

(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁵

A61K 37/26

C07K 7/40

(45) 공고일자 1991년 11월 12일

(11) 공고번호 특 1991-0009344

(21) 출원번호

특 1984-0004496

(65) 공개번호

특 1985-0000981

(22) 출원일자

1984년 07월 28일

(43) 공개일자

1985년 03월 14일

(30) 우선권주장

P 33 27 709.5 1983년 07월 29일 독일(DE)

(71) 출원인

헥스트 아크티엔게젤샤프트 하인리히 벡커, 베른하르트 벡크

독일연방공화국 데-6230 프랑크푸르트 암 마인 80 브뤼닝스트라세 45

(72) 발명자

울리히 그라우

독일연방공화국 데-6238 호프해임 암 타우누스 제일 17

(74) 대리인

이병호

심사관 : 정진수 (책자공보 제2564호)(54) 인슐린 유도체의 결정 혼탁액의 제조방법**요약**

내용 없음.

대표도**도1****영세서**

[발명의 명칭]

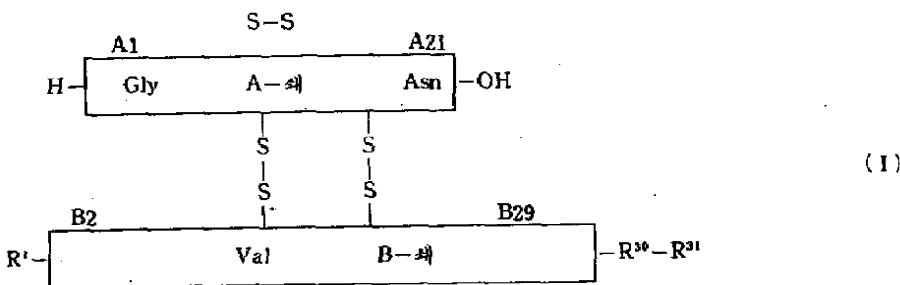
인슐린 유도체의 결정 혼탁액의 제조방법

[도면의 간단한 설명]

제1도는 본 발명의 인슐린 유도체의 결정의 크기분포를 도시한다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 다음 일반식(I)의 인슐린 유도체의 하나 이상의 결정 혼탁액을 제조하는 방법에 관한 것이다.



상기식에서 R^1 은 수소 또는 H-Phe이고, R^{30} 은 유전학적으로 암호화될 수 있는 중성의 L-아미노산 라디칼이고, R^{31} 은 탄소수 50까지의 생리학적으로 허용되는 염기성 유기그룹으로서, 구조중에서 0 내지 3의 α -아미노산이 포함되어 말단 카르복실 기능기가 에스테르, 아미드, 락톤의 기능기와 같이, 유리 상태이거나 CH_2OH 로 환원될 수 있고 등전점이 5.8 내지 8.5이다.

인슐린의 결정화는 구조분석[참조: Adams et al., Nature 224, 491(1969) The peking insulin Structure Research group, Sc.Simica XVIII, 152-118(1974)] 및 약제학적인 사용의 양면에서[참조: Schlichtkrull, Insulin-kristalle(Insulin Crystals)(1961)] 집중적으로 연구되어 왔다. 인슐린의 지연작용 제형으로서 치료적으로 사용하는 경우, 결정의 크기가 가능한 일정하게 제한될 수 있으나 보통 $30\mu\text{m}$ 를 초과하지 않도록 하여 인슐린의 표면적과 절재량 사이에 직접적이고 재생적인 관계를 이루는 것이 가장 중요하다. 소위 단순분산 혼탁액에서는 명확한 재용해 동력학을 예상할 수 있다.

치료적 목적으로 사용되면서 상기의 성질을 갖는 인슈린 결정성 혼탁액의 예로는, 크기가 약 $25\mu\text{m}$ 이

며, 중성 pH에서 0.8 내지 2.5%의 아연(인슐린의 종량에 대해)존재하에 안정하며 자연작용이 있는 사방면체정계 아연-인슐린 결정현탁액과 길이가 약 $10\mu\text{m}$ 이며 두께가 약 $1\mu\text{m}$ 인 소형 막대형태로 자연작용물질로서 사용되는 이소판인슐린 프로타민 결정이 있다.

그밖의 몇몇 인슐린의 결정변형법이 알려졌지만, 지금까지는 X선 구조분석에서만이 관심사가 되었다. 그래서, 아연부재 사방정 혹은 단사구조의 결정이 산성 pH조건하에서 제조되었다. [참조: Einstein, Low, Acta Cryst. 15 32-34(1962)]. 입방의 공간체로 분류되는 좀 더 작은 사방성 십이면체는 등전점에서, 또한 아연 부재하에서 제조된다(참조:Schlichtkrull, Insulin-krystalle(Insulin Crystals)(1961)). 끝으로, 아연과 페놀 또는 페놀유도체의 존재하에 등전점상에서 제조되는 인슐린의 단사구조 결정형태가 슈리흐트크를 (Schlichtkrull) 문헌에 기술되었다. 상기의 결정들은 며칠내에 상당한 크기(3mm까지)로 자라서 날카로운 모서리를 지닌다. 흥미로운 것은, 본 결정이 유리표면에서만 발견되지 용액의 자유표면에서는 발견되지 않는다[참조:Schlichtkrull, Insulin-krystalle(Insulin Crystals) pages 57-60(1961)].

순전하보다 적어도 1개의 양전자를 가지므로서 등전점이 보다 높은 pH치로 이동하는 인슐린 유도체는 인슐린 또는 프로인슐린과 다른 결정화 성질을 갖는다는 것이 밝혀졌다. 이들 유도체에는 특히, 체장 축출액 중 소량이 발견되는 것으로 알려진 프로인슐린 분해생성을 즉 인슐린-Arg³¹-OH 및 인슐린-Arg³¹-Arg³²-OH과 같이 B 쇄 C말단상에 염기성의 기를 추가로 갖는 유도체가 포함된다. 유사한 성질을 지닌 다른 유도체는 반합성 과정으로 제조될 수 있다. 독일연방공화국 특허원 제P 33 26 672.4 호(HOE 83/F 141)과 P 33 26 473.2호(HOE 83/F 142)는 상기의 인슐린 유도체와, 그의 제조방법, 그를 함유하는 제제 및 용도에 관한 것이다.

이 인슐린 유도체들은, 예를들면 아르기닌, 또는 C-말단상의 단순 알코올이나 아민과의 에스테르 또는 그룹 대신에 또는 그외에 다른 염기성 아미노산 또는 염기성 아미노산 유도체(예:D-아미노산, 오르니틴 하이드록시 라이신 또는 아르기니놀)를 갖는다. 상기한 알코올 또는 아미드는, 예를 들면 인슐린-(B 30) 콜린 에스테르에서와 같이 추가의 양전하를 지닐 수 있다.

이제 본 발명에 의해 놀랍게도 상기의 유도체들은 등전점 가까이서 방향성 하이드록시 화합물의 존재하에 수용성 매질로부터 크기가 약 $10\mu\text{m}$ 인 매우 균일한 프리즘 형태로 결정화될 수 있음이 밝혀졌다.

따라서, 본 발명은 일반식(I)의 인슐린 유도체(들)를 방향족 하이드록시 화합물 존재하에 등전점 가까운 수용성 매질중에서 결정화시킴을 특징으로 하여 일반식(I)의 인슐린 유도체 하나 이상의 결정현탁액을 제조하는 방법에 관한 것이다.

일반식(I)의 인슐린 유도체에서 바람직하게 결정화된 것은 R³¹이 일반식-XnS의 라디칼이고, 여기서 n은 0,1,2 또는 3이며, X는 천연에 존재하는 중성 또는 염기성 L-아미노산, 바람직하게는 특히 Arg, Lys, His, Orn 및/또는 이들에 상응하는 D-아미노산의 동일하거나 상이한 라디칼이며, S는 애이거나, 또는 카르복실 그룹을 차단하며, n이 0이면 양전하의 또는 양전자 허용가능한 염기성 라디칼을 수반하며, n이 0보다 크면 라디칼을 지닐 수 있는 생리학적으로 허용가능한 그룹을 나타내는데, C-말단-X-S 도 상응하는 알코올로 환원된 아미노산의 라디칼을 나타낼 수 있으며 n이 2 또는 3이면, 호모세린-락톤 라디칼을 나타낼 수 있는 것이다.

R¹이 H-Phe를 나타내고 및/또는 R³⁰이 Ala, Thr를, 또는 Ser를 나타내며 X가 Arg, Lys, Orn, Cit, Hyl 또는 His 와 같이 천연에 존재하는 염기성 L-아미노산 또는 그의 D-아미노산의 라디칼을 나타내는 일반식(I)의 인슐린 유도체가 특히 바람직하다. 만약 R³¹ 라디칼이 아미노산 라디칼 또는 아미노산 유도체(예:상응하는 알코올 또는 락톤)의 라디칼을 포함하는 경우에는 R³¹이 L-형태만의 라디칼만을 독점적으로 포함한 펩타이드가 더욱 특히 바람직하다.

하기의 L-아미노산은 유전학적으로 암호화될 수 있다: Gly,Ala,
Ser, Thr, Val, Leu, Ile, Asp, Asn, Glu, Gln, Cys, Met, Arg, Lys, His, Tyr, Phe, Trp, 그리고 Pro(중성의 아미노산은 밑줄을 그었다).

중성의 천연 아미노산은, 특히 Gly,Ala,Ser,Thr, Val,Leu, Ile,Asn, Gln, Cys, Met,Tyr,Phe,Pro 또는 Hyp 이다.

천연에 존재하는 염기성의 아미노산은 특히, Arg,Lys,Hyl,Orn,Cit 또는 His이다.

C-말단이 (C₁-C₆)-알콕시, (C₃-C₆)-사이클로알킬알콕시, NH₂, (C₁-C₆)-알킬아미노, 디-(C₁-C₆)-알킬아미노, 아미노-(C₁-C₆)-알콕시, (C₁-C₄)-알킬아미노-(C₂-C₆)-알콕시, 디-(C₁-C₄)-암모니오-(C₂-C₆)-알콕시, 트리-(C₁-C₄)-암모니오-(C₂-C₆)-알콕시, 아미노-(C₂-C₆)-알킬아미노, [(C₁-C₄)-알킬아미노]-(C₂-C₆)-알킬아미노, [디-(C₁-C₄)-알킬아미노]-(C₂-C₆)-알킬아미노 또는 [트리-(C₁-C₄)-알킬암모니오]-(C₂-C₆)-알킬아미노 그룹을 포함한 그룹으로부터 카르복실그룹을 차단시키는 그룹을 함유하는 일반식(I)의 펩타이드가 특히 적당하다.

카르복실그룹을 차단하는 염기성 그룹은 특히

$-\text{O}-[\text{CH}_2]_p-\text{NR}_2, -\text{O}[\text{CH}_2]_p-\text{N}^{\ominus}\text{R}_2, -\text{NH}-$ 또는 $-\text{NH}[\text{CH}_2]_p-\text{NR}_2$ 인데,

이때 p는 2내지 6이고 라디칼 R는 동일하거나 상이하며 수소 또는 (C₁-C₄)-알킬을 나타낸다.

일반식(I)의 인슐린 유도체는 바람직하게는 인체 인슐린 돼지 인슐린 또는 소 인슐린의 서열을 갖는다.

예를들면, 아래의 인슐린 유도체의 결정 혼탁액은 본 발명에 따른 제조방법으로 제조될 수 있다(본 발명은 아래예로 제한되지 않는다):

인체 인슐린-Arg^{B1}-OH

인체 인슐린-Arg^{B1}-Ala^{B32}-OH

돼지 인슐린-Arg^{B31}-OH

돼지 인슐린-Arg^{B31}Ala^{B32}-OH

소 인슐린-Arg^{B31}-OH

소 인슐린-Arg^{B1}-Arg^{B32}-OH

Des-Phe^{B1}-돼지 인슐린-Arg^{B21}-OH

Des-Phe^{B1}-인체 인슐린-Arg^{B31}-OH

Des-Phe^{B1}-돼지 인슐린-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH

Des-Phe^{B1}-인체 인슐린-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH

돼지 인슐린-Arg^{B31}-OCH₃

인체 인슐린-Arg^{B31}-OCH₃

소 인슐린-Arg^{B31}-OCH₃

돼지 인슐린-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OCH₃

인체 인슐린-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OCH₃

Des-Thr^{B30}-인체 인슐린-Val^{B30}-Arg^{B31}-OH

Des-Thr^{B30}-인체 인슐린-Val^{B30}-Ala^{B31}-Arg^{B32}-OH

인체 인슐린-Lys^{B32}-OH

인체 인슐린-D-Arg^{B31}-OH

인체 인슐린-D-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH

인체 인슐린-Arg^{B31}-D-Arg^{B32}-OH

인체 인슐린-Lys^{B31}-Arg^{B32}-OH

인체 인슐린-Arg^{B31}-Lys^{B32}-OH

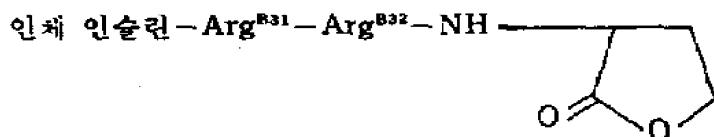
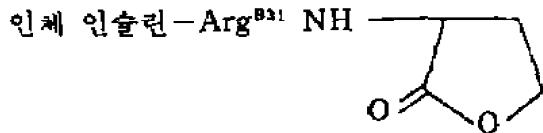
인체 인슐린-Argininol^{B31}

인체 인슐린-Val^{B31}-Arg^{B32}-OH

인체 인슐린-Val^{B31}-Arg^{B32}-Arg^{B33}-OH

인체 인슐린-Arg^{B31}-Argininol^{B32}

인체 인슐린-Lys^{B31}-Arg^{B32}-Arg^{B33}-OH



인체 인슐린-Arg^{B31}-NH₂

인체 인슐린-Arg^{B31}-Arg^{B32}-NH₂

인체 인슐린-Orn^{B31}-OH

인체 인슐린-Leu^{B31}-Cit^{B32}-OH

인체 인슐린-(B30)-OCH₂CH₂-NH₂

인체 인슐린-(B30)-NH-CH₂CH₂-NH₂

인체 인슐린-Arg^{B31}-O-CH₂-CH₂-NH₂

인체 인슐린-Arg^{B31}-CH₂-CH₂-N(CH₃)₂

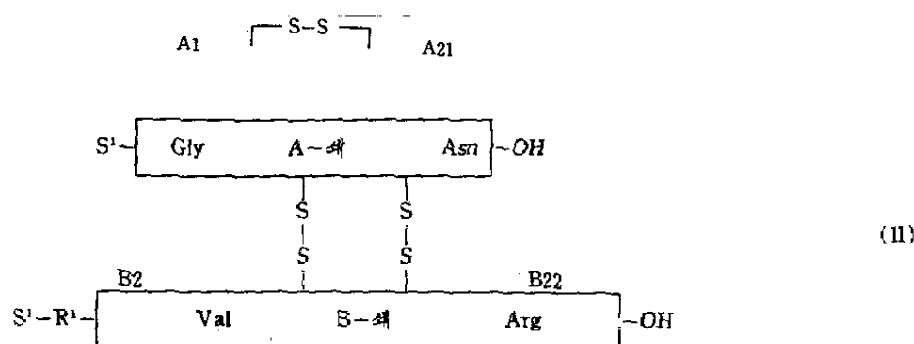
인체 인슐린-(B30)-O-CH₂-CH₂-N(CH₃)₂

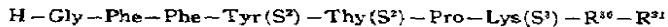
인체 인슐린-(B30)-NH-CH₂-CH₂-N(CH₃)₂

인체 인슐린-Leu^{B31}-O-CH₂-CH₂-CH₂-N(CH₃)₂

인체 인슐린-Trp^{B31}-Trp^{B32}-Trp^{B33}-NH(CH₂)₆-N(n-Bu)₃

일반식(I)의 인슐린 유도체는 a)하기 일반식(II)의 des-옥타펩타이드(B23-30)-인슐린을 하기 일반식(III)의 펩타이드와 축합시킨 후, 경우에 따라 존재하는 보호그룹을 공지의 방법에 따라 제거시키거나, b)트립신 또는 트립신과 같은 엔도펩티데이즈 존재하에서 일반식(I)의 des-B30-인슐린(R0이 ¹H 또는 H-Phe 이고 C-말단 R³⁰-R³¹이 함께 OH를 나타낸다)과 일반식(IV)의 화합물을 반응시킨 후 존재하는 보호그룹을 공지의 방법에 따라 제거시키거나, c) R³¹ 중 L-배위인 아미노산 라디칼을 갖는 인슐린 유도체를 제조하기 위해서는 프로인슐린, 프로인슐린 유도체, 전프로인슐린 또는 전프로인슐린 유도체 또는 이들 화합물들의 중간체를 화학적으로 및/또는 효소적으로 분해하여 제조한다.





(III)



(IV)

상기식에서, R^1 는 Phe 또는 결합을 나타내고, S는 3급-부톡시카보닐(BOC), 3급-아밀옥시카보닐(AOC) 또는 메틸솔포닐에톡시카보닐(MSC) 라디칼과 같은, 양성자 가용매분해 또는 β -제거반응에 의해서 제거될 수 있는 아미노-보호그룹으로, R^{30}, R^{31} 는 상기 정의한 바와 같으며, S^2 는 수소, Bzl 또는 Bu^+ 를 나타내고, S^3 는 Boc, Fmoc 또는 Z과 같은 우레탄 보호 그룹을 나타내고, 일반식(III) 및 (IV)에서 R^{30} 및 R^{31} 라디칼중에 존재하는 유리 COOH, OH, SH, NH, 구아니디노 및/또는 이미다졸 그룹은 필요한 경우에는 공지된 방법으로 보호시킨 형태이다.

출발물질로서 사용되는 des-Phe⁸¹-인슐린은 예를들면 독일연방공화국 특허 제2,005,658호 또는 유럽 특허원 제46,979호에 공지되어 있다.

b) 공정에서 출발물질로 사용되는 des-B30-인슐린은 예를들면 유럽 특허원 제46,979호 또는 문헌[참조: Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.359/1978/799]에 공지되어 있다. b) 공정에서 사용된 일반식(I V)의 출발물질은 펩티드 화학에서 공지된 방법으로 제조된다. 일반식(IV)에 사용될 수 있는 보호기는 문헌[참조:M.Bodanzky et al., Peptide Synthesis Ind.Ed.1976, Wiley Sons.]에 상술되어 있다.

c) 공정에서 출발물질인 인체 또는 영장류 프로인슐린은 대체적으로 유전공학적 방법으로 제조될 수 있다. 이로부터 Arg(B31) 및 di-Arg(B31-32) 유도체는 트립신 또는 트립신과 같은 효소를 사용한 단순한 분해 작용에 의해 제조될 수 있다. 부연하면, 플라스키드는 비교적 간편한 방법으로 작제될 수 있으며 이들은 B31 또는 B32에서 천연에 존재하는 아르기닌 대신 다른 중성 또는 염기성 아미노산을 암호화하기 때문에 상응하는 전프로인슐린 유도체를 제거시켜 신규의 인슐린 유도체를 얻을 수 있다.

제조합 DNA 방법을 사용하여 프로인슐린을 제조하려면 프로인슐린의 아미노산 서열에 대한 DNA 서열의 형성을 필요로 하며, 이는 분리 또는 작제 또는 이두가지를 혼합사용하여 수행할 수 있다. 다음에 프로인슐린-DNA는 판독상에서 적절한 클로닝 및 발현 담체내에 삽입된다. 이 담체는 적절한 미생물을 형질전환시키고, 따라서 획득된 형질전환된 미생물을 발효시켜 프로인슐린 함유 박터 복제물을 더욱 생성시키고 프로인슐린, 순수 인슐린 유도체, 프로인슐린 전구체 또는 전프로인슐린 유도체를 발현시킨다.

만약 발현생성물이 프로인슐린 전구체이면, 일반적으로 이 생성물은 말단 아미노기가 단백질 단편에 결합되어 있는 프로인슐린 아미노산 서열을 가지며 이 서열은 프로인슐린 또는 프로인슐린 유도체가 삽입된 유전자 서열에 의해 발현된다. 프로인슐린 아미노산 서열은 특이적으로 분해될 수 있는 부위(예:메티오닌)를 통해서 단백질 단편에 결합한다. 생성된 프로인슐린 아미노산 서열은 융합된 유전자 생성물로부터, 독일연방공화국 특허원 제3,232,036호에 기술된 바와 같이, 분해되고 정제후 프로인슐린을 분리한다.

본 발명에 의한 공정의 결정화 매질은 인슐린 유도체의 종량에 대해 바람직하게는 1%까지이나 특히 0.8%를 초과하지 않는 아연을 함유할 수 있다. 아연은 최대로는 40 μ g/100단위의 비교적 소량이나, 바람직하게는 30 μ g/100단위를 초과하지 않는 양이면 결정화에 있어서 충분하며, 어떤 경우에는 상기의 양을 건조물질에 함유시킬 수가 있다.

결정화는 바람직하게는 등전점 이하 1pH 단위 내지 등전점 이상 1pH 단위 범위의 pH에서 진행된다. 적절하게는, pH는 완충용액(예: 인산염, 아세트산염, 또는 시트르산염)으로 조절될 수 있다.

결정화 매질은 또한 페놀, 크레졸 또는 유사한 방향족 화합물을 함유한다. 결정화 온도는 바람직하게는 3내지 27°C이고, 특히 10 내지 20°C가 바람직하다. 공정중에, 혼탁액은 약간 교반시킬 수 있다(예: 교반기 내에서 교반). 결정화되기전 일반식(I)의 인슐린 유도체의 농도는 0.2내지40mg/ml, 특히 1내지 7.5 mg/ml가 바람직하다.

결정은 또한, 예를들면 완결된 주사용 혼탁액에 상응하는 매질내에서도 얻어질 수 있다(순수한 지연 작용 생성물인 경우). 따라서, 이(무균성)매질은 페놀 또는 유사방향족 화합물 외에, 적절하다면, 아연 및 염화나트륨 또는 글리세롤과 같은 등장성시약, 및 나트륨 인산염과 같은 완충물질을 함유할 수 있다.

또한, 본 발명은 상기에 언급된 결정화 공정에 의해서 얻어질 수 있는 일반식(I)의 인슐린 유도체 하나 또는 그 이상의 결정현탁액 및, 본 결정화 공정에 의해서 얻어질 수 있는 균일한 모양의 결정 형태인 일반식(I)의 화합물을 관한 것이다.

본 발명에 따른 결정 혼탁액은 추가로 a) 용해된 및/또는 무정형 형태의 일반식(I)의 인슐린 유도체 하나 또는 그 이상, b) 인슐린 및/또는, c)프로인슐린 및/또는, d)용해된, 무정형 및/또는 결정형태의 C-펩타이드를 함유할 수 있다. 또한 결정 혼탁액은 인슐린 방출시 지연 작용을 갖는, 글로빈 또는 프로타민 황산염과 같은 보조제를 함유할 수 있다.

결정의 크기 및 이의 균일성에 관한 유리한 점외에, 아연이 데포우(depot) 담체로 고려되는 농도 이하의 비교적 낮은 아연 함량이 의미하는 것은 본 발명에 의한 결정현탁액이 용해된 인슐린과 자유롭게 혼합될 수 있다는 것이다. 그래서, 예를들면 투약전에 인슐린 유도체 결정의 혼탁액을 인슐린 용액과 합해서 사용할 수 있다. 상기 방법으로 제조된 의약품의 작용 프로파일은 개별성분의 함량을 변화시킴으로써 최적의 방법으로 조절될 수 있다.

결정(예: 아연인슐린 4방 6면체)을 안정화시키기 위해 보다 높은 농도의 아연이 필요하다면 첨가,

용해된 인슐린이 침전되어 더 이상 신속히 작용하는 성분으로 작용하지 못한다.

언급된 유도체의 결정 혼탁액은, 이상적인 방법으로, 당뇨병 치료에 바람직한 작용들을 나타낸다. 지연작용 원리는 인슐린 유도체의 고유의 원리이고 단백질 화학의 현상, 즉 등전점에서의 난용성에 기인한다.

다음 실시예는, 본 발명을 설명하며, 본 발명의 범위가 이에 한정되지 않는다.

[실시예 1]

[돼지 프로인슐린을 트립신으로 분해시켜 40 I.U./ml인 약 10 μ m의 크기를 지닌 프리즘 형태의 결정 혼탁액으로서 제조된 돼지 인슐린-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH 및 그의 크기 분포]

하기 물질을 물중에 혼합한다;

돼지의 인슐린-Arg ^{B31} -Arg ^{B32} -OH(27.0 I.U./mg)	14.8mg
나트륨 디하이드로젠 포스페이트 디하이드레이트	30.0mg
m-크레졸	15.0mg
페놀	6.0mg
글리세롤	16.0mg

pH를 둑은 NaOH로 7.4로 만들고, 총 부피는 물로 10ml가 되도록 한다. 이 뱃치를 18°C에서 약간 교반하여 날카로운 모서리를 지닌 매우 균일하게 성장하여 약 10 μ m 크기로 된 프리즘 형태의 결정을 생성시키고, 이는 편광하에서 매우 작은 각도 범위내에서 흡광효과를 나타낸다. 이들 결정의 크기분포는 콜터(Coulter)계수로기로서 측정된다. 곡선(도면 참조)은 극히 균등한 크기분포를 보여주고; 대부분의 결정은 5 μ m 내지 10 μ m의 균일한 지름(구형입자에 대해)를 갖는다.

[실시예 2]

[40 I.U./ml를 갖는 제형의, 유전공학적 방법에 의해서 제조된 전프로인슐린을 트립신 분해하여 제조한 50%의 인체 인슐린-Arg^{B31}-OH와 돼지 인슐린으로부터 반합성법에 의해서 제조된 50%의 인체 인슐린-B30-콜린 에스테르와의 혼합물의 결정화 및 이의 지연작용]

하기 물질을 물중에 혼합한다.

인체 인슐린-Arg ^{B31} -OH(27.5 I.U./mg)	7.3mg
인체 인슐린-(B30)-콜린에스테르(28.0 I.U./mg)	7.1mg
나트륨 디하이드로젠 포스페이트 디하이드레이트	21.0mg
m-크레졸	15.0mg
페놀	0.6mg
글리세롤	16.0mg

pH를 둑은 NaOH로 7.0까지 만들고, 총 부피는 물로 10ml가 되도록 한다. 이 뱃치를 실온에서 약간 교반하면, 약 10 μ m 크기의 프리즘 형태의 결정이 생긴다. 이 혼탁액은 토끼에서 40 I.U./kg 투여시 현저한 지연 작용을 나타낸다.

혈청중의 글루코즈치[출발치(%)]는 다음과 같다(n은 12마리 동물):

t(시간)	0	1	2	4	6
혈청중 글루코즈	100%	51%	44%	69%	83%

[실시예 3]

[돼지 인슐린으로부터 반합성법으로 제조되었고, 50% 이소판프로타민 인체 인슐린 결정과 혼합된 100 I.U./ml의 결정성 인체 인슐린-Arg^{B31}-Lys^{B32}-COH₃의 혼탁액]

하기 물질을 물중에서 총부피 10ml 가 되도록 용해시킨다 :

인체 인슐린-Arg ^{B31} -Lys ^{B32} -COH ₃	37.0mg
(27.0 I.U./mg), 아연이 함유되지 않음	
염화아연	0.6mg
나트륨 디하이드로젠 포스페이트 디하이드레이트	21.0mg
m-크레졸	15.0mg
페놀	6.0mg
글리세롤	160.0mg

pH를 1N HCl 또는 1N NaOH로 7.4로 만든다. 이 뱃치를 실온에서 서서히 교반하면, 하루안에 프리즘 모양의 결정이 생성된다.

이소판 인체 인슐린 결정(NPH)은 물중에서 하기의 물질을 혼합해서 별도로 제조한다:

인체 인슐린(28.0 I.U./mg),	35.7mg
프로타민 살레이트	3.2mg
나트륨 디하이드로젠 포스페이트 디하이드레이트	21.0mg
m-크레졸	15.0mg
페놀	6.0mg
글리세롤	160.0mg

pH를 1N HCl 또는 1N NaOH로 7.4로 만든다. 혼합물을 물로 10ml로 만든다. 이 뱃치를 서서히 교반하면, 통상적으로 막대모양인 NPH 결정이 생성된다. 상기 두 개의 혼탁액을 합치면, 동물실험에서 현저한 자연작용을 나타내는 100 I.U./ml의 목적하는 혼성생성물이 제조된다.

[실시예 4]

[유전공학적 방법에 의해서 제조된 전프로인슐린을 트립신 분해하여 얻어진 75%의 결정성 인체 인슐린-Arg^{B31}-Lys^{B32}-OH 와 25%의 용해된 형태의 인체 인슐린을 함유하는 40 I.U./ml의 데포우 생성물]

묽은 HCl 250ml에 1.111g의 인체 인슐린-Arg^{B31}-Lys^{B32}-OH(27.0 I.U./mg)(pH 가 4.0)을 용해시킨다. 이 용액을 적당한 방법으로 여과하여 멸균시킨다.

하기 물질을 별도로 물에 용해시킨다 :

나트륨 디하이드로Zen 포스페이트 디하이드레이트	1.575mg
m-크레졸	1.125g
페놀	0.450g
글리세롤	14.118g

pH를 1N NaOH로 7.5로 만들고 혼합물을 물로 0.5리터까지 만든다. 이 완충용액은 마찬가지로 적당한 방법으로 여과하여 멸균시킨다.

무균 조건하에서, 상기의 두 개의 살균용액을 서로 합쳐서 교반시키고, 크기가 약 10μm인 균질한 결정(A)이 생성될때까지 교반한다. 하기 물질을 혼합하면 인슐린 용액(B)가 제조된다 :

인체 인슐린(28.0 I.U./mg),	0.357g
나트륨 디하이드로Zen 포스페이트 디하이드레이트	0.525g
m-크레졸	0.375g
페놀	0.150g
글리세롤	4.706g

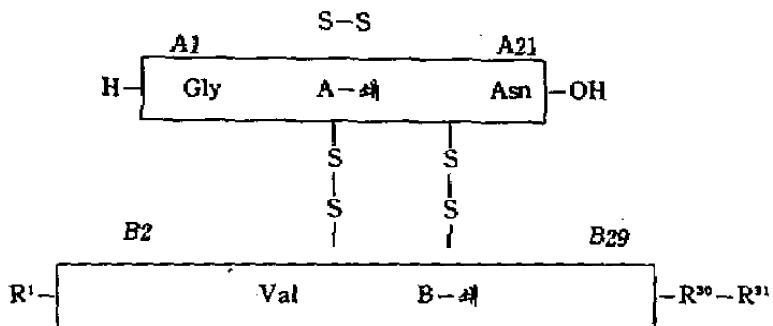
상기 용액을 둘은 NaOH로 pH 7.3으로 만들고 물로 0.25리터까지 만들고 여과하여 멸균시킨다. 무균 상태에서, 인슐린 용액(B)을 결정현탁액(A)에 합치고, 적당한 다회용 병에다 채우다.

상기 데포우 생성물은 당뇨병 치료에 사용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

방향족 하이드록시 화합물 및 등장성 시약인 글리세롤의 존재하에 인슐린 유도체(들)을 등전점에 가까운 수용성 매질내에서 결정화시킴을 특징으로 하여, 하기 일반식(I)의 인슐린 유도체 하나 이상의 결정 혼탁액을 제조하는 방법.



상기식에서, R^1 또는 H 또는 H-Phe를 나타내고, R^{30} 은 유전학적으로 암호화될 수 있는 중성 L-아미노산의 라디칼을 나타내고, R^{31} 은 탄소수 50까지의 생리학적으로 허용되는 염기성 유기그룹으로서, 구조중에는 0내지 3의 α -아미노산이 포함되며 말단 카르복실 기능기가 에스테르, 아미드, 락톤 기능기와 같이 유리상태이거나 CH_2OH 로 환원될 수 있고, 등전점이 5.8 내지 8.50이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 일반식(I)에서 R^{31} 가 일반식-XnS의 라디칼을 나타내며, 여기서, n은 0,1,2 또는 3이고, X는 천연에 존재하는 중성 또는 염기성 L-아미노산, 바람직하게는 염기성 L-아미노산, 특히 Arg,Lys,His 또는 Orn 및/또는 이들에 상응하는 D-아미노산의 동일하거나 상이한 라디칼이며, S는 OH 이거나, 또는 카르복실 그룹을 차단하며, n이 0이면 양전하의 또는 양전자 허용 가능한 염기성 라디칼을 수반하거나, n이 0보다 크면 이 라디칼을 지닐 수 있는 생리학적으로 허용가능한 그룹을 나타내고, C-말단-X-S은 또한 상응하는 알코올로 환원된 아미노산 라디칼을 나타내거나, n이 2 또는 30이면 호모세린-락톤 라디칼을 나타낼 수 있는 방법.

청구항 3

제1항 또는 2항에 있어서, 일반식(I)중의 R^1 이 H-Phe 인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 일반식(I)중의 R^{30} 이 Ala,Thr 또는 Ser인 방법

청구항 5

제2항에 있어서, 일반식(I)중의 X가 Arg,Lys,HyL,Orn,Cit 또는 His와 같은 천연에 존재하는 염기성 L-아미노산 및/또는 그의 D-형태의 라디칼인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 일반식(I)중의 R^{31} 라디칼이 오로지 L-형태인 아미노산 라디칼 또는 그의 유도체 라디칼을 함유하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 일반식(I)의 C-말단이 (C_1-C_6) -알콕시, (C_3-C_6) -사이클로알킬알콕시, NH_2 , (C_1-C_6) -알킬아미노, 디- (C_1-C_6) -알킬아미노, 아미노- (C_1-C_6) -알콕시, (C_1-C_4) -알킬아미노- (C_2-C_6) -알콕시, 디- (C_1-C_4) -암모니오- (C_2-C_6) -알콕시, 트리- (C_1-C_4) -암모니오- (C_2-C_6) -알콕시, 아미노- (C_2-C_6) -알킬아미노, $[(C_1-C_4)$ -알킬아미노]- (C_2-C_6) -알킬아미노, [디- (C_1-C_4) -알킬아미노]- (C_2-C_6) -알킬아미노 또는 [트리- (C_1-C_4) -알킬암모니오]- (C_2-C_6) -알킬아미노 그룹을 포함한 그룹으로부터 카르복실그룹을 차단시키는 그룹을 함유하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 결정화 매질에 존재하는 아연의 양이 인슐린의 중량에 대해 1%까지 존재하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 결정화 매질이 적당한 양의 완충물질 첨가에 의해서 특정한 결정화 pH에서 완충되는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 결정화 매질이 통상의 등장성 시약을 적당한 양 함유하는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 결정화가 3내지 27°C의 온도에서 수행되는 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 결정화매질중 일반식(I)의 인슐린 유도체의 농도가 0.2 내지 40mg/ml 인 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 결정화가 페놀 또는 여러 페놀의 혼합물 존재하에서 수행되는 방법.

도면

도면1

