630 ml의 물을 첨가하고, pH를 7.40으로 조정하였다.

[0246] **인슐린 아스파르트 용액:** 0.18 mmol 인슐린 아스파르트를 15 ml의 물에 부유시키고, 9 ml의 0.01 M 아세트산 아연 및 4.8 ml의 0.2 N 염산을 함유하는 용액과 혼합하여, 맑은 용액을 얻었다. 부피를 물을 첨가함으로써 35 ml로 조정하였다. 그 다음 4.8 mmol 페놀, 4.8 mmol *m*-크레솔, 3 mmol NaCl 및 62 mmol 글리세롤을 함유하는 180 ml의 용액을 첨가하였다. 최종적으로 pH를 7.40으로 조정하고, 부피를 물을 첨가함으로써 270 ml로 조정하였다.

[0247] **LysB29Nε-헥사데칸디오일-γ-Glu desB30 사람 인슐린 용액 및 인슐린 아**스파르트 용액의 혼합: 630 ml의 LysB29Nε-헥사데칸디오일-γ-Glu desB30 사람 인슐린 용액 및 270 ml의 인슐린 아스파르트 용액을 혼합하였다. pH를 7.40으로 조정하고, 최종적으로 부피를 물을 첨가함으로써 1 리터로 조정하였다.

[0248] **실시예 4**

[0249] LysB29Nε-헥사데칸디오일-γ-Glu desB30 사람 인슐린 및 인슐린 아스파르트, 1200 nmol/ml(200 U/ml)을 포함하는 제제의 제조 방법:

[0250] **LysB29Nε-헥사데칸디오일-γ-Glu desB30 사람 인슐린 용액:** 0.84 mmol LysB29Nε-헥사데칸디오일-γ-Glu desB30 사람 인슐린을 210 ml의 물에 용해시키고, 11.2 mmol 페놀, 11.2 mmol *m*-크레솔, 7 mmol NaCl 및 144 mmol 글리세롤을 함유하는 350 ml의 수용액과 혼합하였다. pH를 7.40으로 조정하고, 60.1 ml의 0.01 M 아세트산 아연을 적당한 속도에서 교반하는 동안 연동 펌프를 사용하여 연속적으로 첨가하였다. 첨가는 약 30분 이상 수행하였다. 아세트산 아연의 첨가 후, 주사를 위한 630 ml의 물을 첨가하고, pH를 7.40으로 조정하였다.

[0251] **인슐린 아스파르트 용액:** 0.36 mmol 인슐린 아스파르트를 15 ml의 물에 부유하고, 18 ml의 0.01 M 아세트산 아연 및 4.8 ml의 0.2 N 염산을 함유하는 용액과 혼합하여, 맑은 용액을 얻었다. 부피를 물을 첨가함으로써 35 ml로 조정하였다. 그 다음 4.8 mmol 페놀, 4.8 mmol *m*-크레솔, 3 mmol NaCl 및 62 mmol 글리세롤을 함유하는 180 ml의 용액을 첨가하였다. 최종적으로 pH를 7.40으로 조정하고, 부피를 물을 첨가함으로써 270 ml로 조정하였다.

[0252] **LysB29Nε-헥사데칸디오일-γ-Glu desB30 사람 인슐린 용액 및 인슐린 아**스파르트 용액의 혼합: 630 ml의 LysB29Nε-헥사데칸디오일-γ-Glu desB30 사람 인슐린 용액 및 270 ml의 인슐린 아스파르트 용액을 혼합하였다. pH를 7.40으로 조정하고, 최종적으로 부피를 물을 첨가함으로써 1 리터로 조정하였다.