



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0065126
(43) 공개일자 2016년06월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/62 (2006.01) *A61K 38/28* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/62 (2013.01)
A61K 38/28 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7010201
(22) 출원일자(국제) 2014년10월03일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2016년04월19일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2014/071236
(87) 국제공개번호 WO 2015/052088
국제공개일자 2015년04월16일
(30) 우선권주장
13187626.0 2013년10월07일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
노보 노르디스크 에이/에스
덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레
(72) 발명자
매드센 피터
덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 노보
노르디스크 에이/에스
타그모스 티나 월러
덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 노보
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
송봉식, 정삼영

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 인슐린 유사체의 신규한 유도체

(57) 요 약

본 발명은 당뇨병의 치료에 유용한 인간 인슐린의 유사체의 신규한 유도체를 제공한다.

(72) 발명자

네이버 헬르

덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 노보
노르디스크 에이/에스

카엘드센 토마스 브르글름

덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 노보
노르디스크 에이/에스

명세서

청구범위

청구항 1

A14E, B16E, B25H, B29K(N(eps)-에이코산다이오일-gGlu-2xOEG), desB30 인간 인슐린 (화합물 1).

청구항 2

제 1항에 있어서, 의약으로서 사용하기 위한 화합물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 당뇨병의 치료를 위한 의약으로서 사용하기 위한 화합물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 당뇨병의 치료에 사용하기 위한 것으로, 화합물은 적어도 1개월, 6개월 또는 1년의 기간 동안, 평균적으로, 이틀마다 또는 그것보다 적은 빈도로 동일한 환자에게 투여되고, 상기 화합물은 동일한 환자에게 더 자주 투여되지 않는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 당뇨병의 치료에 사용하기 위한 것으로, 화합물은 적어도 1개월, 6개월 또는 1년의 기간 동안, 평균적으로, 주 2회 또는 그것보다 적은 빈도로 투여되고, 상기 화합물은 동일한 환자에게 더 자주 투여되지 않는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 당뇨병의 치료에 사용하기 위한 것으로, 화합물은 적어도 1개월, 6개월 또는 1년의 기간 동안, 평균적으로, 주 1회 또는 그것보다 적은 빈도로 투여되고, 상기 화합물은 동일한 환자에게 더 자주 투여되지 않는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 7

제 1항의 화합물을 포함하는 수용액.

청구항 8

제 7항에 있어서, 인슐린 6량체당 적어도 5개의 아연 이온을 포함하는 것을 특징으로 하는 수용액.

청구항 9

제 7항 또는 제 8항에 있어서, pH가 7 내지 8의 범위에 있는 것을 특징으로 하는 수용액.

청구항 10

제 1항의 화합물 및 하나 또는 그 이상의 부형제를 포함하는 약학 조성물.

청구항 11

제 10항에 있어서, 인슐린 6량체당 적어도 4.5개의 아연 이온을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 12

치료를 필요로 하는 대상에게 제 1항의 화합물의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는 당뇨병의 치료 또는 예방 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 당뇨병의 치료에 유용한 인간 인슐린의 유사체의 신규한 유도체를 제공한다.

배경 기술

[0002] 인슐린은 췌장의 β -세포에 의해 분비된 폴리펩티드 호르몬이다. 인슐린은 2개의 사슬-간 이황화 가교에 의해 함께 연결되어 있는 A 및 B 사슬로 표시된 2개의 폴리펩티드 사슬로 구성된다. 인간, 돼지 및 소 인슐린에서, A 및 B 사슬은 각각 21 및 30개의 아미노산 잔기를 함유한다. 그러나, 종에 따라, 두 사슬의 상이한 위치에 존재하는 아미노산 잔기들 중에는 변화가 있다. 유전자 엔지니어링의 광범위한 사용은 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기의 교환, 결실 및 첨가에 의해 자연적으로 발생하는 인슐린의 유사체들을 제조하는 것을 가능하게 만들었다. 인슐린은 당뇨병 및 그것과 관련되거나 또는 그것으로부터 유발된 질환들의 치료에 사용된다.

[0003] 수십년 동안, 상이한 작용 기간을 가지는 인슐린 제제가 개발되어 왔고, 시판되었으며 그런 제제들의 일반적인 실례들은 장기-작용 인슐린 제제, 중기 작용 인슐린 제제 및 속효성 인슐린 제제이다. 많은 환자들이 매주, 매달 및 매년, 그리고 임의로 수십년 동안 하루에 2 내지 4회 주사를 맞는다. 오늘날까지, 매일 피하 주사를 맞는 것보다 덜 자주 투여하기 위해 승인된 기초 인슐린 제품은 없다. 예를 들어, 대부분의 매일 주사의 불편함은 매우 긴 작용 기간을 가지는 인슐린 유도체를 사용함으로써 감소될 수 있다.

[0004] WO 2010/049488 및 WO 2011/161125를 포함한 다양한 특허 출원들은 긴 간격으로 인슐린 유도체를 투여하는 가능성을 언급한다. WO 2009/115469는 적어도 하나의 소수성 아미노산이 친수성 아미노산으로 치환되어 있는 특정 아실화 프로테아제 안정화된 인슐린에 관련된다.

[0005] 만약 대략 주 1회로 투여하기 위한 기초 인슐린 제제를 활용할 수 있다면, 당뇨병 환자들에게는 매우 바람직할 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 선행 기술의 단점을 중 적어도 하나를 극복하거나 개선하는 것, 또는 유용한 대체물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 측면은 긴 약물동역학적 (이하 PK) 프로필을 가짐으로써, 예컨대 그로써 주 1회 또는 그것보다 적은 피하 치료가 당뇨병 환자의 기초 인슐린 치료에 대한 요구의 만족스러운 치료가 될 인슐린 유도체의 제공에 관한 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 측면은 피하 투여 후에 긴 PK 프로필, 예컨대 인간 인슐린의 PK 프로필보다 긴 PK 프로필을 가지는 인슐린 유도체의 제공에 관련된다. 이와 관련하여, PK 프로필은 하기 실시예 5 및 6에서 설명되는 것과 같이 측정될 수 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 측면은 임의로 아연을 함유하는 수성 배지에서 높은 용해도, 예컨대 인간 인슐린의 용해도보다 높은 용해도를 가지는 인슐린 유도체의 제공에 관련된다. 이와 관련하여, 용해도는 하기 실시예 7에서 설명되는 것과 같이 측정될 수 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 측면은 제조 후 37°C 이하에서 적어도 4주 보관 후 측정될 때, 아연, 예컨대 인슐린 6량체당 적어도 5개의 아연 이온을 함유하는 수성 배지에 가용성인 인슐린 유도체의 제공에 관련된다. 이와 관련하여, 용해도는 예컨대 하기 실시예 7에서 설명되는 것과 같이 측정될 수 있다.

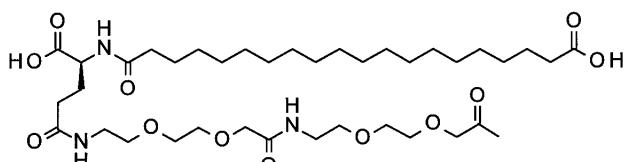
[0011] 본 발명의 또 다른 측면은 제조 후 24 내지 48시간 이내에 측정될 때, 아연, 예컨대 인슐린 6량체당 적어도 5개의 아연 이온을 함유하는 수성 배지에 가용성인 인슐린 유도체의 제공에 관련된다. 이와 관련하여, 용해도는 예컨대 하기 실시예 7에서 설명되는 것과 같이 측정될 수 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 측면은 효소, 예컨대 단백질 가수분해 효소, 예를 들면 인간의 장에 존재하는 단백질 가수분해 효소, 예컨대 펩신, 카이모트립신 및 카르복시펩티다제 A에 대해 양호한 안정성을 가지고 있는 인슐린 유도체의 제공에 관련된다. 이와 관련하여, 효소들에 대한 안정성은 WO 2008/034881의 실시예 1에서 설명되는 것과 같이 측정될 수 있다.

- [0013] 본 발명의 또 다른 측면은 보관시, 예컨대 5°C 및 30°C에서 예컨대 각각 2년 및 2주 동안 보관시 양호한 안정성, 특히 화학적 안정성 및 물리적 안정성을 가지고 있는 인슐린 유도체의 제공에 관련된다. 이와 관련하여, 화학적 안정성은 하기 실시예 9 및 10에서 설명되는 것과 같이 측정될 수 있고 물리적 안정성은 하기 실시예 9 및 10에서 설명되는 것과 같이 측정될 수 있다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 측면은 당뇨병 환자들에게 경구로, 예컨대 매일 1회 효율적으로 투여될 수 있는 인슐린 유도체의 제공에 관련된다. 또한, 또는 다르게는, 본 발명은 높은 경구 생체이용률을 가지는 인슐린 유도체의 제공에 관련된다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 측면은 감소된 매일 변동, 예컨대 주 1회 피하 투여 후에 혈장 농도들 (C_{\max} 및 C_{\min}) 사이에 변화를 가지는 인슐린 유도체의 제공에 관련된다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 측면은 경구 투여 후 생체이용률의 그날그날의 변화에 대해 감소된 영향을 미치는 인슐린 유도체의 제공에 관련된다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 측면은 고효능을 가지는, 즉 낮은 약물 농도에서 큰 반응을 불러 일으키는 (주어진 강도 (intensity) 세기의 효과를 생성하는 데 필요한 양의 관점에서 표시된 약물 활성) 인슐린 유도체의 제공에 관련된다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 측면은 인슐린 수용체에 매우 잘 결합하는 인슐린 유도체의 제공에 관련된다. 이와 관련하여, 인슐린 수용체 친화성은 하기 실시예 2에서 설명되는 것과 같이 측정될 수 있다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 측면은 낮은 인슐린 수용체 친화성을 가지는 인슐린 유도체의 제공에 관련된다. 이와 관련하여, 인슐린 수용체 친화성은 하기 실시예 2에서 설명되는 것과 같이 측정될 수 있다.

과제의 해결 수단

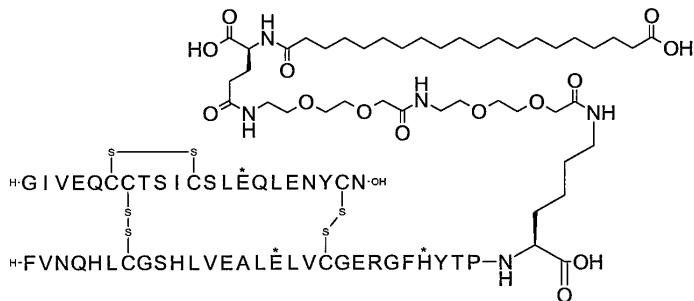
- [0020] 정의
- [0021] 용어 "당뇨병" 또는 "진성 당뇨병"은 1형 당뇨병, 2형 당뇨병, 임신성 당뇨병 (임신 중 당뇨병) 및 고혈당증을 유발하는 다른 상태를 포함한다. 그 용어는 췌장이 불충분한 양의 인슐린을 생성하거나, 또는 신체의 세포들이 인슐린에 적절하게 반응하지 못함으로써 세포들이 글루코오스를 흡수하지 못하는 대사 장애에 대해 사용된다. 그 결과로서, 글루코오스는 혈액 내에 축적된다.
- [0022] 인슐린-의존성 당뇨병 (IDDM) 및 청소년기-발병 당뇨병으로도 불리는 1형 당뇨병은 B-세포 파괴에 의해 유발되고, 통상적으로 절대 인슐린 결핍으로 이어진다. 비-인슐린-의존성 당뇨병 (NIDDM) 및 성인기-발병 당뇨병으로도 불리는 2형 당뇨병은 뚜렷한 인슐린 저항 및 그로써 인슐린 결핍 및/또는 인슐린 저항을 포함하는 뚜렷한 인슐린 분비 결핍과 관련된다.
- [0023] 본원에서, 인슐린의 명칭 부여는 다음의 원칙에 따라 시행된다: 명칭은 인간 인슐린에 대한 돌연변이 및 변형 (아실화)으로서 주어진다. 아실 부분의 명칭 부여에 대해서는, 그것은 IUPAC 명명법에 따라 및 다른 경우에는 웹티드 명명법으로서 시행된다. 예를 들어, 다음의 아실 부분:



- [0024]
- [0025] 은 예를 들면 "에이코산다이오일-γGlu-OEG-OEG", "에이코산다이오일-γGlu-2xOEG" 또는 "에이코산다이오일-gGlu-2xOEG" 또는 "19-카르복시노나데카노일-γGlu-OEG-OEG"로 명명될 수 있고, 이때 OEG는 아미노산 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, [2-(2-아미노에톡시)에톡시]아세트산에 대한 속기 표기이고 γGlu (및 gGlu)는 L-형태의 아미노산 감마 글루탐산에 대한 속기 표기이다. 다르게는, 아실 부분은 IUPAC 명명법 (OpenEye, IUPAC 스타일)에 따라 명칭이 부여될 수 있다. 이 명명법에 따르면, 발명의 상기 아실 부분은 다음의 이름이 부여된다: [2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-카르복시-4-(19-카르복시노나데카노일아미노)부타노일]-아미노]-에톡시]-아세틸]아미노]에톡시]아세틸].

[0026] 예를 들어, 실시예 1의 인슐린 (하기에 서열/구조가 제시됨)은 인간 인슐린의 위치 A14의 아미노산 Y가 E로 돌연변이되어 있고, 인간 인슐린의 위치 B16의 아미노산 Y가 E로 돌연변이되어 있으며, 인간 인슐린의 위치 B25의 아미노산 F가 H로 돌연변이되어 있고, 인간 인슐린의 위치 B29의 아미노산 K가 잔기 에이코산다이오일-gGlu-2xOEG에 의해, N° 로 표시되는, B29의 라이신 잔기의 엡실론 질소 상에서의 아실화에 의해 변형되어 있으며, 인간 인슐린의 위치 B30의 아미노산 T가 결실되어 있는 것을 나타내기 위해 "A14E, B16E, B25H, B29K(N° 에이코산다이오일-gGlu-2xOEG), desB30 인간 인슐린"으로 명명된다.

[0027] 하기 식에서 별표는 인간 인슐린과 비교하여 문제의 잔기가 상이한 (즉 돌연변이되어 있는) 것을 나타낸다.



SEQ ID No: 1 및 2

[0028]

[0029] 다른계는, 발명의 인슐린은 IUPAC 명명법 (OpenEye, IUPAC 스타일)에 따라 명명될 수 있다. 이 명명법에 따르면, 실시예 1의 인슐린 (즉 화합물 1)은 다음의 명칭이 배정된다: N{엡실론-B29}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-카르복시]-4-(19-카르복시노나데카노일 아미노)부타노일]-아미노]-에톡시]-에톡시]아세틸]아미노]에톡시]에톡시]아세틸]-[GluA14,GluB16,HisB25], des-ThrB30-인슐린(인간).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 발명의 요약

[0031] 본 발명은 인슐린 유사체의 유도체, 즉 A14E, B16E, B25H, B29K(N(eps)에이코산다이오일-gGlu-2xOEG), desB30 인간 인슐린 (화합물 1)에 관한 것이다.

[0032] 놀랍게도, A14E, B16E, B25H, B29K(N(eps)에이코산다이오일-gGlu-2xOEG), desB30 인간 인슐린은 상기 목적들을 충분하게 만족시키는 것이 발견되었다. 예를 들어, 주 1회 또는 그것보다 더 적게 화합물 1을 사용한 피하 치료는 기초 인슐린 치료가 필요한 당뇨병 환자의 만족스러운 치료가 될 것이다. 나아가, 화합물 1은 임의로 아연을 함유하고 있는 수성 배지에서 높은 용해도를 가진다. 한 측면으로, 화합물 1은 인간 인슐린의 용해도보다 높은 용해도를 가진다.

[0033] 한 측면으로, 화합물 1은 아연, 예컨대 인슐린 6량체당 적어도 5개의 아연 이온, 인슐린 6량체당 적어도 6개의 아연 이온, 인슐린 6량체당 적어도 7개의 아연 이온, 인슐린 6량체당 적어도 8개의 아연 이온 또는 인슐린 6량체당 적어도 9개의 아연 이온을 함유하고 있는 수성 배지에 가용성이고, 이때 그 용해도는 제조 후 37°C 이하에서 적어도 4주 동안 보관한 후에 측정된다.

[0034] 발명의 한 측면으로, 화합물 1은 아연, 예컨대 인슐린 6량체당 적어도 5개의 아연 이온, 인슐린 6량체당 적어도 6개의 아연 이온, 인슐린 6량체당 적어도 7개의 아연 이온, 인슐린 6량체당 적어도 8개의 아연 이온, 인슐린 6량체당 적어도 9개의 아연 이온, 인슐린 6량체당 적어도 10개의 아연 이온, 인슐린 6량체당 적어도 11개의 아연 이온 또는 인슐린 6량체당 적어도 12개의 아연 이온을 함유하고 있는 수성 배지에 가용성이고, 이때 그 용해도는 제조 후 24 내지 48시간 내에 측정된다.

[0035] 한 측면으로, 용해도는 하기 실시예 7에서 설명되는 것과 같이 측정된다.

[0036] 화합물 1을 함유하고 있는 약학 조성물은 그 자체로 알려져 있는 방식으로, 즉 유사한 인슐린 조성물에서 통상적으로 사용되는 부형제를 사용함으로써 제조될 수 있다.

[0037] 화합물 1을 함유하고 있는 주사가능한 약학 조성물은 필요에 따라 원하는 최종 생성물을 제공하기 위해 성분들을 용해시키고 혼합하는 것을 포함하는 약학 산업의 종래 기법들을 사용하여 제조될 수 있다. 그로써, 한 과정에 따르면, 화합물 1은 제조하고자 하는 약학 조성물의 최종 부피보다 다소 적은 양의 물에 용해된다. 등장성

제제, 보존제 및 완충제가 필요에 따라 첨가되고 용액의 pH 값이 필요에 따라 산, 예를 들면 염산, 또는 염기, 예를 들면 수성 수산화나트륨을 필요에 따라 사용하여 조정된다. 마지막으로, 용액의 부피는 성분들의 원하는 농도를 제공하기 위하여 물을 사용하여 조정된다.

[0038] 보다 정확하게, 본 발명의 인슐린 제제, 예를 들어 용액은 화합물 1을 약간 산성 조건에서 수성 배지에 용해시킴으로써 제조될 수 있다. 수성 배지는 예컨대 긴장성 (tonicity) 조절제의 첨가에 의해 등장성으로 만들어진다. 나아가, 수성 배지는 예컨대 완충제, 보존제 및 이온을 함유할 수 있다. 용액의 pH 값은 잠재적인 침전을 피하기 위해 본 발명의 화합물의 등전점에 너무 가까워지지 않도록 하면서 중성 쪽으로 조정된다. 최종 인슐린 제제의 pH 값은 아연 이온의 농도 및 본 발명의 화합물의 농도에 따라 달라진다. 인슐린 제제는 예를 들면 멸균 여과에 의해 멸균성으로 만들어진다.

[0039] 약학 조성물은 하나 또는 그 이상의 부형제를 함유할 수 있다.

[0040] 용어 "부형제"는 광범위하게 활성 치료 성분(들) 이외의 어떠한 성분을 말한다. 부형제는 불활성 물질, 비활성 물질 및/또는 의학적으로 활성이 아닌 물질일 수 있다.

[0041] 부형제는 약학 조성물에 따라 다양한 목적으로, 예컨대 담체, 비히클, 희석제, 정제 보조제로서, 및/또는 활성 물질의 투여 및/또는 흡수를 향상시키기 위하여 작용할 수 있다. 부형제의 실례로는, 그것들에 한정되지는 않지만, 희석제, 완충제, 보존제, 긴장성 조절제 (또한 긴장성 제제 또는 등장성 제제로도 알려져 있음), 킬레이트 화제, 계면활성제, 프로테아제 억제제, 습윤제, 유화제, 항산화제, 벌크화제, 금속 이온, 유성 비히클, 단백질 및/또는 쌍성 이온 및 안정화제를 포함한다.

[0042] 다양한 부형제들을 포함하는 약학적으로 활성인 성분들의 약학 조성물은 기술분야에 공지되어 있고, 예컨대 Remington: The Science and Practice of Pharmacy (예컨대 19판 (1995), 및 어떠한 후기 편집판)을 참조한다.

[0043] 인슐린 조성물은 알려져 있는 방식 자체로, 예컨대 의사의 일반적인 상식과 조합된 환자의 일반적 상식에 따라 투여된다. 본 발명은 환자가 편리한 대로 최상으로 사용된다. 그러므로, 각 환자에 대해 단위용량이 매일보다 적게 투여되는 특정 투여 간격이 탐색될 것이다. 그러므로 최종 사용 방식은 제품의 역량 및 환자의 성향 및 선호에 따라 달라진다. 이것은 어떠한 인슐린 제품의 효과가 개별적인 환자의 인슐린 요구 및 상기 인슐린의 약물 동역학적 작용에 대한 민감성 및 마지막으로 또한 주어진 상황에서 환자의 선호에 대한 민감성에 따라 달라진다는 사실 때문이다. 이를 조건은 더 긴 기간 (년수) 및 날마다의 두 관점에서 시간의 경과에 따라 변화할 수 있다. 어떠한 환자에 대한 최적 용량 수준은 환자의 연령, 체중, 신체 활동 및 식이요법을 포함한 다양한 인자들, 다른 약물과의 가능한 조합 및 치료될 상태의 심각성에 따라 달라질 것이다. 단위용량 처방은 각각의 개별 환자에 대해 기술분야의 숙련자들에 의해 공지된 인슐린 조성물에 대한 것과 유사한 방식으로 결정되겠지만, 단위용량 간격과 관련된 본 발명의 교시들이 고려되어야 한다.

[0044] 환자들의 편리를 위해, 환자들은 화합물 1의 투여로부터 화합물 1의 다음 투여까지의 시간 간격 (시차)이, 투여 일 수로 계수될 때, 동일한 길이이거나 또는 대략 동일한 길이인 것을 선호한다고 추정된다. 환자들은 화합물 1의 투여가 주마다 1회, 즉 매주 동일한 날에, 예컨대 매주 일요일에 이루어지는 것을 선호할 것으로 예상될 수 있다. 이것은 1개월, 6개월 또는 1년의 기간 동안 평균적으로 계산할 때 7일마다의 화합물 1의 투여일 것이고 더 자주 투여되지 않는다. 일부 환자들에 대해, 1개월, 6개월 또는 1년의 기간 동안 평균적으로 계산할 때 6일마다 또는 대략 6일마다 화합물 1이 투여되고 더 자주 투여되지 않는 것이 바람직할 수 있다. 다른 환자들에 대해, 화합물 1은 1개월, 6개월 또는 1년의 기간 동안 평균적으로, 계산할 때 5일마다 또는 대략 5일마다 투여되고 더 자주 투여되지 않는 것이 바람직할 수 있다. 다른 환자들에 대해, 화합물 1은 1개월, 6개월 또는 1년의 기간 동안 평균적으로 계산할 때 4일마다 또는 대략 4일마다 투여되고 더 자주 투여되지 않는 것이 바람직할 수 있다. 또 다른 환자들은 화합물 1이 1개월, 6개월 또는 1년의 기간 동안 평균적으로 계산할 때 주 2회, 예컨대 각각의 투여 사이에 약 3, 4일의 간격이 있는 것이 유리할 수 있다. 일부 환자들에 대해, 화합물 1은 1개월, 6개월 또는 1년의 기간 동안 평균적으로 계산할 때 3일마다 또는 대략 3일마다 투여되고 더 자주 투여되지 않는 것이 바람직할 수 있다. 다른 환자들에 대해, 화합물 1은 1개월, 6개월 또는 1년의 기간 동안 평균적으로 계산할 때 이틀마다 또는 대략 이틀마다 투여되고 더 자주 투여되지 않는 것이 바람직할 수 있다. 일부 환자들에 대해, 화합물 1은 1개월, 6개월 또는 1년의 기간 동안 평균적으로 계산할 때 8일마다 또는 대략 8일마다 투여되고 더 자주 투여되지 않는 것이 바람직할 수 있다. 또 다른 환자들은 정확하게 동일한 길이 (일수로 계산할 때)의 시간 간격으로, 주마다, 달마다 또는 해마다 화합물 1이 투여되지 않을 수 있다. 일부 환자들은 1개월, 6개월 또는 1년의 기간 동안 평균적으로 계산할 때 때로 6일마다 내지 8일마다의 시간 간격으로 화합물 1이 투여되고 더 자주 투여되지 않을 수 있다. 다른 환자들은 1개월, 6개월 또는 1년의 기간 동안 평균적으로 계산할 때 때로

5일마다 내지 7일마다의 시간 간격으로 화합물 1이 투여되고 더 자주 투여되지 않을 수 있다. 또 다른 환자들은 1개월, 6개월 또는 1년의 기간 동안 평균적으로 계산할 때 때로 4일마다 내지 8일마다의 시간 간격으로 화합물 1이 투여되고 더 자주 투여되지 않을 수 있다. 본원에서 언급된 시간 간격은 표시된 주, 개월 또는 년의 기간 내의 평균 시간 간격으로서 인지되어야 한다. 본원에서, 용어 "일(날)"은 24시간 (즉 주간 및 야간)을 말하는 것이고, 용이함을 위해, 24로 나눌 수 없는 시간의 수는 일의 전체 수로 모아지는 것으로 의도된다. 그러므로, 예컨대 30시간은 1일에 해당되고 40시간은 2일에 해당된다. 상기 언급된 투여는 비경구적인 것이다.

[0045] 환자들은 약 0.2 IU/kg 체중/일 이상 약 1 IU/kg 체중/일 아래의 매일 기초 인슐린 필요를 가질 수 있고, 나아가, 환자들은 약 1 IU/kg 체중/일 이상의 총 (즉 기초 플러스 식사의) 매일 인슐린 필요를 가질 수 있다. 그러나, 이들 범위는 환자마다 상당히 달라질 수 있고 여러 환자들의 경우 다소 본원에서 언급되는 범위 밖에 있을 수 있다.

[0046] 본 발명에 대한 일차 표적인 질병 및 상태는 당뇨병 (1형 또는 2형) 또는 고혈당증을 특징으로 하는 다른 상태뿐 아니라, 일반적으로 인슐린의 대사 효과가 임상적으로 관련이 있거나 관심의 대상이 되는 대사적 질환 및 상태, 예컨대 전-당뇨병, 순상된 글루코오스 내성, 대사 증후군, 비만, 악액질, 생체 내 베타-세포 손실/사멸, 과잉 식욕 및 염증이다. 이들 유형의 상태는 모두 그 질환 또는 상태를 가지고 있는 대상에서 안정한 대사 상태로부터 이익을 얻는 것으로 알려져 있거나 그렇게 여겨진다. 어쨌든, 인슐린의 투여가 포함되어 있는 치료 처방은 본 발명의 교시를 포함시킴으로써 변형될 수 있는데, 그것은 그런 치료법이 본원에 제공된 교시를 따라 연장된 작용 프로필의 인슐린의 투여를 포함할 것임을 의미한다.

[0047] 본 발명을 실시하기 위하여, 화합물 1은 그런 치료를 필요로 하는 환자들에게 비경구적으로 투여될 수 있다. 비경구 투여는 주사기, 임의로 펜-형 주사기를 사용하여 피하, 근육 내 또는 정맥 내 주사에 의해 수행될 수 있다. 다르게는, 비경구 투여는 주입 펌프에 의하여 수행될 수 있다. 추가의 옵션은 인슐린 조성물을 경구로, 코로 또는 폐로, 바람직하게, 논의되는 목적에 대해 특수하게 디자인된 약학 조성물, 분말 또는 액체로 투여하는 것이다.

[0048] 다르게는, 본 발명을 실시하기 위하여, 화합물 1은 그런 치료를 필요로 하는 환자에게 경구로 투여될 수 있다. 경구 투여는 경구 투여용 고체, 반고체 또는 액체 약학 조성물에 의해 수행될 수 있다.

[0049] 본 발명의 방법의 구체예들은 화합물 1의 투여에 속효성 (fast-acting) 자연 발생 인슐린, 인슐린 유사체 또는 인슐린 유도체의 보다 빈번한 투여 및/또는 비-인슐린 항-당뇨병 약물의 투여가 보충되는 것들을 포함한다. 본 발명의 한 구체예에서, 화합물 1의 투여는 비-인슐린 항-당뇨병 약물, 예컨대 메트포르민의 투여가 보충된다.

본 발명의 바람직한 특징

[0051] 상기 진술을 요약하고 보충하기 위하여, 본 발명의 특징 및 조항들은 다음과 같다:

[0052] 1. A14E, B16E, B25H, B29K(N(eps)에이코산다이오일-gGlu-2xOEG), desB30 인간 인슐린 (화합물 1).

[0053] 2. 화합물 1을 포함하는 약학 조성물.

[0054] 3. 의약으로서 사용하기 위한 화합물 1.

[0055] 4. 당뇨병의 치료 또는 예방을 위한 약학 조성물의 제조에 사용하기 위한 화합물 1.

[0056] 5. 1형 및/또는 2형 당뇨병의 치료 또는 예방을 위한 약학 조성물의 제조에 사용하기 위한 화합물 1.

[0057] 6. 화합물이 적어도 1개월, 6개월 또는 1년의 기간 동안, 평균적으로, 이를마다 또는 그것보다 적은 빈도로 동일한 환자에게 투여되고, 상기 화합물은 동일한 환자에게 더 자주 투여되지 않는, 당뇨병의 치료에 사용하기 위한 화합물 1.

[0058] 7. 화합물이 적어도 1개월, 6개월 또는 1년의 기간 동안, 평균적으로, 3일마다 또는 그것보다 적은 빈도로 투여되고, 상기 화합물은 동일한 환자에게 더 자주 투여되지 않는, 당뇨병의 치료에 사용하기 위한 화합물 1.

[0059] 8. 화합물이 적어도 1개월, 6개월 또는 1년의 기간 동안, 평균적으로, 주 2회 또는 그것보다 적은 빈도로 투여되고, 상기 화합물은 동일한 환자에게 더 자주 투여되지 않는, 당뇨병의 치료에 사용하기 위한 화합물 1.

[0060] 9. 화합물이 적어도 1개월, 6개월 또는 1년의 기간 동안, 평균적으로, 4일마다 또는 그것보다 적은 빈도로 투여되고, 상기 화합물은 동일한 환자에게 더 자주 투여되지 않는, 당뇨병의 치료에 사용하기 위한 화합물 1.

[0061] 10. 화합물이 적어도 1개월, 6개월 또는 1년의 기간 동안, 평균적으로, 5일마다 또는 그것보다 적은 빈도로 투여되고, 상기 화합물은 동일한 환자에게 더 자주 투여되지 않는, 당뇨병의 치료에 사용하기 위한 화합물 1.

여되고, 상기 화합물은 동일한 환자에게 더 자주 투여되지 않는, 당뇨병의 치료에 사용하기 위한 화합물 1.

[0062] 11. 화합물이 적어도 1개월, 6개월 또는 1년의 기간 동안, 평균적으로, 6일마다 또는 그것보다 적은 빈도로 투여되고, 상기 화합물은 동일한 환자에게 더 자주 투여되지 않는, 당뇨병의 치료에 사용하기 위한 화합물 1.

[0063] 12. 화합물이 적어도 1개월, 6개월 또는 1년의 기간 동안, 평균적으로, 매주 1회 또는 그것보다 적은 빈도로 투여되고, 상기 화합물은 동일한 환자에게 더 자주 투여되지 않는, 당뇨병의 치료에 사용하기 위한 화합물 1.

[0064] 13. 화합물이 8일마다 또는 그것보다 자주 투여되는, 당뇨병의 치료에 사용하기 위한 화합물 1.

[0065] 14. 화합물이 9일마다 또는 그것보다 자주 투여되는, 당뇨병의 치료에 사용하기 위한 화합물 1.

[0066] 15. 화합물이 10일마다 또는 그것보다 자주 투여되는, 당뇨병의 치료에 사용하기 위한 화합물 1.

[0067] 16. 화합물이 11일마다 또는 그것보다 자주 투여되는, 당뇨병의 치료에 사용하기 위한 화합물 1.

[0068] 17. 화합물이 12일마다 또는 그것보다 자주 투여되는, 당뇨병의 치료에 사용하기 위한 화합물 1.

[0069] 18. 화합물이 14일마다 또는 그것보다 자주 투여되는, 당뇨병의 치료에 사용하기 위한 화합물 1.

[0070] 19. 화합물이 21일마다 또는 그것보다 자주 투여되는, 당뇨병의 치료에 사용하기 위한 화합물 1.

[0071] 20. 현재의 또는 반복적인 치료가 1개월 이상 지속되는, 6 내지 19 조항 중 어느 하나에 따르는 화합물 1.

[0072] 21. 현재의 또는 반복적인 치료가 2개월 이상 지속되는, 6 내지 19 조항 중 어느 하나에 따르는 화합물 1.

[0073] 22. 현재의 또는 반복적인 치료가 3개월 이상 지속되는, 6 내지 19 조항 중 어느 하나에 따르는 화합물 1.

[0074] 23. 현재의 또는 반복적인 치료가 1년 이상 지속되는, 6 내지 19 조항 중 어느 하나에 따르는 화합물 1.

[0075] 24. 화합물이 비경구로, 바람직하게 피하, 근육 내 또는 정맥 내로 투여되는, 2 내지 23 조항 중 어느 하나에 따르는 화합물 1.

[0076] 25. 화합물이 경구로 투여되는, 2 내지 23 조항 중 어느 하나에 따르는 화합물 1.

[0077] 26. 당뇨병의 치료 또는 예방 방법으로, 화합물 1의 치료적 유효량을 치료가 필요한 대상에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

[0078] 27. 화합물 1의 치료적 유효량을 치료가 필요한 대상에게, 적어도 1개월, 6개월 또는 1년의 기간 동안, 평균적으로, 이틀마다 또는 그것보다 적은 빈도로 동일한 환자에게 투여하는 것을 포함하고, 상기 화합물은 동일한 환자에게 더 자주 투여되지 않는, 26 조항에 따르는 방법.

[0079] 28. 화합물 1의 치료적 유효량을 치료가 필요한 대상에게, 적어도 1개월, 6개월 또는 1년의 기간 동안, 평균적으로, 3일마다 또는 그것보다 적은 빈도로 동일한 환자에게 투여하는 것을 포함하고, 상기 화합물은 동일한 환자에게 더 자주 투여되지 않는, 26 조항에 따르는 방법.

[0080] 29. 화합물 1의 치료적 유효량을 치료가 필요한 대상에게, 적어도 1개월, 6개월 또는 1년의 기간 동안, 평균적으로, 주 2회 또는 그것보다 적은 빈도로 동일한 환자에게 투여하는 것을 포함하고, 상기 화합물은 동일한 환자에게 더 자주 투여되지 않는, 26 조항에 따르는 방법.

[0081] 30. 화합물 1의 치료적 유효량을 치료가 필요한 대상에게, 적어도 1개월, 6개월 또는 1년의 기간 동안, 평균적으로, 4일마다 또는 그것보다 적은 빈도로 동일한 환자에게 투여하는 것을 포함하고, 상기 화합물은 동일한 환자에게 더 자주 투여되지 않는, 26 조항에 따르는 방법.

[0082] 31. 화합물 1의 치료적 유효량을 치료가 필요한 대상에게, 적어도 1개월, 6개월 또는 1년의 기간 동안, 평균적으로, 5일마다 또는 그것보다 적은 빈도로 동일한 환자에게 투여하는 것을 포함하고, 상기 화합물은 동일한 환자에게 더 자주 투여되지 않는, 26 조항에 따르는 방법.

[0083] 32. 화합물 1의 치료적 유효량을 치료가 필요한 대상에게, 적어도 1개월, 6개월 또는 1년의 기간 동안, 평균적으로, 6일마다 또는 그것보다 적은 빈도로 동일한 환자에게 투여하는 것을 포함하고, 상기 화합물은 동일한 환자에게 더 자주 투여되지 않는, 26 조항에 따르는 방법.

[0084] 33. 화합물 1의 치료적 유효량을 치료가 필요한 대상에게, 적어도 1개월, 6개월 또는 1년의 기간 동안, 평균적으로, 주마다 1회 또는 그것보다 적은 빈도로 동일한 환자에게 투여하는 것을 포함하고, 상기 화합물은 동일한

환자에게 더 자주 투여되지 않는, 26 조항에 따르는 방법.

[0085] 34. 화합물 1의 치료적 유효량을 치료가 필요한 대상에게, 8일마다 또는 그것보다 자주 동일한 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 26 조항에 따르는 방법.

[0086] 35. 화합물 1의 치료적 유효량을 치료가 필요한 대상에게, 9일마다 또는 그것보다 자주 동일한 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 26 조항에 따르는 방법.

[0087] 36. 화합물 1의 치료적 유효량을 치료가 필요한 대상에게, 10일마다 또는 그것보다 자주 동일한 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 26 조항에 따르는 방법.

[0088] 37. 화합물 1의 치료적 유효량을 치료가 필요한 대상에게, 11일마다 또는 그것보다 자주 동일한 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 26 조항에 따르는 방법.

[0089] 38. 화합물 1의 치료적 유효량을 치료가 필요한 대상에게, 12일마다 또는 그것보다 자주 동일한 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 26 조항에 따르는 방법.

[0090] 39. 화합물 1의 치료적 유효량을 치료가 필요한 대상에게, 14일마다 또는 그것보다 자주 동일한 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 26 조항에 따르는 방법.

[0091] 40. 화합물 1의 치료적 유효량을 치료가 필요한 대상에게, 21일마다 또는 그것보다 자주 동일한 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 26 조항에 따르는 방법.

[0092] 41. 화합물 1을 사용하는 당뇨병에 대한 현재의 또는 반복적인 치료가 1개월 이상 지속되는, 동일한 환자에 대한 화합물 1의 치료적 유효량을 치료가 필요한 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 26 조항에 따르는 방법.

[0093] 42. 화합물 1을 사용하는 당뇨병에 대한 현재의 또는 반복적인 치료가 2개월 이상 지속되는, 동일한 환자에 대한 화합물 1의 치료적 유효량을 치료가 필요한 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 26 조항에 따르는 방법.

[0094] 43. 화합물 1을 사용하는 당뇨병에 대한 현재의 또는 반복적인 치료가 3개월 이상 지속되는, 동일한 환자에 대한 화합물 1의 치료적 유효량을 치료가 필요한 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 26 조항에 따르는 방법.

[0095] 44. 화합물 1을 사용하는 당뇨병에 대한 현재의 또는 반복적인 치료가 1년 이상 지속되는, 동일한 환자에 대한 화합물 1의 치료적 유효량을 치료가 필요한 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 26 조항에 따르는 방법.

[0096] 45. 동일한 환자에 대한 화합물 1의 치료적 유효량을 치료가 필요한 대상에게 비경구로, 바람직하게 피하로, 근육 내로 또는 정맥 내로 투여하는 것을 포함하는, 26 조항에 따르는 방법.

[0097] 46. 동일한 환자에 대한 화합물 1의 치료적 유효량을 치료가 필요한 대상에게 경구로 투여하는 것을 포함하는, 26 조항에 따르는 방법.

[0098] 47. 화합물 1을 포함하는 수용액.

[0099] 48. 화합물 1 및 인슐린 6량체당 적어도 5개의 아연 이온을 포함하는 수용액.

[0100] 49. 화합물 1 및 인슐린 6량체당 적어도 6개의 아연 이온을 포함하는 수용액.

[0101] 50. 화합물 1 및 인슐린 6량체당 적어도 7개의 아연 이온을 포함하는 수용액.

[0102] 51. 화합물 1 및 인슐린 6량체당 적어도 8개의 아연 이온을 포함하는 수용액.

[0103] 52. 화합물 1 및 인슐린 6량체당 적어도 9개의 아연 이온을 포함하는 수용액.

[0104] 53. 화합물 1 및 인슐린 6량체당 적어도 10개의 아연 이온을 포함하는 수용액.

[0105] 54. 화합물 1 및 인슐린 6량체당 적어도 11개의 아연 이온을 포함하는 수용액.

[0106] 55. 화합물 1 및 인슐린 6량체당 적어도 12개의 아연 이온을 포함하는 수용액.

[0107] 56. pH가 7 내지 8의 범위에 있는, 47 내지 55 조항 중 어느 한 조항에 따르는 수용액.

[0108] 57. pH가 약 7.4인, 47 내지 55 조항 중 어느 한 조항에 따르는 수용액.

[0109] 58. 화합물 1 및 하나 이상의 부형제를 포함하는 약학 조성물.

[0110] 59. 화합물 1 및, 희석제, 완충제, 보존제, 긴장성 조절제, 킬레이트화제, 계면활성제, 프로테아제 억제제, 습

윤제, 유화제, 항산화제, 벌크화제, 금속 이온, 유성 비히클, 단백질 및/또는 쌍성 이온 및 안정화제로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 부형제를 포함하는 약학 조성물.

- [0111] 60. 인슐린 6량체당 적어도 4.5개의 아연 이온을 포함하는, 59 조항에 따르는 약학 조성물.
- [0112] 61. 인슐린 6량체당 적어도 5개의 아연 이온을 포함하는, 59 조항에 따르는 약학 조성물.
- [0113] 62. 인슐린 6량체당 적어도 6개의 아연 이온을 포함하는, 59 조항에 따르는 약학 조성물.
- [0114] 63. 인슐린 6량체당 적어도 7개의 아연 이온을 포함하는, 59 조항에 따르는 약학 조성물.
- [0115] 64. 인슐린 6량체당 적어도 8개의 아연 이온을 포함하는, 59 조항에 따르는 약학 조성물.
- [0116] 65. 인슐린 6량체당 적어도 9개의 아연 이온을 포함하는, 59 조항에 따르는 약학 조성물.
- [0117] 66. 인슐린 6량체당 적어도 10개의 아연 이온을 포함하는, 59 조항에 따르는 약학 조성물.
- [0118] 67. 인슐린 6량체당 적어도 11개의 아연 이온을 포함하는, 59 조항에 따르는 약학 조성물.
- [0119] 68. 인슐린 6량체당 적어도 12개의 아연 이온을 포함하는, 59 조항에 따르는 약학 조성물.
- [0120] 69. pH가 7 내지 8의 범위에 있는, 59 내지 68 조항 중 어느 한 조항에 따르는 약학 조성물.
- [0121] 70. pH가 약 7.4인, 59 내지 68 조항 중 어느 한 조항에 따르는 약학 조성물.
- [0122] 71. 수용액의 형태로 존재하는, 59 내지 68 조항 중 어느 한 조항에 따르는 약학 조성물.
- [0123] 72. 정제의 형태로 존재하는, 59 내지 68 조항 중 어느 한 조항에 따르는 약학 조성물.
- [0124] 73. 연질 또는 경질 캡슐과 같은 캡슐에 함유된 고체, 반고체 또는 액체 제제의 형태로 존재하는, 59 내지 68 조항 중 어느 한 조항에 따르는 약학 조성물.
- [0125] 74. 본원에서 기술되는 특징 및 또는 청구항 및/또는 특징 및/또는 청구범위의 조합에 의해 정의되는 어떠한 신규한 생성물, 장치, 방법 또는 용도.
- [0126] 본원에서 기술되는 구체예들의 둘 또는 그 이상의 어떠한 조합이든지 본 발명의 범주 내에 있는 것으로 여겨진다.
- [0127] **실시예**
- [0128] 발명은 다음의 실시예를 참조로 한층 더 예시되며, 실시예는 청구되는 발명의 범주를 어떤 방식으로든 제한하는 것으로 의도되지 않는다.
- [0129] 다음의 약어들이 본원에서 사용된다:
- [0130] β Ala는 베타-알라닐이다;
- [0131] Aoc는 8-아미노옥탄산이다;
- [0132] tBu는 삼차-부틸이다;
- [0133] DCM은 다이클로로메탄이다;
- [0134] DIC는 다이아이소프로필카르보다이이미드이다;
- [0135] DIPEA = DIEA는 N,N -다이아이소프로필에틸아민이다;
- [0136] DMF는 N,N -다이메틸포름아미드이다;
- [0137] DMSO는 다이메틸 셀록사이드이다;
- [0138] EtOAc는 에틸 아세테이트이다;
- [0139] Fmoc는 9-플루오레닐메틸옥시카르보닐이다;
- [0140] γ Glu (gGlu)는 감마 L-글루타밀이다;
- [0141] D γ Glu (DgGlu)는 감마 D-글루타밀이다;

- [0142] HCl은 염산이다;
- [0143] HOAc는 아세트산이다;
- [0144] HOEt는 1-하이드록시벤조트라이아졸이다;
- [0145] NMP는 N-메틸피롤리돈이다;
- [0146] MeCN은 아세토니트릴이다;
- [0147] OEG는 [2-(2-아미노에톡시)에톡시]에틸카르보닐이다;
- [0148] Su는 석신이미딜-1-일 = 2,5-다이옥소-피롤리딘-1-일이다;
- [0149] OSu는 석신이미딜-1-일옥시 = 2,5-다이옥소-피롤리딘-1-일옥시이다;
- [0150] RPC는 역상 크로마토그래피이다;
- [0151] RT는 실온이다;
- [0152] TFA는 트라이플루오로아세트산이다;
- [0153] THF는 테트라하이드로푸란이다;
- [0154] TNBS는 2,4,6-트라이니트로벤젠-설폰산이다;
- [0155] TRIS는 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄이다; 및
- [0156] TSTU는 O-(N-석신이미딜)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 테트라플루오로보레이트이다.
- [0157] 다음의 실시예 및 일반적 과정은 명세서 및 합성 계획도에서 확인된 중간 화합물들 및 최종 생성물을 나타낸다. 본 발명의 화합물의 제조는 다음의 실시예들을 사용하여 상세하게 기술되지만, 기술된 화학적 반응들은 발명의 화합물의 제조에 대한 그것들의 일반적인 응용의 관점에서 개시된다. 때때로, 반응은 발명의 개시된 범주 내에 포함된 각 화합물에 대해 기술된 것과 같이 적용되지 않을 수도 있다. 그런 일이 일어나는 화합물들은 기술분야의 숙련자들에 의해 쉽게 인식될 것이다. 그런 경우에, 반응은 기술분야의 숙련자들에게 알려져 있는 종래의 변형에 의해, 즉 간접기들의 적절한 보호에 의해, 다른 종래 시약들의 변경에 의해 또는 반응 조건의 기본적인 변형에 의해 성공적으로 수행될 수 있다. 다르게는, 본원에 개시된 다른 반응들 또는 그렇지 않으면 종래 반응들은 발명의 해당하는 화합물들의 제조에 적용될 것이다. 모든 제조 방법에서, 모든 출발 물질은 공지되어 있거나 공지된 출발 물질로부터 쉽게 제조될 수 있다. 모든 온도는 섭씨 온도로 설정되고 다르게 표시되지 않는 한, 모든 부 및 백분율은 수율을 언급할 때에는 중량에 의한 것이고 모든 부는 용매 및 용출액을 언급할 때에는 부피에 의한 것이다.
- [0158] 벡터의 구성, 효모 발현, 인슐린 유사체의 처리 및 정제는 기술분야의 숙련자들에 의해 쉽게 인식되는 표준 기법들을 사용하여 시행될 수 있다. 인슐린 유사체의 제조의 한 가지 비-제한적인 실례는 앞서 기술되었다 (Glendorf T, Sorensen AR, Nishimura E, Pettersson I, & Kjeldsen T: Importance of the Solvent-Exposed Residues of the Insulin B Chain α -Helix for Receptor Binding; *Biochemistry* 2008 **47** 4743-4751). 간단히 설명하면, 돌연변이들은 중복 연장 PCR을 사용하여 인슐린 코딩 벡터에 도입된다. 인슐린 유사체들은 사카로마이세스 세례비시아에 균주 MT663에서 Ala-Ala-Lys 미니 C-펩티드를 가지는, 프로인슐린-유사 융합 단백질로서 발현된다. 단일-사슬 전구체들은 A. 라이티кус 엔도프로테아제를 사용하여 2-사슬의 desB30 유사체로 효소적으로 전환된다. 2-사슬 desB30 유사체로의 완전한 전환은 MALDI-TOF MS에 의해 확인되고, 그것의 순도는 산성 및 중성 pH 둘 다에서 RP-HPLC에 의해 측정된다.
- [0159] 발명의 화합물은 기술분야 내에서 전형적인 다음 과정들 중 하나 또는 그 이상을 사용함으로써 정제될 수 있다. 이들 과정은 -필요에 따라- 구배, pH, 염, 농도, 유속, 칼럼 등에 대해 변형될 수 있다. 불순물 프로필, 의문의 인슐린 유도체의 용해도 등과 같은 인자들에 따라, 이들 변형은 기술분야의 숙련자들에 의해 쉽게 인식될 수 있고 만들어질 수 있다.
- [0160] 산성 HPLC 또는 탈염 후에, 화합물들은 순수한 분획의 동결건조에 의해 분리된다. 중성 HPLC 또는 음이온 교환 크로마토그래피 후에, 화합물들은 탈염되고, 등전점 pH에서 침전되거나, 산성 HPLC에 의해 정제된다.
- [0161] 전형적인 정제 과정

- [0162] HPLC 시스템은 다음으로 구성되는 Gilson 시스템이다: 모델 215 액체 핸들러, 모델 322-H2 펌프 및 모델 155 UV 검출기. 검출은 전형적으로 210 nm 및 280 nm에서 이루어진다. Akta 정제기 FPLC 시스템 (Amersham Biosciences)은 다음으로 구성된다: 모델 P-900 펌프, 모델 UV-900 UV 검출기, 모델 pH/C-900 pH 및 전도성 검출기, 모델 Frac-950 분획 수집기. UV 검출은 전형적으로 214 nm, 254 nm 및 276 nm에서 이루어진다. Akta Explorer Air FPLC 시스템 (Amersham BioGE Health Caresciences)은 다음으로 구성된다: 모델 P-900 펌프, 모델 UV-900 UV 검출기, 모델 pH/C-900 pH 및 전도성 검출기, 모델 Frac-950 분획 수집기. UV 검출은 전형적으로 214 nm, 254 nm 및 276 nm에서 이루어진다.
- [0163] 산성 HPLC
- [0164] 칼럼: Phenomenex, Gemini, 5 μ , C18, 110 Å, 250x30 cm
- [0165] 유속: 20 mL/분
- [0166] 용출액: A: 물 중의 0.1% TFA,
- [0167] B: CH₃CN 중의 0.1% TFA
- [0168] 구배: 0 내지 7.5 분: 10% B
- [0169] 7.5 내지 87.5 분: 10% B 내지 60% B
- [0170] 87.5 내지 92.5 분: 60% B
- [0171] 92.5 내지 97.5 분: 60% B 내지 100% B
- [0172] 중성 HPLC
- [0173] 칼럼: Phenomenex, Gemini, C18, 5 μ m 250 x 30.00 mm, 110 Å
- [0174] 유속: 20 mL/분
- [0175] 용출액: A: 수성 10mM TRIS + 15mM (NH₄)SO₄ pH = 7.3 중의 20% CH₃CN,
- [0176] B: 80% CH₃CN, 20% 물
- [0177] 구배: 0 내지 7.5 분: 0% B
- [0178] 7.5 내지 52.5 분: 0% B 내지 60% B
- [0179] 52.5 내지 57.5 분: 60% B
- [0180] 57.5 내지 58 분: 60% B 내지 100% B
- [0181] 58 내지 60 분: 100% B
- [0182] 60 내지 63 분: 10% B
- [0183] 음이온 교환 크로마토그래피
- [0184] 칼럼: 150 mL (2.6x28cm) Poros 50HQ
- [0185] 유속: 25 mL/분
- [0186] 용출액: A 완충액: 15 mM TRIS, 50% 에탄올 중의 50 mM 암모늄아세테이트, pH 7.5 (1.6 mS/cm)
- [0187] B 완충액: 15 mM TRIS, 50% 에탄올 중의 500 mM 암모늄아세테이트, pH 7.5 (14 mS/cm)
- [0188] 구배: 20CV에 걸쳐 0 내지 80% B
- [0189] 고상 혼성
- [0190] 19-((S)-1-카르복시-3-{2-[2-({2-(2,5-다이옥소페놀리딘-1-일옥시카르보닐메톡시)에톡시]에틸카바모일}메톡시)에톡시]에틸카바모일}프로필카바모일)노나데칸산;
- [0191] (다른 명칭: 에이코산다이오일-gGlu-OEG-OEG-OSu)

- [0192] 19-((S)-1-카르복시-3-{2-[2-(2,5-다이옥소피롤리딘-1-일옥시카르보닐메톡시)에톡시]에틸카바모일}메톡시)에톡시]에틸카바모일}프로필카바모일)노나데칸산을 고상 펩티드 합성 기술분야의 숙련자들에게 잘 알려져 있는 과정들을 사용하여 고체 지지체 상에서 합성할 수 있다. 이 과정은 예컨대 Fmoc 보호된 아미노산의 폴리스티렌 2-클로로트라이틸클로라이드 수지에의 부착을 포함한다. 부착은 예컨대 트라이에틸 아민 또는 N,N-다이아이소프로필에틸아민 (하기 참조)와 같은 삼차 아민의 존재하에 유리 N-보호된 아미노산을 사용하여 이루어질 수 있다. 이 아미노산의 C-말단부 (수지에 부착되어 있음)는 발명의 원래의 인슐린에 결합되어 있는 합성 서열의 단부에 있다. Fmoc 아미노산의 수지에의 부착 후에, Fmoc 기는 예컨대 피페리딘 또는 다이에틸 아민과 같은 이차 아민을 사용하여, 이어서 다른 (또는 동일한) Fmoc 보호된 아미노산의 커플링 및 탈보호에 의해 탈보호된다. 합성 순서는 모노-삼차-부틸 보호된 지방(α , ω)2산, 즉 에이코산다이오산 모노-삼차-부틸 에스테르의 결합에 의해 종결된다. 수지로부터 화합물들의 절단은 0.5 내지 5% TFA/DCM (다이클로로메탄 중의 트라이플루오로아세트산), 아세트산 (예컨대 DCM 중의 10% 또는 HOAc/트라이플루오로에탄올/DCM 1:1:8) 또는 DCM 중의 헤카플루오로아이소프로판올과 같은 희석 산을 사용하여 이루어진다 (예컨대 "Organic Synthesis on Solid Phase", F.Z. Dorwald, Wiley-VCH, 2000. ISBN 3-527-29950-5; "Peptides: Chemistry and Biology", N. Sewald & H.-D. Jakubke, Wiley-VCH, 2002, ISBN 3-527-30405-3; and "The Combinatorial Chemistry Catalog" 1999, Novabiochem AG; 및 본원에서 인용된 참고문헌들). 이것은 카르복실산 보호기로서 화합물에 존재하는 삼차-부틸 에스테르가 탈보호되지 않는 것을 보장한다. 마지막으로, C-말단 카르복시기 (수지로부터 이탈된)는 예컨대 N-하이드록시석신이미드 에스테르 (OSu)로서 활성화되고, 직접 또는 정제 후에, 또는 부착에서 탈보호 후에 A14E, B16E, B25H, desB30 인간 인슐린에 대한 커플링제로서 사용된다.
- [0193] 다르게는, 아실화 시약 19-((S)-1-카르복시-3-{2-[2-(2,5-다이옥소-피롤리딘-1-일옥시카르보닐메톡시)에톡시]에틸카바모일}메톡시]에틸카바모일}프로필카바모일)노나데칸산은 용액 상 합성에 의해 제조될 수 있다:
- [0194] 모노-삼차-부틸 보호된 지방 2산, 에이코산다이오산 모노-삼차-부틸 에스테르를, 예컨대 하기 기술되는 OSu-에스테르로서 또는 기술분야의 숙련자들에게 공지되어 있는 어떠한 다른 활성화된 에스테르로서, 예컨대 HOBr- 또는 HOAt-에스테르로서 활성화한다. 이 활성 에스테르를 THF, DMF, NMP (또는 용매 혼합물)과 같은 적당한 용매 중에서, 예컨대 DIPEA 또는 트라이에틸아민과 같은 적당한 염기의 존재하에 글루탐산 α -삼차-부틸 에스테르와 커플링시킨다. 중간체를 예컨대 추출 과정에 의해 또는 크로마토그래피 과정에 의해 분리한다. 그 결과의 중간체를 다시 활성화시키고 (상기에서 기술된 것과 같이) 상기에서 기술된 것과 같이 OEG-OEG ([2-(2-{2-[2-(2-아미노에톡시)에톡시]아세틸아미노}에톡시)에톡시]아세트산)과 커플링시킨 후 이어서 TSTU로 활성화시켜서 아실화 시약 19-((S)-1-카르복시-3-{2-[2-(2,5-다이옥소피롤리딘-1-일옥시카르보닐메톡시)에톡시]에틸카바모일}메톡시]에틸카바모일}프로필카바모일)노나데칸산을 얻는다.
- [0195] 상기에서 기술한 방법에 의해 제조된 아실화 시약은 OSu 에스테르로서 활성화 후에 삼차-부틸 탈보호될 수 있다. 이것은 OSu-활성화된 삼차-부틸 보호된 아실화 시약의 TFA 처리에 의해 시행될 수 있다. A14E, B16E, B25H, desB30 인간 인슐린의 아실화 후에, 그 결과의 탈보호된 아실화된 A14E, B16E, B25H, desB30 인간 인슐린을, 예컨대 실시예 1에서 기술되는 것과 같이 얻는다.
- [0196] 만약 상기 방법들 중 어느 것에 의해 제조한 시약이 OSu 에스테르로서 활성화 후에 삼차-부틸 탈보호되지 않으면, A14E, B16E, B25H, desB30 인간 인슐린의 아실화로 해당하는 삼차-부틸 보호된 아실화된 A14E, B16E, B25H, desB30 인간 인슐린을 얻는다. 탈보호된 아실화된 A14E, B16E, B25H, desB30 인간 인슐린을 얻기 위하여, 보호된 인슐린은 탈보호되어야 한다. 이것은 탈보호된 아실화된 A14E, B16E, B25H, desB30 인간 인슐린을 얻기 위한 TFA 처리에 의해 시행될 수 있다.
- [0197] 다르게는, 아실화 시약은 하기에서 예시되는 카르복실산 기의 벤질 보호를 사용하여 용액 중에서 합성될 수 있다.
- [0198] 19-((S)-1-카르복시-3-{2-[2-(2,5-다이옥소-피롤리딘-1-일옥시카르보닐메톡시)에톡시]에틸카바모일}메톡시)에톡시]에틸카바모일}프로필카바모일)노나데칸산;
- [0199] (다른 명칭: 에이코산다이오일-gGlu-OEG-OEG-OSu)
- [0200] LCMS 방법 (LCMS)
- [0201] Waters Micromass ZQ 질량 분석계를 사용하여 Waters Alliance HT HPLC 시스템으로부터 용출 후에 샘플의 질량을 확인하였다.

[0202] 용출액: A: 물 중의 0.1% 트라이플루오로아세트산

[0203] B: 아세토니트릴 중의 0.1% 트라이플루오로아세트산

[0204] 칼럼: Phenomenex, Jupiter C4 50 X 4.60 mm, id: 5 μ m

[0205] 구배: 7.5분에 걸쳐 1.0 mL/분으로 10% 내지 90% B

[0206] 칼럼: Phenomenex, Jupiter 5 μ C4 300Å 50 x 4.60 mm

[0207] LC 방법: 10 내지 90% B 10분: A: 0.1% CH₃CN B: CH₃CN:

[0208] 0 내지 7.5 분: 10 내지 90% B

[0209] 7.5 내지 8.5 분: 90 내지 10% B

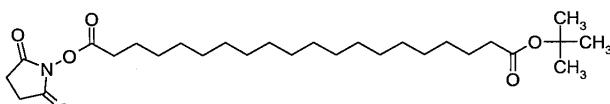
[0210] 8.5 내지 9.5 분 10% B

[0211] 유속: 1 mL/분

[0212] 9.5 내지 10.00 분 10% B

[0213] 유속: 0.1 mL/분

[0214] 에이코산다이오산 삼차-부틸 에스테르 N-하이드록시석신이미드 에스테르

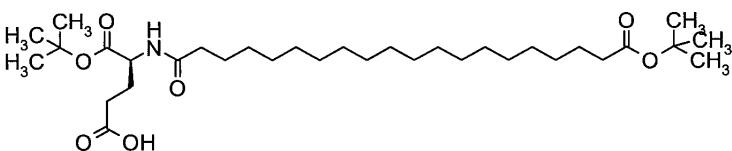


[0215]

[0216] 에이코산다이오산 모노-삼차-부틸 에스테르 (5 g, 12.54 mmol) 및 TSTU (4.53g, 15.05 mmol)를 THF (50 mL) 중에서 혼합하고, DIPEA (2.62 mL)를 첨가하고 그 결과의 구름상 혼합물을 RT에서 2시간 동안 교반한 후, DMF (30 mL)를 첨가하고, 그 결과의 투명한 용액을 추가로 밤새 교반하였다. 그 결과의 혼합물을 거의 건고상태로 증발시키고 그 잔류물을 져온 아세토니트릴과 혼합하여 침전물의 침전을 유발하였다. 그것을 여과하고 진공 중에서 밤새 건조시켜서, 6.01 g (97%)의 에이코산다이오산 삼차-부틸 에스테르 N-하이드록시석신이미드 에스테르를 얻었다.

[0217] MS (전기 분무): m/z: 440 (M-56 (tBu)).

[0218] (S)-2-(19-삼차-부톡시카르보닐노나데카노일아미노)펜탄다이오산 1-삼차-부틸 에스테르

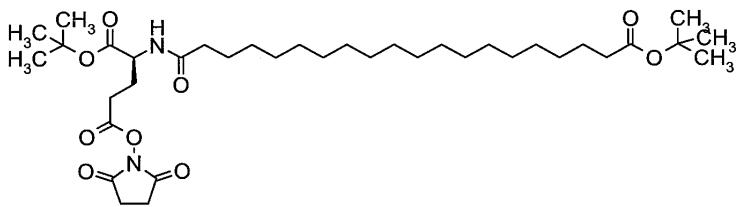


[0219]

[0220] 에이코산다이오산 삼차-부틸 에스테르 2,5-다이옥소-피롤리딘-1-일 에스테르 (6.01g, 12.124 mmol)를 THF (150 mL)에 녹이고 DMF/물 (1/1, 40 mL) 중의 H-Glu-OtBu (2.71 g, 13.33 mmol)의 슬러리와 함께 혼합하였다. 이것으로 겔-유사 용액이 생성되었고, 그것을 투명한 용액으로 가열하여 RT에서 3시간 동안 교반하였다. 그런 다음 용액을 증발시키고, 100 mL의 물을 첨가한 후 혼합물을 60°C로 가열하여 투명한 용액을 만들고, 그것은 냉각시 결정화되었다. 침전을 아세토니트릴로부터 재결정하고, 그 결정을 진공 중에서 건조시켰다. 수율 6.82 g (96%).

[0221] MS (전기 분무): m/z 584 (M+1).

[0222] (S)-2-(19-삼차-부톡시카르보닐노나데카노일아미노)펜탄다이오산 1-삼차-부틸 에스테르 5-(2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 에스테르



[0223]

[0224] (S)-2-(19-삼자-부톡시카르보닐노나데카노일아미노)펜탄다이오산 1-삼자-부틸 에스테르 (6.52g, 11.17 mmol)를 THF (100 mL)에 녹이고, DIPEA (2.14 mL)를 첨가한 후 아세토니트릴 (25 mL) 중의 TSTU (3.70 g, 12.29 mmol)의 용액을 첨가하였다. 그 혼합물을 RT에서 밤새 교반한 후, 증발시켜서 갈색을 띤 잔류물을 얻고, 그것을 아세토니트릴로부터 재결정하였다. 그것을 5°C에서 밤새 냉각시킨 후에 분말이 형성되었다. 그것을 THF에 녹이고 MgSO₄로 건조시킨 후, 여과하고 건고상태로 증발시켜서 6.17 g (81%)의 표제 화합물을 얻었다.

[0225]

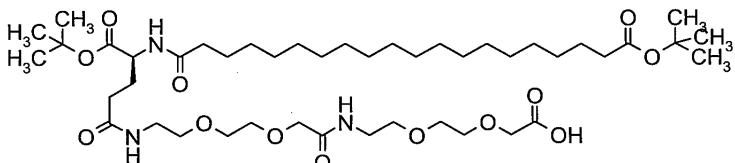
MS (전기 분무): m/z: 681 (M+1).

[0226]

19-{(S)-1-삼자-부톡시카르보닐-3-[2-(2-{[2-(2-카르복시메톡시에톡시)에틸카바모일]메톡시}에톡시)에톡시]에틸카바모일]프로필카바모일}노나데칸산 삼자-부틸 에스테르;

[0227]

(다른 명칭: ^tBu-에이코산다이오일-gGlu(^tBu)-OEG-OEG-OH)



[0228]

[0229] 에탄올 (40 mL)중의 2-(19-삼자-부톡시카르보닐노나데카노일아미노)펜탄다이오산 1-삼자-부틸 에스테르 5-(2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 에스테르 (2.50 g) 및 [2-(2-{2-(2-아미노에톡시)에톡시}아세틸아미노)에톡시]에톡시]아세트산 (다른 명칭: H-OEG-OEG-OH)(1.47 g)에 DIPEA (1.26 mL)를 첨가하였다. 그 혼합물을 밤새 실온에서 교반한 후 진공 중에서 농축하였다. 그 잔류물에 수성 0.1 N HCl (150 mL) 및 에틸 아세테이트 (200 mL)를 첨가하였다. 층이 분리되었고 수성 층을 에틸 아세테이트 (100 mL)로 추출하였다. 유기층을 조합하여 물과 염수로 세척하고, 건조시키고 (황산 마그네슘) 진공 중에서 농축하여 오일을 얻었고, 그것을 방치시켜 결정화하였다.

[0230]

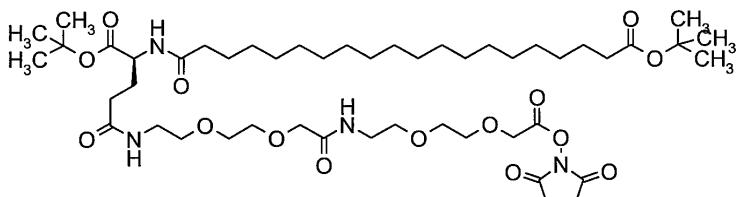
수율 96% (3.1 g). LCMS: 이론적 질량: 874.2. 실측치: 874.49.

[0231]

19-{(S)-1-삼자-부톡시카르보닐-3-[2-[2-(2-{2-(2,5-다이옥소-피롤리딘-1-일옥시카르보닐메톡시)에톡시)에톡시]에틸카바모일]프로필카바모일}노나데칸산 삼자-부틸 에스테르;

[0232]

(다른 명칭: ^tBu-에이코산다이오일-gGlu(^tBu)-OEG-OEG-OSu)



[0233]

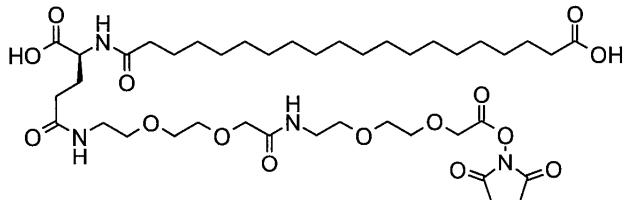
[0234] 아세토니트릴 (50 mL) 중의 19-{(S)-1-삼자-부톡시카르보닐-3-[2-(2-{[2-(2-카르복시메톡시에톡시)에틸카바모일]메톡시}에톡시)에톡시]에틸카바모일]프로필카바모일}노나데칸산 삼자-부틸 에스테르 (3.1 g)의 용액에 TSTU (1.39 g) 및 DIPEA (0.91 mL)를 첨가하였다. 그 혼합물을 실온에서 밤새 교반한 후 진공 중에서 농축하였다. 그 잔류물에 수성 0.1 N HCl (100 mL) 및 에틸 아세테이트 (200 mL)를 첨가하였다. 층이 분리되었고 수성 층을 에틸 아세테이트 (50 mL)로 추출하였다. 유기층을 조합하여 물과 염수로 세척하고, 건조시키고 (황산 마그네슘) 진공 중에서 농축하여 오일을 얻었다.

[0235]

수율 99% (3.4 g). LCMS: 이론적 질량: 971.2 실측치: 971.8.

19-((S)-1-카르복시-3-{2-[2-({2-[2-(2,5-다이옥소-페롤리딘-1-일옥시카르보닐메톡시)에톡시]에틸카바모일}메톡시)에톡시]에틸카바모일}프로필카바모일)노나데칸산;

(다른 명칭: 에이코산다이오일-gGlu-OEG-OEG-OSu)



19-((S)-1-삼차-부톡시카르보닐-3-{2-[2-(2-(2,5-다이옥소-페롤리딘-1-일옥시카르보닐메톡시)에톡시]에틸카바모일}메톡시)에톡시]에틸카바모일)프로필카바모일)노나데칸산 삼차-부틸 에스테르 (3.4 g)를 TFA (75 mL) 중에서 45분 동안 교반한 후 진공 중에서 농축하였다. 그 잔류물을 툴루엔으로 3회 공동-농축하여 고체를 얻었다. 그 잔류물을 2-프로판올 중에서 결정화하고 여과하여 백색 결정화합물을 얻었다.

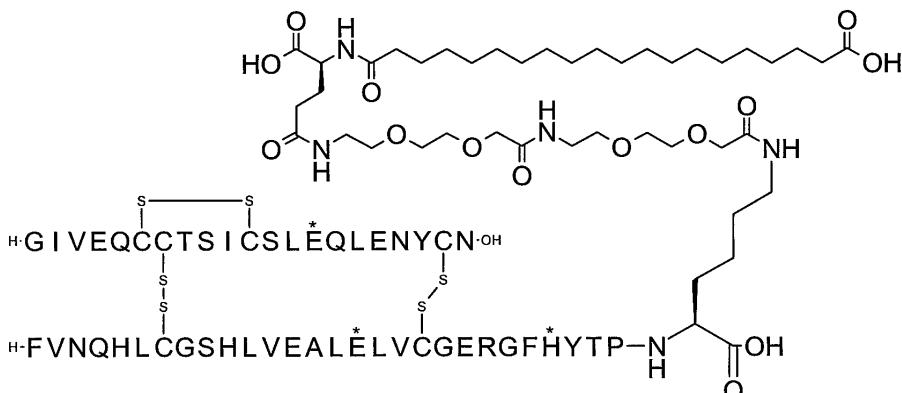
수율 80% (2.4 g). LCMS: 이론적 질량: 859.03 실측치: 859.44.

A14E, B16E, B25H, desB30 인간 인슐린의 위치 B29 (엡실론 위치)의 라이신 잔기의 아실화에 대해, 아실화는 바람직하게 알칼리성 pH (예컨대 pH 10, 10.5 또는 11)에서 수행한다. 이것은 하기 실시예 1에서 예시된다.

실시예 1

N{엡실론-B29}-[2-[2-[2-[2-[2-[4S)-4-카르복시-4-(19-카르복시노나데카노일 아미노)부타노일]아미노]에톡시]에톡시]아세틸]아미노]에톡시]에톡시]아세틸]-[GluA14, GluB16, HisB25], des-ThrB30-인슐린(인간);

(다른 명칭: A14E, B16E, B25H, B29K(N° 에이코산다이오일- g -Glu-2xOEG), desB30, 인간 이му노글로불린, 화합물 1)



A14E, B16E, B25H, desB30 인간 인슐린 (3.0 g, 0.53 mmol)을 150 mM의 수성 Na_2CO_3 (40 mL)에 녹이고 5 mL의 THF를 첨가하였다. pH 값을 1M 수성 NaOH 를 사용하여 11.0으로 조절하였다. 격렬하게 교반하면서 19-((S)-1-카르복시-3-{2-[2-{2-[2-(2,5-다이옥소페롤리딘-1-일옥시카르보닐메톡시)에톡시]에틸카바모일}메톡시)에톡시]에틸카바모일}프로필카바모일)노나데칸산 (641 mg, 0.75 mmol, 상기에서 기술한 대로 제조됨)을 1.5 mL의 THF와 1.5 mL의 DMF의 혼합물에 1분 동안에 녹였다. 1N 수성 NaOH 를 첨가하면서, pH를 10.5 내지 11로 일정하게 유지하였다. 혼합물을 1시간 동안 교반하였다.

pH 값을 1M HCl을 사용하여 7.5로 조절하고, 50% 에탄올을 첨가하여 500 mL의 부피로 만들었다. pH 값을 7.5로 조절하였다. 전도성을 1.6 mS/Cm 로 측정하였다.

정제를 Akta Explorer 상에서 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 수행하였다:

칼럼: 150 mL (2.6x28 cm) Poros 50HQ

A 완충액: 15 mM TRIS, 50% 에탄올 중의 50 mM 암모늄 아세테이트, pH 7.5 (1.6 mS/cm)

B 완충액: 15 mM TRIS, 50% 에탄올 중의 500mM 암모늄 아세테이트, pH 7.5 (14 mS/cm)

- [0252] 구배: 12CV에 걸쳐 0 내지 80% B
- [0253] 유속: 25mL/분.
- [0254] 생성물 풀, 700 mL을 700 mL의 50% 에탄올로 희석하고, 한번 더 정제하였다:
- [0255] 칼럼: 150 mL (2.6x28 cm) Poros 50HQ
- [0256] A 완충액: 15 mM TRIS, 50% 에탄올 중의 50 mM 암모늄 아세테이트, pH 7.5 (1.6 mS/cm)
- [0257] B 완충액: 15 mM TRIS, 50% 에탄올 중의 500mM 암모늄 아세테이트, pH 7.5 (14 mS/cm)
- [0258] 구배: 20CV에 걸쳐 0 내지 100% B
- [0259] 유속: 25mL/분.
- [0260] 생성물 풀, 300 mL을 300 mL의 물로 희석하고 C18 칼럼 상에서 탈염시켰다:
- [0261] 칼럼: 30x250 mm (Daiso_200_15um_FEFgel304_ODDMS_30x250 mm), CV=177 mL
- [0262] A 완충액: 밀리-Q 물 중의 10% 아세토니트릴 + 0.1% TFA
- [0263] B 완충액: 밀리-Q 물 중의 80% 아세토니트릴 + 0.1% TFA
- [0264] 구배: 20분에 걸쳐 25 내지 80% B
- [0265] 유속: 35 mL/분.
- [0266] 생성물 분획을 냉동 건조시켜서 TFA 염을 얻고, 그것을 50 mL의 물 + 10 mL의 아세토니트릴에 녹이고 pH를 0.5M 수성 NaOH를 사용하여 8.0으로 조정하고 냉동 건조시켜서 1.25 g (36%)의 표제 인슐린을 얻었다.
- [0267] LC-MS (전기 분무): $m/z = 1593.1 (M+4)/4$. 계산치: 1594.1.
- [0268] 실시예 2
- [0269] 인슐린 수용체 친화성
- [0270] 본 발명의 아실화된 인슐린 유사체의 인간 인슐린 수용체에 대한 친화성을 SPA 분석 (Scintillation Proximity Assay) 마이크로역가플레이트 항체 포획 분석에 의해 측정한다. SPA-PVT 항체-결합 비즈, 항-마우스 시약 (Amersham Biosciences, Cat No. PRNQ0017)을 25 mL의 결합 완충액 (100 mM HEPES pH 7.8; 100 mM 염화나트륨, 10 mM MgSO₄, 0.025% Tween-20)과 혼합한다. 단일 Packard Optiplate (Packard No. 6005190)에 대한 시약 믹스는 2.4 μ l의 1:5000 희석 정제된 재조합 인간 인슐린 수용체 (액손 11이 있거나 없음), 시약 믹스의 100 μ l당 5000 cpm에 해당하는 A14Tyr[¹²⁵I]-인간 인슐린의 스톡 용액의 상당량, F12 항체의 12 μ l의 1:1000 희석액, 3 mL의 SPA-비즈 및 결합 완충액의 총 12 mL로 구성된다. 그런 다음 총 100 μ l의 시약 믹스를 Packard Optiplate의 각 웰에 첨가하고 인슐린 유도체의 희석 시리즈를 적절한 샘플로부터 Optiplate에서 만든다. 그런 다음 샘플을 부드럽게 흔들어주면서 16시간 동안 인큐베이션한다. 그런 다음 상들을 1분 동안 원심분리에 의해 분리하고 플레이트를 Topcounter에서 계수한다. 결합 데이터를 GraphPad Prism 2.01 (GraphPad Software, San Diego, CA)에서 비선형 회귀 알고리즘을 사용하여 적용하였고, 친화성을 인간 인슐린의 친화성에 대해 표시한다 (백분율 (%))로 표시함).
- [0271] 생리적 조건을 모방하기 위하여 결합 완충액에 1.5% HSA가 또한 함유되어 있는 관련된 분석을 또한 사용한다.

표 1

발명의 선택된 인슐린의 인슐린 수용체 친화성

시험 화합물	상대적 IR-A 친화성 (0% HSA) (%)	상대적 IR-A 친화성 (1.5% HSA) (%)
화합물 1	0.1	0.01

- [0273] 실시예 3

[0274] 발명의 인슐린 유도체의 소수성

인슐린 유도체의 소수성은 등용매 조건하에서 역상 HPLC 작동에 의해 발견된다. 인슐린 유도체의 용출 시간은 인간 인슐린 (본원에서 HI로 표시됨) 또는 동일 조건하에서 공지된 소수성을 가지고 있는 다른 유도체의 그것과 비교한다. 소수성, $k'_{\text{rel}}_{\text{deriv}}$ 은 다음과 같이 계산된다: $k'_{\text{rel}}_{\text{deriv}} = ((t_{\text{deriv}} - t_0) / (t_{\text{ref}} - t_0)) * k'_{\text{rel}}_{\text{ref}}$. HI를 참조로서 사용하면 $k'_{\text{rel}}_{\text{ref}} = k'_{\text{rel}}_{\text{HI}} = 1$ 이다. HPLC 시스템의 보이드 시간, t_0 은 5 μl 의 0.1 mM NaNO₃를 주입함으로써 측정한다.

[0276] 작동 조건:

칼럼: Lichrosorb RP-C18, 5 μm , 4 x 250 mm

완충액 A: 0.1 M 인산 나트륨 pH 7.3, 10 vol% CH₃CN

완충액 B: 50 vol% CH₃CN

주입 부피: 5 μl

작동 시간: 최대 60분

[0282] 초기 구배로 작동시킨 후, 유도체 및 참조 (예를 들면 HI)의 작동에 대한 등용매 수준을 선택하고, 등용매 조건하에서 유도체 및 참조의 용출 시간을 $k'_{\text{rel}}_{\text{deriv}}$ 를 계산하기 위해 상기 식에 사용한다.

표 2

[0283] 발명의 인슐린 유도체의 소수성

시험 화합물	상대적 소수성 $k'_{\text{rel}}_{\text{deriv}}$
화합물 1	0.6

[0284] 실시예 4[0285] 십이지장 루멘 효소를 사용한 인슐린 유사체의 분해

[0286] SPD 래트로부터의 십이지장 루멘 효소 (십이지장 루멘 내용물의 여과에 의해 제조함)를 사용한 인슐린 유사체의 분해. 분석을 인슐린 유사체 및 표준에 대해 활용할 수 있는 16 웰을 포함한 96 웰 플레이트 (2 mL)에서 로봇에 의해 수행한다. ~15 μM 의 인슐린 유사체를 100 mM Hepes, pH=7.4에서 37°C에서 십이지장 효소들과 함께 인큐베이션하고, 1, 15, 30, 60, 120 및 240 분 후에 샘플을 취하여 반응을 TFA의 첨가에 의해 끝친다. 각 지점에서의 무상 인슐린 유사체를 RP-HPLC에 의해 측정한다. 분해 반감기를 데이터의 지수 조정에 의해 측정하고 각 분석에서 참조 인슐린, A14E, B25H, desB30 인간 인슐린 또는 인간 인슐린에 대해 측정된 반감기로 표준화한다. 분해를 위해 첨가한 효소의 양은 참조 인슐린의 분해를 위한 반감기가 60분 내지 180분 사이에 있을 정도의 양이다. 그 결과를 동일한 실험으로부터의 참조 인슐린의 분해 반감기로 나눈 래트 십이지장의 인슐린 유사체에 대한 분해 반감기로서 제시한다 (상대적인 분해율).

표 3

[0287] 분해

시험 화합물	십이지장 분해 상대적 안정성 대 A14E, B25H, desB30 인간 인슐린
화합물 1	0.7

[0288] 실시예 5[0289] 정맥 내 래트 PK

[0290] 마취된 래트에 다양한 용량의 인슐린 유사체를 정맥 내로 (i.v.) 투여하고 시험 화합물의 혈장 농도를 면역분석

또는 질량 분광계를 사용하여 4시간 동안 또는 더 많은 투여 후 동안 특정 간격으로 측정한다. 약물동역학 매개 변수들을 계속해서 WinNonLin Professional (Pharsight Inc., Mountain View, CA, USA)을 사용하여 계산한다.

[0291] 무게가 대략 200 그램인 금식하지 않은 수컷 Wistar 래트 (Taconic)를 사용한다. 체중을 측정하고 래트를 계속해서 Hypnorm/Dormicum (각 화합물은 별도로 멀균수로 1:1로 희석한 후에 혼합한다; 실험일에 새롭게 제조함)으로 마취한다. 마취는 2 mL/kg의 Hypnorm/Doricum 혼합물로 sc로 처음 주사한 후, 이어서 30분 간격으로 1 mL/kg의 유지 용량을 sc로 2회 주사한 다음, 45분 간격으로 1 mL/kg의 유지 용량을 sc로 2회 주사한다. 필요에 따라 래트를 전체적으로 가볍게 마취된 상태로 유지하기 위해서는, 1 내지 2 mL/kg sc의 추가 용량(들)을 공급한다. 무게 측정과 초기 마취는 래트들을 방마다 이동시킴으로써 동물에게 스트레스를 가하는 것을 피하기 위해 래트 보유실에서 수행한다.

표 4

래트 PK

시험 화합물	래트 PK i.v. MRT (h)
화합물 1	24.5

[0293] 실시예 6

[0294] 개 정맥 내 약물동역학적 (PK) 프로필

[0295] 이 프로토콜의 목적은 비글 개에 정맥 내 투여 후에 상이한 인슐린 유사체의 혈장 농도-시간 프로필로부터 약물동역학적 (PK) 데이터를 얻고, 유사체에 대한 관련된 약물동역학적 매개변수를 계산하는 것이다.

[0296] 동물들은 가정용 품질의 음료수에 자유롭게 접근할 수 있었다. 동물들의 무게를 투여하는 각각의 날에 측정하였다. 각 시험 물질을 3마리의 동물에게 제공하였다. 각 동물에 대해 수행할 과정의 횟수와 정도의 관점에서 개별적인 동물의 복지에 대해 충분히 고려하였다. 전체 혈장 농도-시간 프로필을 각 동물로부터 얻었다. 혈액 샘플링 중에, 개들을 테이블 위에 놓고 동물 조련사 옆에 앉아있도록 하였다. 이 과정을 적응 기간 동안 훈련시켰다. 0.5 mL의 혈액 샘플을 다음 스케줄에 따라 EDTA 투브에 수집하였다:

[0297] 투여 전 (-10, 0), 및 5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300, 480, 600, 720, 960, 1440, 1920, 2880, 4320, 5760, 7200, 8640, 10080 분.

[0298] 반복적인 샘플링 기간 중에, 혈액 샘플을 헤파린-식염수로 개방상태를 유지하고 있는 요측피정맥의 Venflon 카테테르로부터 취하였다. 다른 혈액 샘플을 경정맥으로부터 취하였다.

[0299] 혈액 샘플을 열음 상에 최대 20분 동안 보관한 후 4°C에서 4분 동안 1,300g에서 원심분리하였다.

[0300] 혈장을 즉시 2개의 마이크로닉 투브에 옮기고, 각 혈액 샘플로부터 각각 80 μ l의 혈장을 옮기고, 랙 아웃라인에 따라 놓았다. 혈장을 -20°C에서 분석할 때까지 보관하였다.

[0301] 혈장 농도-시간 프로필을 WinNonlin Professional (Pharsight Inc., Mountain View, CA, USA)을 사용하여 비-구획성 약물동역학적 분석에 의해 분석하였다.

[0302] 계산을 각 동물로부터의 개별적인 농도-시간 값을 사용하여 수행하였다.

표 5

개 PK

시험 화합물	개 정맥 내 $T_{1/2} \pm SD$ (시간)	개 정맥 내 MRT $\pm SD$ (시간) (평균 보유 시간)
화합물 1	92 \pm 22	121 \pm 28

[0304] 실시예 7

[0305] 아연의 존재하에 화합물 1 및 비교 화합물 A의 초기 용해도

[0306]

화합물 1 및 비교 화합물 A (즉 N{엡실론-B29}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-카르복시]-4-(19-카르복시)노나데카노일아미노)부타노일]아미노]에톡시]에톡시]아세틸]아미노]에톡시]에톡시]아세틸]-[GluA14, HisB16, HisB25], des-ThrB30-인슐린(인간); 다른 명칭: A14E, B16H, B25H, B29K(N^ε에이코산다이오일-gGlu-2xOEG), desB30 인간 인슐린을 각각 약 8의 pH의 밀리-Q 물에 녹였다. 페놀, 크레졸, 아연 아세테이트 (Zn), 염화 나트륨 및 글리세롤을 언급한 순서로 첨가하여 다음을 함유하고 하기 표에 나타낸 아연 및 염화 나트륨 농도를 가지는 최종 약학 조성물을 얻었다: 4.2 내지 5 mM 인슐린, 1.6% 글리세롤, 25 mM 페놀, 25 mM 크레졸, pH 7.4. 약학 조성물을 24시간 동안 22°C에서 보관하고 15,000 x g에서 15분 동안 원심분리하였다. 100 μl의 상층액을 HPLC 바이알에 옮기고 농도를 Eur. Pharm. Novo-Rapid에 기술되어 있는 것과 같이 산성 젤여과를 사용하여 측정하였다. 가용성 인슐린의 양을 출발 농도의 백분율로 측정하였다. 측정의 정확성은 +/- 2%였다.

표 6

아연의 존재하에 화합물 1 및 비교 화합물 A의 각각의 용해도

Zn/6량체	0 mM NaCl 화합물 A % 가용성 인슐린	20 mM NaCl 화합물 A % 가용성 인슐린	0 mM NaCl 화합물 1 % 가용성 인슐린	20 mM NaCl 화합물 1 % 가용성 인슐린
4.5	100	100		100
5.5	101	100		100
5.9			100	
6.5	100	100		100
6.6			100	
7.4			100	
7.5	100	100		100
8.3			100	
8.5	100	100		100
9.2			100	
9.5	96	100		103
10.0			100	
10.5	100	99		100
10.9			100	
11.5	100	91		100
11.8			100	
12.5	99	85		100
12.7			100	
13.5	82	67		100
13.6			100	
14.4			100	
14.5	64	23		100
15.3			100	
15.5	47	5		91
16.2			92	
16.5	19	1		79
17.1			13	
17.5	19	1		60
18.5	19	1		9

[0307]

결론

[0309]

NaCl이 없는 조성물 중의 비교 화합물은 시험 조건하에서 6량체당 최대 12.5 아연 분자의 존재하에 가용성이다. 20 mM의 NaCl을 포함한 조성물 중의 비교 화합물 A는 6량체당 최대 10.5 분자의 아연의 존재하에 시험 조건하에서 가용성이다.

[0310]

화합물 1은 최대 약 15.3 아연/6량체 인슐린의 시험 조건 하에서 NaCl이 없는 조성물에 가용성이다. 나아가, 화합물 1은 6량체 인슐린당 최대 약 14.5 분자의 아연의 시험 조건하에서 20 mM NaCl로 가용성이다.

[0311]

실시예 8

[0312] 아연의 존재하에 인간 인슐린의 초기 용해도

[0313] 인간 인슐린을 약 8의 pH 값에서 밀리-Q 물에 녹였다. 페놀, 크레졸, 아연 아세테이트 (Zn), 염화 나트륨 및 글리세롤을 언급한 순서로 첨가하여 다음을 함유하고 하기 표에 나타낸 아연 및 염화 나트륨 농도를 가지는 최종 약학 조성물을 얻었다: 4.2 내지 5 mM 인슐린, 1.6% 글리세롤, 25 mM 페놀, 25 mM 크레졸, pH 7.4. 제형을 24 시간 동안 22°C에서 보관한 후 15,000 x g에서 15분 동안 원심분리하였다. 100 μ l의 상층액을 HPLC 바이알에 옮기고 농도를 Eur. Pharm. NovoRapid에 기술되어 있는 것과 같이 산성 젤여과를 사용하여 측정하였다. 가용성 인슐린의 양을 출발 농도의 퍼센트로 측정하였다.

[0314] 측정의 정확성은 +/- 2%이다.

표 7

아연의 존재하에 인간 인슐린의 용해도

Zn/6량체	0 mM NaCl % 가용성 인슐린	20 mM NaCl % 가용성 인슐린
2	100	100
4	100	100
6	83	100
8	15	19

[0316] 결론

[0317] 인간 인슐린은 제형이 NaCl을 함유할 때 최대 6 Zn/인슐린 6량체를 함유하는 제형에서 및 제형이 NaCl을 함유하지 않은 것과 가까울 때 최대 4 Zn/인슐린 6량체를 함유하는 제형에서 가용성이다.

[0318] 실시예 9

[0319] 아연 및 염화 나트륨 함량의 함수로서의 화학적 및 물리적 안정성

[0320] 이 실험의 목적은 SEC 실험에 의해 측정된 아연/6량체 윈도우 내에서 제형의 화학적 및 물리적 안정성을 측정하는 것이었다. 나아가 염화 나트륨의 존재가 화학적 및/또는 물리적 안정성에 영향을 미쳤는지를 시험하는 것이다.

[0321] 제형

[0322] 제형은 다음을 함유하였다: 3.6 mM의 화합물 1, 25 mM의 페놀, 25 mM의 크레졸, pH 7.4. 아연 및 염화 나트륨은 하기 예 나타낸다.

표 8

화합물 1의 아연 함유 화합물

6량체당 아연	염화 나트륨 mM	글리세롤 % w/w
5.8	20	1.6
5.8	75	0.7
5.8	120	0
8.1	20	1.6
8.1	75	0.7
8.1	120	0
10.5	20	1.6
10.5	75	0.7
10.5	120	0

[0324] 제형을 다음과 같이 제조하였다:

[0325] 화합물 1 분말을 제형의 최종 농도의 약 2배 양의 스톡 용액중에서 밀리-Q 물에 녹였다. 페놀, 크레졸, 아연 아세테이트, 염화 나트륨 및 글리세롤을 언급한 순서로 첨가하였다. 그 결과의 용액은 약 7.8의 pH를 가졌고, 0.2

N HCl을 사용하여 pH 7.4로 조정하여 1.45 mM 클로라이드의 클로라이드 농도의 최종 증가를 얻었다.

[0326] 제형을 멸균 여과하고 스토퍼가 달린 3 ml의 카트리지에 채웠다.

[0327] 물리적 안정성을 다음과 같이 측정하였다:

[0328] 세동 성향을 티오플라빈 T (THT) 분석으로 측정하였다. 가시적인 입자 형성을 유도하는 잠재적인 침전형성을 혼탁도의 잠재적 증가로서 측정하였다. 2 μm 아래의 입자 형성을 동적 광산란 (DLS)에 의해 측정하였다. 2 μm 이상의 입자 형성을 미세 유동 영상 (MFI)에 의해 측정하였다.

[0329] 화학적 안정성을 고분자량 입자 (HMWP)의 % 증가 및 역상 UPLC에 의해 측정되는 것과 같은 순도의 감소로서 측정하였다.

티오플라빈 T 분석에서 세동 성향

[0330] 화합물 1의 농도를 WO 2013/153000에 기술된 방법을 따라 측정하였다.

표 9

[0332] 티오플라빈 T 분석에서 시간으로 측정된 지체 시간. 세동에 대한 지체 시간은 제형 중의 아연 함량의 함수로서 증가한다. 5.8 이상의 Zn/6량체를 함유하는 제형은 세동화하지 않고 그로써 45시간보다 긴 지체 시간을 가진다.

Zn/ 6량체 / mM NaCl	지체 시간, 시간	ThF 분석 전 mM의 인슐린 농도	ThF 분석 후 출발 농도의 %로 표시된 인슐린 농도
5.8 Zn/ 6량체 / 20 mM NaCl	15	4.3	91%
5.8 Zn/ 6량체 / 75 mM NaCl	14	4.2	90%
5.8 Zn/ 6량체 / 120 mM NaCl	15	4.2	88%
8.1 Zn/ 6량체 / 20 mM NaCl	45	4.3	100%
8.1 Zn/ 6량체 / 75 mM NaCl	45	4.2	100%
8.1 Zn/ 6량체 / 120 mM NaCl	45	4.1	100%
10.5 Zn/ 6량체 / 20 mM NaCl	45	4.0	100%
10.5 Zn/ 6량체 / 75 mM NaCl	45	4.2	100%
10.5 Zn / 6량체 / 120 mM NaCl	45	4.2	100%

[0333] DLS에 의해 증명된 화합물 1의 휴지기 안정성

[0334] 4°C, 37°C 및 45°C에서 보관한, 다양한 농도의 NaCl 및 Zn-아세테이트로 제형된 화합물 1의 물리적 안정성을 동적 광산란 (DLS)에 의해 증명하였다.

방법

[0336] 각각의 샘플을 25°C에서 DynaPro 플레이트 판독기 상에서 10초의 20개 획득을 기록함으로써 삼중으로 측정하였고; 데이터를 3회 실험의 평균으로서 기록하였다. 샘플을 여과하지는 않았지만, 대신 샘플을 15 000 x g에서 20 분 동안 원심분리하여, 제거하지 않으면 측정을 방해할 매우 큰 응집체 및 집합체들만을 제거하였다. 나아가, DLS 미세역가 플레이트의 웰들을 밀봉하기 위해 보다 통상적으로 사용된 플라스틱 흐일 대신 파라핀 오일을 사용하였다.

표 10

[0337] 2 내지 8주 동안 4°C, 30°C, 37°C 또는 45°C에서 인큐베이션된 상이한 제형들에 대한 nm로 표시된 유체역학적 직경 (HD)로서 측정된 단백질 올리고머 평균 크기

제형 Zn NaCl	2주 4°C		8주 4°C		2주 37°C		2주 45°C		8주 30°C		8주 37°C	
	H R Diam /nm	St.D. / nm										

5.8 Zn/6량체 / 20 mM NaCl	4.05	0.10	3.99	0.06	3.8	0.01	3.84	0.02	4.08	0.04	4.17	0.05
5.8 Zn/6량체 / 75 mM NaCl	5.25	0.09	5.02	0.02	4.96	0.02	4.97	0.04	5.12	0.09	5.14	0.06
8.1 Zn/6량체 / 20 mM NaCl	3.88	0.03	3.88	0.02	3.87	0.01	3.87	0.03	3.94	0.01	4.14	0.03
8.1 Zn/6량체 / 75 mM NaCl	5.21	0.01	5.24	0.04	5.17	0.02	5.11	0.03	5.20	0.06	5.32	0.12
10.5 Zn/ 6 량체/ 20 mM NaCl	4.34	0.02	4.28	0.04	4.2	0.05	4.17	0.01	4.23	0.03	4.29	0.02
10.5 Zn/6량체 / 75 mM NaCl	5.95	0.03	5.93	0.04	5.68	0.05	5.63	0.05	5.65	0.04	5.71	0.04

[0338] H R: 유체역학적 반경 (nm)

[0339] Diam: 직경 (nm)

[0340] St.D: 표준 편차

[0341] DLS로 측정된 단백질 올리고머 평균 크기는 3.8 nm (5.8 Zn/인슐린 6량체, 20 mM NaCl로 만든 제형에 대해 37°C에서, 2주 후) 내지 5.95 nm (10.5 Zn/인슐린 6량체, 75 mM NaCl로 만든 제형에 대해 4°C에서, 2주 후)의 범위이다. 4°C에서 보관된 샘플에 대해 유체역학적 직경은 평균 1% 감소한 반면 37 및 45°C에서 각각 보관된 샘플에 대해서는 1 및 4% 증가하였다. 더욱이, 기록된 자동-보정 함수는 모두 단일모드 입자 분포와 부합하였고, 그들은 어떠한 큰 응집체가 없는 꽤 좁은 크기 분포를 나타낸다.

[0342] 결론

[0343] 비록 상이한 제형 조건들이 뚜렷한 상이한 평균 올리고머 크기를 나타냈지만, 시간에 따른 변화는 시험된 8주 기간 내에 4°C, 37°C 뿐 아니라 45°C에서 물리적으로 안정한 것으로 나타난 전체 및 모든 제형이 존재하는 경우 예상외로 작았다. 응집체는 이 기간 동안 형성되지 않았다.

[0344] MFI를 사용한 2 μm 이상의 입자 측정

[0345] 제형을 미세 유동 영상 (MFITM)을 사용하여 마이크로미터 범위의 현미경으로 볼 수 있는 입자 형성에 대해 분석하였다. 입자 총수는 일반적으로 낮았고, 입자의 대부분은 실리콘-오일 방울에 대해 예상된 어두운 구형 외관을 가졌다. 그러나, 큰 반투명 플레이크-유사 입자들은 각각 45°C에서 2주 동안 인큐베이션한 후 및 37°C에서 8주 동안 인큐베이션한 후 10.5 Zn/6량체 및 150mM 또는 75mM을 함유한 제형에서 나타났다.

표 11

[0346] 4°C, 30°C, 37°C 또는 45°C에서 2 내지 20주 동안 인큐베이션한 상이한 제형에 대한 mL로 나타낸 입자 농도. 둑근 정도 ^{*}공횡비 ^{*}세기 STD>75 및 ECD<3 μm 를 가지는 입자들은 잠재적으로 실리콘 오일을 나타내는 것으로서 분석으로부터 배제하였다.

시간		2주			4주			8주			20주	
Zn/Hex	[NaCl] (mM)	4°C	37°C	45°C	4°C	37°C	4°C	30°C	37°C	4°C	25°C	
		89.9	91.8	224.1	202.5	179.7	15.3	80.3	162.4	24.9	5.7	
5.8	20	38.2	24.9	57.4	28.7	108.9	21.0	22.9	28.7	1.9	49.7	
5.8	75	78.6	80.3	45.9	47.8	86.0	7.7	21.0	19.1	32.5	38.2	
5.8	120	19.1	30.6	40.1	7.6	147.2						
8.1	20	105.1	87.9	137.6	26.8	273.2	93.6	82.2	34.4	53.5	370.5	
8.1	75	17.2	65.0	57.3	118.5	210.2	59.3	105.1	51.6	72.6	57.3	
8.1	120	74.6	44.0	23.0	21.0	191.1						
10.5	20	158.7	78.4	152.9	230.0	326.7	137.6	290.4	131.8	13.4	17.2	
10.5	75	63.1	203.2	154.9	225.5	221.7	120.7	126.1	586.6	28.7	44.0	

10.5	120	80.3	343.9	1807.6	267.5	279.0				
------	-----	------	-------	--------	-------	-------	--	--	--	--

표 12

[0347] 4°C, 30°C, 37°C 또는 45°C에서 2 내지 20주 동안 인큐베이션한 상이한 제형에 대한 입자 부피 분획 (mL 샘플 부피당 nL 입자). 등근 정도^{*}공횡비^{*}세기 STD>75 및 ECD<3 μ m를 가지는 입자들은 잠재적으로 실리콘 오일을 나타내는 것으로서 분석으로부터 배제하였다.

시간	[NaCl] (mM)	2주			4주			8주			20주	
		4°C	37°C	45°C	4°C	37°C	4°C	30°C	37°C	4°C	25°C	
Zn/Hex		0.01	0.01	0.5	0.06	0.04	0	0.03	0.02	0.01	0	
5.8	20	0	0	0.12	0.03	0.03	0	0	0.01	0	0.04	
5.8	75	0	0.01	0.02	0	0.03	0.05	0	0	0.05	0.19	
5.8	120	0	0	0	0	0.06						
8.1	20	0.01	0	0.01	0	0.02	0	0.01	0	0.02	0.22	
8.1	75	0	0.01	0.06	0.01	0.01	0.03	0.02	0.01	0.01	0.01	
8.1	120	0.02	0.01	0.03	0	0.03						
10.5	20	0.01	0.01	0.02	0.02	0.08	0.09	0.06	0.03	0.06	0	
10.5	75	0.02	0.11	0.04	0.01	0.03	0.01	0.02	0.36	0.01	0.01	
10.5	120	0.02	0.26	1.32	0.12	0.08						

물리적 안정성 결론

[0349] 물리적 안정성을 ThT 분석에서 5.8부터 8.1 Zn/인슐린 6량체로 증가하는 아연 함량을 가지는 아연/6량체 증가의 함수로서 지체 시간으로서 측정하였다. DLS에 의해 측정된 평균 올리고머 크기 변화는 올리고머 크기에 아무 변화도 나타내지 않았고 제형 중 어느 것에서도 응집체 형성을 나타내지 않았다. MFI에 의해 측정된 입자 측정은 10.5 Zn/ 6량체 및 75 mM NaCl을 함유하고 있는 제형에서 입자 형성의 증가를 보였다.

[0350] 그러므로 물리적 안정성은 5.8 이상 10.5 아래의 Zn/인슐린 6량체를 함유하고 있는 제형에서 최적이었다.

화학적 안정성

[0352] HMWP 형성을 WO 2013/153000에 기술된 것과 같이 아세트산 유리 용출액 중에서 겔여과 칼럼을 사용하여 측정하였다. 4°C에서 보관된 샘플에 대한 HMWP를 30°C 또는 37°C에서 보관된 샘플에 대한 HMWP로부터 뺐다.

표 13

4°C, 30°C 또는 37°C에서 2 내지 8주 동안 인큐베이션된 상이한 제형에 대한 HMWP 발생.

	2w 37°C-2w 4°C	8w 30°C-8w 4°C	4w 30°C-4w 4°C	8w 37°C-8w 4°C
5.8 Zn/6량체 / 20 mM NaCl	0.35	0.32	0.52	1.01
5.8 Zn/6량체 / 75 mM NaCl	0.41	0.35	0.58	1.17
5.8 Zn/6량체 / 120 mM NaCl	0.40	0.34		
8.1 Zn/6량체 / 20 mM NaCl	0.25	0.22	0.43	0.75
8.1 Zn/ 6량체/ 75 mM NaCl	0.26	0.23	0.43	0.73
8.1 Zn/examer/ 120 mM NaCl	0.28	0.31		
10.5 Zn/6량체/ 20 mM NaCl	0.28	0.32	0.45	0.76
10.5 Zn/6량체/ 75 mM NaCl	0.25	0.26	0.39	0.72

10.5 Zn/6량체 / 120 mM NaCl	0.28	0.23		
------------------------------	------	------	--	--

[0354]

결론

[0355]

5.8 Zn/인슐린 6량체를 함유하는 제형들은 8.1 또는 그 이상의 Zn/인슐린 6량체를 함유하는 제형들보다 더 많은 HMWP 발생을 보인다.

[0356]

순도 손실

[0357]

순도 손실을 시작할 때와 비교하여 측정하였다. 4°C에서 보관된 샘플에 대해 역상 크로마토그래피에 의해 측정된 순도를 30°C 또는 37°C에서 보관된 샘플에 대해 측정된 순도에서 뺐다. WO 2013/153000에 기술된 방법을 약간 변형시킨 UPLC 순도 방법을 사용하였다. 본 실험의 경우에 Waters CSH, C18 칼럼을 사용하였고, 그것은 이 경우 변경 전에 칼럼에 대해 허용된 분리 및 주입 횟수를 향상시킨다.

표 14

[0358]

4°C, 30°C 또는 37°C에서 2 내지 8주 동안 인큐베이션된 상이한 제형들에 대한, %로 나타낸 순도의 손실.

	2w 37°C-2w 4°C	8w 30°C-8w 4°C	4w 30°C-4w 4°C	8w 37°C-8w 4°C
5.8 Zn/6량체 / 20 mM NaCl	1.800	1.700	3.29	6.12
5.8 Zn/6량체 / 75 mM NaCl	1.500	1.300	2.86	5.44
8.1 Zn/6량체 / 20 mM NaCl	1.200	1.000	1.92	3.78
8.1 Zn/6량체 / 75 mM NaCl	1.000	1.000	1.90	3.24
10.5 Zn/6량체 / 20 mM NaCl	1.000	1.100	1.91	3.45
10.5 Zn/6량체 / 75 mM NaCl	0.900	0.800	1.58	3.10

[0359]

결론

[0360]

5.8 Zn/인슐린 6량체를 함유하고 있는 제형들이 가장 높은 분해를 보인다. 8.1 또는 그 이상의 Zn/인슐린 6량체를 함유하고 있는 제형들은 더 낮은 분해를 보인다. 그러므로 화학적 안정성은 8.1 또는 그 이상의 Zn/인슐린 6량체를 함유하고 있는 제형들에서 최적이다. 안정성은 20 mM NaCl을 함유하고 있는 제형들보다 75 mM NaCl을 함유하고 있는 제형들에서 더 높다.

[0361]

실시예 10

[0362]

이 실험의 목적은 4.2 mM 인슐린 및 고정된 아연/인슐린 6량체로 비교 화합물 A (즉 N{엡실론-B29}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-카르복시-4-(19-카르복시노나데카노일아미노)부타노일]아미노]에톡시]에톡시]아세틸]아미노]에톡시]에톡시]아세틸]-[GluA14, HisB16, HisB25], des-ThrB30-인슐린(인간); 다른 명칭: A14E, B16H, B25H, B29K(^f에이코산다이오일-gGlu-2xOEG), desB30 인간 인슐린)를 함유하고 있는 제형 중의 NaCl 함량의 함수로서 크기 축출 크로마토그래피에 의한 올리고머화를 조사하는 것이었다. 나아가, 목적은 물리적 및 화학적 안정성을 측정하는 것이었다.

[0363]

제형

[0364]

화합물 A를 약 8의 pH 값에서 밀리-Q 물에 녹였다. 페놀, 크레졸, 아연 아세테이트 (Zn) 및 글리세롤을 언급한 순서로 첨가하여 다음: 4.5 Zn/ 6 인슐린, 25 mM 페놀, 25 mM 크레졸, pH 7.4, 4.2 mM의 인슐린 농도 및 아래 표에 나타낸 염화 나트륨 (NaCl), 아연 아세테이트 및 글리세롤을 함유하는 최종 제형을 얻었다.

[0365]

물리적 안정성을 다음을 측정함으로써 평가하였다:

[0366]

- 세동 성향. 티오플라빈 T 분석에 의해 측정함. 세동 성향을 티오플라빈 T (THT) 분석에서 세동에 대한 지체

시간으로서 측정하였다. THT 분석을 새롭게 제조한 샘플에 대해 기술한 것과 같이 측정하였다; 및

[0367] 2. nm의 올리고머 반경 및 동적 광산란에 의한 4 μm 아래의 응집체 형성.

[0368] 제형들의 화학적 안정성을 4°C에서 보관한 후 고분자량 단백질 (HMWP)의 양에 대하여 37°C에서 4주 동안 (4w) 보관한 후 인슐린 관련 불순물의 HMWP 증가의 증분으로서 측정하였다.

[0369] HMWP를 WO 2013/153000에 기술된 HMWP 방법 2를 사용하여 측정하였다.

[0370] 탈아미드화 화합물과 유사한 인슐린 관련된 불순물의 형성을 역상 크로마토그래피 (UPLC)를 사용하여 측정하였다.

[0371] 단량체의 양을 폐놀이 없는 용출액에서 WO 2013/153000에 기술된 방법 2를 사용하여 천연 젤 여과로 측정하였다.

표 15

화합물 A의 THT 분석에서 HMWP 형성 및 세동에 대한 지체 시간

아연/인슐린 6량체, NaCl 및 글리세롤 함량	% 단량체 폐놀 없는 EFC	% 단량체 폐놀 없는 SEC	HMWP 형성 (%) 4w 37°C	THT 지체 시간 (시간)	HMWP 형성 (%) 4w 37°C
4 Zn/6량체 20 mM NaCl, 1.6% 글리세롤	61	48	0.4	15.6	0.89
4 Zn/6량체 50 mM NaCl, 1.1% 글리세롤	49	33	0.39	19.2	0.8
4 Zn/6량체 75 mM NaCl, 0.7% 글리세롤	46	30	0.43	22.0	0.81
4 Zn/6량체 120 mM NaCl	45	29	0.49	23.0	0.87
5 Zn/6량체, 20 mM NaCl, 1.6% 글리세롤	78	48	0.52	22.0	0.85
5 Zn/6량체 50 mM NaCl 1.1% 글리세롤	68	36	0.41	27.7	0.84
5 Zn/6량체 75 mM NaCl 0.7% 글리세롤	62	32	0.40	30.9	0.79
5 Zn/6량체, 120 mM NaCl	64	32	0.35	29.6	0.77
6 Zn/6량체 20 mM NaCl 1.6% 글리세롤	86	44	0.35	34.2	0.8
6 Zn/6량체 50 mM NaCl 1.1% 글리세롤	77	37	0.28	40.4	0.73
6 Zn/6량체 75 mM NaCl 0.7% 글리세롤	77	35	0.33	45.0	0.73
6 Zn/6량체 120 mM NaCl	62	28	0.40	45.0	0.73
7 Zn/6량체 20 mM NaCl 1.6% 글리세롤	58	34	0.45	45.0	0.95

[0373]

결론

[0374]

화합물 A 단량체의 양은 염화 나트륨 농도의 함수로서 감소하고 단지 최대 50 mM의 NaCl의 첨가로 큰 효과를 나타낸다. HMWP 형성 및 불순물 형성으로서 측정된 화학적 분해는 단량체 함량에도 불구하고 모든 제형에서 낫다. THT 지체 시간은 아연 함량 및 염화 나트륨 함량에 따라 증가한다.

표 16

[0375]

nm로 표시되는 평균 유체역학적 반경 R_h avg. 및 10^6 cts/초 (4°C)로 표시되는 표준화된 강도 I_{norm} avg. 주의:

샘플은 $t=0$ 에서 측정되지 않았다.

인슐린	아연/6량체, NaCl 함량 및 글리세롤 함량	R_h avg. (nm)		I_{norm} avg. (10^6 cts)	
		2w	4w	2 w	4 w
Degludec		1.14	1.15	1.44	1.76
NovoRapid		2.49	2.49	1.94	2.27
화합물 A	4 Zn/6량체 20 mM NaCl, 1.6% 글리세롤	2.35	2.32	7.52	7.53
	4 Zn/6량체 50 mM NaCl, 1.1% 글리세롤	2.96	3.02	14.7	16.1
	4 Zn/6량체 75 mM NaCl, 0.7% 글리세롤	3.41	3.49	18.0	19.5
	4 Zn/6량체 120 mM NaCl	4.11	4.16	21.7	23.4
	5 Zn/6량체 50 mM NaCl, 1.1% 글리세롤	3.07	3.11	13.3	14.8
	5 Zn/6량체 75 mM NaCl, 0.7% 글리세롤	3.39	3.49	20.0	20.1
	5 Zn/6량체 120 mM NaCl	3.79	3.94	21.9	22.2
	6 Zn/6량체 50 mM NaCl, 1.6% 글리세롤	2.90	3.03	15.6	16.7
	6 Zn/6량체 75 mM NaCl, 1.1% 글리세롤	3.23	3.41	17.9	19.8
	6 Zn/6량체 120 mM NaCl, 0.7% 글리세롤	3.88	3.85	24.3	23.1
	7 Zn/6량체 20 mM NaCl, 1.6% 글리세롤	2.52	2.14	18.0	8.24
	5 Zn/6량체 20 mM NaCl, 1.6% 글리세롤	2.18	2.28	7.85	6.56
	6 Zn/6량체 20 mM NaCl, 1.6% 글리세롤	2.04	1.99	5.64	4.65

[0376]

R_h avg. (nm): nm의 평균 유체역학적 반경

[0377]

I_{norm} avg. (10^6 cts): 10^6 총수/초 (37°C)로 표시된 표준화된 강도

표 17

[0378]

nm로 표시되는 평균 유체역학적 반경 R_h avg. 및 10^6 cts/초 (4°C)로 표시되는 표준화된 강도 I_{norm} avg. 주의:

샘플은 $t=0$ 에서 측정되지 않았다.

인슐린	Zn/6량체, NaCl 함량 및 글리세롤 함량	R _h avg. (nm)		I _{norm} avg. (10 ⁶ cts)	
		2 w	4 w	2 w	4 w
Degludec		1.14	1.14	1.44	1.50
NovoRapid		2.49	2.46	1.94	1.94
화합물 A	4 Zn/6량체 20 mM NaCl, 1.6% 글리세롤	2.35	2.26	7.52	10.6
	4 Zn/6량체 50 mM NaCl, 1.1% 글리세롤	2.96	2.99	14.7	15.6
	4 Zn/6량체 75 mM NaCl, 0.7% 글리세롤	3.41	3.43	18.0	18.9
	4 Zn/6량체 120 mM NaCl	4.11	4.03	21.7	23.0
	5 Zn/6량체 50 mM NaCl, 1.1% 글리세롤	3.07	3.02	13.3	16.4
	5 Zn/6량체 75 mM NaCl, 0.7% 글리세롤	3.39	3.47	20.0	19.6
	5 Zn/6량체 120 mM NaCl	3.79	3.88	21.9	21.5
	6 Zn/6량체 50 mM NaCl, 1.6% 글리세롤	2.90	2.90	15.6	15.7
	6 Zn/6량체 75 mM NaCl, 1.1% 글리세롤	3.23	3.23	17.9	18.1
	6 Zn/6량체 120 mM NaCl, 0.7% 글리세롤	3.88	3.87	24.3	22.4
	7 Zn/6량체 20 mM NaCl, 1.6% 글리세롤	2.52	2.40	18.0	12.7
	5 Zn/6량체 20 mM NaCl, 1.6% 글리세롤	2.18	2.11	7.85	10.7
	6 Zn/6량체 20 mM NaCl, 1.6% 글리세롤	2.04	1.96	5.64	9.73

[0379] R_h avg. (nm): nm의 평균 유체역학적 반경

[0380] I_{norm} avg. (10⁶ cts): 10⁶ 총수/초 (37°C)로 표시된 표준화된 강도

[0381] 결론

[0382] 유체역학적 반경은 염 농도의 증가와 함께 증가한다. Zn 농도는 인슐린 6량체당 7 Zn에서를 제외하면 크기에 거의 영향을 미치지 않는다. 인큐베이션 온도로부터 올리고며 크기 및 물리적 안정성에 미치는 효과는 유의미하지 않다.

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Novo Nordisk A/S

<120> NOVEL INSULIN DERIVATIVE

<130> 8721.000-EP

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modified Insulin A-chain

<400> 1

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn

20

<210> 2

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modified Insulin B-chain

<220><221> MOD_RES

<222> (29)..(29)

<223> Lysine(N(epsilon)-Eicosanediyl-gGlu-2xOEG)

<400> 2

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu

1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Thr Pro Xaa

20 25