

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4808785号  
(P4808785)

(45) 発行日 平成23年11月2日 (2011. 11. 2)

(24) 登録日 平成23年8月26日 (2011. 8. 26)

(51) Int. Cl.

F I

<b>A 6 1 K</b>	<b>38/28</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>37/26</b>
<b>A 6 1 P</b>	<b>3/10</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>3/10</b>
<b>A 6 1 K</b>	<b>47/34</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>47/34</b>
<b>A 6 1 K</b>	<b>47/10</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>47/10</b>
<b>A 6 1 K</b>	<b>9/08</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>9/08</b>

請求項の数 14 (全 84 頁)

(21) 出願番号 特願2008-547953 (P2008-547953)  
 (86) (22) 出願日 平成18年12月21日 (2006. 12. 21)  
 (65) 公表番号 特表2009-522231 (P2009-522231A)  
 (43) 公表日 平成21年6月11日 (2009. 6. 11)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2006/070104  
 (87) 国際公開番号 W02007/074133  
 (87) 国際公開日 平成19年7月5日 (2007. 7. 5)  
 審査請求日 平成21年12月18日 (2009. 12. 18)  
 (31) 優先権主張番号 05113021. 9  
 (32) 優先日 平成17年12月28日 (2005. 12. 28)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 596113096  
 ノボ・ノルディスク・エー／エス  
 デンマーク国、バグスヴァエルト ディ  
 ーケー 2880、ノボ アレー  
 (74) 代理人 100109726  
 弁理士 園田 吉隆  
 (74) 代理人 100101199  
 弁理士 小林 義敦  
 (72) 発明者 ハヴェルンド、 スヴェンド  
 デンマーク国 ディーケー 2880 バ  
 ッグスヴァエルト、 クーヴェイ 24  
 (72) 発明者 フバレク、 フランチセク  
 デンマーク国 ディーケー 2100 コ  
 ペンハーゲン エー、 2ティーヴィ、  
 クラッセンズガデ 19 エー  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インスリン組成物および組成物の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アシル化インスリン、即効型インスリン、および 6 分子のアシル化インスリン毎に 6 以上最大 12 の亜鉛原子を含む、治療の必要がある患者における糖尿病の治療のための可溶性製薬学的組成物であって、

該アシル化インスリンは、親インスリンの B 鎖中に存在する L y s 残基の - アミノ基と結合している側鎖であって、一般式：

$$- W - X - Y - Z_2$$

[ 上式中、

W は、

- A s p、 - A s p、 - G l u、 - G l u、 - h G l u および - h G l u からなる群から選択される側鎖中にカルボン酸基を有する - アミノ酸残基であって、そのカルボン酸基のうちの一つと共に、親のインスリンの B 鎖中に存在する L y s 残基の - アミノ基または B 鎖の N 末端のアミノ酸残基の - アミノ基と一緒にアミド基を形成する - アミノ酸残基であり；

X は、

$$\cdot - \underline{C} O - ;$$

であり；

Y は、

$$\cdot m \text{ が } 6 \text{ から } 32 \text{ の範囲の整数である } - ( C H_2 )_m - ;$$

であり；かつ、

$Z_2$  は、

・ - C O O H ；

である ]

の側鎖を有するインスリン分子を含んでなる、製薬学的組成物。

【請求項 2】

親インスリンが d e s B 3 0 ヒトインスリンアナログである請求項 1 に記載の製薬学的組成物。

【請求項 3】

即効型インスリンが A s p B 2 8 ヒトインスリン、 L y s B 3 G l u B 2 9 ヒトインスリンおよび / または L y s B 2 8 P r o B 2 9 ヒトインスリンである請求項 1 または 2 に記載の製薬学的組成物。

【請求項 4】

アシル化インスリン、即効型インスリン、および亜鉛原子を含み、6 分子のアシル化インスリン毎に6 以上最大 1 2 の亜鉛原子が添加された、治療の必要がある患者における糖尿病の治療のための製薬学的組成物を製造するための方法であって、

該アシル化インスリンは、親インスリンの B 鎖中に存在する L y s 残基の - アミノ基と結合している側鎖であって、一般式：

- W - X - Y -  $Z_2$

[ 上式中、

W は、

- A s p、 - A s p、 - G l u、 - G l u、 - h G l u および - h G l u からなる群から選択される側鎖中にカルボン酸基を有する - アミノ酸残基であって、そのカルボン酸基のうちの一つと共に、親のインスリンの B 鎖中に存在する L y s 残基の - アミノ基または B 鎖の N 末端のアミノ酸残基の - アミノ基と一緒にアミド基を形成する - アミノ酸残基であり；

X は、

・ -  $\underline{C} O$  - ；

であり；

Y は、

・ m が 6 から 3 2 の範囲の整数である - ( C H <sub>2</sub> ) <sub>m</sub> - ；

であり；

$Z_2$  は、

・ - C O O H ；

である ]

の側鎖を有し；

該方法は、

i ) 水相を提供し、

i i ) 該アシル化インスリンを添加し、

i i i ) アシル化インスリン 6 分子当たり 6 以上最大 1 2 の亜鉛原子を添加し、

i v ) 任意でさらに賦形剤を添加する

工程を含む方法。

【請求項 5】

保存料の添加後に、亜鉛を組成物に添加する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

保存料の添加前に亜鉛の一部を添加し、保存料の添加後に亜鉛の一部を添加する、請求項 4 または 5 に記載の方法。

【請求項 7】

保存料がフェノールおよび / または m - クレゾールである、請求項 5 または 6 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 8】

界面活性剤を製薬学的組成物と混合する、請求項 4 - 7 の何れか一項に記載の方法。

## 【請求項 9】

親インスリンが d e s B 3 0 ヒトインスリンアナログである請求項 4 - 8 の何れか一項に記載の方法。

## 【請求項 10】

即効型インスリンが A s p B 2 8 ヒトインスリン、L y s B 3 G l u B 2 9 ヒトインスリンおよび / または L y s B 2 8 P r o B 2 9 ヒトインスリンである請求項 4 - 9 の何れか一項に記載の方法。

## 【請求項 11】

糖尿病の治療のための医薬の製造のための、請求項 1 - 3 の何れか一項に記載の組成物の使用。

## 【請求項 12】

請求項 1 - 3 の何れか一項に記載の製薬学的組成物の治療的有效量を製薬学的に許容される担体と共に含む、治療の必要がある患者における糖尿病の治療のための製薬学的組成物。

## 【請求項 13】

請求項 1 - 3 の何れか一項に記載の製薬学的組成物の治療的有效量を製薬学的に許容される担体と共に含む、治療の必要がある患者における糖尿病の治療のための医薬。

## 【請求項 14】

1 型糖尿病または 2 型糖尿病の治療において使用するための製薬学的組成物の製造のための、請求項 1 - 3 の何れか一項に記載の組成物の使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【発明の開示】

## 【0001】

## 〔発明の分野〕

本発明は、遷延性の作用特性と高い亜鉛含有量を有するアシル化インスリンの製薬学的組成物に関する。さらに、本発明は、遷延性の作用特性と高い亜鉛含有量を有するアシル化インスリンの製薬学的組成物を製造するための方法、および糖尿病の治療のための組成物を製造する方法に関する。

## 【0002】

## 〔発明の背景〕

現在、1 型糖尿病および 2 型糖尿病の双方の糖尿病の治療は、いわゆる強化インスリン療法への信頼が高まっている。この療法によると、基礎インスリン要求性をカバーするための持続型インスリンの一または二回の毎日の注射を、食事と関連するインスリン要求性をカバーするための、即効型インスリンのボース注射により補充して含む多様な毎日のインスリン注射により、患者を治療する。

持続型インスリン組成物は、当技術分野において周知である。したがって、持続型インスリン組成物の主な型には、インスリン結晶または非晶質インスリンの注射可能な水性懸濁液が含まれる。これらの組成物では、使用されるインスリン化合物は、典型的には、プロタミンインスリン、亜鉛インスリンまたはプロタミン亜鉛インスリンである。

## 【0003】

ある欠点があるインスリン懸濁液の使用に関連する。例えば、正確な投与を確保するために、該懸濁液の限量がバイアルから引き出されるまたはカートリッジから排出される前に、インスリンの粒子は、穏やかな振盪により均質に懸濁されなくてはならない。また、塊形成または凝固を避けるために、インスリン懸濁液の貯蔵は、インスリン溶液に比較してより狭い範囲で温度を保たなくてはならない。

プロタミンは非免疫性であると依然と考えられていたが、現在では、プロタミンはヒトにおいて免疫性であり、且つ薬剤目的におけるそれらの使用は抗体の形成を引き起こすことが明らかとなっている。また、プロタミン - インスリン複合体がそれ自身免疫性である

10

20

30

40

50

ことがであるという証拠も見つかっている。従って、ある患者には、プロタミンを含有する持続型インスリン組成物の使用をさけなくてはならない。

【 0 0 0 4 】

もう1つの種類の持続型インスリン組成物は、その溶液を注射した際にpH値が上昇することから、インスリンが沈殿するであろう生理学的なpHよりも低いpH値を有する溶液である。これらの溶液の欠点は、注射した組織に形成された沈殿の粒径分布、したがって、薬物の放出特性が、幾らか予測不能な様式で、注射部位の血流および他のパラメーターに依存することである。更なる欠点は、インスリンの固体粒子が注射部位の組織の炎症の原因となる局所的な刺激物として作用することである。

インスリンは、膵臓のランゲルハンス島で生産される51アミノ酸のペプチドである。モノマーとして働き、その第一の機能は、膜貫通受容体に結合し、活性化することにより、グルコース分子の脂肪および筋肉組織の細胞膜を横切った輸送を促進することである。

【 0 0 0 5 】

インスリンの特性は、ヘキサマーへと会合することができ、その形態でそのホルモンは生合成および貯蔵の間の化学および物理的な分解から保護されるということである。インスリンについて研究されたX線結晶からは、ヘキサマーは、三褶曲軸の回転により関連する三つのダイマーからなることが示されている。これらのダイマーは、その三褶曲軸上に位置する核にある二つの亜鉛イオンとの相互作用を介して、密接に会合してる。

ヒトインスリンが高濃度製薬学的製剤の形態で皮下組織に注射されるとき、それは自己会合しており、モノマーへの解離は比較的緩やかである。インスリンのヘキサマーおよびダイマーは、モノマーより毛細血管壁を貫通するのが遅い。

【 0 0 0 6 】

亜鉛およびフェノール性添加物は、通常、貯蔵の間の分解に対する予防としての、ヘキサマー形成を促進するために、治療的インスリン製剤に用いられる。しかしながら、この形態では、注射されたインスリンの作用は、皮下組織を介してヘキサマーが拡散し、ダイマーおよびモノマーに解離する間、遅延することになる。

インスリン製剤は、大抵、インスリンを、酸性条件下で小体積の水に溶解することにより調製される。亜鉛は、その後、製剤に添加され、続いて中和され、フェノールおよびm-クレゾールのような保存料が添加される。これらのインスリンの製薬学的製剤は、ヘキサマーのインスリン毎に約2、3もしくは4の亜鉛原子として提供される。

国際公開第2005/012347号は、国際公開第95/07931号に開示されるアシル化インスリンと比較して追加の負電荷を含んでなるアシル化インスリン誘導体の別の群を開示する。これらのアシル化インスリンの製薬学的製剤は、ヘキサマーのインスリン毎に約2、3もしくは4の亜鉛原子として提供される。

【 0 0 0 7 】

国際公開第2003/094956号は、モノマーのインスリンと可溶性アシル化インスリンアナログを混合することにより調製される安定インスリン製剤を開示する。製剤は、ヘキサマーのインスリン毎に約2.3から約4.5の $Zn^{2+}$ を含む。この発明のアシル化インスリンアナログはインスリンデテミル(detemir)である。

国際公開第2003/094951号から、即効作用および持続作用の双方を有する安定可溶性インスリン製剤を製剤化することは公知である。製剤は、ヘキサマーのインスリン毎に約2.3から約4.5の $Zn^{2+}$ の範囲の亜鉛含有量を有する。この発明のアシル化インスリンアナログはインスリンデテミル(detemir)である。

【 0 0 0 8 】

国際公開第99/21888号は、6分子のインスリン誘導体毎に最大5の亜鉛原子を含むヒトインスリン誘導体の凝集に関する。

ヒトインスリンは、三つの第一級アミノ基を有する：A鎖およびB鎖のN末端基、および $Lys^{B29}$ のアミノ基。これらの基の一または複数で置換された幾つかのインスリン誘導体が、先行技術中で知られている。したがって、米国特許第3528960号(Elli Lilly)は、インスリン分子のうちの1、2または3の第一級アミノ基がカ

10

20

30

40

50

ルボキシアロイル ( a r o y l ) 基を有する N - カルボキシアロイル ( a r o y l ) インスリンに関する。

欧州特許第 8 9 4 0 9 5 号は、B 鎖の N 末端および / または位置 B 2 8、B 2 9 または B 3 0 の L y s の - アミノ基が、W が長鎖炭化水素基であり得る式 - C O - W - C O O H の置換を有するこれらのインスリン誘導体を開示している。これらのインスリン誘導体は、作用の持続性を有し、生理学的 p H 値で可溶性である。

#### 【 0 0 0 9 】

国際公開第 9 5 / 0 7 9 3 1 号は、脂溶性 ( l i p h o p h i l i c ) の側鎖が、親インスリンの B 鎖の N 末端アミノ酸残基の - アミノ基もしくは B 鎖に存在する L y s 残基の - アミノ基の何れか一方に結合している持続性インスリン誘導体を開示する。

インスリンデテミル ( d e t e m i r ) の遅い吸収のメカニズムは、Havelund らにより研究されている (The mechanism of protraction of insulin detemir, a long-acting acylated analog of human insulin., Pharmaceutical Research, 21(2004)1498-1504)。インスリン製剤は、ヘキサマーのインスリン毎に 2 の亜鉛原子、続いてグリセロール、フェノール、m - クレゾールおよびリン酸ナトリウムを添加することにより調製される。

#### 【 0 0 1 0 】

Whittingham ら (Crystallographic and solution studies of N-Lithocholyl insulin: a new generation of prolonged-acting human insulin, Biochemistry 2004, 43, 5987-5995) では、アシル化インスリンアナログの製剤が調製されている。そのインスリン製剤は、ヘキサマーのインスリン毎に 2 - 2 . 5 の亜鉛原子、続いてグリセロールおよびフェノールを添加することにより調製される。インスリンの構造は、サイズ排除カラムクロマトグラフィーで測定される。

本発明は、先行技術の課題を解決するアシル化インスリンの製薬学的組成物に関する。

#### 【 0 0 1 1 】

##### 〔 発明の概要 〕

本発明は、および 6 分子のアシル化インスリン毎に 4 より多い亜鉛原子を含んでなるアシル化インスリンを含む可溶性製薬学的組成物に関する。

亜鉛含有量は、6 分子のアシル化インスリン毎に最大約 1 2 の亜鉛原子であってよい。亜鉛含有量の上限は、インスリンの沈殿を起こし、溶液を懸濁液にする亜鉛含有量である。

#### 【 0 0 1 2 】

本発明のある態様では、製薬学的組成物は、6 分子のアシル化インスリン毎に約 4 . 3 から約 1 2 の亜鉛原子、あるいは、6 分子のアシル化インスリン毎に約 4 . 5 から約 1 2 の亜鉛原子を含む。本発明の更なる態様では、製薬学的組成物は、6 分子のアシル化インスリン毎に約 5 から約 1 1 . 4 の亜鉛原子、あるいは、6 分子のアシル化インスリン毎に約 5 . 5 から約 1 0 の亜鉛原子を含む。更なる態様では、製薬学的組成物は、6 分子のアシル化インスリン毎に約 6 から約 1 0 . 5 の亜鉛原子、もしくは、6 分子のアシル化インスリン毎に約 6 . 5 から約 1 0 の亜鉛原子を含むか、あるいは、製薬学的組成物は、6 分子のアシル化インスリン毎に約 7 から約 9 の亜鉛原子を含む。更なる態様では、製薬学的組成物は、亜鉛濃度の約 1 / 3 から 3 倍のクエン酸塩を含む。

#### 【 0 0 1 3 】

本発明のインスリン分子は、互いに相互作用して、亜鉛を含んでなる複合体を形成する。これらのインスリン - 亜鉛複合体は、製薬学的組成物中に、ヘキサマー、ドデカマーもしくはドデカマーより高分子量の複合体として存在し得る。全ての種類のインスリンが亜鉛と複合体を形成する、例えば、ヒトインスリン、アシル化インスリン (インスリン誘導体) およびインスリンアナログ。

#### 【 0 0 1 4 】

本発明のある態様では、少なくとも 8 5 % のアシル化インスリンが、アシル化インスリンドデカマー複合体もしくはアシル化インスリンドデカマーより高分子量の複合体として存在する。

本発明のある態様では、少なくとも 90、92、95、96、97、98、99 もしくは 99.5% のアシル化インスリンが、アシル化インスリンデカマー複合体もしくはアシル化インスリンデカマーより高分子量の複合体として存在する。

【0015】

本発明のある態様では、製薬学的組成物は界面活性剤を含む。界面活性剤は、製薬学的組成物の重量に基づいて 0.0005 - 0.01% の量で存在し得る。ある態様では、界面活性剤は、製薬学的組成物の重量に基づいて 0.0005 - 0.007% の量で存在し得る。界面活性剤の例としては、poly sorbate 20 が挙げられ、それは組成物の重量に基づいて 0.001 - 0.003% の量で存在し得る。別の例としては、poloxamer 188 が挙げられ、それは組成物の重量に基づいて 0.002 - 0.006% の量で存在し得る。

10

【0016】

インスリン分子は、インスリン分子の様々な位置でアシル化されてよい。ある態様では、インスリンは、親インスリン分子の B 鎖中の位置の Lys 残基の - アミノ基、特にヒトインスリン分子の B29 リジン基の - アミノ基においてアシル化される。しかしながら、本発明の他の態様によると、アシル化は、インスリン分子の別の位置で起きてもよく、例えば、B29 がリジンから別のアミノ酸残基へと改変されたとすれば、位置 B1 の - アミノ基もしくはインスリン分子中の天然アミノ酸残基がリジン残基に置換された位置で起きてもよい。

したがって、ある態様では、アシル化インスリンは、位置 B1 の - アミノ基もしくはインスリン分子の A または B 鎖中のリジン残基の遊離 - アミノ基のどちらかにおいてアシル化される。

20

ある態様では、インスリンは、インスリン分子の位置 B29 のリジン残基の遊離 - アミノ基においてアシル化される。

【0017】

アシル基は、脂溶性 (lipophilic) 基であり、典型的には、少なくとも一つの遊離カルボン酸基もしくは中性 pH で負に荷電する基を含み、約 6 から約 32 の炭素原子を有する脂肪酸部分であろう。より典型的には、脂肪酸部分は、6 から 24、8 から 20、12 から 20、12 - 16、10 - 16、10 - 20、14 - 18 もしくは 14 - 16 の炭素原子を有するであろう。

30

【0018】

ある態様では、製薬学的組成物は、少なくとも一つの遊離カルボン酸基もしくは中性 pH で負に荷電する基を含む。ある態様では、製薬学的組成物は、4 から 32 の炭素原子を有する二カルボン酸性脂肪酸から誘導されるアシル基を含む。

更なる態様では、脂肪酸部分は、約 6 から約 32、6 から 24、8 から 20、12 から 20、12 - 16、10 - 16、10 - 20、14 - 18 もしくは 14 - 16 の炭素原子を有する二カルボン酸性脂肪酸から誘導される。

【0019】

ある態様では、製薬学的組成物は、アミド結合を介するリンカー基を介して、インスリンと結合したアシル基を含む。

40

アシル基は、問題の遊離アミノ基と直接結合してよい。しかしながら、アシル基は、インスリン分子中の遊離アミノ基と、問題のアシル基とを一緒に連結するリンカーにより、アミド結合を介して結合していてもよい。

アシル化インスリンは、典型的には、ヒトインスリンと比較して、少なくとも一つ、もしくは二つの追加の負の正味荷電を有し、より典型的には、二つの追加の負の荷電を有するであろう。追加の負の荷電は、脂肪酸中の遊離カルボン酸基、あるいは、少なくとも一つが遊離カルボン酸もしくは中性 pH で負に荷電する基を含む一または複数のアミノ酸残基を含み得るリンカー基によりもたらされ得る。更なる態様では、アシル基は、二カルボン酸性脂肪酸から誘導される。

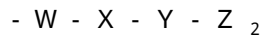
【0020】

50

ある態様では、製薬学的組成物は、インスリンが、親インスリン部分のB鎖のN末端アミノ酸残基の - アミノ基もしくは親インスリン部分のB鎖中のLys残基の - アミノ基の何れか一方とアミド結合を介して結合している側鎖であって、少なくとも一つの遊離カルボン酸基もしくは中性pHで負に荷電する基と；炭素鎖中に約4から約32の炭素原子を有する脂肪酸部分と；側鎖中の個々の構成成分をアミド結合を介して一緒に連結する一または複数のリンカーと；を含んでなる側鎖を有するインスリンを含む。

【0021】

ある態様では、インスリン分子は、親インスリンのB鎖中に存在するLys残基の - アミノ基と結合している側鎖であって、一般式：



[上式中、

Wは、

・そのカルボン酸基のうちの一つと共に、親のインスリンのB鎖中に存在するLys残基の - アミノ基と一緒に becoming アミド基を形成する側鎖中のカルボン酸基を有する - アミノ酸残基；

・アミドカルボニル結合を介して一緒に連結されている2、3または4の - アミノ酸残基からなる鎖であって、

アミド結合 - を介した鎖 - は親インスリンのB鎖中に存在するLys残基の - アミノ基と連結しており、

Wのアミノ酸残基が、Wが側鎖中にカルボン酸基を有するアミノ酸残基を少なくとも一つ有するように、中性側鎖を有するアミノ酸残基および側鎖中にカルボン酸基を有するアミノ酸残基の群から選択される鎖；もしくは、

・Xから親インスリンのB鎖中に存在するLys残基の - アミノ基までの共有結合であり；

Xは、

・ -  $\underline{CO}$  - ；

・ -  $CH(COOH)\underline{CO}$  - ；

・ -  $CO-N(CH_2COOH)CH_2\underline{CO}$  - ；

・ -  $CO-N(CH_2COOH)CH_2CON(CH_2COOH)CH_2\underline{CO}$  - ；

・ -  $CO-N(CH_2CH_2COOH)CH_2CH_2\underline{CO}$  - ；

・ -  $CO-N(CH_2CH_2COOH)CH_2CH_2CON(CH_2CH_2COOH)CH_2CH_2\underline{CO}$  - ；

・ -  $CO-NHCH(COOH)(CH_2)_4NH\underline{CO}$  - ；

・ -  $CO-N(CH_2CH_2COOH)CH_2\underline{CO}$  - ；もしくは

・ -  $CO-N(CH_2COOH)CH_2CH_2\underline{CO}$  - であって、

a) Wがアミノ酸残基もしくはアミノ酸残基の鎖であるとき、下線の炭素からの結合を介して、W中のアミノ基とアミド結合を形成するか、あるいは、

b) Wが共有結合であるとき、下線のカルボニル炭素からの結合を介して、親インスリンのB鎖中に存在するLys残基の - アミノ基とアミド結合を形成し；

Yは、

・ mが6から32の範囲の整数である -  $(CH_2)_m$  - ；

・ 1、2もしくは3の -  $CH=CH$  - 基と、鎖中に10から32の範囲の合計数の炭素原子を与えるのに十分な数の -  $CH_2$  - 基とを含んでなる二価の炭化水素鎖

であり；かつ、

Z<sub>2</sub>は、

・ -  $COOH$  ；

・ -  $CO-Asp$  ；

・ -  $CO-Glu$  ；

・ -  $CO-Gly$  ；

・ -  $CO-Sar$  ；

10

20

30

40

50

- ・ - CH(COOH)<sub>2</sub> ;
- ・ - N(CH<sub>2</sub>COOH)<sub>2</sub> ;
- ・ - SO<sub>3</sub>H ; もしくは
- ・ - PO<sub>3</sub>H

であるが、

ただし、Wが共有結合であってXが - CO - であるならば、Zは - COOHとは異なる ] の側鎖を有するもの、およびそのZn<sup>2+</sup>錯体である。

#### 【0022】

ある態様では、B30アミノ酸残基は除去されており、アシル化インスリンはdesB30インスリンである。

ある態様では、Wは4から10の炭素原子を有する - アミノ酸残基であり、更なる態様では、Wは、 - Asp、 - Asp、 - Glu、 - Glu、 - hGluおよび - hGluからなる群から選択される。

ある態様では、Xは、 - CO - である。

ある態様では、Z<sub>2</sub>は、 - COOHである。

#### 【0023】

側鎖 - W - X - Y - Z<sub>2</sub> の置換基Yは、mが6から32、8から20、12から20、もしくは12 - 16の範囲の整数である式 - (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub> - の基であってよい。

ある態様では、Yは、1、2もしくは3の - CH=CH - 基と、鎖中に6から32、10から32、12から20、もしくは12 - 16の範囲の合計数の炭素原子を与えるのに十分な数の - CH<sub>2</sub> - 基とを含んでなる二価の炭化水素鎖である。

ある態様では、Yは、式 - (CH<sub>2</sub>)<sub>v</sub> C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (CH<sub>2</sub>)<sub>w</sub> - (vおよびwの合計が6から30、10から20、もしくは12 - 16の範囲になるように、vおよびwは整数であるか、あるいは、それらのうちの一つは0である) の二価の炭化水素鎖である。

更なる態様では、Wは、 - Asp、 - Asp、 - Glu、および - Gluからなる群から選択され；Xは、 - CO - もしくは - CH(COOH)COであり；Yは、mが12 - 18の範囲の整数である - (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub> - であり、かつ、Z<sub>2</sub>は、 - COOHもしくは - CH(COOH)<sub>2</sub> である。

#### 【0024】

アシル化インスリン化合物の非限定的な例としては、 $N^{B29} - (N - (HOOC(CH_2)_{14}CO) - - Glu) desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - (HOOC(CH_2)_{15}CO) - - Glu) desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - (HOOC(CH_2)_{16}CO) - - Glu) desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - (HOOC(CH_2)_{17}CO) - - Glu) desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - (HOOC(CH_2)_{18}CO) - - Glu) desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - (HOOC(CH_2)_{16}CO) - - Glu - N - (- Glu)) desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - (Asp - OC(CH_2)_{16}CO) - - Glu) desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - (Glu - OC(CH_2)_{14}CO) - - Glu) desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - (Glu - OC(CH_2)_{14}CO - ) desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - (Asp - OC(CH_2)_{16}CO - ) desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - (HOOC(CH_2)_{16}CO) - - Glu - N - (- Asp)) desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - (Gly - OC(CH_2)_{13}CO) - - Glu) desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - (Sar - OC(CH_2)_{13}CO) - - Glu) desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - (HOOC(CH_2)_{13}CO) - - Glu) desB30$  ヒトインスリン； $(N^{B29} - (N - (HOOC(CH_2)_{13}CO) - - Asp) desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - (HOOC(CH_2)_{13}CO) - - Glu) desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - (HOOC(CH_2)_{16}CO) - - D - Glu) desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N -$

10

20

30

40

50



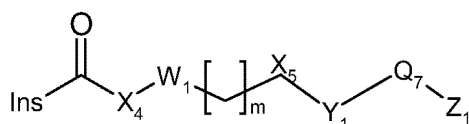
$(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}) - \text{D-Asp})\text{desB30}$  ヒトインスリン<sup>B</sup>  
<sup>29</sup> -  $(\text{N} - (\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}) - \text{D-Asp})\text{desB30}$  ヒト  
 インスリン;  $\text{N}^{\text{B}29} - (\text{N} - \text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO} - \text{D-Asp})\text{desB}$   
 $30$  ヒトインスリン;  $\text{N}^{\text{B}29} - (\text{N} - \text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO} - \text{IDA})\text{des}$   
 $\text{B30}$  ヒトインスリン;  $\text{N}^{\text{B}29} - [\text{N} - (\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}) - \text{N} - (\text{カルボキシエチル}) - \text{Gly}]\text{desB30}$  ヒトインスリン;  $\text{N}^{\text{B}29} - [\text{N} - (\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}) - \text{N} - (\text{カルボキシエチル}) - \text{Gly}]\text{desB30}$  ヒトインスリン; および  $\text{N}^{\text{B}29} - [\text{N} - (\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}) - \text{N} - (\text{カルボキシメチル}) - \text{Ala}]\text{desB30}$  ヒトインスリンが挙げられる。

ある態様では、側鎖は、少なくとも一つの芳香族基もしくは少なくとも一つの二官能性 PEG 基を含んでよい。以下、略語「PEG」は、ポリエチレングリコールに対して用いる。

10

# 【0025】

本発明のある態様では、本発明の組成物に用いられるアシル化インスリンは、式



[ 上式中、

20

Ins は、B 鎖の N 末端アミノ酸残基の - アミノ基もしくはインスリン部分の B 鎖中に存在する Lys 残基の - アミノ基を介して、アミド結合を介して側鎖の CO - 基と結合している親インスリン部分であり；

X<sub>4</sub> は、

- ・ n が 1、2、3、4、5 もしくは 6 である - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>；
- ・ R が、水素もしくは - (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> - COOH； - (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> - SO<sub>3</sub>H； - (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> - PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>； - (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> - O - SO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>； - (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> - O - PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>；1 又 2 の - (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> - O - COOH 基で置換されたアリーレン； - (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> - テトラゾリルである NR

{ 上式中、p は 1 から 6 の範囲の整数である }；

30

・ R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は、互いに独立し、それぞれの q の値からも独立して、H、- COOH、もしくは OH であってよく、q は 1 - 6 であり、R は上記のように定義される - (CR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>)<sub>q</sub> - NR - CO -；

・ R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> は、互いに独立し、それぞれの q<sub>1</sub> の値からも独立して、H、- COOH、もしくは OH であってよく、q<sub>1</sub> は 1 - 6 であり、R は上記のように定義される - ((CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)<sub>q<sub>1</sub></sub> - NR - CO)<sub>2 - 4</sub> -；もしくは、

・ 結合

であり；

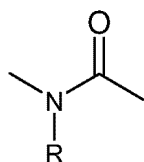
W<sub>1</sub> は、- COOH、- SO<sub>3</sub>H、および - PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> およびテトラゾリルからなる群から選択される一または二の基で置換されていてもよいアリーレンもしくはヘテロアリーレンであるか、あるいは W<sub>1</sub> は結合であり；

40

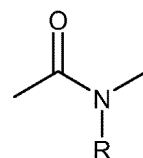
m は 0、1、2、3、4、5 もしくは 6 であり；

X<sub>5</sub> は、

- ・ - O -；
- ・



又は



{ R は上記のように定義される } ; もしくは

・ 結合

であり ;

$Y_1$  は、

・  $R_1$  および  $R_2$  は、互いに独立し、それぞれの  $q$  の値からも独立して、H、 $-COOH$ 、結合もしくはOHであってよく、 $q$  は 1 - 6 であり、R は上記のように定義される - (  $CR_1R_2$  )  $_q$  - NR - CO -

・ R が上記のように定義される NR ;

・  $R_3$  および  $R_4$  は、互いに独立し、それぞれの  $q_1$  の値からも独立して、H、 $-COOH$ 、もしくはOHであってよく、 $q_1$  は 1 - 6 であり、R は上記のように定義される - ( (  $CR_3R_4$  )  $_{q_1}$  - NR - CO )  $_{2-4}$  - ; もしくは

・ 結合

であり ;

$Q_7$  は、

・  $r$  が 4 から 22 の整数である - (  $CH_2$  )  $_r$  - ;

・ 1、2 もしくは 3 の  $-CH=CH-$  基と、鎖中に 4 から 22 の範囲の合計数の炭素原子を与えるのに十分な数の  $-CH_2-$  基とを含んでなる二価の炭化水素鎖 ; もしくは

・ 式

- (  $CH_2$  )  $_s$  -  $Q_8$  - (  $C_6H_4$  )  $_{v_1}$  -  $Q_9$  - (  $CH_2$  )  $_w$  -  $Q_{10}$  - (  $C_6H_4$  )  $_{v_2}$  -  $Q_{11}$  - (  $CH_2$  )  $_t$  -  $Q_{12}$  - (  $C_6H_4$  )  $_{v_3}$  -  $Q_{13}$  - (  $CH_2$  )  $_z$  -

{  $Q_8$  -  $Q_{13}$  は、互いに独立して、O ; S もしくは結合であってよく ;  $s$ 、 $w$ 、 $t$  および  $z$  は、互いに独立して、 $s$ 、 $w$ 、 $t$  および  $z$  の合計が 4 から 22 の範囲になるように、

0 もしくは 1 から 10 の整数であり、かつ、 $v_1$ 、 $v_2$ 、および  $v_3$  は、互いに独立して、0 もしくは 1 であってよいが、ただし、 $W_1$  が結合であるならば、 $Q_7$  は式 - (  $CH_2$  )  $_{v_4}$   $C_6H_4$  (  $CH_2$  )  $_{w_1}$  - (  $v_4$  および  $w_1$  の合計が 6 から 22 の範囲になるように、

$v_4$  および  $w_1$  は整数であるか、あるいは、それらのうちの一つは 0 である ) の二価の炭化水素鎖ではない }

の二価の炭化水素鎖

であり ; かつ、

$Z_1$  は、

-  $COOH$  ;

-  $CO-Asp$  ;

-  $CO-Glu$  ;

-  $CO-Gly$  ;

-  $CO-Sar$  ;

-  $CH(COOH)_2$  ;

-  $N(CH_2COOH)_2$  ;

-  $SO_3H$

-  $PO_3H_2$  ;

-  $O-SO_3H$  ;

-  $O-PO_3H_2$  ;

- テトラゾリルもしくは

$W_2$  が、 $-COOH$ 、 $-SO_3H$ 、および  $-PO_3H_2$  およびテトラゾリルから選択される一または二の基で置換されているアリーレンもしくはヘテロアリーレンである - O - W

10

20

30

40

50

2

であるが；

ただし、 $W_1$  が結合であり、かつ  $v_1$ 、 $v_2$  および  $v_3$  が全て 0 であり、かつ  $Q_1 - \dots - Q_6$  が全て結合であれば、 $Z_1$  は  $O - W_2$  である]

を有するもの、およびその任意の  $Zn^{2+}$  錯体である。

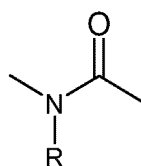
【0026】

本発明のある態様では、 $W_1$  はフェニレンである。ある態様では、 $W_1$  は、窒素、酸素または硫黄を含んでなる 5 - 7 員環ヘテロ環系である。ある態様では、 $W_1$  は、少なくとも一つの酸素を含んでなる 5 員環ヘテロ環系である。

本発明のある態様では、 $Q_7$  は、 $r$  が 4 から 22、8 から 20、12 から 20、もしくは 14 - 18 の範囲の整数である  $-(CH_2)_r-$  である。ある態様では、 $Q_8$ 、 $Q_9$ 、 $Q_{12}$  および  $Q_{13}$  は、全て結合であり、 $v_2$  は 1 であり、 $v_1$  および  $v_3$  は 0 である。ある態様では、 $Q_{10}$  および  $Q_{11}$  は酸素である。

【0027】

本発明のある態様では、 $X_4$  および  $Y_1$  は結合であり、 $X_5$  は、



[ 上式中、 $R$  は、 $p$  が 1 - 4 である  $-(CH_2)_p-COOH$  である ]  
である。

ある態様では、 $Z_1$  は、 $-COOH$  である。

【0028】

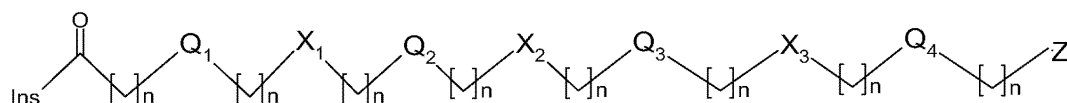
本発明のある態様では、製薬学的組成物のアシル化インスリンは、

$N^{B29} - [N - (HOOC(CH_2)_{14}CO) - N - (カルボキシエチル) - CH_2 - C_6H_4CO] desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - [N - (HOOC(CH_2)_{13}CO) - N - (カルボキシエチル) - CH_2 - C_6H_4CO] desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - [N - (HOOC(CH_2)_{15}CO) - N - (カルボキシエチル) - CH_2 - C_6H_4CO] desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - [N - (HOOC(CH_2)_{16}CO) - N - (カルボキシエチル) - CH_2 - C_6H_4CO] desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - [N - (HOOC(CH_2)_{14}CO) - N - (カルボキシメチル) - C_6H_4CO] desB30$  ヒトインスリン、および  $N^{B29} - [N - (HOOC(CH_2)_{14}CO) - N - (カルボキシエチル) - CH_2 - (フラニレン)CO] desB30$  ヒトインスリン、 $N^{B29} - \{4 - \text{カルボキシ} - 4 - [10 - (4 - \text{カルボキシ} - \text{フェノキシ}) - \text{デカノイルアミノ}] - \text{ブチリル}\} desB30$  ヒトインスリン

からなる群から選択される。

【0029】

本発明のある態様では、製薬学的組成物中に存在するアシル化インスリンは、式



[ 上式中、

$Ins$  は、B 鎖の N 末端アミノ酸残基の - アミノ基もしくはインスリン部分の B 鎖中に存在する  $Ly s$  残基の - アミノ基を介して、アミド結合を介して側鎖の  $CO -$  基と結合している親インスリン部分であり；

それぞれの  $n$  は独立して、0、1、2、3、4、5 もしくは 6 であり；

10

20

•



40

$$- \text{OPO}_3\text{H}_2$$

- $\text{PO}_3\text{H}_2$  もしくは
- テトラゾール - 5 - イル

である]

を有するもの、およびその任意の  $Z_{n^2+}$  錯体である。

【 0 0 3 0 】

本発明のある態様では、 $s$  は、 $2 - 1/2$ 、 $2 - 4$  もしくは  $2 - 3$  の範囲である。ある態様では、 $s$  は好ましくは  $1$  である。

本発明のある態様では、Zは、 $-COOH$ である。

**【 0 0 3 1 】**

本発明のある態様では、製薬学的組成物のアシル化インスリンは、

N<sup>B 2 9</sup> - ( 3 - [ 2 - { 2 - ( 2 - [ - カルボキシ - ペンタデカノイル - - グル  
タミル - ( 2 - アミノ - エトキシ ) ] - エトキシ ) - エトキシ } - エトキシ ] - プロピノ

イル(propinoyl) ) d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - ( 3 - [ 2 - { 2 - ( 2 - [ - カルボキシ - ヘプタデカノイル - - グルタミル - ( 2 - アミノ - エトキシ ) ]

- エトキシ) - エトキシ} - エトキシ] - プロピノイル(propinoyl)) de s B 3 0 ヒト  
インスリン、N<sup>B 2 9</sup> - { 3 - [ 2 - ( 2 - { 2 - [ 2 - ( - カルボキシ - ペンタデ

カノイルアミノ) - エトキシ] - エトキシ} - エトキシ) - エトキシ] - プロピオニル -  
- グルタミル d e s B 3 0 ヒトインスリン、 N<sup>B 2 9</sup> - ( - [ 2 - ( 2 - { 2 - [

2 - ( 2 - カルボキシ - エトキシ ) - エトキシ } - エトキシ ) - エチルカル  
バチイル ] - ヘプタデカノイル - - グルタミル ) d e s B 3 0 ヒトインスリン N<sup>B</sup>

$$^2\text{ }^9\text{ } - ( \text{ } - [ 2 - ( 2 - \{ 2 - [ 2 - ( 2 - \text{カルボキシ} - \text{エトキシ} ) - \text{エトキシ} ] - \text{エトキシ} ) - \text{エトキシ} ) - \text{エチルカルバモイル} ] - \text{ヘプタジカノイル} - \text{ } - \text{グルタミル} ) \text{ } d$$

e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - 3 - [ 2 - ( 2 - { 2 - [ 2 - ( - カルボキ

ロピオニル - - グルタミル d e s B 3 0 ヒトインスリン、 N <sup>B 2 9</sup> - ( 3 - ( 3 - {

2 - [ 2 - ( 3 - [ 7 - カルボキシペンタノイルアミノ ] プロパ - オキシ ) エトキシ ] -  
エトキシ } プロピルカルバモイル ) プロピオニル ) d e s B 3 0 ヒトインスリン、 N<sup>B</sup>  
2 . 9

2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100. 101. 102. 103. 104. 105. 106. 107. 108. 109. 110. 111. 112. 113. 114. 115. 116. 117. 118. 119. 120. 121. 122. 123. 124. 125. 126. 127. 128. 129. 130. 131. 132. 133. 134. 135. 136. 137. 138. 139. 140. 141. 142. 143. 144. 145. 146. 147. 148. 149. 150. 151. 152. 153. 154. 155. 156. 157. 158. 159. 160. 161. 162. 163. 164. 165. 166. 167. 168. 169. 170. 171. 172. 173. 174. 175. 176. 177. 178. 179. 180. 181. 182. 183. 184. 185. 186. 187. 188. 189. 190. 191. 192. 193. 194. 195. 196. 197. 198. 199. 200. 201. 202. 203. 204. 205. 206. 207. 208. 209. 210. 211. 212. 213. 214. 215. 216. 217. 218. 219. 220. 221. 222. 223. 224. 225. 226. 227. 228. 229. 230. 231. 232. 233. 234. 235. 236. 237. 238. 239. 240. 241. 242. 243. 244. 245. 246. 247. 248. 249. 250. 251. 252. 253. 254. 255. 256. 257. 258. 259. 260. 261. 262. 263. 264. 265. 266. 267. 268. 269. 270. 271. 272. 273. 274. 275. 276. 277. 278. 279. 280. 281. 282. 283. 284. 285. 286. 287. 288. 289. 290. 291. 292. 293. 294. 295. 296. 297. 298. 299. 300. 301. 302. 303. 304. 305. 306. 307. 308. 309. 310. 311. 312. 313. 314. 315. 316. 317. 318. 319. 320. 321. 322. 323. 324. 325. 326. 327. 328. 329. 330. 331. 332. 333. 334. 335. 336. 337. 338. 339. 340. 341. 342. 343. 344. 345. 346. 347. 348. 349. 350. 351. 352. 353. 354. 355. 356. 357. 358. 359. 360. 361. 362. 363. 364. 365. 366. 367. 368. 369. 370. 371. 372. 373. 374. 375. 376. 377. 378. 379. 380. 381. 382. 383. 384. 385. 386. 387. 388. 389. 390. 391. 392. 393. 394. 395. 396. 397. 398. 399. 400. 401. 402. 403. 404. 405. 406. 407. 408. 409. 410. 411. 412. 413. 414. 415. 416. 417. 418. 419. 420. 421. 422. 423. 424. 425. 426. 427. 428. 429. 430. 431. 432. 433. 434. 435. 436. 437. 438. 439. 440. 441. 442. 443. 444. 445. 446. 447. 448. 449. 450. 451. 452. 453. 454. 455. 456. 457. 458. 459. 460. 461. 462. 463. 464. 465. 466. 467. 468. 469. 470. 471. 472. 473. 474. 475. 476. 477. 478. 479. 480. 481. 482. 483. 484. 485. 486. 487. 488. 489. 490. 491. 492. 493. 494. 495. 496. 497. 498. 499. 500. 501. 502. 503. 504. 505. 506. 507. 508. 509. 510. 511. 512. 513. 514. 515. 516. 517. 518. 519. 520. 521. 522. 523. 524. 525. 526. 527. 528. 529. 530. 531. 532. 533. 534. 535. 536. 537. 538. 539. 540. 541. 542. 543. 544. 545. 546. 547. 548. 549. 550. 551. 552. 553. 554. 555. 556. 557. 558. 559. 560. 561. 562. 563. 564. 565. 566. 567. 568. 569. 570. 571. 572. 573. 574. 575. 576. 577. 578. 579. 580. 581. 582. 583. 584. 585. 586. 587. 588. 589. 590. 591. 592. 593. 594. 595. 596. 597. 598. 599. 600. 601. 602. 603. 604. 605. 606. 607. 608. 609. 610. 611. 612. 613. 614. 615. 616. 617. 618. 619. 620. 621. 622. 623. 624. 625. 626. 627. 628. 629. 630. 631. 632. 633. 634. 635. 636. 637. 638. 639. 640. 641. 642. 643. 644. 645. 646. 647. 648. 649. 650. 651. 652. 653. 654. 655. 656. 657. 658. 659. 660. 661. 662. 663. 664. 665. 666. 667. 668. 669. 670. 671. 672. 673. 674. 675. 676. 677. 678. 679. 680. 681. 682. 683. 684. 685. 686. 687. 688. 689. 690. 691. 692. 693. 694. 695. 696. 697. 698. 699. 700. 701. 702. 703. 704. 705. 706. 707. 708. 709. 710. 711. 712. 713. 714. 715. 716. 717. 718. 719. 720. 721. 722. 723. 724. 725. 726. 727. 728. 729. 730. 731. 732. 733. 734. 735. 736. 737. 738. 739. 740. 741. 742. 743. 744. 745. 746. 747. 748. 749. 750. 751. 752. 753. 754. 755. 756. 757. 758. 759. 760. 761. 762. 763. 764. 765. 766. 767. 768. 769. 770. 771. 772. 773. 774. 775. 776. 777. 778. 779. 780. 781. 782. 783. 784. 785. 786. 787. 788. 789. 790. 791. 792. 793. 794. 795. 796. 797. 798. 799. 800. 801. 802. 803. 804. 805. 806. 807. 808. 809. 810. 811. 812. 813. 814. 815. 816. 817. 818. 819. 820. 821. 822. 823. 824. 825. 826. 827. 828. 829. 830. 831. 832. 833. 834. 835. 836. 837. 838. 839. 840. 841.

トインスリン、N<sup>B</sup>2<sup>9</sup> - (3 - (3 - {2 - [2 - (3 - [9 - カルボキシノチノイルアミノ]プロパ - オキシ)エトキシ]エトキシ} - プロピルカルバモイル)プロピオニ

ル)desB30ヒトインスリン、N<sup>B29</sup>-(3-(2-{2-[2-(9-カルボキシノナノイルアミノ)エトキシ]エトキシ}エチルカルバモイル)プロピオニル-

グルタミル)desB30ヒトインスリン、N<sup>B29</sup>-(3-(3-{4-[3-(9  
-カルボキシノナノイルアミノ)プロパ-オキシ]ブトキシ}-プロピルカルバモイル)

プロピオニル - グルタミル) des B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - ( 2 - [ 3  
- ( 2 - ( 2 - { 2 - ( 7 - カルボキシヘプタノイルアミノ) エトキシ} エトキシ) - エ

チルカルバモイル]プロピオニル- -グルタミル)desB30ヒトインスリン、N<sup>B29</sup>-(3-[2-(2-{2-[2-( -カルボキシペンタデカノイルアミノ)エ

トキシ]エトキシ}エトキシ)エトキシ]プロピオニル)) des B 30 ヒトインスリン  
、 N<sup>B 2 9</sup> - ( 3 - ( 2 - { 2 - [ 2 - ( 2 - { 2 - [ 2 - ( 2 - { 2 - [ 2 - ( 2 -

{ 2 - [ 2 - ( - カルボキシ - トリデカノイルアミノ ) - エトキシ ] - エトキシ } - エトキシ ) - エトキシ ] - エトキシ } - エトキシ ) - エトキシ ] - エトキシ } - エトキシ )

- エトキシ } - エトキシ } - エトキシ } - プロポイオノイル(propionoyl) - - グルタミ  
ル) de s B 3 0 ヒトインスリン N<sup>B 2 9</sup> - ( 3 - [ 2 - ( 2 - { 2 - [ 2 - (

カルボキシ - トリデカノイルアミノ ) - エトキシ ] - エトキシ } - エトキシ ) - エトキシ

$\text{B}^{29} - (3 - [2 - (2 - \{2 - [2 - (2 - \{2 - [2 - (\text{カルボキシ - トリ$   
 $\text{メカノイルアミノ}) - \text{エトキシ}) - \text{エトキシ}) - \text{エトキシ}) - \text{エトキシ}) - \text{エトキシ})$

エトキシ) - エトキシ] - エトキシ} - プロポイオノイル(propionoyl) - - グルタミル

) d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - ( 3 - ( 2 - { 2 - [ 2 - ( - カルボキシ - ペンタデカノイルアミノ ) - エトキシ ] - エトキシ } - エチルカルバモイル ) - プロピオニル - - グルタミル ) d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - ( 3 - ( 3 - { 2 - [ 2 - ( 3 - [ - カルボキシペンタデカノイルアミノ ] プロパ - オキシ ) エトキシ ] - エトキシ } プロピルカルバモイル ) プロピオニル - - グルタミル ) d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - ( 3 - ( 3 - { 4 - [ 3 - ( - カルボキシウンデカノイルアミノ ) プロパ - オキシ ] ブトキシプロピルカルバモイル ) プロピオニル - - グルタミル ) d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - ( 3 - ( 3 - { 4 - [ 3 - ( - カルボキシトリデカノイルアミノ ) プロパ - オキシ ] ブトキシプロピルカルバモイル ) プロピオニル - - グルタミル ) d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - ( 3 - ( 2 - { 2 - [ 2 - ( - カルボキシウンデカノイルアミノ ) エトキシ ] エトキシ } エチルカルバモイル ) プロピオニル - - グルタミル ) d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - ( 3 - ( 2 - { 2 - [ 2 - ( - カルボキシトリデカノイルアミノ ) エトキシ ] エトキシ } エチルカルバモイル ) プロピオニル - - グルタミル ) d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - { 3 - [ 2 - ( 2 - { 2 - [ 2 - ( - カルボキシ - ペンタデカノイルアミノ ) エトキシ ] エトキシ } エトキシ ] エトキシ ] プロピオニル - ガンマ - - D - グルタミル ) d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - { 3 - [ 2 - ( 2 - { 2 - [ 2 - ( 7 - カルボキシヘプタノイルアミノ ) エトキシ ] エトキシ } エトキシ ] エトキシ ] プロピオニル - - グルタミル } d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - { 3 - [ 2 - ( 2 - { 2 - [ 2 - ( 9 - カルボキシノナノイルアミノ ) エトキシ ] エトキシ } エトキシ ] エトキシ ] プロピオニル(propionyl) - - グルタミル } d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - { 3 - [ 2 - ( 2 - { 2 - [ 2 - ( - カルボキシウンデカノイルアミノ ) エトキシ ] エトキシ } エトキシ ] エトキシ ] プロピオニル - - グルタミル } d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - { 3 - [ 2 - ( 2 - { 2 - [ 2 - ( - カルボキシトリデカノイルアミノ ) エトキシ ] エトキシ } エトキシ ] エトキシ ] プロピオニル - - グルタミル } d e s B 3 0 ヒトインスリン

からなる群から選択される。

#### 【 0 0 3 2 】

親インスリン分子は、ヒトインスリンもしくはそのアナログである。ヒトインスリン非限定的なアナログとしては、d e s B 3 0 アナログ；位置 B 3 0 のアミノ酸残基が L y s であり、位置 B 2 9 のアミノ酸残基は、C y s、M e t、A r g および L y s 以外の任意のコードされ得るアミノ酸であるインスリンアナログ；位置 A 2 1 のアミノ酸残基が A s n であるインスリンアナログおよび位置 B 3 のアミノ酸残基が L y s であり、位置 B 2 9 のアミノ酸残基が G l u であるインスリンアナログが挙げられる。

#### 【 0 0 3 3 】

親インスリンアナログの別の群では、位置 B 2 8 のアミノ酸残基は A s p である。親インスリンアナログのこの群の具体的な例としては、欧州特許第 2 1 4 8 2 6 号に開示された A s p B 2 8 ヒトインスリンが挙げられる。

親インスリンアナログの別の群では、位置 B 2 8 のアミノ酸残基は L y s であり、位置 B 2 9 のアミノ酸残基は P r o である。親インスリンアナログのこの群の具体的な例としては、L y s<sup>B 2 8</sup> P r o<sup>B 2 9</sup> ヒトインスリンが挙げられる。

#### 【 0 0 3 4 】

親インスリンアナログの別の群では、位置 B 3 0 のアミノ酸残基は L y s であり、位置 B 2 9 のアミノ酸残基は、C y s、M e t、A r g および L y s 以外の任意のコードされ得るアミノ酸である。例としては、位置 B 2 9 のアミノ酸残基が T h r であり、位置 B 3 0 のアミノ酸残基が L y s であるインスリンアナログが上げられる。親インスリンアナログのこの群の具体的な例としては、T h r<sup>B 2 9</sup> L y s<sup>B 3 0</sup> ヒトインスリンが挙げられる。

親インスリンアナログの別の群では、位置 B 3 のアミノ酸残基は L y s であり、位置 B 2 9 のアミノ酸残基は G l u である。親インスリンアナログのこの群の具体的な例として

は、 $\text{Lys}^{\text{B}3}\text{Glu}^{\text{B}29}$  ヒトインスリンが挙げられる。

【0035】

本発明に係る製薬学的組成物は、治療の必要のある患者における1型糖尿病、2型糖尿病および高血糖を引き起こす他の状態の治療のための、アシル化インスリンの治療的有効量を製薬学的に許容される担体と共に含むであろう。

本発明の更なる態様では、治療の必要のある患者における1型糖尿病、2型糖尿病および高血糖を引き起こす他の状態の治療のための、上記定義のアシル化インスリン誘導体の治療的有効量を、インスリンまたは作用が急速に発現するインスリンアナログと混合して、製薬学的に許容される担体および/または添加物と共に含む製薬学的組成物が提供される。

10

【0036】

このように、製薬学的組成物は、二つのインスリン構成成分の混合物を含んでいてもよい：遅延性のインスリン作用を有するもの、基礎インスリン、および作用が急速に発現する別のもの、ボーラスインスリン。そのような混合物の例としては、国際公開2005/012347号に開示される $\text{LysB29N}$  - ヘキサデカンジオイル - -  $\text{GluDesB30}$  ヒトインスリンに対応する $\text{N}^{\text{B}29}$  - ( $\text{N}$  - ( $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}$ ) - -  $\text{Glu}$ )  $\text{DesB30}$  ヒトインスリンと混合した、インスリンアスパルト、 $\text{AspB28}$  ヒトインスリンが挙げられる。そのような混合物の別の例としては、 $\text{LysB29N}$  - ヘキサデカンジオイル - -  $\text{GluDesB30}$  ヒトインスリンと混合した、 $\text{Lispro}$ 、 $\text{Lys}^{\text{B}28}\text{Pro}^{\text{B}29}$  ヒトインスリンが挙げられる。そのような混合物の第三の例としては、 $\text{LysB29N}$  - ヘキサデカンジオイル - -  $\text{GluDesB30}$  ヒトインスリンと混合した、グルリシン、 $\text{Lys}^{\text{B}3}\text{Glu}^{\text{B}29}$  - ヒトインスリンが挙げられる。

20

【0037】

本発明のある態様では、少なくとも85%の即効型インスリンが、即効型インスリンヘキサマーもしくは即効型インスリンヘキサマーより低分子量の複合体として存在する。

本発明のある態様では、少なくとも90、92、95、96、97、98、99、99.5%の即効型インスリンが、即効型インスリンヘキサマーもしくは即効型インスリンヘキサマーより低分子量の複合体として存在する。

アシル化インスリン誘導体と即効型インスリンアナログとは、約90%/10%；約75%/25%、約70%/30%、約50%/50%、約25%/75%、約30%/70%もしくは約10%/90%のモル比で混合することができる。

30

【0038】

ある態様では、本発明の製薬学的組成物は、約6.5から約8.5のpHを有するであろう。別の態様では、pHは約7.0から約8.2であるか、pHは約7.2から約8.0もしくは約7.4から約8.0であるか、あるいは、pHは、約7.4から約7.8である。

【0039】

本発明は、さらに、6分子のアシル化インスリン毎に約4より多い亜鉛原子を組成物に添加する、アシル化インスリンを含む製薬学的組成物を製造するための方法を含む。

40

本発明の更なる態様では、6分子のアシル化インスリン毎に約4.3より多い亜鉛原子を組成物に添加するか、あるいは、6分子のアシル化インスリン毎に約4.5より多い亜鉛原子を組成物に添加するか、あるいは、6分子のアシル化インスリン毎に約5より多い亜鉛原子を組成物に添加する。更なる態様では、6分子のアシル化インスリン毎に約5.5より多い亜鉛原子、もしくは、6分子のアシル化インスリン毎に約6.5より多い亜鉛原子、もしくは、6分子のアシル化インスリン毎に約7.0より多い亜鉛原子、もしくは、6分子のアシル化インスリン毎に約7.5より多い亜鉛原子を組成物に添加する。

【0040】

本発明のある態様では、本方法は、6分子のアシル化インスリン毎に最大約12の亜鉛原子を組成物に添加することを含む。

50

本発明のある態様では、本方法は、6分子のアシル化インスリン毎に約4.3から約12の亜鉛原子を組成物に添加することを含む。

本発明の更なる態様では、6分子のアシル化インスリン毎に約4.5から約12の亜鉛原子を組成物に添加するか、あるいは、6分子のアシル化インスリン毎に約5から約11.4の亜鉛原子を組成物に添加するか、あるいは、6分子のアシル化インスリン毎に約5.5から約10の亜鉛原子を組成物に添加する。

更なる態様では、6分子のアシル化インスリン毎に約6から約10.5の亜鉛原子、もしくは、6分子のアシル化インスリン毎に約6.5から約10の亜鉛原子、もしくは、6分子のアシル化インスリン毎に約7から約9の亜鉛原子を組成物に添加する。

【0041】

10

本発明のある態様では、本方法は、保存料の添加前に、亜鉛を組成物に添加することを含む。本発明の更なる態様では、保存料の添加前に添加する亜鉛原子の数は、6分子のアシル化インスリン毎に1より多い亜鉛原子であるか、あるいは、保存料の添加前に添加する亜鉛原子の数は、6分子のアシル化インスリン毎に2より多い亜鉛原子であるか、あるいは、保存料の添加前に添加する亜鉛原子の数は、6分子のアシル化インスリン毎に3より多い亜鉛原子であるか、あるいは、保存料の添加前に添加する亜鉛原子の数は、6分子のアシル化インスリン毎に4より多い亜鉛原子であるか、あるいは、保存料の添加前に添加する亜鉛原子の数は、6分子のアシル化インスリン毎に5より多い亜鉛原子である。

【0042】

本発明の更なる態様では、6分子のアシル化インスリン毎に約4.5から約12の亜鉛原子を保存料の添加前に組成物に添加するか、あるいは、6分子のアシル化インスリン毎に約5から約11.4の亜鉛原子を保存料の添加前に組成物に添加するか、あるいは、さらにより好ましくは、6分子のアシル化インスリン毎に約5.5から約10の亜鉛原子を保存料の添加前に組成物に添加する。更なる態様では、6分子のアシル化インスリン毎に約6から約10.5の亜鉛原子、もしくは、6分子のアシル化インスリン毎に約6.5から約10の亜鉛原子、もしくは、6分子のアシル化インスリン毎に約7から約9の亜鉛原子を保存料の添加前に組成物に添加する。

20

【0043】

本発明のある態様では、本方法は、保存料の添加後に、亜鉛を組成物に添加することを含む。本発明のある態様では、6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも0.5の亜鉛原子を保存料の添加後に組成物に添加するか、あるいは、6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも1の亜鉛原子を保存料の添加後に組成物に添加する。

30

本発明の更なる態様では、6分子のアシル化インスリン毎に約2より多い亜鉛原子を保存料の添加後に組成物に添加するか、あるいは、6分子のアシル化インスリン毎に約3より多い亜鉛原子を保存料の添加後に組成物に添加するか、あるいは、6分子のアシル化インスリン毎に約4より多い亜鉛原子を保存料の添加後に組成物に添加する。

【0044】

本発明の更なる態様では、6分子のアシル化インスリン毎に約0.5から約12、約1から約11.4、約1.5から約11、約2から約10.5、約3から約10、もしくは約4から約9の亜鉛原子を保存料の添加後に組成物に添加する。

40

本発明の更なる態様では、6分子のアシル化インスリン毎に約4.5から約12の亜鉛原子を保存料の添加後に組成物に添加するか、あるいは、6分子のアシル化インスリン毎に約5から約11.4の亜鉛原子を保存料の添加後に組成物に添加するか、あるいは、6分子のアシル化インスリン毎に約5.5から約10の亜鉛原子を保存料の添加後に組成物に添加する。

【0045】

更なる態様では、6分子のアシル化インスリン毎に約6から約10.5、もしくは6分子のアシル化インスリン毎に約6.5から約10、もしくは6分子のアシル化インスリン毎に約7から約9の亜鉛原子を保存料の添加後に組成物に添加する。

本発明のある態様では、本方法は、保存料の添加前に亜鉛の一部を添加し、保存料の添

50



加後に亜鉛の一部を添加することを含む。

ある態様では、本方法は、6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも0.5の亜鉛原子を保存料の添加前に添加し、6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも1の亜鉛原子を保存料の添加後に添加することを含む。ある態様では、本方法は、6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも0.5の亜鉛原子を保存料の添加前に添加し、6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10もしくは11の亜鉛原子を保存料の添加後に添加することを含む。

【0046】

ある態様では、本方法は、6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも1の亜鉛原子を保存料の添加前に添加し、6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも1の亜鉛原子を保存料の添加後に添加すること、あるいは、6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも1の亜鉛原子を保存料の添加前に添加し、6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも2または3の亜鉛原子を保存料の添加後に添加すること、あるいは、6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも1の亜鉛原子を保存料の添加前に添加し、6分子のアシル化インスリン毎に最大約11の亜鉛原子を保存料の添加後に添加することを含む。ある態様では、本方法は、6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも1の亜鉛原子を保存料の添加前に添加し、6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも4、5、6、7、8、9、10もしくは11の亜鉛原子を保存料の添加後に添加することを含む。

【0047】

ある態様では、本方法は、6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも2の亜鉛原子を保存料の添加前に添加し、6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも1の亜鉛原子を保存料の添加後に添加すること、あるいは、6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも2の亜鉛原子を保存料の添加前に添加し、6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも2または3の亜鉛原子を保存料の添加後に添加すること、あるいは、6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも2の亜鉛原子を保存料の添加前に添加し、6分子のアシル化インスリン毎に最大約10の亜鉛原子を保存料の添加後に添加することを含む。ある態様では、本方法は、6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも2の亜鉛原子を保存料の添加前に添加し、6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも4、5、6、7、8、9もしくは10の亜鉛原子を保存料の添加後に添加することを含む。

【0048】

ある態様では、本方法は、6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも3の亜鉛原子を保存料の添加前に添加し、6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも1の亜鉛原子を保存料の添加後に添加すること、あるいは、6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも3の亜鉛原子を保存料の添加前に添加し、6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも2または3の亜鉛原子を保存料の添加後に添加すること、あるいは、6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも3の亜鉛原子を保存料の添加前に添加し、6分子のアシル化インスリン毎に最大約9の亜鉛原子を保存料の添加後に添加することを含む。

本発明のある態様では、保存料の添加前に添加する亜鉛原子の数は、6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも3の亜鉛原子であり、保存料の添加後に添加する亜鉛原子の数は、6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも3の亜鉛原子である。ある態様では、本方法は、6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも3の亜鉛原子を保存料の添加前に添加し、6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも4、5、6、7、8もしくは9の亜鉛原子を保存料の添加後に添加することを含む。

【0049】

本発明のある態様では、添加する保存料は、フェノールおよび/またはm-クレゾールである。

本発明のある態様では、本方法は、一工程で、製薬学的組成物に亜鉛原子の総量を添加することを含む。

本発明のある態様では、本方法は、二以上の工程で、製薬学的組成物に亜鉛原子を添加することを含む。例えば、亜鉛は、それぞれの工程が最大1 Zn / 6 i n sのうちの少量

10

20

30

40

50

の添加を含む 1、2、3、4 または 5 工程で、組成物に添加されてよい。亜鉛は、それぞれの工程が  $2\text{ Zn} / 6\text{ ins}$ 、 $3\text{ Zn} / 6\text{ ins}$ 、 $4\text{ Zn} / 6\text{ ins}$ 、 $5\text{ Zn} / 6\text{ ins}$  もしくは  $6\text{ Zn} / 6\text{ ins}$  のうちの少量の添加を含む 1、2、3、4 または 5 工程で、組成物に添加されてよい。

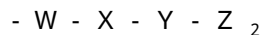
#### 【0050】

本発明のある態様では、本方法は、製薬学的組成物に界面活性剤を添加することを含む。界面活性剤は、製薬学的組成物の重量に基づいて 0.0005 - 0.01% の量で製薬学的組成物中に混合し得る。ある態様では、界面活性剤は、組成物の重量に基づいて 0.0005 - 0.007% の量で製薬学的組成物中に混合し得る。界面活性剤の例としては、poly sorbate 20 が挙げられ、それは組成物の重量に基づいて 0.001 - 0.003% の量で製薬学的組成物中に混合し得る。別の例としては、poloxamer 188 が挙げられ、それは組成物の重量に基づいて 0.002 - 0.006% の量で製薬学的組成物中に混合し得る。

10

#### 【0051】

本発明の更なる態様では、本方法は、インスリンが、親インスリンの B 鎖中に存在する Lys 残基の - アミノ基と結合している側鎖であって、一般式：



[上式中、

W は、

・そのカルボン酸基のうちの一つと共に、親のインスリンの B 鎖中に存在する Lys 残基の - アミノ基と一緒にあってアミド基を形成する、側鎖中にカルボン酸基を有するアミノ酸残基；

20

・アミドカルボニル結合を介して一緒に連結されている 2、3 または 4 の - アミノ酸残基からなる鎖であって、

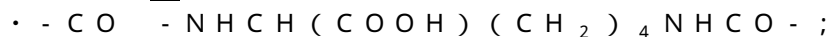
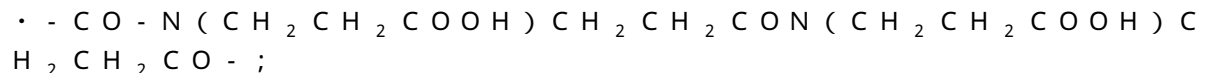
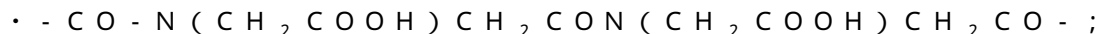
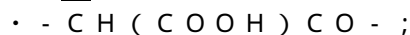
アミド結合 - を介した鎖 - は親インスリンの B 鎖中に存在する Lys 残基の - アミノ基と連結しており、

W のアミノ酸残基は、W が側鎖中にカルボン酸基を有するアミノ酸残基を少なくとも一つ有するように、中性側鎖を有するアミノ酸残基および側鎖中にカルボン酸基を有するアミノ酸残基の群から選択される鎖；もしくは、

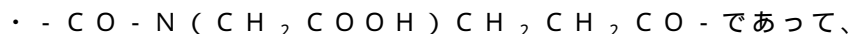
・X から親インスリンの B 鎖中に存在する Lys 残基の - アミノ基までの共有結合であり；

30

X は、



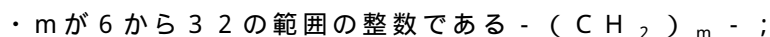
40



a) W がアミノ酸残基もしくはアミノ酸残基の鎖であるとき、下線の炭素からの結合を介して、W 中のアミノ基とアミド結合を形成するか、あるいは、

b) W が共有結合であるとき、下線のカルボニル炭素からの結合を介して、親インスリンの B 鎖中に存在する Lys 残基の - アミノ基とアミド結合を形成し；

Y は、



・1、2 もしくは 3 の - CH=CH - 基と、鎖中に 10 から 32 の範囲の合計数の炭素原子を与えるのに十分な数の - CH<sub>2</sub> - 基とを含んでなる二価の炭化水素鎖

50

であり；かつ、

Z<sub>2</sub> は、

- ・ - COOH；
- ・ - CO - Asp；
- ・ - CO - Glu；
- ・ - CO - Gly；
- ・ - CO - Sar；
- ・ - CH(COOH)<sub>2</sub>；
- ・ - N(CH<sub>2</sub>COOH)<sub>2</sub>；
- ・ - SO<sub>3</sub>H；もしくは
- ・ - PO<sub>3</sub>H

であるが、

ただし、Wが共有結合であってXが - CO - であるならば、Zは - COOHとは異なる ] の側鎖を有するアシル化インスリンを含む。

#### 【0052】

本発明のある態様では、アシル化インスリンは、 $N^{B29} - (N - (HOOC(CH_2)_{14}CO) - -Glu)desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - (HOOC(CH_2)_{15}CO) - -Glu)desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - (HOOC(CH_2)_{16}CO) - -Glu)desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - (HOOC(CH_2)_{17}CO) - -Glu)desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - (HOOC(CH_2)_{18}CO) - -Glu)desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - (HOOC(CH_2)_{16}CO) - -Glu - N - (-Glu))desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - (Asp - OC(CH_2)_{16}CO) - -Glu)desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - (Glu - OC(CH_2)_{14}CO) - -Glu)desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - (Glu - OC(CH_2)_{14}CO - )desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - (Asp - OC(CH_2)_{16}CO - )desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - (HOOC(CH_2)_{16}CO) - -Glu - N - (-Asp))desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - (Gly - OC(CH_2)_{13}CO) - -Glu)desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - (Sar - OC(CH_2)_{13}CO) - -Glu)desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - (HOOC(CH_2)_{13}CO) - -Glu)desB30$  ヒトインスリン； $(N^{B29} - (N - (HOOC(CH_2)_{13}CO) - -Asp)desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - (HOOC(CH_2)_{13}CO) - -Glu)desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - (HOOC(CH_2)_{16}CO) - -D - Glu)desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - (HOOC(CH_2)_{14}CO) - -D - Asp)desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - HOOC(CH_2)_{16}CO - -D - Asp)desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - (N - HOOC(CH_2)_{14}CO - IDA)desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - [N - (HOOC(CH_2)_{16}CO) - N - (カルボキシエチル) - Gly]desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29} - [N - (HOOC(CH_2)_{14}CO) - N - (カルボキシエチル) - Gly]desB30$  ヒトインスリン；および  $N^{B29} - [N - (HOOC(CH_2)_{14}CO) - N - (カルボキシメチル) - -Ala]desB30$  ヒトインスリンからなる群から選択されるもの、およびその  $Zn^{2+}$  錯体である。

#### 【0053】

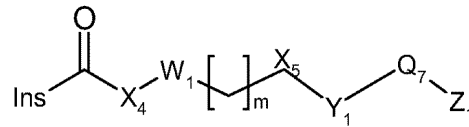
本発明のある態様では、製薬学的組成物を調整するための方法に用いられるアシル化インスリンは、式

10

20

30

40



[ 上式中、

Ins は、B 鎖の N 末端アミノ酸残基の - アミノ基もしくはインスリン部分の B 鎖中に存在する Lys 残基の - アミノ基を介して、アミド結合を介して側鎖の CO - 基と結合している親インスリン部分であり；

X<sub>4</sub> は、

- ・ n が 1、2、3、4、5 もしくは 6 である - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>；
- ・ R が、水素もしくは - (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> - COOH； - (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> - SO<sub>3</sub>H； - (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> - PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>； - (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> - O - SO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>； - (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> - O - PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>；1 又 2 の - (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> - O - COOH 基で置換されたアリーレン； - (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> - テトラゾリルである NR

10

{ 上式中、p は 1 から 6 の範囲の整数である }；

・ R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は、互いに独立し、それぞれの q の値からも独立して、H、- COOH、もしくは OH であってよく、q は 1 - 6 であり、R は上記のように定義される - (CR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>)<sub>q</sub> - NR - CO -；

・ R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> は、互いに独立し、それぞれの q<sub>1</sub> の値からも独立して、H、- COOH、もしくは OH であってよく、q<sub>1</sub> は 1 - 6 であり、R は上記のように定義される - (CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)<sub>q<sub>1</sub></sub> - NR - CO )<sub>2 - 4</sub> -；もしくは、

20

・ 結合

であり；

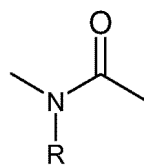
W<sub>1</sub> は、- COOH、- SO<sub>3</sub>H、および - PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> およびテトラゾリルからなる群から選択される一または二の基で置換されていてもよいアリーレンもしくはヘテロアリーレンであるか、あるいは W<sub>1</sub> は結合であり；

m は 0、1、2、3、4、5 もしくは 6 であり；

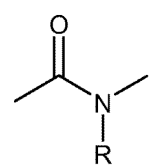
X<sub>5</sub> は、

- ・ - O -；
- ・

30



又は



{ R は上記のように定義される }；もしくは

・ 結合

40

であり；

Y<sub>1</sub> は、

・ R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は、互いに独立し、それぞれの q の値からも独立して、H、- COOH、結合もしくは OH であってよく、q は 1 - 6 であり、R は上記のように定義される - (CR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>)<sub>q</sub> - NR - CO -

・ R が上記のように定義される NR；

・ R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> は、互いに独立し、それぞれの q<sub>1</sub> の値からも独立して、H、- COOH、もしくは OH であってよく、q<sub>1</sub> は 1 - 6 であり、R は上記のように定義される - (CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)<sub>q<sub>1</sub></sub> - NR - CO )<sub>2 - 4</sub> -；もしくは

・ 結合

50

であり；

$Q_7$  は、

・  $r$  が 4 から 22 の整数である -  $(CH_2)_r$  - ；  
 ・ 1、2 もしくは 3 の -  $CH=CH$  - 基と、鎖中に 4 から 22 の範囲の合計数の炭素原子  
 を与えるのに十分な数の -  $CH_2$  - 基とを含んでなる二価の炭化水素鎖；もしくは

・ 式

-  $(CH_2)_s$  -  $Q_8$  -  $(C_6H_4)_{v_1}$  -  $Q_9$  -  $(CH_2)_w$  -  $Q_{10}$  -  $(C_6H_4)_{v_2}$  -  $Q_{11}$  -  $(CH_2)_t$  -  $Q_{12}$  -  $(C_6H_4)_{v_3}$  -  $Q_{13}$  -  $(CH_2)_z$  -  
 {  $Q_8$  -  $Q_{13}$  は、互いに独立して、0； $s$  もしくは結合であってよく； $s$ 、 $w$ 、 $t$  およ  
 び  $z$  は、互いに独立して、 $s$ 、 $w$ 、 $t$  および  $z$  の合計が 4 から 22 の範囲になるように、  
 0 もしくは 1 から 10 の整数であり、かつ、 $v_1$ 、 $v_2$ 、および  $v_3$  は、互いに独立して  
 、0 もしくは 1 であってよいが、ただし、 $w_1$  が結合であるならば、 $Q_7$  は式 -  $(CH_2)_{v_4}$   $C_6H_4$   $(CH_2)_{w_1}$  - ( $v_4$  および  $w_1$  の合計が 6 から 22 の範囲になるよう  
 に、 $v_4$  および  $w_1$  は整数であるか、あるいは、それらのうちの一つは 0 である) の二価  
 の炭化水素鎖ではない }

10

の二価の炭化水素鎖

であり；かつ、

$Z_1$  は、

-  $COOH$  ；  
 -  $CO-Asp$  ；  
 -  $CO-Glu$  ；  
 -  $CO-Gly$  ；  
 -  $CO-Sar$  ；  
 -  $CH(COOH)_2$  ；  
 -  $N(CH_2COOH)_2$  ；  
 -  $SO_3H$  ；  
 -  $PO_3H_2$  ；  
 -  $O-SO_3H$  ；  
 -  $O-PO_3H_2$  ；  
 - テトラゾリルもしくは

20

$W_2$  が、-  $COOH$ 、-  $SO_3H$ 、および -  $PO_3H_2$  および テトラゾリルから選択され  
 る一または二の基で置換されているアリーレンもしくはヘテロアリーレンである -  $O-W$

$2$

であるが；

ただし、 $w_1$  が結合であり、かつ  $v_1$ 、 $v_2$  および  $v_3$  が全て 0 であり、かつ  $Q_8$  -  $Q_{13}$   
 が全て結合であれば、 $Z_1$  は  $O-W_2$  である ]

を有するもの、およびその任意の  $Zn^{2+}$  錯体である。

【0054】

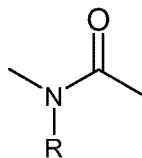
本発明のある態様では、 $W_1$  はフェニレンである。ある態様では、 $W_1$  は、窒素、酸素  
 または硫黄を含んでなる 5 - 7 員環ヘテロ環系である。ある態様では、 $W_1$  は、少なくと  
 も一つの酸素を含んでなる 5 員環ヘテロ環系である。

40

本発明のある態様では、 $Q_7$  は、 $r$  が 4 から 22、8 から 20、12 から 20、もしくは  
 14 - 18 の範囲の整数である -  $(CH_2)_r$  - である。ある態様では、 $Q_8$ 、 $Q_9$ 、  
 $Q_{12}$  および  $Q_{13}$  は、全て結合であり、 $v_2$  は 1 であり、 $v_1$  および  $v_3$  は 0 である。  
 ある態様では、 $Q_{10}$  および  $Q_{11}$  は酸素である。

【0055】

本発明のある態様では、 $X_4$  および  $Y_1$  は結合であり、 $X_5$  は、



[ 上式中、Rは、p が 1 - 4 である - (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> - COOH である ]  
である。

ある態様では、Z<sub>1</sub> は、- COOH である。

#### 【 0 0 5 6 】

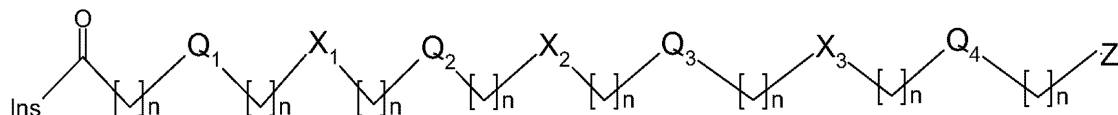
本発明のある態様では、本方法で用いられるアシル化インスリンは、

N<sup>B 2 9</sup> - [ N - (HOOC (CH<sub>2</sub>)<sub>1 4</sub> CO) - N - (カルボキシエチル) - CH<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> CO ] des B 3 0 ヒトインスリン ; N<sup>B 2 9</sup> - [ N - (HOOC (CH<sub>2</sub>)<sub>1 3</sub> CO) - N - (カルボキシエチル) - CH<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> CO ] des B 3 0 ヒトインスリン ; N<sup>B 2 9</sup> - [ N - (HOOC (CH<sub>2</sub>)<sub>1 5</sub> CO) - N - (カルボキシエチル) - CH<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> CO ] des B 3 0 ヒトインスリン ; N<sup>B 2 9</sup> - [ N - (HOOC (CH<sub>2</sub>)<sub>1 6</sub> CO) - N - (カルボキシエチル) - CH<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> CO ] des B 3 0 ヒトインスリン ; N<sup>B 2 9</sup> - [ N - (HOOC (CH<sub>2</sub>)<sub>1 4</sub> CO) - N - (カルボキシメチル) - C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> CO ] des B 3 0 ヒトインスリン、および N<sup>B 2 9</sup> - [ N - (HOOC (CH<sub>2</sub>)<sub>1 4</sub> CO) - N - (カルボキシエチル) - CH<sub>2</sub> - (フラニレン) CO ] des B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - { 4 - カルボキシ - 4 - [ 1 0 - ( 4 - カルボキシ - フェノキシ ) - デカノイルアミノ ] - ブチリル } des B 3 0 ヒトインスリン

からなる群から選択される。

#### 【 0 0 5 7 】

本発明のある態様では、本方法で用いられるアシル化インスリンは、式



[ 上式中、

I n s は、B 鎖の N 末端アミノ酸残基の - アミノ基もしくはインスリン部分の B 鎖中に存在する L y s 残基の - アミノ基を介して、アミド結合を介して側鎖の C O - 基と結合している親インスリン部分であり ;

それぞれの n は独立して、0、1、2、3、4、5 もしくは 6 であり ;

Q<sub>1</sub>、Q<sub>2</sub>、Q<sub>3</sub>、および Q<sub>4</sub> は、互いに独立して、

・ s が 1 - 2 0 である (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>s</sub> - ; (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>s</sub> - ; (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>s</sub> - ; (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>s</sub> - もしくは (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>s</sub> - ;

・ r が 4 から 2 2 の整数である - (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub> - ; もしくは、1、2 もしくは 3 の - CH = CH - 基と、鎖中に 4 から 2 2 の範囲の合計数の炭素原子を与えるのに十分な数の - CH<sub>2</sub> - 基とを含んでなる二価の炭化水素鎖 ;

・ t が 1 から 6 の整数である - (CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub> - もしくは - (CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>)<sub>t</sub> - ;

・ R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> が、互いに独立して、H、- COOH、(CH<sub>2</sub>)<sub>1 - 6</sub> COOH であってよく、かつ、R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> が、それぞれの炭素において異なっていてよく、かつ、q が 1 - 6 である - (CR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>)<sub>q</sub> - ;

・ R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> が、互いに独立して、H、- COOH であってよく、かつ、R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> が、それぞれの炭素において異なっていてよく、かつ、q<sub>1</sub> が 1 - 6 である - ((CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)<sub>q<sub>1</sub></sub>)<sub>1</sub> - (NHCO - (CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)<sub>q<sub>1</sub></sub> - NHCO)<sub>1 - 2</sub> - ((CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)<sub>q<sub>1</sub></sub>)<sub>1</sub> もしくは - ((CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)<sub>q<sub>1</sub></sub>)<sub>1</sub> - (CONH - (CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)<sub>q<sub>1</sub></sub>

- CONH )<sub>1-2</sub> - ( (CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)<sub>q1</sub> - ) - 、 - ( (CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)<sub>q1</sub> )<sub>1</sub> - (NHCO - (CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)<sub>q1</sub> - CONH )<sub>1-2</sub> - ( (CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)<sub>q1</sub> )<sub>1</sub> もしくは - ( (CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)<sub>q1</sub> )<sub>1</sub> - (CONH - (CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)<sub>q1</sub> - NHCO )<sub>1-2</sub> - ( (CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)<sub>q1</sub> )<sub>1</sub> ; もしくは

・結合

であってよいが ;

ただし、Q<sub>1</sub> - Q<sub>4</sub> は異なっており ;

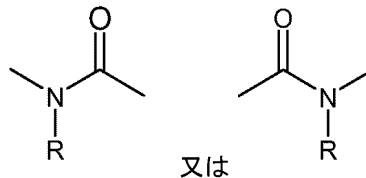
X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub> および X<sub>3</sub> は、独立して、

・O ;

・結合 ; もしくは

・

10



{ 上式中、

R は、水素もしくはそれぞれの p が、残りの p' と独立して、1 から 6 の範囲の整数である - (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> - COOH、- (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> - SO<sub>3</sub>H、- (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> - PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> 20  
 、 - (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> - O - SO<sub>3</sub>H ; - (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> - O - PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> ; もしくは - (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> - テトラゾール - 5 - イルである }

であり ; かつ

Z は、

- COOH ;

- CO - Asp ;

- CO - Glu ;

- CO - Gly ;

- CO - Sar ;

- CH (COOH)<sub>2</sub> ;

- N (CH<sub>2</sub>COOH)<sub>2</sub> ;

- SO<sub>3</sub>H

- OSO<sub>3</sub>H

- OPO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>

- PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> もしくは

- テトラゾール - 5 - イル

である ]

を有する もの、およびその任意の Z n<sup>2+</sup> 錯体である。

【0058】

本発明のある態様では、s は、2 - 12、2 - 4 もしくは 2 - 3 の範囲の整数である。 40  
 ある態様では、s は好ましくは 1 である。

本発明のある態様では、Z は、- COOH である。

【0059】

本発明のある態様では、製薬学的組成物を調整するための方法で用いられるアシル化インスリンは、N<sup>B29</sup> - (3 - [2 - {2 - (2 - [ - カルボキシ - ペンタデカノイル - - グルタミル - (2 - アミノ - エトキシ) ] エトキシ) - エトキシ} - エトキシ] - プロピノイル (propinoyl) ) des B30 ヒトインスリン、N<sup>B29</sup> - (3 - [2 - {2 - (2 - [ - カルボキシ - ヘプタデカノイル - - グルタミル - (2 - アミノ - エトキシ) ] - エトキシ) - エトキシ} - エトキシ] - プロピノイル (propinoyl) ) des B30 ヒトインスリン、N<sup>B29</sup> - {3 - [2 - (2 - {2 - [ 50

50



シ}エトキシ)エトキシ]プロピオニル-ガンマ- -D-グルタミル)desB30ヒトインスリン、N<sup>B29</sup>-{3-[2-(2-{2-[2-(7-カルボキシヘプタノイルアミノ)エトキシ]エトキシ}エトキシ)エトキシ]プロピオニル- -グルタミル}desB30ヒトインスリン、N<sup>B29</sup>-{3-[2-(2-{2-[2-(9-カルボキシノナノイルアミノ)エトキシ]エトキシ}エトキシ)エトキシ]プロピオニル(propionyl)- -グルタミル}desB30ヒトインスリン、N<sup>B29</sup>-{3-[2-(2-{2-[2-( -カルボキシウンデカノイルアミノ)エトキシ]エトキシ}エトキシ)エトキシ]プロピオニル- -グルタミル}desB30ヒトインスリン、N<sup>B29</sup>-{3-[2-(2-{2-[2-( -カルボキシトリデカノイルアミノ)エトキシ]エトキシ}エトキシ)エトキシ]プロピオニル- -グルタミル}desB30ヒトインスリンからなる群から選択される。

10

#### 【0060】

本発明のある態様では、本方法は、即効型インスリンを組成物に添加することを含む。即効型インスリンは、AspB28ヒトインスリン、LysB28ProB29ヒトインスリンおよびLys<sup>B3</sup>Glu<sup>B29</sup>-ヒトインスリンもしくはそれらの混合物である。

#### 【0061】

本発明のある態様では、アシル化インスリンを含む製薬学的組成物は、糖尿病の治療のために用いられる。

本発明のある態様では、アシル化インスリンを含む製薬学的組成物は、糖尿病の治療のための医薬の製造のために用いられる。

20

ある態様では、本発明は、製薬学的に許容される担体および/または製薬学的に許容される添加物を有する本発明の製薬学的組成物に関し、その組成物は、治療を必要とする患者における1型糖尿病、2型糖尿病および高血糖を引き起こす他の状態の治療のために提供され得る。

#### 【0062】

本発明のある態様では、治療の必要のある患者において、1型糖尿病、2型糖尿病および高血糖を引き起こす他の状態を治療するための方法であって、製薬学的に許容される担体および/または添加物を含む製薬学的組成物の治療の有効量を患者に投与することを含む方法が提供される。

本発明のある態様では、1型糖尿病、2型糖尿病および高血糖を引き起こす他の状態の治療において用いるための製薬学的組成物の製造のための方法が提供される。

30

#### 【0063】

本発明のある態様では、治療の必要のある患者において、1型糖尿病、2型糖尿病および高血糖を引き起こす他の状態を治療するための製薬学的組成物が提供される。

本発明のある態様では、治療の必要のある患者において、1型糖尿病、2型糖尿病および高血糖を引き起こす他の状態を治療するための方法であって、本発明に係る製薬学的組成物の治療の有効量を患者に投与することを含む方法が提供される。

本発明のある態様では、1型糖尿病、2型糖尿病および高血糖を引き起こす他の状態の治療において用いるための製薬学的組成物の製造のための方法が提供される。

#### 【0064】

40

本明細書で定義されるアシル化インスリンを含む製薬学的組成物は、OADもしくはGLP-1と同時にまたは連続して投与してよい。ファクターは、双方の化合物を含む単回投与形態、あるいは、アシル化インスリンを含む製薬学的組成物と、第二単位投与形態としてのOADを含む製薬学的組成物を含む製薬学的組成物の製剤を含む部分キット形態で提供されてよい。

第一または第二または第三などの単位投与がこの明細書の至るところで記述されるとき、これは投与の好ましい順序を示すものではなく、単に便宜上の目的のためになされるものである。

#### 【0065】

アシル化インスリンおよびOADまたはGLP-1の製剤を含む製薬学的組成物の製剤

50

を「同時に」投与するとは、単回投与形態での化合物の投与、もしくは、第一の薬剤の投与に続く、15分、10、5または2分以下の時間間隔での第二の薬剤の投与を意味する。どちらのファクターが最初に投与されてもよい。

「連続的に」投与するとは、第一の薬剤の投与に続く、15分以上の時間間隔での第二の薬剤の投与を意味する。二つの単位投与形態のどちらが最初に投与されてもよい。好ましくは、双方の製品は、同じ静脈経路を通して注射する。

【0066】

本発明の更なる態様では、アシル化インスリンを含む製薬学的組成物は、一日一回、O A DまたはG L P - 1と共に、同時または連続して投与される。より好ましい態様では、アシル化インスリンを含む製薬学的組成物は、さらに、即効型インスリンを含み、O A DまたはG L P - 1と共に一日一回投与される。本発明のある態様では、アシル化インスリンを含む製薬学的組成物は、独立型の集中治療で一日五回まで与えられ得る。さらにより好ましい態様では、製薬学的組成物は、さらに即効型インスリンを含み、集中治療は、一日五回まで与えられる独立型の治療であり得る。

【0067】

本発明は、以下の項に要約されるであろう：

1 .

アシル化インスリンを含み、6分子のアシル化インスリン毎に4より多い亜鉛原子をさらに含む可溶性製薬学的組成物。

2 .

6分子のアシル化インスリン毎に最大約12の亜鉛原子を含む項1に記載の製薬学的組成物。

【0068】

3 .

6分子のアシル化インスリン毎に約4.3から約12の亜鉛原子を含む項1または2に記載の製薬学的組成物。

4 .

6分子のアシル化インスリン毎に約4.5から約12の亜鉛原子を含む項1ないし3の何れか一項に記載の製薬学的組成物。

5 .

少なくとも85%のアシル化インスリンが、アシル化インスリンデカマー複合体もしくはアシル化インスリンデカマーより高分子量の複合体として存在する項1ないし4の何れか一項に記載の製薬学的組成物。

【0069】

6 .

少なくとも92%のアシル化インスリンが、アシル化インスリンデカマー複合体もしくはアシル化インスリンデカマーより高分子量の複合体として存在する項1ないし5の何れか一項に記載の製薬学的組成物。

7 .

少なくとも95%のアシル化インスリンが、アシル化インスリンデカマー複合体もしくはアシル化インスリンデカマーより高分子量の複合体として存在する項1ないし6の何れか一項に記載の製薬学的組成物。

8 .

少なくとも97%のアシル化インスリンが、アシル化インスリンデカマー複合体もしくはアシル化インスリンデカマーより高分子量の複合体として存在する項1ないし7の何れか一項に記載の製薬学的組成物。

【0070】

9 .

組成物が界面活性剤を含む項1ないし8の何れか一項に記載の製薬学的組成物。

10 .

アシル化インスリンが、親インスリン部分のB鎖中のLys残基の - アミノ基でアシル化されたインスリンである項1ないし9の何れか一項に記載の製薬学的組成物。

11.

アシル基が、少なくとも一つの遊離カルボン酸基もしくは中性pHで負に荷電する基を含んでなる項1ないし10の何れか一項に記載の製薬学的組成物。

【0071】

12.

アシル基が、4から32の炭素原子を有する二カルボン酸性脂肪酸から誘導される項1または10 - 11の何れか一項に記載の製薬学的組成物。

13.

アシル基が、アミド結合を介したリンカー基を介して、インスリン分子と結合している項1または10 - 12の何れか一項に記載の製薬学的組成物。

14.

リンカー基が、少なくとも一つの遊離カルボキシル基もしくは中性pHで負に荷電する基を含んでなる項1または13に記載の製薬学的組成物。

【0072】

15.

インスリン分子が、親インスリン部分のB鎖のN末端アミノ酸残基の - アミノ基もしくはB鎖中のLys残基の - アミノ基の何れか一方とアミド結合を介して結合している側鎖であって、少なくとも一つの遊離カルボン酸基もしくは中性pHで負に荷電する基を含んでなる側鎖と、炭素鎖に約4から約32の炭素原子を有する脂肪酸部分と；あり得る、側鎖中の個々の構成成分をアミド結合を介して一緒に連結する一または複数のリンカーとを有する項1ないし14の何れか一項に記載の製薬学的組成物。

16.

側鎖が少なくとも一つの芳香族基を含んでなる項1 - 15に記載の製薬学的組成物。

17.

側鎖が少なくとも一つの二官能性PEG基を含んでなる項1 - 15に記載の製薬学的組成物。

【0073】

18.

インスリン分子が、親インスリンのB鎖中に存在するLys残基の - アミノ基と結合している側鎖であって、一般式：

- W - X - Y - Z<sub>2</sub>

[上式中、

Wは、

・そのカルボン酸基のうちの一つと共に、親のインスリンのB鎖中に存在するLys残基の - アミノ基と一緒にあってアミド基を形成する、側鎖中にカルボン酸基を有する - アミノ酸残基；

・アミドカルボニル結合を介して一緒に連結されている2、3または4の - アミノ酸残基からなる鎖であって、

アミド結合 - を介した鎖 - は親インスリンのB鎖中に存在するLys残基の - アミノ基と連結しており、

Wのアミノ酸残基は、Wが側鎖中にカルボン酸基を有するアミノ酸残基を少なくとも一つ有するように、中性側鎖を有するアミノ酸残基および側鎖中にカルボン酸基を有するアミノ酸残基の群から選択される鎖；もしくは、

・Xから親インスリンのB鎖中に存在するLys残基の - アミノ基までの共有結合であり；

Xは、

・ - CO - ；

・ - CH(COOH)CO - ；

10

20

30

40

50

$\cdot -CO-N(CH_2COOH)CH_2\text{CO}-$  ;  
 $\cdot -CO-N(CH_2COOH)CH_2CON(CH_2COOH)CH_2\text{CO}-$  ;  
 $\cdot -CO-N(CH_2CH_2COOH)CH_2CH_2\text{CO}-$  ;  
 $\cdot -CO-N(CH_2CH_2COOH)CH_2CH_2CON(CH_2CH_2COOH)CH_2CH_2\text{CO}-$  ;  
 $\cdot -CO-NHCH(COOH)(CH_2)_4NH\text{CO}-$  ;  
 $\cdot -CO-N(CH_2CH_2COOH)CH_2\text{CO}-$  ; もしくは  
 $\cdot -CO-N(CH_2COOH)CH_2CH_2\text{CO}-$  であって、  
 a) Wがアミノ酸残基もしくはアミノ酸残基の鎖であるとき、下線の炭素からの結合を介して、W中のアミノ基とアミド結合を形成するか、あるいは、  
 b) Wが共有結合であるとき、下線のカルボニル炭素からの結合を介して、親インスリンのB鎖中に存在するLys残基の - アミノ基とアミド結合を形成し；

10

Yは、

$\cdot m$ が6から32の範囲の整数である  $-(CH_2)_m-$  ;  
 $\cdot 1$ 、2もしくは3の  $-CH=CH-$  - 基と、鎖中に10から32の範囲の合計数の炭素原子を与えるのに十分な数の  $-CH_2-$  - 基とを含んでなる二価の炭化水素鎖

であり；かつ、

Z<sub>2</sub>は、

$\cdot -COOH$  ;  
 $\cdot -CO-Asp$  ;  
 $\cdot -CO-Glu$  ;  
 $\cdot -CO-Gly$  ;  
 $\cdot -CO-Sar$  ;  
 $\cdot -CH(COOH)_2$  ;  
 $\cdot -N(CH_2COOH)_2$  ;  
 $\cdot -SO_3H$  ; もしくは  
 $\cdot -PO_3H$

20

であるが、

ただし、Wが共有結合であってXが  $-CO-$  であるならば、Zは  $-COOH$  とは異なる ] の側鎖を有するもの、およびその  $Zn^{2+}$  錯体である、項1 - 15の何れか一項に記載の製薬学的組成物。

30

19.

Z<sub>2</sub>が  $-COOH$  である項1 - 15および18の何れか一項に記載の製薬学的組成物。

【0074】

20.

アシル化インスリンが、 $N^{B29}-(N-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-Glu)desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29}-(N-(HOOC(CH_2)_{15}CO)-Glu)desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29}-(N-(HOOC(CH_2)_{16}CO)-Glu)desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29}-(N-(HOOC(CH_2)_{17}CO)-Glu)desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29}-(N-(HOOC(CH_2)_{18}CO)-Glu)desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29}-(N-(HOOC(CH_2)_{16}CO)-Glu-N-(Glu))desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29}-(N-(Asp-OC(CH_2)_{16}CO)-Glu)desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29}-(N-(Glu-OC(CH_2)_{14}CO)-Glu)desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29}-(N-(Glu-OC(CH_2)_{14}CO)-desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29}-(N-(Asp-OC(CH_2)_{16}CO)-desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29}-(N-(HOOC(CH_2)_{16}CO)-Glu-N-(Asp))desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29}-(N-(Gly-OC(CH_2)_{13}CO)-Glu)desB30$  ヒトインスリン； $N^{B29}-(N-(Sar-OC($

40

50

$\text{CH}_2)_1\text{CO}) - \text{Glu}) \text{des B 30 ヒトインスリン}; \text{N}^{\text{B 2 9}} - (\text{N} -$   
 $(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_1\text{CO}) - \text{Glu}) \text{des B 30 ヒトインスリン}; (\text{N}^{\text{B}}$   
 $^{\text{2 9}} - (\text{N} - (\text{HOOC}(\text{CH}_2)_1\text{CO}) - \text{Asp}) \text{des B 30 ヒトインス}$   
 $\text{リン}; \text{N}^{\text{B 2 9}} - (\text{N} - (\text{HOOC}(\text{CH}_2)_1\text{CO}) - \text{Glu}) \text{des B 3}$   
 $0 \text{ ヒトインスリン}; \text{N}^{\text{B 2 9}} - (\text{N} - (\text{HOOC}(\text{CH}_2)_1\text{CO}) - \text{D - G}$   
 $\text{lu}) \text{des B 30 ヒトインスリン}; \text{N}^{\text{B 2 9}} - (\text{N} - (\text{HOOC}(\text{CH}_2)_1\text{C}$   
 $\text{O}) - \text{D - Asp}) \text{des B 30 ヒトインスリン}; \text{N}^{\text{B 2 9}} - (\text{N} - (\text{HOOC}(\text{CH}_2)_1\text{C}$   
 $\text{O}) - \text{D - Asp}) \text{des B 30 ヒトインスリン}; \text{N}^{\text{B 2 9}} - (\text{N} - (\text{HOOC}(\text{CH}_2)_1\text{C}$   
 $\text{O} - \text{D - Asp}) \text{des B 30 ヒトインスリン}; \text{N}^{\text{B 2 9}} - (\text{N} - \text{HOOC}(\text{CH}_2)_1\text{C}$   
 $\text{O} - \text{IDA}) \text{des B 30 ヒトインスリン}; \text{N}^{\text{B 2 9}} - [\text{N} - (\text{HOOC}(\text{CH}_2)_1\text{C}$   
 $\text{O}) - \text{N} - (\text{カルボキシエチル}) - \text{Gly}] \text{des B 30 ヒトインスリン}; \text{N}^{\text{B 2 9}} - [\text{N} - (\text{HOOC}(\text{CH}_2)_1\text{C}$   
 $\text{O}) - \text{N} - (\text{カルボキシエチル}) - \text{Gly}] \text{des B 30 ヒトインスリン}; \text{N}^{\text{B 2 9}} - [\text{N} - (\text{HOOC}(\text{CH}_2)_1\text{C}$   
 $\text{O}) - \text{N} - (\text{カルボキシメチル}) - \text{Ala}] \text{des B 30 ヒトインスリン}$  からなる群から選択される項 1 - 15 および 18 - 19 の何れか一  
 項に記載の製薬学的組成物。

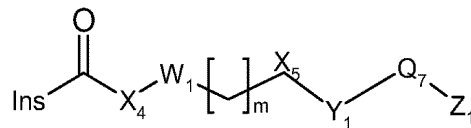
10

【0075】

21.

アシル化インスリンが、式

20



[ 上式中、

$\text{Ins}$  は、B鎖のN末端アミノ酸残基の - アミノ基もしくはインスリン部分のB鎖中に存在する  $\text{Lys}$  残基の - アミノ基を介して、アミド結合を介して側鎖の  $\text{CO}$  - 基と結合している親インスリン部分であり；

 $\text{X}_4$  は、

- ・  $n$  が 1、2、3、4、5 もしくは 6 である  $-(\text{CH}_2)_n$ ；
- ・  $R$  が、水素もしくは  $-(\text{CH}_2)_p - \text{COOH}$ ；  $-(\text{CH}_2)_p - \text{SO}_3\text{H}$ ；  $-(\text{CH}_2)_p - \text{PO}_3\text{H}_2$ ；  $-(\text{CH}_2)_p - \text{O} - \text{SO}_3\text{H}_2$ ；  $-(\text{CH}_2)_p - \text{O} - \text{PO}_3\text{H}_2$ ； 1又2の  $-(\text{CH}_2)_p - \text{O} - \text{COOH}$  基で置換されたアリーレン；  $-(\text{CH}_2)_p$  - テトラゾリルである  $\text{NR}$

30

{ 上式中、  $p$  は 1 から 6 の範囲の整数である }；

- ・  $R_1$  および  $R_2$  は、互いに独立し、それぞれの  $q$  の値からも独立して、 $\text{H}$ 、 $-\text{COOH}$ 、もしくは  $\text{OH}$  であってよく、 $q$  は 1 - 6 であり、 $R$  は上記のように定義される  $-(\text{CR}_1\text{R}_2)_q - \text{NR} - \text{CO} -$ ；

- ・  $R_3$  および  $R_4$  は、互いに独立し、それぞれの  $q_1$  の値からも独立して、 $\text{H}$ 、 $-\text{COOH}$ 、もしくは  $\text{OH}$  であってよく、 $q_1$  は 1 - 6 であり、 $R$  は上記のように定義される  $-(\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1} - \text{NR} - \text{CO})_2 - 4 -$ ；もしくは、

40

・ 結合

であり；

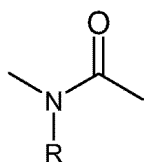
$\text{W}_1$  は、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、および  $-\text{PO}_3\text{H}_2$  およびテトラゾリルからなる群から選択される一または二の基で置換されていてもよいアリーレンもしくはヘテロアリーレンであるか、あるいは  $\text{W}_1$  は結合であり；

 $m$  は 0、1、2、3、4、5 もしくは 6 であり； $\text{X}_5$  は、

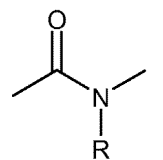
- ・  $-\text{O}-$ ；

・

50



又は



{ R は上記のように定義される } ; もしくは

・ 結合

であり ;

$Y_1$  は、

・  $R_1$  および  $R_2$  は、互いに独立し、それぞれの  $q$  の値からも独立して、H、 $-COOH$ 、結合もしくはOHであってよく、 $q$  は 1 - 6 であり、R は上記のように定義される - (  $CR_1R_2$  )  $q$  - NR - CO -

・ R が上記のように定義される NR ;

・  $R_3$  および  $R_4$  は、互いに独立し、それぞれの  $q_1$  の値からも独立して、H、 $-COOH$ 、もしくはOHであってよく、 $q_1$  は 1 - 6 であり、R は上記のように定義される - ( (  $CR_3R_4$  )  $q_1$  - NR - CO )  $2-4$  - ; もしくは

・ 結合

であり ;

$Q_7$  は、

・  $r$  が 4 から 22 の整数である - (  $CH_2$  )  $r$  - ;

・ 1、2 もしくは 3 の  $-CH=CH-$  基と、鎖中に 4 から 22 の範囲の合計数の炭素原子を与えるのに十分な数の  $-CH_2-$  基とを含んでなる二価の炭化水素鎖 ; もしくは

・ 式

- (  $CH_2$  )  $s$  -  $Q_8$  - (  $C_6H_4$  )  $v_1$  -  $Q_9$  - (  $CH_2$  )  $w$  -  $Q_{10}$  - (  $C_6H_4$  )  $v_2$  -  $Q_{11}$  - (  $CH_2$  )  $t$  -  $Q_{12}$  - (  $C_6H_4$  )  $v_3$  -  $Q_{13}$  - (  $CH_2$  )  $z$  -

{  $Q_8 - Q_{13}$  は、互いに独立して、O ; S もしくは結合であってよく ;  $s$ 、 $w$ 、 $t$  および  $z$  は、互いに独立して、 $s$ 、 $w$ 、 $t$  および  $z$  の合計が 4 から 22 の範囲になるように、

0 もしくは 1 から 10 の整数であり、かつ、 $v_1$ 、 $v_2$ 、および  $v_3$  は、互いに独立して、0 もしくは 1 であってよいが、ただし、 $W_1$  が結合であるならば、 $Q_7$  は式 - (  $CH_2$  )  $v_4$   $C_6H_4$  (  $CH_2$  )  $w_1$  - (  $v_4$  および  $w_1$  の合計が 6 から 22 の範囲になるように、

$v_4$  および  $w_1$  は整数であるか、あるいは、それらのうちの一つは 0 である ) の二価の炭化水素鎖ではない }

の二価の炭化水素鎖

であり ; かつ、

$Z_1$  は、

-  $COOH$  ;

-  $CO-Asp$  ;

-  $CO-Glu$  ;

-  $CO-Gly$  ;

-  $CO-Sar$  ;

-  $CH(COOH)_2$  ;

-  $N(CH_2COOH)_2$  ;

-  $SO_3H$

-  $PO_3H_2$  ;

-  $O-SO_3H$  ;

-  $O-PO_3H_2$  ;

- テトラゾリルもしくは

$W_2$  が、 $-COOH$ 、 $-SO_3H$ 、および  $-PO_3H_2$  およびテトラゾリルから選択される一または二の基で置換されているアリーレンもしくはヘテロアリーレンである - O - W

10

20

30

40

50

2  
であるが；

ただし、 $W_1$  が結合であり、かつ  $v_1$ 、 $v_2$  および  $v_3$  が全て 0 であり、かつ  $Q_{8-13}$  が全て結合であれば、 $Z_1$  は  $O-W_2$  である]

を有するもの、およびその任意の  $Z_{n^{2+}}$  錯体である、項 1 - 16 に記載の製薬学的組成物。

【0076】

22.

$W_1$  がフェニレンである項 1 または 21 に記載の製薬学的組成物。

23.

$W_1$  が、窒素、酸素または硫黄を含んでなる 5 - 7 員環ヘテロ環系である項 1 または 21 に記載の製薬学的組成物。

24.

$W_1$  が、少なくとも一つの酸素を含んでなる 5 - 7 員環ヘテロ環系である項 1、21 および 23 に記載の製薬学的組成物。

【0077】

25.

本発明のある態様では、 $Q_7$  は、 $r$  が 4 から 22、8 から 20、12 から 20、もしくは 14 - 18 の範囲の整数である  $-(CH_2)_r-$  である項 21 - 24 に記載の製薬学的組成物。

26.

$Q_8$ 、 $Q_9$ 、 $Q_{12}$  および  $Q_{13}$  は、全て結合であり、 $v_2$  は 1 であり、 $v_1$  および  $v_3$  は 0 である項 21 - 24 に記載の製薬学的組成物。

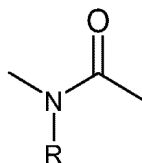
27.

$Q_{10}$  および  $Q_{11}$  は酸素である項 26 に記載の製薬学的組成物。

【0078】

28.

$X_4$  および  $Y_1$  は結合であり、 $X_5$  は、



[上式中、 $R$  は、 $p$  が 1 - 4 である  $-(CH_2)_p-COOH$  である] である項 21 - 27 に記載の製薬学的組成物。

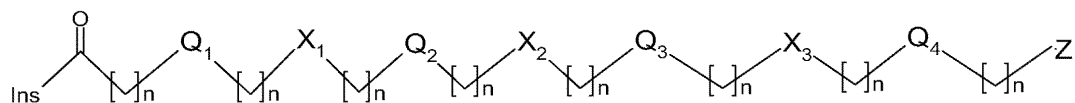
29.

$Z_1$  は、 $-COOH$  である項 21 - 28 に記載の製薬学的組成物。

【0079】

30.

アシル化インスリンが、式



[上式中、

$Ins$  は、B鎖のN末端アミノ酸残基の - アミノ基もしくはインスリン部分のB鎖中に存在する  $Ly_s$  残基の - アミノ基を介して、アミド結合を介して側鎖の  $CO-$  基と結合している親インスリン部分であり；

それぞれの  $n$  は独立して、0、1、2、3、4、5 もしくは 6 であり；

$Q_1$ 、 $Q_2$ 、 $Q_3$ 、および  $Q_4$  は、互いに独立して、

10

20

30

40

50

・  $s$  が 1 - 20 である  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_s -$  ;  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_s -$  ;  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_s -$  ;  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_s -$  もしくは  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_s -$  ;

・  $r$  が 4 から 22 の整数である  $-(\text{CH}_2)_r -$  ; もしくは、1、2 もしくは 3 の  $-\text{CH}=\text{CH}-$  基と、鎖中に 4 から 22 の範囲の合計数の炭素原子を与えるのに十分な数の  $-\text{CH}_2-$  基とを含んでなる二価の炭化水素鎖 ;

・  $t$  が 1 から 6 の整数である  $-(\text{CH}_2)_t -$  もしくは  $-(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_t -$  ;

・  $R_1$  および  $R_2$  が、互いに独立して、 $\text{H}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $(\text{CH}_2)_{1-6}\text{COOH}$  であってよく、かつ、 $R_1$  および  $R_2$  が、それぞれの炭素において異なっていてよく、かつ、 $q$  が 1 - 6 である  $-(\text{CR}_1\text{R}_2)_q -$  ;

・  $R_3$  および  $R_4$  が、互いに独立して、 $\text{H}$ 、 $-\text{COOH}$  であってよく、かつ、 $R_3$  および  $R_4$  が、それぞれの炭素において異なっていてよく、かつ、 $q_1$  が 1 - 6 である  $-(\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1})_1 - (\text{NHCO} - (\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1} - \text{NHCO})_{1-2} - ((\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1})_1$  もしくは  $-(\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1})_1 - (\text{CONH} - (\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1} - \text{CONH})_{1-2} - ((\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1})_1 - ((\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1})_1 - (\text{CONH} - (\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1} - \text{NHCO})_{1-2} - ((\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1})_1$  ; もしくは

・ 結合

であってよいが ;

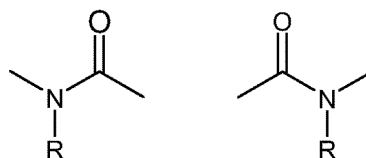
ただし、 $Q_1 - Q_4$  は異なっており ;

$X_1$ 、 $X_2$  および  $X_3$  は、独立して、

・  $\text{O}$  ;

・ 結合 ; もしくは

.



又は

{ 上式中、

$R$  は、水素もしくはそれぞれの  $p$  が、残りの  $p'$  と独立して、1 から 6 の範囲の整数である

$-(\text{CH}_2)_p - \text{COOH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_p - \text{SO}_3\text{H}$ 、 $-(\text{CH}_2)_p - \text{PO}_3\text{H}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_p - \text{O} - \text{SO}_3\text{H}$  ;  $-(\text{CH}_2)_p - \text{O} - \text{PO}_3\text{H}_2$  ; もしくは  $-(\text{CH}_2)_p - \text{テトラゾール} - 5 - \text{イル}$  である }

であり ; かつ

$Z$  は、

-  $\text{COOH}$  ;

-  $\text{CO} - \text{Asp}$  ;

-  $\text{CO} - \text{Glu}$  ;

-  $\text{CO} - \text{Gly}$  ;

-  $\text{CO} - \text{Sar}$  ;

-  $\text{CH}(\text{COOH})_2$  ;

-  $\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$  ;

-  $\text{SO}_3\text{H}$

-  $\text{OSO}_3\text{H}$

-  $\text{OPO}_3\text{H}_2$

-  $\text{PO}_3\text{H}_2$  もしくは

10

20

30

40

50



- テトラゾール - 5 - イル

である]

を有するもの、およびその任意の  $Zn^{2+}$  錯体である、項 1 - 15 および 17 の製薬学的組成物。

【0080】

31.

s が、2 - 12、2 - 4 もしくは 2 - 3 の範囲の整数である項 1 または 30 に記載の製薬学的組成物。

32.

s が好ましくは 1 である項 1 または 30 に記載の製薬学的組成物。

10

33.

Z が - COOH である項 30 - 32 に記載の製薬学的組成物。

34.

親インスリンが des B30 ヒトインスリンアナログである項 1 ないし 33 の何れか一項に記載の製薬学的組成物。

【0081】

35.

親インスリンが、ヒトインスリン; des B1 ヒトインスリン; des B30 ヒトインスリン; Gly A21 ヒトインスリン; Gly A21 des B30 ヒトインスリン; Asp B28 ヒトインスリン; ブタインスリン; Lys B28 Pro B29 ヒトインスリン; Gly A21 Arg B31 Arg B32 ヒトインスリン; および Lys B3 Glu B29 ヒトインスリンもしくは Asp B28 des B30 ヒトインスリンからなる群から選択される項 1 ないし 34 の何れか一項に記載の製薬学的組成物。

20

【0082】

36.

アシル化インスリンが、

$N^{B^{29}} - [N - (HOOC(CH_2)_{14}CO) - N - (カルボキシエチル) - CH_2 - C_6H_4CO] des B30$  ヒトインスリン;  $N^{B^{29}} - [N - (HOOC(CH_2)_{13}CO) - N - (カルボキシエチル) - CH_2 - C_6H_4CO] des B30$  ヒトインスリン;  $N^{B^{29}} - [N - (HOOC(CH_2)_{15}CO) - N - (カルボキシエチル) - CH_2 - C_6H_4CO] des B30$  ヒトインスリン;  $N^{B^{29}} - [N - (HOOC(CH_2)_{16}CO) - N - (カルボキシエチル) - CH_2 - C_6H_4CO] des B30$  ヒトインスリン;  $N^{B^{29}} - [N - (HOOC(CH_2)_{14}CO) - N - (カルボキシメチル) - C_6H_4CO] des B30$  ヒトインスリン、および  $N^{B^{29}} - [N - (HOOC(CH_2)_{14}CO) - N - (カルボキシエチル) - CH_2 - (フランレン)CO] des B30$  ヒトインスリン、 $N^{B^{29}} - \{4 - カルボキシ - 4 - [10 - (4 - カルボキシ - フェノキシ) - デカノイルアミノ] - ブチリル\} des B30$  ヒトインスリン

30

からなる群から選択される項 1 - 16、21 - 29 および 34 - 35 に記載の製薬学的組成物。

40

【0083】

37.

アシル化インスリンが、 $N^{B^{29}} - (3 - [2 - \{2 - (2 - [ - カルボキシ - ペンタデカノイル - - グルタミル - (2 - アミノ - エトキシ)] - エトキシ) - エトキシ\} - エトキシ] - プロピノイル(propionyl)) des B30$  ヒトインスリン、 $N^{B^{29}} - (3 - [2 - \{2 - (2 - [ - カルボキシ - ヘプタデカノイル - - グルタミル - (2 - アミノ - エトキシ)] - エトキシ) - エトキシ\} - エトキシ] - プロピノイル(propionyl)) des B30$  ヒトインスリン、 $N^{B^{29}} - \{3 - [2 - (2 - \{2 - [2 - ( - カルボキシ - ペンタデカノイルアミノ) - エトキシ] - エトキシ\} - エトキシ) - エトキシ] - プロピオニル - - グルタミル des B30$  ヒトインス

50

リン、N<sup>B 2 9</sup> - ( - [ 2 - ( 2 - { 2 - [ 2 - ( 2 - カルボキシ - エトキシ ) - エ  
トキシ ] - エトキシ } - エトキシ ) - エチルカルバモイル ] - ヘプタデカノイル - - グ  
ルタミル ) d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - ( - [ 2 - ( 2 - { 2 - [ 2 -  
( 2 - カルボキシ - エトキシ ) - エトキシ ] - エトキシ } - エトキシ ) - エチルカルバモ  
イル ] - ヘプタデカノイル - - グルタミル ) d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup>  
- 3 - [ 2 - ( 2 - { 2 - [ 2 - ( - カルボキシ - ヘプタデカノイルアミノ ) - エトキ  
シ ] - エトキシ } - エトキシ ) - エトキシ ] - プロピオニル - - グルタミル d e s B 3  
0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - ( 3 - ( 3 - { 2 - [ 2 - ( 3 - [ 7 - カルボキシヘプ  
タノイルアミノ ] プロパ - オキシ ) エトキシ ] - エトキシ } プロピルカルバモイル ) プロ  
ピオニル ) d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - ( 3 - ( 3 - { 4 - [ 3 - ( 7 -  
カルボキシヘプタノイルアミノ ) プロパ - オキシ ] ブトキシ } プロピルカルバモイル ) -  
プロピオニル - - グルタミル ) d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - ( 3 - ( 3 -  
- { 2 - [ 2 - ( 3 - [ 9 - カルボキシノナノイルアミノ ] プロパ - オキシ ) エトキシ ]  
エトキシ } - プロピルカルバモイル ) プロピオニル ) d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup>  
- ( 3 - ( 2 - { 2 - [ 2 - ( 9 - カルボキシノナノイルアミノ ) エトキシ ] エト  
キシ } エチルカルバモイル ) プロピオニル - - グルタミル ) d e s B 3 0 ヒトインスリ  
ン、N<sup>B 2 9</sup> - ( 3 - ( 3 - { 4 - [ 3 - ( 9 - カルボキシノナノイルアミノ ) プロパ  
- オキシ ] ブトキシ } - プロピルカルバモイル ) プロピオニル - - グルタミル ) d e s  
B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - ( 2 - [ 3 - ( 2 - ( 2 - { 2 - ( 7 - カルボキシ  
ヘプタノイルアミノ ) エトキシ } エトキシ ) - エチルカルバモイル ] プロピオニル - -  
グルタミル ) d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - ( 3 - [ 2 - ( 2 - { 2 - [ 2 -  
( - カルボキシペンタデカノイルアミノ ) エトキシ ] エトキシ } エトキシ ) エトキシ  
] プロピオニル ) ) d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - ( 3 - ( 2 - { 2 - [ 2 -  
( 2 - { 2 - [ 2 - ( 2 - { 2 - [ 2 - ( 2 - { 2 - [ 2 - ( - カルボキシ - トリデ  
カノイルアミノ ) - エトキシ ] - エトキシ } - エトキシ ) - エトキシ ] - エトキシ } - エ  
トキシ ) - エトキシ ] - エトキシ } - エトキシ ) - エトキシ ] - エトキシ } - エトキシ )  
- プロピオノイル ( p r o p i o n o y l ) - - グルタミル ) d e s B 3 0 ヒトイン  
スリン、N<sup>B 2 9</sup> - ( 3 - [ 2 - ( 2 - { 2 - [ 2 - ( - カルボキシ - トリデカノイ  
ルアミノ ) - エトキシ ] - エトキシ } - エトキシ ) - エトキシ ] - プロピオノイル ( p  
r o p i o n o y l ) - - グルタミル ) d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - ( 3 - [ 2 - ( 2 - { 2 - [ 2 - ( 2 - { 2 - [ 2 - ( - カルボキシ - トリデカノイルア  
ミノ ) - エトキシ ] - エトキシ } - エトキシ ) - エトキシ ] - エトキシ } - エトキシ ) -  
エトキシ ] - エトキシ } - プロピオノイル ( p r o p i o n o y l ) - - グルタミル )  
d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - ( 3 - ( 2 - { 2 - [ 2 - ( - カルボキ  
シ - ペンタデカノイルアミノ ) - エトキシ ] - エトキシ } - エチルカルバモイル ) - プロ  
ピオニル - - グルタミル ) d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - ( 3 - ( 3 - { 2 - [ 2 - ( 3 - [ - カルボキシペンタデカノイルアミノ ] プロパ - オキシ ) エトキシ  
] - エトキシ } プロピルカルバモイル ) プロピオニル - - グルタミル ) d e s B 3 0 ヒ  
トインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - ( 3 - ( 3 - { 4 - [ 3 - ( - カルボキシウンデカノイル  
アミノ ) プロパ - オキシ ] ブトキシプロピルカルバモイル ) プロピオニル - - グルタミ  
ル ) d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - ( 3 - ( 3 - { 4 - [ 3 - ( - カルボ  
キシトリデカノイルアミノ ) プロパ - オキシ ] ブトキシプロピルカルバモイル ) プロピオ  
ニル - - グルタミル ) d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - ( 3 - ( 2 - { 2 -  
[ 2 - ( - カルボキシウンデカノイルアミノ ) エトキシ ] エトキシ } エチルカルバモイ  
ル ) プロピオニル - - グルタミル ) d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - ( 3 -  
( 2 - { 2 - [ 2 - ( - カルボキシトリデカノイルアミノ ) エトキシ ] エトキシ } エチ  
ルカルバモイル ) プロピオニル - - グルタミル ) d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup>  
- { 3 - [ 2 - ( 2 - { 2 - [ 2 - ( - カルボキシ - ペンタデカノイルアミノ ) エ  
トキシ ] エトキシ } エトキシ ) エトキシ ] プロピオニル - ガンマ - - D - グルタミル )  
d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - { 3 - [ 2 - ( 2 - { 2 - [ 2 - ( 7 - カル

10

20

30

40

50

ボキシヘブタノイルアミノ)エトキシ]エトキシ}エトキシ)エトキシ]プロピオニル -  
 - グルタミル} d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - { 3 - [ 2 - ( 2 - { 2 -  
 [ 2 - ( 9 - カルボキシノナノイルアミノ)エトキシ]エトキシ}エトキシ)エトキシ]  
 プロピオニル ( p r o p i o n i y l ) - - グルタミル} d e s B 3 0 ヒトインスリン  
 、N<sup>B 2 9</sup> - { 3 - [ 2 - ( 2 - { 2 - [ 2 - ( - カルボキシウンデカノイルアミノ  
 )エトキシ]エトキシ}エトキシ)エトキシ]プロピオニル - - グルタミル} d e s B  
 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - { 3 - [ 2 - ( 2 - { 2 - [ 2 - ( - カルボキシト  
 リデカノイルアミノ)エトキシ]エトキシ}エトキシ)エトキシ]プロピオニル - - グ  
 ルタミル} d e s B 3 0 ヒトインスリンからなる群から選択される項 1 - 1 5、1 7 およ  
 び 3 0 - 3 5 に記載の製薬学的組成物。

10

【 0 0 8 4 】

3 8 .

約 6 . 5 から 8 . 5 の p H を有する項 1 - 3 7 の何れか一項に記載の製薬学的組成物。

3 9 .

即効型インスリンをさらに含む項 1 - 3 8 の何れか一項に記載の製薬学的組成物。

4 0 .

少なくとも 8 5 % の即効型インスリンが、即効型インスリンヘキサマーもしくは即効型  
 インスリンヘキサマーより低分子量の複合体として存在する項 1 および 3 9 に記載の製薬  
 学的組成物。

【 0 0 8 5 】

20

4 1 .

少なくとも 9 2 % の即効型インスリンが、即効型インスリンヘキサマーもしくは即効型  
 インスリンヘキサマーより低分子量の複合体として存在する項 1 および 3 9 - 4 0 に記載  
 の製薬学的組成物。

4 2 .

少なくとも 9 5 % の即効型インスリンが、即効型インスリンヘキサマーもしくは即効型  
 インスリンヘキサマーより低分子量の複合体として存在する項 1 および 3 9 - 4 1 に記載  
 の製薬学的組成物。

【 0 0 8 6 】

4 3 .

30

少なくとも 9 7 % の即効型インスリンが、即効型インスリンヘキサマーもしくは即効型  
 インスリンヘキサマーより低分子量の複合体として存在する項 1 および 3 9 - 4 2 に記載  
 の製薬学的組成物。

4 4 .

少なくとも 9 9 % の即効型インスリンが、即効型インスリンヘキサマーもしくは即効型  
 インスリンヘキサマーより低分子量の複合体として存在する項 1 および 3 9 - 4 3 に記載  
 の製薬学的組成物。

【 0 0 8 7 】

4 5 .

即効型インスリンが、A s p B 2 8 ヒトインスリン、L y s B 3 G l u B 2 9 ヒトイン  
 スリンおよび / または L y s B 2 8 P r o B 2 9 ヒトインスリンである項 3 9 - 4 4 に記載  
 の製薬学的組成物。

40

4 6 .

6 分子のアシル化インスリン毎に約 4 より多い亜鉛原子を組成物に添加する、アシル化  
 インスリンを含む製薬学的組成物を製造するための方法。

4 7 .

6 分子のアシル化インスリン毎に最大約 1 2 の亜鉛原子を組成物に添加する項 4 6 に記  
 載の方法。

【 0 0 8 8 】

4 8 .

50

6分子のアシル化インスリン毎に約4.3から約12の亜鉛原子を組成物に添加する項46-47の何れか一項に記載の方法。

49.

保存料の添加前に、亜鉛を組成物に添加する項46-48に記載の方法。

50.

6分子のアシル化インスリン毎に1より多い亜鉛原子を保存料の添加前に組成物に添加する項46-49の何れか一項に記載の方法。

【0089】

51.

6分子のアシル化インスリン毎に2より多い亜鉛原子を保存料の添加前に組成物に添加する項46-50の何れか一項に記載の方法。

10

52.

6分子のアシル化インスリン毎に3より多い亜鉛原子を保存料の添加前に組成物に添加する項46-51の何れか一項に記載の方法。

53.

6分子のアシル化インスリン毎に4より多い亜鉛原子を保存料の添加前に組成物に添加する項46-52の何れか一項に記載の方法。

【0090】

54.

6分子のアシル化インスリン毎に5より多い亜鉛原子を保存料の添加前に組成物に添加する項46-53の何れか一項に記載の方法。

20

55.

保存料の添加後に、亜鉛を組成物に添加する項46-48に記載の方法。

56.

6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも0.5の亜鉛原子を保存料の添加後に組成物に添加する項46-48および55に記載の方法。

【0091】

57.

6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも1の亜鉛原子を保存料の添加後に組成物に添加する項46-48および55-56の何れか一項に記載の方法。

30

58.

保存料の添加前に亜鉛の一部を添加し、保存料の添加後に亜鉛の一部を添加する項46ないし57の何れか一項に記載の方法。

59.

保存料の添加前に添加する亜鉛原子の数は、6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも3の亜鉛原子であり、保存料の添加後に添加する亜鉛原子の数は、6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも3の亜鉛原子である項46ないし58の何れか一項に記載の方法。

【0092】

60.

保存料がフェノールおよび/またはm-クレゾールである項46ないし59の何れか一項に記載の方法。

40

61.

界面活性剤を製薬学的組成物と混合する項46ないし60の何れか一項に記載の方法。

【0093】

62.

アシル化インスリンが、親インスリンのB鎖中に存在するLys残基のε-アミノ基と結合している側鎖であって、一般式：

-W-X-Y-Z<sub>2</sub>

[上式中、

50

Wは、

・そのカルボン酸基のうちの一つと共に、親のインスリンのB鎖中に存在するL y s 残基の - アミノ基と一緒にアミド基を形成する、側鎖中にカルボン酸基を有する - アミノ酸残基；

・アミドカルボニル結合を介して一緒に連結されている2、3または4の - アミノ酸残基からなる鎖であって、

アミド結合 - を介した鎖 - は親インスリンのB鎖中に存在するL y s 残基の - アミノ基と連結しており、

Wのアミノ酸残基は、Wが側鎖中にカルボン酸基を有するアミノ酸残基を少なくとも一つ有するように、中性側鎖を有するアミノ酸残基および側鎖中にカルボン酸基を有するアミノ酸残基の群から選択される鎖；もしくは、

・Xから親インスリンのB鎖中に存在するL y s 残基の - アミノ基までの共有結合であり；

Xは、

・ -  $\underline{\text{CO}}$  - ；

・ -  $\text{CH}(\text{COOH})\underline{\text{CO}}$  - ；

・ -  $\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{\text{CO}}$  - ；

・ -  $\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{\text{CO}}$  - ；

・ -  $\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{CO}}$  - ；

・ -  $\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{CO}}$  - ；

・ -  $\text{CO}-\text{NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_4\text{NH}\underline{\text{CO}}$  - ；

・ -  $\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{\text{CO}}$  - ；もしくは

・ -  $\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{CO}}$  - であって、

a) Wがアミノ酸残基もしくはアミノ酸残基の鎖であるとき、下線の炭素からの結合を介して、W中のアミノ基とアミド結合を形成するか、あるいは、

b) Wが共有結合であるとき、下線のカルボニル炭素からの結合を介して、親インスリンのB鎖中に存在するL y s 残基の - アミノ基とアミド結合を形成し；

Yは、

・mが6から32の範囲の整数である -  $(\text{CH}_2)_m$  - ；

・1、2もしくは3の -  $\text{CH}=\text{CH}$  - 基と、鎖中に10から32の範囲の合計数の炭素原子を与えるのに十分な数の -  $\text{CH}_2$  - 基とを含んでなる二価の炭化水素鎖

であり；かつ、

Z<sub>2</sub>は、

・ -  $\text{COOH}$  ；

・ -  $\text{CO}-\text{Asp}$  ；

・ -  $\text{CO}-\text{Glu}$  ；

・ -  $\text{CO}-\text{Gly}$  ；

・ -  $\text{CO}-\text{Sar}$  ；

・ -  $\text{CH}(\text{COOH})_2$  ；

・ -  $\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$  ；

・ -  $\text{SO}_3\text{H}$  ；もしくは

・ -  $\text{PO}_3\text{H}$

であるが、

ただし、Wが共有結合であってXが -  $\text{CO}-$  であるならば、Zは -  $\text{COOH}$  とは異なる ] の側鎖を有するもの、およびそのZn<sup>2+</sup>錯体である、項46ないし61の何れか一項に記載の方法。

【0094】

63.

アシル化インスリンが、 $\text{N}^{\text{B}29}-(\text{N}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})-$

10

20

30

40

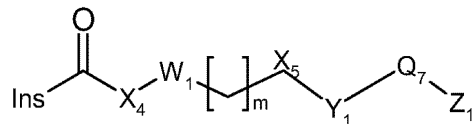
50

$\text{Glu)} \text{des B30 ヒトインスリン}; \text{N}^{\text{B}29} - (\text{N} - (\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{15} \text{CO}) - \text{Glu)} \text{des B30 ヒトインスリン}; \text{N}^{\text{B}29} - (\text{N} - (\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16} \text{CO}) - \text{Glu)} \text{des B30 ヒトインスリン}; \text{N}^{\text{B}29} - (\text{N} - (\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{17} \text{CO}) - \text{Glu)} \text{des B30 ヒトインスリン}; \text{N}^{\text{B}29} - (\text{N} - (\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{18} \text{CO}) - \text{Glu)} \text{des B30 ヒトインスリン}; \text{N}^{\text{B}29} - (\text{N} - (\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16} \text{CO}) - \text{Glu} - \text{N} - (\text{Glu)} \text{des B30 ヒトインスリン}; \text{N}^{\text{B}29} - (\text{N} - (\text{Asp} - \text{OC}(\text{CH}_2)_{16} \text{CO}) - \text{Glu)} \text{des B30 ヒトインスリン}; \text{N}^{\text{B}29} - (\text{N} - (\text{Glu} - \text{OC}(\text{CH}_2)_{14} \text{CO}) - \text{Glu)} \text{des B30 ヒトインスリン}; \text{N}^{\text{B}29} - (\text{N} - (\text{Glu} - \text{OC}(\text{CH}_2)_{14} \text{CO} - ) \text{des B30 ヒトインスリン}; \text{N}^{\text{B}29} - (\text{N} - (\text{Asp} - \text{OC}(\text{CH}_2)_{16} \text{CO} - ) \text{des B30 ヒトインスリン}; \text{N}^{\text{B}29} - (\text{N} - (\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16} \text{CO}) - \text{Glu} - \text{N} - (\text{Asp})) \text{des B30 ヒトインスリン}; \text{N}^{\text{B}29} - (\text{N} - (\text{Gly} - \text{OC}(\text{CH}_2)_{13} \text{CO}) - \text{Glu)} \text{des B30 ヒトインスリン}; \text{N}^{\text{B}29} - (\text{N} - (\text{Sar} - \text{OC}(\text{CH}_2)_{13} \text{CO}) - \text{Glu)} \text{des B30 ヒトインスリン}; \text{N}^{\text{B}29} - (\text{N} - (\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{13} \text{CO}) - \text{Glu)} \text{des B30 ヒトインスリン}; (\text{N}^{\text{B}29} - (\text{N} - (\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{13} \text{CO}) - \text{Asp}) \text{des B30 ヒトインスリン}; \text{N}^{\text{B}29} - (\text{N} - (\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{13} \text{CO}) - \text{Glu)} \text{des B30 ヒトインスリン}; \text{N}^{\text{B}29} - (\text{N} - (\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16} \text{CO}) - \text{D} - \text{Glu)} \text{des B30 ヒトインスリン}; \text{N}^{\text{B}29} - (\text{N} - (\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14} \text{CO}) - \text{D} - \text{Asp}) \text{des B30 ヒトインスリン}; \text{N}^{\text{B}29} - (\text{N} - (\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14} \text{CO}) - \text{D} - \text{Asp}) \text{des B30 ヒトインスリン}; \text{N}^{\text{B}29} - (\text{N} - \text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16} \text{CO} - \text{D} - \text{Asp}) \text{des B30 ヒトインスリン}; \text{N}^{\text{B}29} - (\text{N} - \text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14} \text{CO} - \text{IDA}) \text{des B30 ヒトインスリン}; \text{N}^{\text{B}29} - [\text{N} - (\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16} \text{CO}) - \text{N} - (\text{カルボキシエチル}) - \text{Gly}] \text{des B30 ヒトインスリン}; \text{N}^{\text{B}29} - [\text{N} - (\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14} \text{CO}) - \text{N} - (\text{カルボキシエチル}) - \text{Gly}] \text{des B30 ヒトインスリン}; および \text{N}^{\text{B}29} - [\text{N} - (\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14} \text{CO}) - \text{N} - (\text{カルボキシメチル}) - \text{Ala}] \text{des B30 ヒトインスリン} からなる群から選択される項 46 ないし 62 の何れか一項に記載の方法。$

【0095】

64.

アシル化インスリンが、式



[上式中、

$\text{Ins}$  は、B鎖のN末端アミノ酸残基の - アミノ基もしくはインスリン部分のB鎖中に存在する  $\text{Lys}$  残基の - アミノ基を介して、アミド結合を介して側鎖の  $\text{CO}$  - 基と結合している親インスリン部分であり；

$\text{X}_4$  は、

- ・  $n$  が 1、2、3、4、5 もしくは 6 である  $-(\text{CH}_2)_n$ ；
- ・  $\text{R}$  が、水素もしくは  $-(\text{CH}_2)_p - \text{COOH}$ ；  $-(\text{CH}_2)_p - \text{SO}_3\text{H}$ ；  $-(\text{CH}_2)_p - \text{PO}_3\text{H}_2$ ；  $-(\text{CH}_2)_p - \text{O} - \text{SO}_3\text{H}_2$ ；  $-(\text{CH}_2)_p - \text{O} - \text{PO}_3\text{H}_2$ ； 1又2の  $-(\text{CH}_2)_p - \text{O} - \text{COOH}$  基で置換されたアリーレン；  $-(\text{CH}_2)_p$  - テトラゾリルである  $\text{NR}$

{上式中、  $p$  は 1 から 6 の範囲の整数である}；

- ・  $\text{R}_1$  および  $\text{R}_2$  は、互いに独立し、それぞれの  $q$  の値からも独立して、 $\text{H}$ 、 $-\text{COOH}$ 、もしくは  $\text{OH}$  であってよく、 $q$  は 1 - 6 であり、 $\text{R}$  は上記のように定義される  $-(\text{CR}$

$1 R_2) q - NR - CO -$  ;

・  $R_3$  および  $R_4$  は、互いに独立し、それぞれの  $q_1$  の値からも独立して、H、 $-COOH$ 、もしくはOHであってよく、 $q_1$  は1 - 6であり、Rは上記のように定義される - (  $(CR_3 R_4)_{q_1} - NR - CO$  )  $2 - 4 -$  ; もしくは、

・ 結合

であり ;

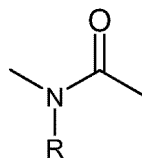
$W_1$  は、 $-COOH$ 、 $-SO_3H$ 、および  $-PO_3H_2$  およびテトラゾリルからなる群から選択される一または二の基で置換されていてもよいアリーレンもしくはヘテロアリーレンであるか、あるいは  $W_1$  は結合であり ;

$m$  は0、1、2、3、4、5もしくは6であり ;

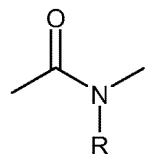
$X_5$  は、

・  $-O-$  ;

・



又は



10

{ Rは上記のように定義される } ; もしくは

・ 結合

であり ;

$Y_1$  は、

・  $R_1$  および  $R_2$  は、互いに独立し、それぞれの  $q$  の値からも独立して、H、 $-COOH$ 、結合もしくはOHであってよく、 $q$  は1 - 6であり、Rは上記のように定義される - (  $CR_1 R_2$  )  $q - NR - CO -$

・ Rが上記のように定義されるNR ;

・  $R_3$  および  $R_4$  は、互いに独立し、それぞれの  $q_1$  の値からも独立して、H、 $-COOH$ 、もしくはOHであってよく、 $q_1$  は1 - 6であり、Rは上記のように定義される - (  $(CR_3 R_4)_{q_1} - NR - CO$  )  $2 - 4 -$  ; もしくは

・ 結合

であり ;

$Q_7$  は、

・  $r$  が4から22の整数である - (  $CH_2$  )  $r -$  ;

・ 1、2もしくは3の  $-CH=CH-$  基と、鎖中に4から22の範囲の合計数の炭素原子を与えるのに十分な数の  $-CH_2-$  基とを含んでなる二価の炭化水素鎖 ; もしくは

・ 式

- (  $CH_2$  )  $s - Q_8 - (C_6H_4)$   $v_1 - Q_9 - (CH_2)$   $w - Q_{10} - (C_6H_4)$   $v_2 - Q_{11} - (CH_2)$   $t - Q_{12} - (C_6H_4)$   $v_3 - Q_{13} - (CH_2)$   $z -$

{  $Q_8 - Q_{13}$  は、互いに独立して、O ; Sもしくは結合であってよく ;  $s$ 、 $w$ 、 $t$  および  $z$  は、互いに独立して、 $s$ 、 $w$ 、 $t$  および  $z$  の合計が4から22の範囲になるように、0もしくは1から10の整数であり、かつ、 $v_1$ 、 $v_2$ 、および  $v_3$  は、互いに独立して、0もしくは1であってよいが、ただし、 $W_1$  が結合であるならば、 $Q_7$  は式 - (  $CH_2$  )  $v_4 C_6H_4 (CH_2)$   $w_1 - (v_4$  および  $w_1$  の合計が6から22の範囲になるように、 $v_4$  および  $w_1$  は整数であるか、あるいは、それらのうちの一つは0である ) の二価の炭化水素鎖ではない }

の二価の炭化水素鎖

であり ; かつ、

$Z_1$  は、

20

30

40

50

- C O O H ;
- C O - A s p ;
- C O - G l u ;
- C O - G l y ;
- C O - S a r ;
- C H ( C O O H ) <sub>2</sub> ;
- N ( C H <sub>2</sub> C O O H ) <sub>2</sub> ;
- S O <sub>3</sub> H
- P O <sub>3</sub> H <sub>2</sub> ;
- O - S O <sub>3</sub> H ;
- O - P O <sub>3</sub> H <sub>2</sub> ;
- テトラゾリルもしくは

W<sub>2</sub> が、- C O O H、- S O <sub>3</sub> H、および - P O <sub>3</sub> H <sub>2</sub> およびテトラゾリルから選択される一または二の基で置換されているアリーレンもしくはヘテロアリーレンである - O - W<sub>2</sub> であるが；

ただし、W<sub>1</sub> が結合であり、かつ v<sub>1</sub>、v<sub>2</sub> および v<sub>3</sub> が全て 0 であり、かつ Q<sub>8-13</sub> が全て結合であれば、Z<sub>1</sub> は O - W<sub>2</sub> である ]

を有するもの、およびその任意の Z<sub>n</sub><sup>2+</sup> 錯体である、項 4 6 ないし 6 1 の何れか一項に記載の方法。

【 0 0 9 6 】

6 5 .

W<sub>1</sub> がフェニレンである項 4 6 および 6 4 に記載の方法。

6 6 .

W<sub>1</sub> が、窒素、酸素または硫黄を含んでなる 5 - 7 員環ヘテロ環系である項 4 6 および 6 4 に記載の方法。

6 7 .

W<sub>1</sub> が、少なくとも一つの酸素を含んでなる 5 員環ヘテロ環系である項 6 6 に記載の方法。

【 0 0 9 7 】

6 8 .

本発明のある態様では、Q<sub>7</sub> は、r が 4 から 2 2、8 から 2 0、1 2 から 2 0、もしくは 1 4 - 1 8 の範囲の整数である - ( C H <sub>2</sub> )<sub>r</sub> - である項 4 6 および 6 4 - 6 7 に記載の方法。

6 9 .

Q<sub>8</sub>、Q<sub>9</sub>、Q<sub>12</sub> および Q<sub>13</sub> は、全て結合であり、v<sub>2</sub> は 1 であり、v<sub>1</sub> および v<sub>3</sub> は 0 である項 4 6 および 6 4 - 6 8 に記載の方法。

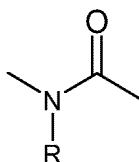
7 0 .

Q<sub>10</sub> および Q<sub>11</sub> は酸素である項 6 9 に記載の方法。

【 0 0 9 8 】

7 1 .

X<sub>4</sub> および Y<sub>1</sub> は結合であり、X<sub>5</sub> は、



[ 上式中、R は、p が 1 - 4 である - ( C H <sub>2</sub> )<sub>p</sub> - C O O H である ]  
である項 6 4 に記載の方法。

7 2 .

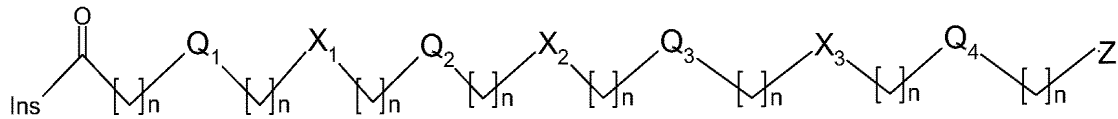


$Z_1$  が -COOH である項 64 - 71 に記載の方法。

【0099】

73 .

アシル化インスリンが、式



[ 上式中、

Ins は、B 鎖の N 末端アミノ酸残基の - アミノ基もしくはインスリン部分の B 鎖中に存在する Lys 残基の - アミノ基を介して、アミド結合を介して側鎖の CO - 基と結合している親インスリン部分であり；

それぞれの n は独立して、0、1、2、3、4、5 もしくは 6 であり；

$Q_1$ 、 $Q_2$ 、 $Q_3$ 、および  $Q_4$  は、互いに独立して、

・ s が 1 - 20 である  $(CH_2CH_2O)_s$  - ；  $(CH_2CH_2CH_2O)_s$  - ；  $(CH_2CH_2CH_2CH_2O)_s$  - ；  $(CH_2CH_2OCH_2CH_2CH_2CH_2O)_s$  - もしくは  $(CH_2CH_2CH_2OCH_2CH_2CH_2CH_2O)_s$  - ；

・ r が 4 から 22 の整数である -  $(CH_2)_r$  - ；もしくは、1、2 もしくは 3 の - CH = CH - 基と、鎖中に 4 から 22 の範囲の合計数の炭素原子を与えるのに十分な数の - C

$H_2$  - 基とを含んでなる二価の炭化水素鎖；

・ t が 1 から 6 の整数である -  $(CH_2)_t$  - もしくは -  $(CH_2OCH_2)_t$  - ；

・  $R_1$  および  $R_2$  が、互いに独立して、H、-COOH、 $(CH_2)_{1-6}COOH$  であってよく、かつ、 $R_1$  および  $R_2$  が、それぞれの炭素において異なっていてよく、かつ、q が 1 - 6 である -  $(CR_1R_2)_q$  - ；

・  $R_3$  および  $R_4$  が、互いに独立して、H、-COOH であってよく、かつ、 $R_3$  および  $R_4$  が、それぞれの炭素において異なっていてよく、かつ、 $q_1$  が 1 - 6 である -  $((CR_3R_4)_{q_1})_1$  -  $(NHCO - (CR_3R_4)_{q_1} - NHCO)_1 - 2$  -  $((CR_3R_4)_{q_1})_1$  もしくは -  $((CR_3R_4)_{q_1})_1$  -  $(CONH - (CR_3R_4)_{q_1} - CONH)_1 - 2$  -  $((CR_3R_4)_{q_1})_1$  -  $(NHCO - (CR_3R_4)_{q_1} - CONH)_1 - 2$  -  $((CR_3R_4)_{q_1})_1$  もしくは -  $((CR_3R_4)_{q_1})_1$  -  $(CONH - (CR_3R_4)_{q_1} - NHCO)_1 - 2$  -  $((CR_3R_4)_{q_1})_1$  ；もしくは

・ 結合

であってよいが；

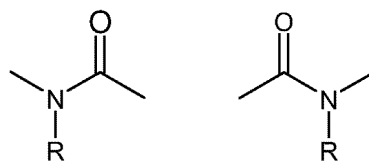
ただし、 $Q_1$  -  $Q_4$  は異なっており；

$X_1$ 、 $X_2$  および  $X_3$  は、独立して、

・ O ；

・ 結合；もしくは

・



又は

{ 上式中、

R は、水素もしくはそれぞれの p が、残りの p' と独立して、1 から 6 の範囲の整数である -  $(CH_2)_p$  - COOH、-  $(CH_2)_p$  - SO<sub>3</sub>H、-  $(CH_2)_p$  - PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>

10

20

30

40

50

、 $-(CH_2)_p-O-SO_3H$ ； $-(CH_2)_p-O-PO_3H_2$ ；もしくは $-(CH_2)_p$ -テトラゾール-5-イルである}

であり；かつ

Zは、

- COOH；
- CO-Asp；
- CO-Glu；
- CO-Gly；
- CO-Sar；
- CH(COOH)<sub>2</sub>；
- N(CH<sub>2</sub>COOH)<sub>2</sub>；
- SO<sub>3</sub>H
- OSO<sub>3</sub>H
- OPO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>
- PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>もしくは
- テトラゾール-5-イル

10

である]

を有するもの、およびその任意の $Zn^{2+}$ 錯体である、項46-61に記載の方法。

【0100】

74.

20

sが、2-12、2-4もしくは2-3の範囲である項73に記載の方法。

75.

sが好ましくは1である項73に記載の方法。

76.

Zが-COOHである項73-75に記載の方法。

77.

親インスリンがdesB30ヒトインスリンアナログである項46ないし76の何れか一項に記載の方法。

【0101】

78.

30

親インスリンが、ヒトインスリン；desB1ヒトインスリン；desB30ヒトインスリン；GlyA21ヒトインスリン；GlyA21desB30ヒトインスリン；AspB28ヒトインスリン；ブタインスリン；LysB28ProB29ヒトインスリン；GlyA21ArgB31ArgB32ヒトインスリン；およびLysB3GluB29ヒトインスリンもしくはAspB28desB30ヒトインスリンからなる群から選択される項46ないし77の何れか一項に記載の方法。

【0102】

79.

アシル化インスリンが、

$N^{B29}-[N-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-N-(カルボキシエチル)-CH_2-C_6H_4CO]$ desB30ヒトインスリン； $N^{B29}-[N-(HOOC(CH_2)_{13}CO)-N-(カルボキシエチル)-CH_2-C_6H_4CO]$ desB30ヒトインスリン； $N^{B29}-[N-(HOOC(CH_2)_{15}CO)-N-(カルボキシエチル)-CH_2-C_6H_4CO]$ desB30ヒトインスリン； $N^{B29}-[N-(HOOC(CH_2)_{16}CO)-N-(カルボキシエチル)-CH_2-C_6H_4CO]$ desB30ヒトインスリン； $N^{B29}-[N-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-N-(カルボキシメチル)-C_6H_4CO]$ desB30ヒトインスリン、および $N^{B29}-[N-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-N-(カルボキシエチル)-CH_2-(フラニレン)CO]$ desB30ヒトインスリン、 $N^{B29}-\{4-カルボキシ-4-[10-(4-カルボキシ-フェノキシ)-デカノイルアミノ]-ブチリル\}$ desB30ヒト

40

50

## 80.

50

トインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - ( 3 - ( 3 - { 4 - [ 3 - ( - カルボキシウンデカノイル  
 アミノ)プロパ - オキシ]プトキシプロピルカルバモイル)プロピオニル - - グルタミ  
 ル) d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - ( 3 - ( 3 - { 4 - [ 3 - ( - カルボ  
 キシトリデカノイルアミノ)プロパ - オキシ]プトキシプロピルカルバモイル)プロピオ  
 ニル - - グルタミル) d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - ( 3 - ( 2 - { 2 -  
 [ 2 - ( - カルボキシウンデカノイルアミノ)エトキシ]エトキシ}エチルカルバモイ  
 ル)プロピオニル - - グルタミル) d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - ( 3 -  
 ( 2 - { 2 - [ 2 - ( - カルボキシトリデカノイルアミノ)エトキシ]エトキシ}エチ  
 ルカルバモイル)プロピオニル - - グルタミル) d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B</sup>  
<sup>2 9</sup> - { 3 - [ 2 - ( 2 - { 2 - [ 2 - ( - カルボキシ - ペンタデカノイルアミノ)エ  
 トキシ]エトキシ}エトキシ)エトキシ]プロピオニル - ガンマ - - D - グルタミル)  
 d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - { 3 - [ 2 - ( 2 - { 2 - [ 2 - ( 7 - カル  
 ボキシヘプタノイルアミノ)エトキシ]エトキシ}エトキシ)エトキシ]プロピオニル -  
 - グルタミル} d e s B 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - { 3 - [ 2 - ( 2 - { 2 -  
 [ 2 - ( 9 - カルボキシノナノイルアミノ)エトキシ]エトキシ}エトキシ)エトキシ]  
 プロピオニル ( p r o p i o n i y l ) - - グルタミル} d e s B 3 0 ヒトインスリン  
 、N<sup>B 2 9</sup> - { 3 - [ 2 - ( 2 - { 2 - [ 2 - ( - カルボキシウンデカノイルアミノ  
 )エトキシ]エトキシ}エトキシ)エトキシ]プロピオニル - - グルタミル} d e s B  
 3 0 ヒトインスリン、N<sup>B 2 9</sup> - { 3 - [ 2 - ( 2 - { 2 - [ 2 - ( - カルボキシト  
 リデカノイルアミノ)エトキシ]エトキシ}エトキシ)エトキシ]プロピオニル - - グ  
 ルタミル} d e s B 3 0 ヒトインスリンからなる群から選択される項 4 6 - 6 1 または 7  
 3 - 7 8 の何れか一項に記載の方法。

10

20

【 0 1 0 4 】

8 1 .

即効型インスリンを組成物と混合する項 4 6 ないし 8 0 の何れか一項に記載の方法。

8 2 .

即効型インスリンが、A s p B 2 8 ヒトインスリン、L y s B 3 G l u B 2 9 ヒトイン  
 スリンおよび / または L y s B 2 8 P r o B 2 9 ヒトインスリンである項 4 6 および 8 0  
 に記載の方法。

8 3 .

糖尿病の治療のための医薬の製造のための、項 1 - 4 5 の何れか一項に記載の組成物の  
 使用。

30

【 0 1 0 5 】

8 4 .

項 1 - 4 5 に記載の製薬学的組成物の治療的有効量を製薬学的に許容される担体と共に  
 含む、治療の必要がある患者における糖尿病の治療のための製薬学的組成物。

8 5 .

項 1 - 4 5 に記載の製薬学的組成物の治療的有効量を製薬学的に許容される担体と共に  
 患者に投与することを含む、治療の必要がある患者における糖尿病の治療方法。

8 6 .

糖尿病の肺性治療のための、項 8 5 に記載の方法。

40

【 0 1 0 6 】

8 7 .

1 型糖尿病、2 型糖尿病および高血糖を引き起こす他の状態の治療において使用するた  
 めの製薬学的組成物の製造のための、項 1 - 4 5 に記載の組成物の使用。

8 8 .

実施例に記載される組成物。

本発明の別の態様は、以下に要約される。

9 1 .

アシル化インスリンを含み、6 分子のアシル化インスリン毎に 4 より多い亜鉛原子をさ

50

らに含む可溶性製薬学的組成物。

【 0 1 0 7 】

9 2 .

アシル化インスリンを含み、6分子のアシル化インスリン毎に5より多い亜鉛原子をさらに含む項 9 1 に記載の可溶性製薬学的組成物。

9 3 .

6分子のアシル化インスリン毎に最大約 1 4 の亜鉛原子を含む項 9 1 - 9 2 に記載の製薬学的組成物。

9 4 .

6分子のアシル化インスリン毎に約 5 から約 1 4 の亜鉛原子を含む項 9 1 - 9 3 に記載の製薬学的組成物。

10

【 0 1 0 8 】

9 5 .

6分子のアシル化インスリン毎に約 5 から約 1 3 の亜鉛原子を含む項 9 1 - 9 4 の何れか一項に記載の製薬学的組成物。

9 6 .

6分子のアシル化インスリン毎に約 5 から約 1 2 の亜鉛原子を含む項 9 1 - 9 5 の何れか一項に記載の製薬学的組成物。

9 7 .

6分子のアシル化インスリン毎に約 5 . 3 から約 1 2 の亜鉛原子を含む項 9 1 - 9 6 の何れか一項に記載の製薬学的組成物。

20

【 0 1 0 9 】

9 8 .

6分子のアシル化インスリン毎に約 5 . 5 から約 1 1 . 4 の亜鉛原子を含む項 9 1 - 9 7 の何れか一項に記載の製薬学的組成物。

9 9 .

6分子のアシル化インスリン毎に約 5 . 5 から約 1 0 の亜鉛原子を含む項 9 1 - 9 8 の何れか一項に記載の製薬学的組成物。

1 0 0 .

アシル化インスリンが、L y s B 2 9 ( N - テトラデカノイル ) d e s B 3 0 ヒトインスリンもしくは L y s <sup>B 2 9</sup> N - リトコロイル ( lithocholoyl ) - - G l u d e s B 3 0 ヒトインスリンである項 9 1 - 9 9 の何れか一項に記載の製薬学的組成物。

30

【 0 1 1 0 】

1 0 1 .

アシル化インスリンが、親インスリンの B 鎖中に存在する L y s 残基の - アミノ基と結合している側鎖であって、一般式：

- W - X - Y - Z

[ 上式中、

W は、

・そのカルボン酸基のうちの一つと共に、親のインスリンの B 鎖中に存在する L y s 残基の - アミノ基と一緒にあってアミド基を形成する、側鎖中にカルボン酸基を有する - アミノ酸残基；

40

・アミドカルボニル結合を介して一緒に連結されている 2、3 または 4 の - アミノ酸残基からなる鎖であって、

アミド結合 - を介した鎖 - は親インスリンの B 鎖中に存在する L y s 残基の - アミノ基と連結しており、

W のアミノ酸残基は、W が側鎖中にカルボン酸基を有するアミノ酸残基を少なくとも一つ有するように、中性側鎖を有するアミノ酸残基および側鎖中にカルボン酸基を有するアミノ酸残基の群から選択される鎖；もしくは、

・ X から親インスリンの B 鎖中に存在する L y s 残基の - アミノ基までの共有結合

50

であり；

Xは、

- ・ -  $\underline{\text{C}}\text{O} -$  ；
- ・ -  $\text{CH}(\text{COOH})\underline{\text{C}}\text{O} -$  ；
- ・ -  $\text{CO} - \text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O} -$  ；
- ・ -  $\text{CO} - \text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O} -$  ；
- ・ -  $\text{CO} - \text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O} -$  ；
- ・ -  $\text{CO} - \text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O} -$  ；
- ・ -  $\text{CO} - \text{NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_4\text{NH}\underline{\text{C}}\text{O} -$  ；
- ・ -  $\text{CO} - \text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O} -$  ；もしくは
- ・ -  $\text{CO} - \text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O} -$  であって、

a) Wがアミノ酸残基もしくはアミノ酸残基の鎖であるとき、下線の炭素からの結合を介して、W中のアミノ基とアミド結合を形成するか、あるいは、

b) Wが共有結合であるとき、下線のカルボニル炭素からの結合を介して、親インスリンのB鎖中に存在するLys残基の - アミノ基とアミド結合を形成し；

Yは、

- ・ mが6から32の範囲の整数である -  $(\text{CH}_2)_m -$  ；
- ・ 1、2もしくは3の -  $\text{CH}=\text{CH} -$  基と、鎖中に10から32の範囲の合計数の炭素原子を与えるのに十分な数の -  $\text{CH}_2 -$  基とを含んでなる二価の炭化水素鎖

であり；かつ、

Zは、

- ・ -  $\text{COOH}$  ；
- ・ -  $\text{CO} - \text{Asp}$  ；
- ・ -  $\text{CO} - \text{Glu}$  ；
- ・ -  $\text{CO} - \text{Gly}$  ；
- ・ -  $\text{CO} - \text{Sar}$  ；
- ・ -  $\text{CH}(\text{COOH})_2$  ；
- ・ -  $\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$  ；
- ・ -  $\text{SO}_3\text{H}$  ；もしくは
- ・ -  $\text{PO}_3\text{H}$

である]

の側鎖を有さない項91 - 100の何れか一項に記載の製薬学的組成物。

【0111】

101 .

アシル化インスリンがLys<sup>B29</sup>N<sup>1</sup> - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B30ヒトインスリンではない0項91 - 101の何れか一項に記載の製薬学的組成物。

102 .

約6.5から8.5のpHを有する項91ないし101の何れか一項に記載の製薬学的組成物。

103 .

即効型インスリンをさらに含む項91ないし102の何れか一項に記載の製薬学的組成物。

104 .

即効型インスリンが、AspB28ヒトインスリンおよび/またはLysB28ProB29ヒトインスリンである項103に記載の製薬学的組成物。

【0112】

109 .

6分子のアシル化インスリン毎に約4より多い亜鉛原子を組成物に添加する、アシル化インスリンを含む製薬学的組成物を製造するための方法。

本発明の更なる態様では、6分子のアシル化インスリン毎に約4.3より多い亜鉛原子を組成物に添加するか、あるいは、6分子のアシル化インスリン毎に約4.5より多い亜鉛原子を組成物に添加するか、あるいは、6分子のアシル化インスリン毎に約5より多い亜鉛原子を組成物に添加する。

110.

6分子のアシル化インスリン毎に最大約14の亜鉛原子を組成物に添加する項109に記載の方法。

【0113】

111.

6分子のアシル化インスリン毎に約4.3から約14の亜鉛原子を組成物に添加する項109-110の何れか一項に記載の方法。 10

本発明の更なる態様では、6分子のアシル化インスリン毎に約4.5から約12の亜鉛原子を組成物に添加するか、あるいは、6分子のアシル化インスリン毎に約5から約11.4の亜鉛原子を組成物に添加するか、あるいは、6分子のアシル化インスリン毎に約5.5から約10の亜鉛原子を組成物に添加する。

【0114】

112.

保存料の添加前に、亜鉛を組成物に添加する項109-111に記載の方法。

113.

保存料の添加前に添加する亜鉛原子の数が、6分子のアシル化インスリン毎に1より多い亜鉛原子である項109-112の何れか一項に記載の方法。 20

114.

保存料の添加前に添加する亜鉛原子の数が、6分子のアシル化インスリン毎に2より多い亜鉛原子である項109-113の何れか一項に記載の方法。

【0115】

115.

保存料の添加前に添加する亜鉛原子の数が、6分子のアシル化インスリン毎に3より多い亜鉛原子である項109-114の何れか一項に記載の方法。

116.

保存料の添加前に添加する亜鉛原子の数が、6分子のアシル化インスリン毎に4より多い亜鉛原子である項109-115の何れか一項に記載の方法。 30

【0116】

117.

保存料の添加前に添加する亜鉛原子の数が、6分子のアシル化インスリン毎に5より多い亜鉛原子である項109-116の何れか一項に記載の方法。

本発明の更なる態様では、6分子のアシル化インスリン毎に約4.5から約12の亜鉛原子を保存料の添加前に組成物に添加するか、あるいは、より好ましくは、6分子のアシル化インスリン毎に約5から約11.4の亜鉛原子を保存料の添加前に組成物に添加するか、あるいは、さらにより好ましくは6分子のアシル化インスリン毎に約5.5から約10の亜鉛原子を保存料の添加前に組成物に添加する。 40

【0117】

118.

保存料の添加後に、亜鉛を組成物に添加する項109-111の何れか一項に記載の方法。

119.

6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも0.5の亜鉛原子を保存料の添加後に組成物に添加する項118に記載の方法。

【0118】

120.

6分子のアシル化インスリン毎に少なくとも1の亜鉛原子を保存料の添加後に組成物に 50

添加する項 1 1 8 - 1 1 9 に記載の方法。

本発明の更なる態様では、6 分子のアシル化インスリン毎に約 2 より多い亜鉛原子を保存料の添加後に組成物に添加するか、あるいは、6 分子のアシル化インスリン毎に約 3 より多い亜鉛原子を保存料の添加後に組成物に添加するか、あるいは、6 分子のアシル化インスリン毎に約 4 より多い亜鉛原子を保存料の添加後に組成物に添加する。

本発明の更なる態様では、6 分子のアシル化インスリン毎に約 4 . 5 から約 1 2 の亜鉛原子を保存料の添加後に組成物に添加するか、あるいは、より好ましくは、6 分子のアシル化インスリン毎に約 5 から約 1 1 . 4 の亜鉛原子を保存料の添加後に組成物に添加するか、あるいは、さらにより好ましくは、6 分子のアシル化インスリン毎に約 5 . 5 から約 1 0 の亜鉛原子を保存料の添加後に組成物に添加する。

10

【 0 1 1 9 】

1 2 1 .

保存料の添加前に亜鉛の一部を添加し、保存料の添加後に亜鉛の一部を添加する項 1 0 9 - 1 2 0 の何れか一項に記載の方法。

ある態様では、本方法は、6 分子のアシル化インスリン毎に少なくとも 1 の亜鉛原子を保存料の添加前に添加し、6 分子のアシル化インスリン毎に少なくとも 1 の亜鉛原子を保存料の添加後に添加するか、あるいは、6 分子のアシル化インスリン毎に少なくとも 1 の亜鉛原子を保存料の添加前に添加し、6 分子のアシル化インスリン毎に少なくとも 2 - 3 の亜鉛原子を保存料の添加後に添加するか、あるいは、6 分子のアシル化インスリン毎に少なくとも 1 の亜鉛原子を保存料の添加前に添加し、6 分子のアシル化インスリン毎に最大約 1 1 の亜鉛原子を保存料の添加後に添加することを含む。

20

【 0 1 2 0 】

ある態様では、本方法は、6 分子のアシル化インスリン毎に少なくとも 2 の亜鉛原子を保存料の添加前に添加し、6 分子のアシル化インスリン毎に少なくとも 1 の亜鉛原子を保存料の添加後に添加するか、あるいは、6 分子のアシル化インスリン毎に少なくとも 2 の亜鉛原子を保存料の添加前に添加し、6 分子のアシル化インスリン毎に少なくとも 2 - 3 の亜鉛原子を保存料の添加後に添加するか、あるいは、6 分子のアシル化インスリン毎に少なくとも 2 の亜鉛原子を保存料の添加前に添加し、6 分子のアシル化インスリン毎に最大約 1 0 の亜鉛原子を保存料の添加後に添加することを含む。

【 0 1 2 1 】

30

ある態様では、本方法は、6 分子のアシル化インスリン毎に少なくとも 3 の亜鉛原子を保存料の添加前に添加し、6 分子のアシル化インスリン毎に少なくとも 1 の亜鉛原子を保存料の添加後に添加するか、あるいは、6 分子のアシル化インスリン毎に少なくとも 3 の亜鉛原子を保存料の添加前に添加し、6 分子のアシル化インスリン毎に少なくとも 2 - 3 の亜鉛原子を保存料の添加後に添加するか、あるいは、6 分子のアシル化インスリン毎に少なくとも 3 の亜鉛原子を保存料の添加前に添加し、6 分子のアシル化インスリン毎に最大約 9 の亜鉛原子を保存料の添加後に添加することを含む。

【 0 1 2 2 】

1 2 2 .

保存料の添加前に添加する亜鉛原子の数が、6 分子のアシル化インスリン毎に少なくとも 3 の亜鉛原子であり、保存料の添加後に添加する亜鉛原子の数が、6 分子のアシル化インスリン毎に少なくとも 3 の亜鉛原子である項 1 2 1 の何れか一項に記載の方法。

40

1 2 3 .

保存料がフェノールおよび / または m - クレゾールである項 1 1 2 - 1 2 2 の何れか一項に記載の方法。

【 0 1 2 3 】

1 2 4 .

アシル化インスリンが、L y s B 2 9 ( N - テトラデカノイル ) d e s B 3 0 ヒトインスリンもしくは L y s <sup>B 2 9</sup> N - リトコロイル ( lithocholoyl ) - - G l u d e s B 3 0 ヒトインスリンである項 1 0 9 - 1 2 3 の何れか一項に記載の方法。

50



1 2 5 .

アシル化インスリンが、親インスリンの B 鎖中に存在する L y s 残基の - アミノ基と結合している側鎖であって、一般式：

- W - X - Y - Z

[ 上式中、

W は、

・そのカルボン酸基のうちの一つと共に、親のインスリンの B 鎖中に存在する L y s 残基の - アミノ基と一緒にあってアミド基を形成する、側鎖中にカルボン酸基を有する - アミノ酸残基；

・アミドカルボニル結合を介して一緒に連結されている 2、3 または 4 の - アミノ酸残基からなる鎖であって、

アミド結合 - を介した鎖 - は親インスリンの B 鎖中に存在する L y s 残基の - アミノ基と連結しており、

W のアミノ酸残基は、W が側鎖中にカルボン酸基を有するアミノ酸残基を少なくとも一つ有するように、中性側鎖を有するアミノ酸残基および側鎖中にカルボン酸基を有するアミノ酸残基の群から選択される鎖；もしくは、

・X から親インスリンの B 鎖中に存在する L y s 残基の - アミノ基までの共有結合であり；

X は、

・ -  $\underline{\text{CO}}$  - ；

・ -  $\text{CH}(\text{COOH})\underline{\text{CO}}$  - ；

・ -  $\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{\text{CO}}$  - ；

・ -  $\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{\text{CO}}$  - ；

・ -  $\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{CO}}$  - ；

・ -  $\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{CO}}$  - ；

・ -  $\text{CO}-\text{NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_4\text{NH}\underline{\text{CO}}$  - ；

・ -  $\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{\text{CO}}$  - ；もしくは

・ -  $\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{CO}}$  - であって、

a) W がアミノ酸残基もしくはアミノ酸残基の鎖であるとき、下線の炭素からの結合を介して、W 中のアミノ基とアミド結合を形成するか、あるいは、

b) W が共有結合であるとき、下線のカルボニル炭素からの結合を介して、親インスリンの B 鎖中に存在する L y s 残基の - アミノ基とアミド結合を形成し；

Y は、

・ m が 6 から 32 の範囲の整数である -  $(\text{CH}_2)_m$  - ；

・ 1、2 もしくは 3 の -  $\text{CH}=\text{CH}$  - 基と、鎖中に 10 から 32 の範囲の合計数の炭素原子を与えるのに十分な数の -  $\text{CH}_2$  - 基とを含んでなる二価の炭化水素鎖

であり；かつ、

Z は、

・ -  $\text{COOH}$  ；

・ -  $\text{CO}-\text{Asp}$  ；

・ -  $\text{CO}-\text{Glu}$  ；

・ -  $\text{CO}-\text{Gly}$  ；

・ -  $\text{CO}-\text{Sar}$  ；

・ -  $\text{CH}(\text{COOH})_2$  ；

・ -  $\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$  ；

・ -  $\text{SO}_3\text{H}$  ；もしくは

・ -  $\text{PO}_3\text{H}$

である]

の側鎖を有さない項 1 0 9 - 1 2 4 の何れか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 2 4 】

1 2 6 .

アシル化インスリンが L y s <sup>B 2 9</sup> N - ヘキサデカンジオイル - - G l u d e s B 3 0 ヒトインスリンではない項 1 2 5 の何れか一項に記載の方法。

1 2 7 .

即効型インスリンを組成物に添加する項 1 0 9 - 1 2 6 の何れか一項に記載の方法。

1 2 8 .

即効型インスリンが、A s p B 2 8 ヒトインスリンおよび / または L y s B 2 8 P r o B 2 9 ヒトインスリンである項 1 2 7 に記載の方法。

1 2 9 .

糖尿病の治療のための医薬品の製造のための、項 9 1 - 1 0 4 の何れか一項に記載の組成物の使用。

## 【 0 1 2 5 】

〔 発明の詳細な説明 〕

本発明は、通常水準（ 6 分子のアシル化インスリン毎に 2 から 4 の亜鉛原子）を超える亜鉛含有量の増加が、あるアシル化インスリン誘導体、特にアシル化インスリン L y s <sup>B 2 9</sup> N - ヘキサデカンジオイル - - G l u d e s B 3 0 ヒトインスリンの中および高分子量インスリン複合体を増加させるという驚くべき知見に基づいたものである

本発明によれば、所望の度合いの会合を有するインスリンを含むインスリン製剤を設計することができる。

## 【 0 1 2 6 】

さらに、アシル化インスリンを即効型インスリンアナログと混合するとき、鈍化が起きることなく、真の二相性特性が得られる。したがって、本発明によると、即効型インスリンアナログと遷延性アシル化インスリンの混合物であって、即効型インスリンとアシル化インスリンの注射部位からの消失速度は、別個の組成物で注射するときと同様である可溶性組成物が提供される。二相性製薬学的組成物としてのインスリンを投与することにより、注射の回数は減少し、より利便性が高く、安全な治療となる。

本発明は、さらに、インスリン製剤を調製するときに、保存料の添加後に亜鉛を加えることができるという驚くべき知見に基づいたものである。亜鉛は、典型的には、酢酸亜鉛、塩化亜鉛またはクエン酸亜鉛をインスリン製剤に添加することにより提供される。

## 【 0 1 2 7 】

本発明によれば、本発明のアシル化インスリン組成物は、吸入により送達され、その急速な吸収を成し得る。吸入による投与は、薬物動態学的に、インスリンの皮下投与に比較し得る結果となり得る。本発明のアシル化インスリン組成物の吸入は、循環インスリンレベルの急速な上昇と、それに続く急速な血中グルコースレベルの降下につながる。異なる吸入装置が、典型的には、類似の粒子サイズおよび類似の肺付着レベルで比較すると、類似の薬物動態学を与える。

## 【 0 1 2 8 】

本発明によれば、本発明のアシル化インスリン組成物は、それらの迅速な吸収を達成するために吸入法によって送達してもよい。吸入法による投与は、インスリン類の皮下投与と同等の薬物動態を生じ得る。本発明のアシル化インスリン組成物の吸入は、循環インスリンレベルの迅速な上昇、続く血糖値の迅速な落下を引き起こす。異なる吸入装置でも、同様の粒径および同様の肺沈着レベルを比較すると、典型的には同様の薬物動態を提供する。

## 【 0 1 2 9 】

本発明によれば、本発明のアシル化インスリン組成物は、は、吸入法による治療剤の投与のための、当技術分野において既知の種々の吸入装置のいずれにより送達してもよいこれらの装置には、定用量吸入器、ネブライザー、乾燥粉末発生装置、噴霧器、その他を含む。好ましくは、本発明のアシル化インスリン組成物は、乾燥粉末吸入器または噴霧器により送達される。本発明のアシル化インスリン組成物を投与するための吸入装置には、い

10

20

30

40

50

くつかの望ましい特色がある。例えば、吸入装置による送達は、信頼でき、再現性があり、かつ正確であることが都合よい。吸入装置は、小粒子、例えば約 $10\text{ }\mu\text{m}$ 未満、例えば快適に呼吸できるためには、約 $1\sim 5\text{ }\mu\text{m}$ を送達すべきである。本発明の実施に適した市販の吸入装置の幾つかの具体例としては、Turbohaler（商標）（Astra）、Rotahaler（登録商標）（Glaxo）、Diskus（登録商標）（Glaxo）、Spiros（商標）吸入器（Dura）、Inhale Therapeuticによって市場に出されている装置、AERx（商標）（Aradigm）、Ultraventネブライザー（Mallinckrodt）、Acorn II（登録商標）ネブライザー（Marquest Medical Products）、Ventolin（登録商標）定用量吸入器（Glaxo）、Spinhaler（登録商標）粉末吸入器（Fisons）、C-haler（登録商標）（Microdrug）、E-flex（登録商標）（Microdrug）等が挙げられる。

10

#### 【0130】

当業者であれば認識するであろうとおり、本発明のアシル化インスリン組成物の製剤、送達される製剤の量および単一用量の投与の期間は、使用される吸入装置のタイプに依存する。ネブライザーなどの幾つかのエアロゾル送達系については、投与の頻度および系が活性化される延べ時間は主に、エアロゾル内のインスリンコンジュゲートの濃度に依存する。例えば、投与の期間が短いほど、ネブライザー溶液において高濃度のインスリンコンジュゲートを使用することができる。定用量吸入器などの装置では、より高いエアロゾル濃度を生じさせることができ、所望の量のインスリンコンジュゲートを送達するために、操作をより短い期間にすることができる。粉末吸入器などの装置は、所与の装入量の薬剤が装置から放出されるまで、活性薬剤を送達する。この種の吸入器では、所与の量の粉末中の本発明のインスリン誘導体の量により、単独投与で送達される用量を決定する。

20

#### 【0131】

吸入装置によって送達される製剤中の本発明のインスリン誘導体の粒径は、インスリンが肺内、より好ましくは下気道または肺胞でこれを作る能力に関して重要である。好ましくは、本発明のアシル化インスリン組成物は、また、送達されたインスリンコンジュゲートの少なくとも約 $10\%$ 、好ましくは約 $10$ から約 $20\%$ もしくはそれ以上が肺に沈着するように製剤される。約 $2\text{ }\mu\text{m}$ ～約 $3\text{ }\mu\text{m}$ の粒径で、口呼吸しているヒトのための肺沈着の最高効率を得られることが知られている。粒径が上記の約 $5\text{ }\mu\text{m}$ を上回るとき、肺沈着は大きく減少する。約 $1\text{ }\mu\text{m}$ を下回る粒径では、肺沈着の減少を引き起こし、治療的に有効な十分量の粒子を送達することが困難になる。したがって、吸入によって送達されるアシル化インスリン組成物の粒子は、好ましくは約 $10\text{ }\mu\text{m}$ 未満、より好ましくは約 $1\text{ }\mu\text{m}$ から約 $5\text{ }\mu\text{m}$ の範囲の粒径を有する。インスリン誘導体の製剤は、選ばれた吸入装置において所望の粒径を生じるように選択される。

30

#### 【0132】

乾燥粉末としての投与する上で有利には、本発明のアシル化インスリン組成物は、約 $10\text{ }\mu\text{m}$ 未満、好ましくは約 $1$ から約 $5\text{ }\mu\text{m}$ の粒径をもつ粒状形態で調製される。好ましい粒径は、患者の肺の肺胞に送達するために有効である。好ましくは、乾燥粉末は、大多数の粒子が所望の範囲のサイズを有するように製造された粒子で主に構成される。有利には、乾燥粉末の少なくとも約 $50\%$ は、約 $10\text{ }\mu\text{m}$ 未満の直径を有する粒子でできている。このような製剤は、インスリンコンジュゲートとその他の所望の成分とを含む溶液の噴霧乾燥、粉碎または臨界点凝縮によって達成することができる。また、本発明に有用な粒子を作製するために適したその他の方法は、当該技術分野において既知である。

40

#### 【0133】

粒子は、通常、乾燥粉末製剤から容器内に分離し、次いで担体気流を経て患者の肺に輸送される。典型的には、現在の乾燥粉末吸入器では、固体を分解する力は、単に患者の吸入のみによって提供される。吸入器のもう一つのタイプでは、患者の吸入によって発生する気流が、粒子の塊をほぐす羽根車モーターを活性化する。

#### 【0134】

50

乾燥粉末吸入器からの投与のための本発明のアシル化インスリン組成物の製剤は、典型的にはアシル化インスリンを含む微細に分割された乾燥粉末を含むが、粉末には、増量剤、担体、賦形剤、別の添加物等も含むことができる。添加物には、例えば特定の粉末吸入器からの送達のために必要とされる粉末を希釈するために、製剤のプロセッシングを容易にするために、製剤に有利な粉体物性を提供するために、吸入装置からの粉末の分散を促進するために、製剤を安定化するために（例えば、抗酸化剤または緩衝剤）、製剤に味を提供するために、その他のためにインスリンコンジュゲートの乾燥粉末製剤で含めることができる。添加物は、患者の気道に悪影響を与えないことが都合よい。アシル化インスリンは、分子レベルで添加物と混合することができ、または固体製剤には、添加物の粒子と混合し、またはコーティングしたインスリンコンジュゲートの粒子を含めることができる。典型的な添加物には、一糖、二糖および多糖；例えば乳糖、グルコース、ラフィノース、メレチトース、ラクチトール、マルチトール、トレハロース、ショ糖、マンニトール、デンプンまたはこれらの組み合わせなどの糖アルコールおよびその他のポリオール；ソルビトール、ジホスファチジルコリンまたはレシチンなどの界面活性物質；その他を含む。典型的には、増量剤などの添加物は、上記した目的のために有効な量で、たいてい製剤の約50%～約90重量%で存在する。また、インスリンアナログタンパク質などのタンパク質製剤のための、当該技術分野において既知の付加的な薬剤も、製剤に含めることができる。

10

#### 【0135】

本発明のアシル化インスリン組成物を含むスプレーは、圧力下でノズルを介してインスリンコンジュゲートの懸濁液または溶液を圧力をかけることによって產生することができる。ノズルサイズおよび配置、加圧力、および液体の流加速度は、所望出力および粒径を達成するように選ぶことができる。エレクトロスプレーは、例えばキャピラリーまたはノズルフィードと組み合わせた電場によって產生することができる。有利には、噴霧器によって送達されるインスリンコンジュゲートの粒子は、約10 $\mu$ m未満、好ましくは約1 $\mu$ mから約5 $\mu$ mの範囲の粒径を有する。

20

#### 【0136】

噴霧器の用途に適した本発明のアシル化インスリン組成物の製剤は、典型的には溶液1mlあたり約1mg～約20mgのインスリンコンジュゲートの濃度で水溶液中にインスリン誘導体を含む。製剤には、例えば、賦形剤、緩衝剤、等張剤、保存料、界面活性物質および好ましくは、亜鉛などの薬剤を含むことができる。製剤は、緩衝液、還元剤、バルクタンパク質または炭水化物などのインスリン誘導体の安定化のための賦形剤または薬剤を含むこともできる。インスリンコンジュゲートを製剤化するのに有用なバルクタンパク質には、アルブミン、プロタミン等が含まれる。インスリンコンジュゲートを製剤化するのに有用な典型的な炭水化物には、ショ糖、マンニトール、乳糖、トレハロース、グルコース等が含まれる。また、インスリン誘導体製剤は、界面活性剤を含むことができ、エアロゾルを形成する際に溶液の微粒化によって生じる表面で誘導されるインスリンコンジュゲートの凝集を減少させ、または防止することができる。例えば、ポリオキシエチレン脂肪酸エステルおよびアルコール、並びにポリオキシエチレンソルビトール脂肪酸エステルなどの種々の一般的な界面活性物質を使用することができる。量は、一般に製剤の約0.001～約4重量%の間の範囲である。

30

40

#### 【0137】

本発明の製薬学的組成物は、治療を必要とする患者に対して非経口的に投与してもよい。非経口的な投与は、シリンジ、任意にペン様シリンジもしくは簡便な投薬機器を用いて、皮下、筋肉内、または静脈内注射により行ってもよい。あるいは、非経口的な投与は、注入ポンプを用いて行うことができる。

#### 【0138】

本発明のある態様は、製薬学的に許容される担体および/または製薬学的に許容される添加物と一緒にした本発明の製薬学的組成物に関し、それは、治療を必要とする患者における1型糖尿病、2型糖尿病もしくは高血糖を引き起こす他の状態の経肺治療のために

50

提供され得る。

【 0 1 3 9 】

本発明のある態様では、治療を必要とする患者における 1 型糖尿病、2 型糖尿病もしくは高血糖を引き起こす他の状態の治療に用いるための製薬学的組成物の製造のための方法が提供され、その組成物は、経肺で用いられ、製薬学的に許容される担体および / または製薬学的に許容される添加物と一緒にした本発明の製薬学的組成物の治療的有効量を含む。

【 0 1 4 0 】

アシル化インスリン誘導体の注射用組成物は、所望の最終産物を得るのに適切な成分を溶解および混合することに関する製薬産業の通常の技法を用いて調製することができる。したがって、ある手順によれば、インスリン誘導体を、調製される組成物の最終体積よりも幾分少ない量の水中に溶解する。等張剤、保存料もしくは、保存の混合物、酢酸塩、クエン酸塩もしくは塩酸塩としての亜鉛またはその混合物、およびバッファを必要に応じて添加することができ、さらに、界面活性剤を添加してもよく、そして、溶液の pH 値が - 必要ならば - 必要に応じて、例えば、塩酸のような酸、もしくは、例えば、水酸化ナトリウム水溶液のような塩基を用いて調整する。最終的に、溶液の体積を、水を用いて、成分の所望の濃度が得られるように調整する。

【 0 1 4 1 】

バッファは、酢酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、クエン酸塩、グリシン、リジン、アルギニン、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素ナトリウム、リン酸ナトリウム、ADA (N - [ 2 - アセタミド ] - 2 - イミノニ酢酸)、ACES (N - [ 2 - アセタミド ] - 2 - アミノエタンスルホン酸)、BES (N, N - bis [ 2 - ヒドロキシエチル ] - 2 - アミノエタンスルホン酸)、bicine (N, N - bis - [ 2 - ヒドロキシエチル ] グリシン)、BIS - TRIS (bis [ 2 - ヒドロキシエチル ] イミノ tris [ ヒドロキシメチル ] - メタン)、DIPSO (3 [ N, N - bis ( 2 - ヒドロキシエチル ] アミン ] - 2 - ヒドロキシプロパンスルホン酸)、エチレンジアミンジヒドロクロリド、グリシルグリシン、HEPES (N - [ 2 - ヒドロキシエチル ] ピペラジン - N' - [ 2 - エタンスルホン酸 ] )、HEPPSO (N - [ 2 - ヒドロキシエチル ] ピペラジン - N' - [ 2 - ヒドロキシプロパンスルホン酸 ] )、イミダゾール、MOBS (4 - [ N - モリホリノ ] ブタンスルホン酸)、MOPS (3 - [ N - モリホリノ ] プロパンスルホン酸)、PIPES (ピペラジン - N, N' - bis [ 2 - エタンスルホン酸 ] )、TAPSO (3 - [ N - tris ( ヒドロキシメチル ) メチルアミノ ] - 2 - ヒドロキシプロパンスルホン酸)、THAM (tris [ ヒドロキシメチル ] - アミノメタン)、TES (N - tris [ ヒドロキシメチル ] メチル - 2 - アミノエタンスルホン酸、tricine (N - tris [ ヒドロキシメチル ] メチルグリシン)、アジピン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、リンゴ酸、マロン酸、コハク酸、および / またはそれらの塩、および / またはそれらの混合物からなる群から選択してもよい。

【 0 1 4 2 】

本発明の更なる態様では、製剤は、フェノール、o - クレゾール、m - クレゾール、p - クレゾール、p - ヒドロキシ安息香酸メチル、p - ヒドロキシ安息香酸プロピル、2 - フェノキシエタノール、p - ヒドロキシ安息香酸ブチル、2 - フェニルエタノール、ベンジルアルコール、クロロブタノール、およびプロノポール、安息香酸、イミドウレア、クロロヘキシジン、デヒドロ酢酸ナトリウム、クロロクレゾール、p - ヒドロキシ安息香酸エチル、塩化ベンゼトニウム、クロロフェネシン ( 3 - ( 4 - クロロフェノキシ ) プロパン - 1 , 2 - ジオール ) もしくはそれらの混合物からなる群から選択され得る製薬学的に許容される保存料をさらに含む。本発明の更なる態様では、保存料は、0 . 1 mg / ml から 20 mg / ml の濃度で存在する。本発明の更なる態様では、保存料は、0 . 1 mg / ml から 5 mg / ml の濃度で存在する。本発明の更なる態様では、保存料は、5 mg / ml から 10 mg / ml の濃度で存在する。本発明の更なる態様では、保存料は、10 mg / ml から 20 mg / ml の濃度で存在する。これらの具体的な保存料のそれぞれ一

10

20

30

40

50

つは、本発明の代替的な態様を構成する。製薬学的組成物における保存料の使用は、当業者には周知のことである。簡便には、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19<sup>th</sup> edition, 1995を参照のこと。

【 0 1 4 3 】

本発明の更なる態様では、製剤は、塩（例えば、塩化ナトリウム）、糖もしくは糖アルコール、アミノ酸（例えば、1 - グリシン、1 - ヒスチジン、アルギニン、リジン、イソロイシン、アスパラギン酸、トリプトファン、スレオニン）、1, 2 - プロパンジオール（プロピレングリコール）、1, 3 - プロパンジオール、1, 3 - ブタンジオール）ポリエチレングリコール（例えば、PEG 400）、もしくはそれらの混合物を、さらに含む。フルクトース、グルコース、マンノース、ソルボース、キシロース、マルトース、ラクトース、スクロース、トレハロース、デキストラン、プルラン、デキストリン、シクロデキストリン、可溶性デンプン、ヒドロキシエチルスターチおよびカルボキシメチルセルロース - Naを含む、例えば、一糖、二糖もしくは多糖のような任意の糖、あるいは水溶性グルカン類を用いてもよい。ある態様では、糖添加物はスクロースである。糖アルコールは、少なくとも一つの - OH基を有するC 4 - C 8炭化水素として定義され、例えば、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、ガラクトール、ズルシトール、キシリトール、およびアラビトールを含む。ある態様では、糖アルコール添加物は、マンニトールである。上述の糖および糖アルコールは、別個にあるいは組み合わせて用いられ得る。糖および糖アルコールが液体組成物に可溶性で、かつ本発明の方法を用いて達成される安定化効果に悪影響を与えない限り、用いられる量に制限は課されない。ある態様では、糖および糖アルコールの濃度は、約1 mg / mlから約150 mg / mlである。本発明の更なる態様では、等張剤は、約1 mg / mlから約50 mg / mlの濃度で存在する。本発明の更なる態様では、等張剤は、約1 mg / mlから約7 mg / mlの濃度で存在する。本発明の更なる態様では、等張剤は、約8 mg / mlから約24 mg / mlの濃度で存在する。本発明の更なる態様では、等張剤は、約25 mg / mlから約50 mg / mlの濃度で存在する。これらの具体的な等張剤のそれぞれ一つは、本発明の代替的な態様を構成する。製薬学的組成物における等張剤の使用は、当業者には周知のことである。簡便には、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19<sup>th</sup> edition, 1995を参照のこと。

【 0 1 4 4 】

本発明の更なる態様では、特に、インスリン誘導体を、インスリンアスパルトのような即効型インスリンと混合する際には、製剤は、フィブリル化を防止するために界面活性剤を含む。例えば、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル類およびアルコール類、およびポリオキシエチレンソルビトール脂肪酸エステル類のような、種々の一般的な界面活性剤を用いることができる。量は一般的に、製剤の約0.001から約0.1重量%の範囲である。

典型的な等張剤は、塩化ナトリウム、マンニトール、ジメチルスルホン、1, 2プロパンジオール、およびグリセロールであり、典型的な保存料は、フェノール、m - クレゾール、メチルp - ヒドロキシ安息香酸およびベンジルアルコールである。

【 0 1 4 5 】

適するバッファの例としては、酢酸ナトリウム、グリシルグリシン、HEPES（4 - （2 - ヒドロキシエチル） - 1 - ピペラジンエタンスルホン酸）、tris - ヒドロキシメチル - アミノメタン、エチレンジアミンジヒドロクロリド、およびリン酸ナトリウムが挙げられる。

本発明の組成物は、インスリンに感受性の状態の治療に用いることができる。したがって、それらは、1型糖尿病、2型糖尿病および、例えば重傷者および大きな手術を受けた人に時々見られるような高血糖の治療に用いることができる。任意の患者についての最適な投与レベルは、具体的なアシル化インスリンもしくはアシル化インスリンと用いられる即効型インスリンとの混合物の効率、年齢、体重、生理的活動、および患者の常食、他の薬物との有り得る組み合わせ、および治療されるべき状態の重篤さを含む種々の因子に依

存する。本発明のインスリン誘導体の1日投与量は、既知のインスリン組成物と同様に、個々の患者それぞれについて、当業者により決定されることが推奨される。

本発明の組成物に含まれるアシル化インスリンもしくはインスリンアナログを調製するための出発産物は、周知のペプチド合成により、もしくは適する形質転換微生物中での周知の組み換え生産により、生産することができる。したがって、インスリン出発産物は、ポリペプチドをコードするDNAを含み、適切な栄養培地でペプチドの発現が許容される条件下でポリペプチドを発現することのできる宿主細胞、を培養し、その後、生じたペプチドを培養物から回収することを含む。

【0146】

細胞を培養するために用いる培地は、適切な補助物質を含有する最少培地または混合培地などの、宿主細胞を生育するために適する任意の一般的な培地であってよい。適切な培地は、市販の供給元から入手可能であるかまたは公開された製法（例えばAmerican Type Culture Collectionのカatalogにおいて）に従って調製してもよい。細胞によって生産されるペプチドは、対象のペプチドの種類に応じて、遠心または濾過によって培地から宿主細胞を分離すること、硫酸ナトリウムなどの塩によって上清または濾過液のタンパク質性成分を沈殿する、例えばイオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィーなどの種々のクロマトグラフィーの手順による精製、を含む一般的な手順によって培養培地から回収してもよい

【0147】

インスリンポリペプチドをコードするDNA配列はゲノム起源または、cDNA起源のものでよく、例えばゲノムもしくはcDNAのライブラリを調製して、標準的な技法に従って合成オリゴヌクレオチドプローブを用いたハイブリダイゼーションによってポリペプチドのすべてまたは一部をコードするDNA配列に関してスクリーニングすることによって得られ得る（例えば、Sambrook, J, Fritsch, EF and Maniatis, T, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989を参照のこと）。また、ポリペプチドをコードするDNA配列は、確立された標準的な方法、例えばBeaucage and Caruthers, Tetrahedron Letters 22 (1981), 1859 - 1869によって記述されるホスホアミダイト法またはMatthes等, EMBO Journal 3 (1984), 801 - 805によって記述される方法によって合成して調製されてもよい。また、例えば、米国特許第4683202号またはSaiki et al., Science 239 (1988), 487 - 491に記載のように、DNA配列は、特定のプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応によって調製されてもよい。

DNA配列は、簡便には、組換えDNA手順の対象となり得る任意のベクターに挿入してよく、ベクターの選択は導入すべき宿主細胞によることが多いであろう。したがって、ベクターは自己複製するベクター、すなわち染色体外の独立体として存在し、その複製が染色体複製から独立しているベクター、例えばプラスミドであってよい。あるいは、ベクターは、宿主細胞に導入される場合、宿主細胞ゲノムに組み込まれ、組み込まれている染色体（一または複数）と共に複製されるものであってもよい。

【0148】

好ましくは、ベクターは、例えばプロモーターのような、ペプチドをコードするDNA配列がDNAの転写に必要な付加的なセグメントに作用可能に連結されている発現ベクターである。プロモーターは、選択した宿主細胞において転写活性を示す任意のDNA配列であってよく、宿主細胞に同種なまたは異種なタンパク質をコードする遺伝子由来でよい。種々の宿主細胞における本発明のペプチドをコードするDNAの転写を管理するのに適切なプロモーターの例は、当技術分野で周知であり、例えば、Sambrook, et al., Molecular Cloning: a laboratory manual, second edition 1989が参照される。

また、ペプチドをコードするDNA配列は、必要ならば、適切なターミネーター、ポリアデニル化シグナル、転写促進因子配列および翻訳促進因子配列に作用可能に連結されてよい。さらに、本発明の組み換えベクターは、問題の宿主細胞においてベクターが複製することを可能にするDNA配列を更に含んでもよい。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 4 9 】

ベクターはまた、選択可能なマーカー、例えば、遺伝子産物が、薬剤、例えばアンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ネオマイシン、ハイゲロマイシンもしくはメトトレキサートに対する耐性を与えるか、もしくは宿主細胞における欠損を補完する遺伝子を含んでよい。

## 【 0 1 5 0 】

宿主細胞の分泌経路にインスリンペプチドを導くために、分泌シグナル配列（リーダー配列、プレプロ配列またはプレ配列としても知られる）は、組換えベクターに提供されてよい。分泌シグナル配列は、正しい読み取り枠においてペプチドをコードするDNA配列に連結される。分泌シグナル配列は、一般的に、ペプチドをコードするDNA配列の5'位に位置する。分泌シグナル配列は、そのペプチドに通常相関したものであってもよいし、あるいは他の分泌タンパク質をコードする遺伝子由来でもよい。

10

## 【 0 1 5 1 】

本ペプチド、プロモーターおよび任意的にターミネーターおよび/または分泌性シグナル配列それぞれをコードするDNA配列をライゲートし、複製のために必要な情報を含む適切なベクターにこれらを挿入するために使用される手順は、当業者にとって周知である（例えば、Sambrook et al.、上記参照のこと）。

## 【 0 1 5 2 】

DNA配列または組換えベクターが導入される宿主細胞は、本ペプチドを産生することができる任意の細胞であってよく、細菌、酵母、真菌類および高等真核細胞が含まれる。当該技術分野において周知かつ使用される適切な宿主細胞の例には、これらに限定されないが、大腸菌（*E. coli*）、酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）または哺乳動物BHKまたはCHO細胞株が含まれる。

20

## 【 0 1 5 3 】

## 〔 定義 〕

ここで用いられる場合、「有効量」という用語は、治療しない場合と比較して患者に対して効果のある治療のために十分な投与量を意味する。

## 【 0 1 5 4 】

「製薬学的組成物」という用語は、ここで用いられる場合、活性化化合物またはそれらの塩を、バッファー、保存料、および張度調節剤のような製薬学的な賦形剤と共に含んでなる生成物を意味し、前記製薬学的組成物は、ヒトに投与することによって疾患または障害の重症度を治療、予防、または軽減するのに有用である。それ故、製薬学的組成物は、製薬学的製剤としても当該技術分野において既知である。再構成されるための製薬学的組成物のpHは、室温において、所定の再構成液体中の再構成により製造された再構成組成物について計測されるpH値である。

30

## 【 0 1 5 5 】

「製薬学的に許容される」という用語は、ここで用いられる場合、通常の製薬学的な適用に適している、すなわち、患者等において有害事象が生じないことを意味する。

## 【 0 1 5 6 】

「バッファー（緩衝剤、緩衝液）」という用語は、ここで用いられる場合、化学反応により生じ得るような、時間にわたって組成物のpHが変化する傾向を低下させる、製薬学的組成物中での化学化合物を意味する。バッファーには、リン酸ナトリウム、TRIS、グリシルグリシンおよびクエン酸ナトリウムのような化学物質が含まれる。

40

## 【 0 1 5 7 】

「保存料」という用語は、ここで用いられる場合、微生物活性（増殖および代謝）を妨げるためまたは遅延させるために製薬学的組成物に添加される化学物質を称する。製薬学的に許容される保存料の例は、フェノール、m-クレゾール、ならびにフェノールおよびm-クレゾールの混合物である。

## 【 0 1 5 8 】

「等張剤」という用語は、ここで用いられる場合、製薬学的組成物の浸透圧をヒトの血

50



漿の浸透圧により近づけるように調節するのに役立つ製薬学的組成物中の化学物質を称する。等張化剤には、NaCl、グリセロール、マンニトール等が含まれる。

【0159】

「安定化剤」という用語は、ここで用いられる場合、ペプチドを安定化するため、すなわちそのような組成物の貯蔵寿命および／または有効期間を増大させるための、ペプチド含有製薬学的組成物に加える化学物質を称する。製薬学的製剤中に用いられる安定化剤の例としては、L-グリシン、L-ヒスチジン、アルギニン、ポリエチレングリコール、およびカルボキシメチルセルロースが挙げられる。さらに、フェノール類、亜鉛イオン類および塩化ナトリウムも、安定化剤として作用し得る。

【0160】

「界面活性剤」という用語は、ここで用いられる場合、インスリン、インスリンアナログおよびインスリン誘導体を境界面から離れさせるように、空気に対する接触面および疎水性表面を装飾するように機能する、製薬学的組成物中の化学物質を称する。例えば、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル類およびアルコール類、ポリオキシエチレンソルビトール脂肪酸エステル類のような、種々の標準的な界面活性剤を用いることができる。例としては、ポリソルベート20 (poly sorbate 20) が挙げられる。

【0161】

「疾患の治療」という用語は、ここで用いられる場合、病気、状態もしくは疾患を進行させた患者の管理および世話を意味する。治療の目的は、病気、状態もしくは疾患を治すことである。治療には、病気、状態もしくは疾患に関連した症状もしくは合併症を緩和することと同様に、病気、状態もしくは疾患を終結させるもしくは制御するための、活性化化合物の投与が含まれる。

【0162】

「疾患の予防」という用語は、ここで用いられる場合、病気の臨床的発現より前の、病気を進行させる危険性についての、管理および世話として定義される。予防の目的は、病気、状態もしくは疾患の進行を防ぐことであり、症状および合併症の発現を予防するもしくは遅延させるため、および、関連した病気、状態もしくは疾患の進行を予防もしくは遅延させるための、活性化化合物の投与が含まれる。

【0163】

「ヒトインスリン」という用語は、ここで用いられる場合、その構造および性質が周知であるヒトホルモンを意味する。ヒトインスリンは、システイン残基間をジスルフィド架橋により結合された2つのポリペプチド鎖、すなわちA鎖およびB鎖を有する。A鎖は21アミノ酸ペプチドであり、B鎖は30アミノ酸ペプチドであり、2つの鎖は3つのジスルフィド架橋により結合されている：1つ目は、A鎖の位置6および位置11のシステインの間、2つ目は、A鎖の位置7のシステインとB鎖の位置7のシステインの間、3つ目は、A鎖の位置20のシステインとB鎖の位置19のシステインの間である。

【0164】

「基礎インスリン」という用語は、ここで用いられる場合、糖尿病の標準的なモデルにおいて15時間より長い時間作用を有し、夜の間と、食事と食事の間のインスリン要求をカバーするのに適したインスリンペプチドの製剤を意味する。好ましくは、基礎インスリンは、少なくとも20時間の時間作用を有する。好ましくは、基礎インスリンは、少なくとも10時間の時間作用を有する。好ましくは、基礎インスリンは、15から48時間の時間作用を有する。好ましくは、基礎インスリンは、NPHインスリンもしくはN<sup>B 2</sup><sub>9</sub>-テトラデカノイル des B30ヒトインスリンの市販の製薬学的組成物について観察されるのと類似の時間作用を有する。

【0165】

「ボラスインスリン」、「食事関連インスリン」もしくは「即効型インスリン」という用語は、ここで用いられる場合、即効性であり、食中、食後のインスリン要求をカバーするのに適したインスリンペプチドを意味する。

【0166】

10

20

30

40

50

「二相性インスリン」という用語は、ここで用いられる場合、「ボーラスインスリン」および「基礎インスリン」の混合物を含む製薬学的組成物を意味する。

【 0 1 6 7 】

「des B 3 0」または「B ( 1 - 2 9 )」とは、B 3 0 アミノ酸残基を欠くインスリン B 鎖もしくはそのアナログを意味する。「A ( 1 - 2 1 )」は天然インスリン A 鎖もしくはそのアナログを意味する。C ペプチドとそのアミノ酸配列は、三文字のアミノ酸コードで示されている。des B 3 0、des B 2 9 ヒトインスリンとは、B 2 9 および B 3 0 を欠くヒトインスリンである。

【 0 1 6 8 】

「B 1」、「A 1」等とは、それぞれインスリンの B 鎖の位置 1 ( N 末端から数えて ) のアミノ酸残基およびインスリンの A 鎖の位置 1 ( N 末端から数えて ) のアミノ酸残基を意味する。特定の位置にあるアミノ酸残基は、例えば、位置 B 1 のアミノ酸残基がフェニルアラニン残基であることを意味する、P h e <sup>B 1</sup> のようにして表し得る。

【 0 1 6 9 】

「インスリン類似体」は、ここで用いられる場合、天然発生型インスリンに、形式上由来し得る分子構造を有するポリペプチド、例えば、天然発生型インスリン中の少なくとも一のアミノ酸残基の欠失および/または置換、および/または、少なくとも一のアミノ酸残基の付加によるヒトインスリンのそれ、を意味する。

【 0 1 7 0 】

付加および/または置換されるアミノ酸残基は、コード可能なアミノ酸残基または他の天然発生型の残基または純粋な合成アミノ酸残基の何れであってもよい。インスリンアナログは、B 鎖の位置 2 8 が天然の P r o 残基から A s p、L y s または I l e に修飾され得るものでもよい。別の態様では、位置 B 2 9 の L y s は P r o へと修飾されてもよい。ある態様では、B 3 0 は L y s であってよく、B 2 9 は、C y、M e t、A r g および L y s 以外の任意のコード可能なアミノ酸であり得る。

【 0 1 7 1 】

また、位置 A 2 1 の A s n は、A l a、G l n、G l u、G l y、H i s、I l e、L e u、M e t、S e r、T h r、T r p、T y r または V a l、特に G l y、A l a、S e r または T h r、そして特に G l y へと修飾されてよい。さらに、位置 B 3 の A s n は L y s または A s p に修飾されてよい。インスリンアナログの更なる例は、des B 3 0 ヒトインスリン；des B 3 0 ヒトインスリンアナログ；P h e B 1 が欠失しているインスリンアナログ；A 鎖および/または B 鎖が N 末端伸展を有するインスリンアナログおよび A 鎖および/または B 鎖が C 末端伸展を有するインスリンアナログである。このように、一つか二つの A r g は、位置 B 1 もしくは位置 B 3 0 に拭かされてよい。

【 0 1 7 2 】

ある態様では、インスリンアナログは、天然ペプチドと比較して 6 つ未満の修飾 ( 置換、欠失、付加 ) を含む。別の態様では、アナログは、天然ペプチドと比較して 5 つ未満の修飾 ( 置換、欠失、付加 ) を含む。別の態様では、アナログは、天然ペプチドと比較して 4 つ未満の修飾 ( 置換、欠失、付加 ) を含む。別の態様では、アナログは、天然ペプチドと比較して 3 つ未満の修飾 ( 置換、欠失、付加 ) を含む。別の態様では、アナログは、天然ペプチドと比較して 2 つ未満の修飾 ( 置換、欠失、付加 ) を含む。別の態様では、アナログは、天然ペプチドと比較して 1 つのみの修飾 ( 置換、欠失、付加 ) を含む。

【 0 1 7 3 】

「インスリン類似体」は、ここで用いられる場合、例えばインスリン骨格の一または複数の位置に側鎖が導入されることにより、もしくはインスリン中のアミノ酸残基の基を酸化または還元することにより、もしくは遊離のカルボン酸をエステル基に変換することまたは遊離のアミノ基またはヒドロキシ基をアシル化することにより、化学的に修飾された天然発生型インスリンまたはインスリンアナログを意味する。

【 0 1 7 4 】

「アシル化インスリン」は、ここで用いられる場合、遊離のアミノ基またはヒドロキシ

10

20

30

40

50

基をアシル化することにより、化学的に修飾された天然発生型インスリン、例えば、ヒトインスリンのそれ、インスリン分子、インスリン誘導体もしくはインスリンアナログを意味する。

【0175】

「非鈍化」という用語は、ここで用いられる場合、一製剤中に処方される場合に、速効型インスリンとアシル化インスリンの双方が、別々の製剤として速効型インスリンとアシル化インスリンとを投与する場合の作用プロファイルと、同一もしくは実質的に同一の作用プロファイルを有していることを意味する。

【0176】

「OAD」もしくは「OAD(s)」という用語は、ここで用いられる場合、傾向の抗糖尿病薬もしくは複数の抗糖尿病薬を意味する。OAD(s)の非限定的なリストとしては、スルホニルウレア(SU)、ピアグナイド類、例えば、メルホルミン(Melformin)もしくはチアゾリジンジオン類(TZD)を挙げ得る。

【0177】

「コード可能なアミノ酸」もしくは「コード可能なアミノ酸残基」という表現は、ヌクレオチドのトリプレット(「コドン」)によりコードされ得るアミノ酸もしくはアミノ酸残基を示すために用いられる。

【0178】

hGluはホモグルタミン酸である。

-Aspは、 $-HNCH(CO-)CH_2COOH$ のL体である。

-Aspは、 $-HNCH(COOH)CH_2CO-$ のL体である。

-Gluは、 $-HNCH(CO-)CH_2CH_2COOH$ のL体である。

-Gluは、 $-HNCH(COOH)CH_2CH_2CO-$ のL体である。

-hGluは、 $-HNCH(CO-)CH_2CH_2CH_2COOH$ のL体である。

-hGluは、 $-HNCH(COOH)CH_2CH_2CH_2CO-$ のL体である。

-Alaは、 $-NH-CH_2-CH_2-COOH$ である。

Sarは、サルコシン(N-メチルグリシン)である。

【0179】

「側鎖にカルボン酸基を有するアミノ酸残基」という表現は、Asp、GluおよびhGluのようなアミノ酸残基を示す。アミノ酸は、L-もしくはD-の何れの配置も取り得る。何も特記されていなければ、アミノ酸残基はL配置であると解される。

「中性側鎖を有するアミノ酸残基」という表現は、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Phe、Pro、Ser、Thr、Cys、Met、Tyr、AsnおよびGlnのようなアミノ酸残基を示す。

【0180】

本発明に係るインスリン誘導体が「生理学的pH値で可溶性である」と記載されている場合は、インスリン誘導体が生理学的pH値で十分に溶解する注射可能なインスリン組成物を調製するのに使用可能であることを意味する。このような好ましい溶解度は、インスリン誘導体単独の固有の特性、またはインスリン誘導体と、ビヒクルに含まれる一または複数の成分との好ましい相互作用の結果の何れかに拠り得る。

【0181】

「高分子インスリン」もしくは「hmw」という表現は、ヒトインスリン複合体、インスリンアナログ、もしくはインスリン誘導体の分子量が、ヒト血清アルブミンより高いか、インスリンアナログもしくはインスリン誘導体の12量複合体より高いか、または約72kダルトンより高いことを意味する。

「中間分子量インスリン」もしくは「mmw」という表現は、ヒトインスリン複合体、インスリンアナログ、もしくはインスリン誘導体の分子量が、ほぼインスリン6量体から24~80kダルトンのインスリン12量体までであることを意味する。

「低分子量インスリン」もしくは「lmw」なる表現は、ヒトインスリン、インスリンアナログもしくはインスリン誘導体の分子量が、24kダルトン未満であることを意味す

10

20

30

40

50

る。

【 0 1 8 2 】

「正味荷電」という表現は、分子の全体の荷電を意味する。pH 7.4で、ヒトインスリンは、約 - 3 の負の正味荷電を有するか、あるいは、六量体を形成した際には、インスリン単量体当たり、約 - 2.5 の負の正味荷電を有する。

【 0 1 8 3 】

以下の略語が、明細書および実施例で使用される：

h G l u            ホモグルタミン酸  
S a r :            サルコシン ( N - メチル - グリシン )  
S . c .            皮下  
アシル i n s      アシル化インスリン  
I n s              インスリン

10

【 0 1 8 4 】

各文献が、出典明示により個々にかつ具体的に援用されるように記載され、その全内容がここに記載されているかと同程度に、ここに引用された、刊行物、特許出願および特許を含む全ての文献は、出典明示によりその全内容がここに援用される（法律により許容される最大範囲）。

全ての表題および副題は、ここでは便宜的に使用され、決して本発明を限定するものと解すべきではない。

【 0 1 8 5 】

ここに提供される任意かつ全ての例、または例示的な言語（例えば「例えば、等」）の使用は、単に本発明をより明らかにすることを意図しており、特に請求項に記載がない限り、本発明の範囲に限定をもたらすものではない。明細書中の如何なる語句も請求項に記載していない要素が本発明の実施に必須であることを示しているものと解すべきではない。

20

ここでの特許文献の引用および援用は単に便宜上なされているものに過ぎず、そのような特許文献の有効性、特許性、および/または権利行使性についての見解を反映させるものではない。

この発明は、適用される法律に容認される場合、ここに付加される請求項に列挙された主題事項の全ての修正点および等価物を含む。

30

【 0 1 8 6 】

〔実施例〕

実施例 1

A : インスリンアスパルト 6 0 0 μ M、3 Z n / 6 インスリン、1.6 % グリセロール、16 m M のフェノールおよび 16 m M の m - クレゾール、7 m M の t r i s ヒドロキシメチルアミノメタン、10 m M の N a C l、p H 7.5 および 8 m l の体積：

31 m g のインスリンアスパルトを 2 m l の水に懸濁し、30 μ L の 1 N の H C l を加えて、溶液を得た。その後、240 μ L の 10 m M の Z n ( A c O )<sub>2</sub> を加え、続いて、3200 μ L の 4 % グリセロール、400 μ L の 0.32 M フェノール、800 μ L の m - クレゾール、560 μ L の 0.1 M t r i s ヒドロキシメチルアミノメタン、160 μ L の 0.5 M の N a C l を加え、その後、1 N の N a O H により pH を調整し、最終的に、水で体積を 8 m l まで調整した。溶液を 0.22 μ m の滅菌フィルターを通して濾過した。

40

【 0 1 8 7 】

B : L y s B 2 9 N - ヘキサデカンジオイル - - G l u d e s B 3 0 ヒトインスリン 1200 μ M、3 Z n / 6 i n s、1.6 % グリセロール、16 m M のフェノールおよび 16 m M の m - クレゾール、7 m M の t r i s ヒドロキシメチルアミノメタン、10 m M の N a C l、p H 7.5 および 7 m l の体積：

58 m g の L y s B 2 9 N - ヘキサデカンジオイル - - G l u d e s B 3 0 ヒトインスリンを 2 m l の水に懸濁し、溶解し、続いて、420 μ L の 10 m M の Z n ( A c

50

O)<sub>2</sub>、2800 μLの4%グリセロール、350 μLの0.32 Mフェノール、700 μLのm-クレゾール、490 μLの0.1 M trisヒドロキシメチルアミノメタン、140 μLの0.5 MのNaClを加え、最終的に1 NのNaOHの添加によりpH 7.5に調整し、水を加え、7 mlを得た。溶液を0.22 μmの滅菌フィルターを通して濾過した。

【0188】

C：インスリンアスパルト600 μM、4 Zn / 6 ins、1.6%グリセロール、16 mMのフェノールおよび16 mMのm-クレゾール、7 mMのtrisヒドロキシメチルアミノメタン、10 mMのNaCl、pH 7.5および15 mlの体積：

製剤は、製剤Aと同様に調製した。

10

【0189】

D：Lys B29N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B30ヒトインスリン1200 μM、4 Zn / 6 ins、1.6%グリセロール、16 mMのフェノールおよび16 mMのm-クレゾール、7 mMのtrisヒドロキシメチルアミノメタン、10 mMのNaCl、pH 7.5および20 mlの体積：

製剤は、製剤Bと同様に調製した。

【0190】

E：インスリンアスパルト600 μM、6 Zn / 6 ins、1.6%グリセロール、16 mMのフェノールおよび16 mMのm-クレゾール、7 mMのtrisヒドロキシメチルアミノメタン、10 mMのNaCl、pH 7.5：

製剤は、製剤Cと同様に調製し、最終的に、1 ml当たり20 μLの10 mMのZn (AcO)<sub>2</sub>を加え、pHを7.5に調整した。

20

【0191】

F：Lys B29N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B30ヒトインスリン1200 μM、6 Zn / 6 ins、1.6%グリセロール、16 mMのフェノールおよび16 mMのm-クレゾール、7 mMのtrisヒドロキシメチルアミノメタン、10 mMのNaCl、pH 7.5：

製剤は、製剤Dと同様に調製し、最終的に、1 ml当たり40 μLの10 mMのZn (AcO)<sub>2</sub>を加え、pHを7.5に調整した。

【0192】

G：インスリンアスパルト600 μM、8 Zn / 6 ins、1.6%グリセロール、16 mMのフェノールおよび16 mMのm-クレゾール、7 mMのtrisヒドロキシメチルアミノメタン、10 mMのNaCl、pH 7.5：

製剤は、製剤Cと同様に調製し、最終的に、1 ml当たり40 μLの10 mMのZn (AcO)<sub>2</sub>を加え、pHを7.5に調整した。

30

【0193】

H：Lys B29N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B30ヒトインスリン1200 μM、8 Zn / 6 ins、1.6%グリセロール、16 mMのフェノールおよび16 mMのm-クレゾール、7 mMのtrisヒドロキシメチルアミノメタン、10 mMのNaCl、pH 7.5：

製剤は、製剤Dと同様に調製し、最終的に、1 ml当たり80 μLの10 mMのZn (AcO)<sub>2</sub>を加え、pHを7.5に調整した。

40

【0194】

媒質：1.6%グリセロール、16 mMのフェノールおよび16 mMのm-クレゾール、7 mMのtrisヒドロキシメチルアミノメタン、10 mMのNaCl、pH 7.5。

【0195】

Lys B29N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B30ヒトインスリン600 μMおよび3、4、6、および8で変化するZn / 6 アシル - insの製剤を、上記の製剤B、D、F、およびHを同量の媒質で希釈することにより得た。サイズ排除カラムクロマトグラフィーにより、140 mMのNaCl、10 mMのtrisヒドロキシメチルアミノメタン pH 7.4、および0.01% NaN<sub>3</sub>、37 および0.25 ml

50

/minで溶出したSuperose 6 HRカラム上での高分子量インスリンの形成能力について、製剤を試験した。高分子量排除限界から開始し、単量体ピークの最後で終わるように、4分毎に、計14フラクションとなるように、フラクションを集めた。インスリンアナログのフラクション濃度を、逆相クロマトグラフィーで定量し、発色性亜鉛キレート剤terpy添加後のpH 2.5での偏位で亜鉛濃度をを定量した(図3、4、5および6)。アルブミンより大きなサイズを有するLys B 29 N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B 30 ヒトインスリンの相対的な量(フラクション[1 - 8])は、それぞれ、3、4、6、および8 Zn / 6 インスリンについて、67.4、88.9、98.0、および97.9%と測定された。さらに、高分子量フラクションでは、亜鉛濃度は、Lys B 29 N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B 30 ヒトインスリンにより、特に高分子量フラクションにおいて、フォローされた。

10

3および6で変化する亜鉛/インスリンのインスリンアスパルト600 μM (AおよびE) からなる製剤は、単量体として溶出され(フラクション[12 - 13])、添加した亜鉛の少しの部分しかフォローしなかった、図面1 - 2を参照のこと。

【0196】

インスリンアナログおよびアシル化インスリンの混合

インスリン180 μMアスパルトおよび420 μMのLys B 29 N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B 30 ヒトインスリンおよび3、6、および8 Zn / 6 インスリンで変化する亜鉛濃度からなる製剤を、上記ストック溶液AからHおよび上記媒質を同様に混合することにより得た。亜鉛/6アシル化インスリンの濃度を計算した例としては、3 Zn / 6 インスリンを有するアスパルト180 μM、および3 Zn / 6 アシル - insを有するLys B 29 N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B 30 ヒトインスリン420 μMの混合が、 $4.3 \text{ Zn} / 6 \text{ アシル化インスリン} [(180 \times 3 + 420 \times 3) / 420 = 4.3 \text{ Zn} / \text{アシル - ins}]$ となることが挙げられる。サイズ排除カラムクロマトグラフィーにより、Superose 6 HRカラム上での高分子量インスリンの形成能力について、製剤を試験し、インスリンアナログと亜鉛の双方を定量するために、フラクションを同様に集めた。図面8から理解できるように、4.3 Zn / 6 アシル - インスリンの製剤に相当する、3 Zn / 6 インスリンと混合したアナログは、高分子量フラクション[1 - 8]で、主に、Lys B 29 N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B 30 ヒトインスリン(72.5%のLys B 29 N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B 30 ヒトインスリン)および亜鉛を示したが、フラクション[9 - 14]の残りの平均として、インスリンアスパルトおよびLys B 29 N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B 30 ヒトインスリンの等価量が計測される形で、インスリンアスパルトも示した(図8)。6 Zn / 6 insからなるインスリンアスパルトおよびLys B 29 N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B 30 ヒトインスリンの残りは、それぞれ図2および図5に示される。アスパルト180 μM + Lys B 29 N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B 30 ヒトインスリン420 μMに対し、6 Zn / 6 ins (図2および図5)の二つの薬剤を混合し、8.6 Zn / 6 アシル - insに相当するものは、高分子量および低分子量のインスリンアスパルトにおいて、Lys B 29 N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B 30 ヒトインスリンの完全に区別されるフラクションを示した(図10)。インスリンアスパルトおよびLys B 29 N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B 30 ヒトインスリンの等量を12 Zn / 6 アシル - insに混合したものの、同様に、区別されるフラクションを示した(図12)。さらに、個々の製剤における8 Zn / 6 insまでの亜鉛の濃度の増加は、Lys B 29 N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B 30 ヒトインスリンについては、図6中に、アスパルト180 μM + Lys B 29 N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B 30 ヒトインスリン420 μMの混合物につくえは、図11に示されている。

20

30

40

【0197】

図面から明確であるように、亜鉛の量の増加は、驚くべきことに、製薬学的処方におけ

50

るインスリンアスパルトおよび  $\text{Lys B 29 N}$  - ヘキサデカンジオイル - -  $\text{Glu des B 30}$  ヒトインスリンの分離を引き起こし、そのアナログ間の有意な鈍化を示さなかった。

亜鉛の量の増加は、アナログが現実的な鈍化を示さないように、製薬学的処方におけるインスリンアスパルトおよび  $\text{Lys B 29 N}$  - ヘキサデカンジオイル - -  $\text{Glu des B 30}$  ヒトインスリンの分離を引き起こした。

【0198】

#### 実施例 2

2 A : フェノールおよび  $m$  - クレゾールの前に添加した  $3 \text{ Zn} / 6$  アシル化インスリン  $\text{Lys B 29 N}$  - ヘキサデカンジオイル - -  $\text{Glu des B 30}$  ヒトインスリン  $600 \mu\text{M}$ 、 $3 \text{ Zn} / 6$  インスリン、 $1.6\%$  グリセロール、 $16 \text{ mM}$  のフェノールおよび  $16 \text{ mM}$  の  $m$  - クレゾール、 $20 \text{ mM}$  の  $\text{NaCl}$ 、 $7 \text{ mM}$  のリン酸塩、 $\text{pH } 7.5$ 、 $1.5 \mu\text{Ci}$  の  $^{125}\text{I} - \text{Tyr}^{A14} - \text{Lys B 29 N}$  - ヘキサデカンジオイル - -  $\text{Glu des B 30}$  ヒトインスリンのトレーサー、および  $2 \text{ mL}$  の体積。

$1.2 \text{ mg}$  の  $\text{Lys B 29 N}$  - ヘキサデカンジオイル - -  $\text{Glu des B 30}$  ヒトインスリンを  $400 \mu\text{L}$  の水に溶解し、 $3 \mu\text{Ci}$  の  $^{125}\text{I} - \text{Tyr}^{A14} - \text{Lys B 29 N}$  - ヘキサデカンジオイル - -  $\text{Glu des B 30}$  ヒトインスリン トレーサーを加え、続いて、 $800 \mu\text{L}$  の  $4\%$  グリセロールを加え、 $10 - 15$  分間減圧遠心処理して、トレーサー溶液に含まれる添加エタノールを除去した。 $60 \mu\text{L}$  の  $10 \text{ mM}$  の  $\text{Zn}(\text{AcO})_2$  を加え、続いて、 $2$  分間隔で  $100 \mu\text{L}$  の  $0.32 \text{ M}$  フェノール、 $200 \mu\text{L}$  の  $0.16 \text{ M}$  の  $m$  - クレゾール、 $80 \mu\text{L}$  の  $0.5 \text{ M}$  の  $\text{NaCl}$ 、および  $140 \mu\text{L}$  の  $0.1 \text{ M}$  リン酸ナトリウムを加え、 $\text{pH}$  を  $\text{pH } 7.5 \text{ mM}$  に調整し、合計の体積を  $2 \text{ mL}$  に調整した。溶液は、 $0.22 \mu\text{m}$  の滅菌フィルターを通じて濾過し、ブタでの皮下注射の後の消失実験に用いられた。製剤例 2 A から 2 D のクロスオーバー研究でのアッセイ下で記載されるように、 $T_{50\%} \pm \text{SEM}(\text{h})$  は、 $9.6 \pm 0.7 \text{ h}$  と決定された。

【0199】

2 B : フェノールおよび  $m$  - クレゾールの前に添加した  $3 \text{ Zn} / 6$  アシル化インスリンおよび後に添加した  $3 \text{ Zn} / 6$  アシル化インスリン  $\text{Lys B 29 N}$  - ヘキサデカンジオイル - -  $\text{Glu des B 30}$  ヒトインスリン  $600 \mu\text{M}$ 、 $1.6\%$  グリセロール、 $16 \text{ mM}$  のフェノールおよび  $16 \text{ mM}$  の  $m$  - クレゾールの前に添加した  $3 \text{ Zn} / 6$  アシル化インスリンおよび後に添加した  $3 \text{ Zn} / 6$  アシル化インスリン、 $20 \text{ mM}$  の  $\text{NaCl}$ 、 $7 \text{ mM}$  のリン酸塩、 $\text{pH } 7.5$ 、 $1.5 \mu\text{Ci}$  ヨウ素 -  $^{125}\text{I} - \text{Tyr}^{A14} - \text{Lys B 29 N}$  - ヘキサデカンジオイル - -  $\text{Glu des B 30}$  ヒトインスリン トレーサー、 $2 \text{ mL}$  の体積。

【0200】

$2.2 \text{ mg}$  の  $\text{Lys B 29 N}$  - ヘキサデカンジオイル - -  $\text{Glu des B 30}$  ヒトインスリンを  $400 \mu\text{L}$  の水に溶解し、 $3 \mu\text{Ci}$  の  $^{125}\text{I} - \text{Tyr}^{A14} - \text{Lys B 29 N}$  - ヘキサデカンジオイル - -  $\text{Glu des B 30}$  ヒトインスリン トレーサーを加え、続いて、 $800 \mu\text{L}$  の  $4\%$  グリセロールを加え、 $10 - 15$  分間減圧遠心処理して、トレーサー溶液に含まれる添加エタノールを除去した。 $60 \mu\text{L}$  の  $10 \text{ mM}$  の  $\text{Zn}(\text{AcO})_2$  を加え、続いて、 $2$  分間隔で  $100 \mu\text{L}$  の  $0.32 \text{ M}$  フェノール、 $200 \mu\text{L}$  の  $0.16 \text{ M}$  の  $m$  - クレゾール、 $80 \mu\text{L}$  の  $0.5 \text{ M}$  の  $\text{NaCl}$ 、および  $140 \mu\text{L}$  の  $0.1 \text{ M}$  リン酸ナトリウムを加え、 $\text{pH}$  を  $\text{pH } 7.5 \text{ mM}$  に調整し、合計の体積を  $2 \text{ mL}$  に調整した。溶液は、 $0.22 \mu\text{m}$  の滅菌フィルターを通じて濾過し、ブタでの皮下注射の後の消失実験に用いられた。製剤例 2 A から 2 D のクロスオーバー研究でのアッセイ下で記載されるように、 $T_{50\%} \pm \text{SEM}$  は、 $11.9 \pm 1.0 \text{ h}$  と決定された。

【0201】

2 C : バッファーを含まず、フェノールおよび  $m$  - クレゾールの前に添加した  $3 \text{ Zn} / 6$  アシル化インスリンおよび後に添加した  $3 \text{ Zn} / 6$  アシル化インスリン  $\text{Lys B 29 N}$  - ヘキサデカンジオイル - -  $\text{Glu des B 30}$  ヒトインスリン  $600 \mu\text{M}$ 、 $1.6\%$  グリセロール、 $16 \text{ mM}$  のフェノールおよび  $16 \text{ mM}$  の  $m$  - クレゾールの前に添加した  $3 \text{ Zn} / 6$  アシル化インスリンおよび後に添加した  $3 \text{ Zn} / 6$  アシル化インスリン、 $20 \text{ mM}$  の  $\text{NaCl}$ 、 $7 \text{ mM}$  のリン酸塩、 $\text{pH } 7.5$ 、 $1.5 \mu\text{Ci}$  ヨウ素 -  $^{125}\text{I} - \text{Tyr}^{A14} - \text{Lys B 29 N}$  - ヘキサデカンジオイル - -  $\text{Glu des B 30}$  ヒトインスリン トレーサー、 $2 \text{ mL}$  の体積。

0.0 μM、1.6%グリセロール、1.6 mMのフェノールおよび1.6 mMのm-クレゾールの前に添加した3 Zn / 6 アシル化インスリンおよび後に添加した3 Zn / 6 アシル化インスリン、2.0 mMのNaCl、pH 7.5、1.5 μCiの<sup>125</sup>I-Tyr<sup>A14</sup>-Lys B29N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B30 ヒトインスリン トレーサー、および2 mlの体積。

#### 【0202】

8.2 mgのLys B29N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B30 ヒトインスリンを400 μLの水に溶解し、3 μCiの<sup>125</sup>I-Tyr<sup>A14</sup>-Lys B29N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B30 ヒトインスリン トレーサーを加え、続いて、800 μLの4%グリセロールを加え、10 - 15分間減圧遠心処理して、トレーサー溶液に含まれる添加エタノールを除去した。60 μLの10 mMのZn(AcO)<sub>2</sub>を加え、続いて、2分間隔で100 μLの0.32 Mフェノール、200 μLの0.16 Mのm-クレゾール、80 μLの0.5 MのNaClを加え、pHをpH 7.5 mMに調整し、合計の体積を2 mlに調整した。溶液は、0.22 μmの滅菌フィルターを通じて濾過し、ブタでの皮下注射の後の消失実験に用いられた。製剤例2Aから2Dのクロスオーバー研究でのアッセイ下で記載されるように、T<sub>50%</sub> ± SEMは、14.4 ± 2.4 hと決定された。

10

#### 【0203】

2D: バッファーを含まず、フェノールおよびm-クレゾールの後に添加した6 Zn / 6 アシル化インスリン

20

Lys B29N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B30 ヒトインスリン 6.0 μM、1.6%グリセロール、1.6 mMのフェノールおよび1.6 mMのm-クレゾールの後に加えた6 Zn / 6 アシル化インスリン、2.0 mMのNaCl、7 mMのリン酸塩、pH 7.5、1.5 μCiの<sup>125</sup>I-Tyr<sup>A14</sup>-Lys B29N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B30 ヒトインスリン トレーサー、および2 mlの体積。

#### 【0204】

8.2 mgのLys B29N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B30 ヒトインスリンを400 μLの水に溶解し、3 μCiの<sup>125</sup>I-Tyr<sup>A14</sup>-Lys B29N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B30 ヒトインスリンを加え、続いて、800 μLの4%グリセロールを加え、10 - 15分間減圧遠心処理して、トレーサー溶液に含まれる添加エタノールを除去した。100 μLの0.32 Mフェノールを加え、続いて、2分間隔で、200 μLの0.16 Mのm-クレゾール、120 μLの10 mMのZn(AcO)<sub>2</sub>、80 μLの0.5 MのNaClを加え、pHをpH 7.5 mMに調整し、合計の体積を2 mlに調整した。溶液は、0.22 μmの滅菌フィルターを通じて濾過し、ブタでの皮下注射の後の消失実験に用いられた。製剤例2Aから2Dのクロスオーバー研究でのアッセイ下で記載されるように、T<sub>50%</sub> ± SEMは、13.5 ± 1.7 hと決定された。

30

#### 【0205】

##### 実施例 3

40

Lys B29N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B30 ヒトインスリンの結晶化による単離

Lys B29N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B30 ヒトインスリンは、6 molのインスリン当たり2 - 6 molの亜鉛の亜鉛含有量および過剰のフェノール様分子（好ましくは、フェノール）を有するヘキサマー（六量体）として結晶化され得る。沈殿化剤として、イオン性の塩が用いられ、NaClが好ましい。さらに、結晶化は、少量の有機溶媒（エタノール）により促進され得る。

#### 【0206】

タンパク質溶液の調製（溶液A）:

1.5 mgの凍結乾燥Lys B29N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des

50



B 3 0 ヒトインスリンを、4 m l の 0 . 0 2 m o l / l t r i s ヒドロキシメチルアミノメタンバッファー ( H C l を用いて p H 7 . 0 に調整 ) に懸濁した。

1 . 8 m l のこの L y s B 2 9 N - ヘキサデカンジオイル - - G l u d e s B 3 0 ヒトインスリン溶液に対し、0 . 0 1 0 m o l / l の Z n ( O A c ) <sub>2</sub> を含有する水溶液を 6 9 . 5 μ l と、2 m o l / l のフェノールを含有するエタノール溶液 1 8 μ l を添加する。

【 0 2 0 7 】

沈殿化剤溶液の調製 ( 溶液 B ) :

5 m l の 0 . 1 M t r i s ヒドロキシメチルアミノメタン含有溶液 ( H C l を用いて p H 7 . 5 に調整 ) に対し、1 . 7 5 g N a C l および 1 m l のエタノールを加え、終体積を 1 0 m l に調整する。

結晶化 :

等量 ( 典型的には、5 0 0 μ l ) の溶液 A および B をガラスバイアル中で混合する。室温で 1 2 時間経過の後に、再結晶化は完全となり、生じた結晶は、濾過もしくは遠心分離により単離することができる。

【 0 2 0 8 】

実施例 4

製剤 :

B 2 9 N - ヘキサデカンジオイル - - G l u d e s B 3 0 インスリン ( 6 0 0 μ M まで ) を水に懸濁し、水酸化ナトリウムの添加により溶解し、以下の順で以下のものを添加した : グリセロール 1 . 6 % 、フェノールおよび 1 6 m M の m - クレゾール 1 6 m M 、酢酸亜鉛 0 から 6 Z n / 6 i n s 、塩化ナトリウム 1 0 m M 、リン酸塩 7 m M 、p H 7 . 5 、および体積調整のための水。

【 0 2 0 9 】

S E C 法 :

場合によっては 2 m M のフェノールを加えた、3 7 、p H 7 . 3 の等張の 1 0 m M の t r i s 緩衝生理食塩水を用いた、2 0 μ L の注入体積、0 . 0 5 m l / m i n の流量、1 3 0 m i n のランタイムでの、Superose 6 P C カラム ( 0 . 3 2 × 3 0 c m ) 上でのサイズ排除クロマトグラフィー ( S E C ) による分析。青色デキストラン ( 5 M D a 、K<sub>AV</sub> 0 . 0 ) 、Tyroglobulin ( チログロブリン ) ( 6 6 9 k D a 、K<sub>AV</sub> 0 . 2 8 ) 、Ferritin ( フェリチン ) ( 4 4 0 k D a 、K<sub>AV</sub> 0 . 3 9 ) 、Ovalbumin ( オバルブミン ) ( 4 4 . 5 k D a 、K<sub>AV</sub> 0 . 5 6 ) 、Ribonuclease ( リボヌクレアーゼ ) ( 1 3 . 7 k D a 、K<sub>AV</sub> 0 . 6 9 ) という第一基準および Albumin ( アルブミン ) ( 6 6 k D a 、K<sub>AV</sub> 0 . 5 3 ) 、Co ( I I I ) インスリン - ヘキサマー ( 3 5 k D a 、K<sub>AV</sub> 0 . 6 1 ) 、および単量体インスリン X 2 ( 6 k D a 、K<sub>AV</sub> 0 . 7 3 ) という第二基準。青色デキストランの保持時間は、1 7 . 9 m i n ( t<sub>0</sub> ) およびカラムなしでは 0 . 7 4 m i n ( t<sub>d</sub> ) であり、かつ、アルブミン ( H S A ) の保持時間は、約 3 4 . 1 m i n であった。

【 0 2 1 0 】

$K_{AV} = ( t - t_0 ) / ( V / f + t_d - t_0 )$

t : 保持時間 ( m i n )

t<sub>0</sub> : 青色デキストランの保持時間 ( 排除限界 )

t<sub>d</sub> : カラム無しでの青色デキストランの保持時間 ( 空隙容量 )

V<sub>t</sub> : 総カラム容量 ( m L )

f : 流量 ( m L / m i n )

【 0 2 1 1 】

データフォーマット :

K<sub>AV</sub> ピーク 1                      x . x x

面積ピーク 1 ( % )            x x x

K<sub>AV</sub> ピーク 2                      x . x x

面積ピーク 2 ( % )    x x x

【 0 2 1 2 】

$K_{AV}$  面積ピーク 1 は、アルブミンより大きな自己会合に対応する  $K_{AV} < 0.46$  に対する合計面積の相対的面积 % として、 $K_{AV} = 0$  から  $K_{AV} = 0.46$  ( 32 min ) で計測される。 $K_{AV}$  ピーク 1 については、約 0.56 ( アルブミンサイズ ) の積分値のカットは、アルブミンサイズとインスリンヘキサマーサイズの間である。

【 0 2 1 3 】

ピークフラクションの特異的検出を用いた、持続型インスリン誘導体および即効型インスリンアスパルトの混合物に対する SEC 法：

インスリンアスパルト ( 3 Zn / 6 ins ) および遷延作用型インスリン誘導体の 50 : 50 の混和性は、SEC からのフラクションを集め、即効型および遷延作用型のインスリンの高分子量フラクション ( ピーク 1 ) および低分子量フラクション ( ピーク 2 ) における存在を HPLC により定量化することにより計測する。フラクションカットは、上述した以下の積分値カットである。

溶出液にフェノールの無い SEC 法では、ピーク 1 は、アルブミンより大きな会合形態を含有し、ピーク 2 は、インスリンのジヘキサマー、ヘキサマー、ダイマーおよびモノマー携帯を含有する。

溶出液に 2 mM のフェノールを含む SEC 法では、ピーク 1 は、インスリンのジヘキサマーおよび他のより大きな携帯を含有し、ピーク 2 は、インスリンのヘキサマー、ダイマーおよびモノマー形態を含有する。

【 0 2 1 4 】

双方のアナログに対してインスリンアスパルトを参照物質として使い、4.5 min 線形、5 min の急な初期状態、7 min のランタイム、0.5 ml / min の流量、14  $\mu$  L の注入体積および 276 nm での UV 検出で、A : 0.2 M 硫酸ナトリウム、0.04 M リン酸ナトリウム、10 % アセトニトリル、pH 7.2 および B : 30 の 70 % アセトニトリルを用い、19 - 34 % B の勾配溶出した、Zorbax Eclipse XD B - C18 2.1 x 15 mm ( 1.8  $\mu$  m ) 上での HPLC 逆相クロマトグラフィーによる、インスリン誘導体およびインスリンアスパルトの特異的な検出。

【 0 2 1 5 】

データフォーマット：

インスリン誘導体ピーク 1 面積 ( % )            x x x

インスリンアスパルトピーク 2 面積 ( % )    x x x

【 0 2 1 6 】

結果：

10

20

30

【表 1】

| 製剤: インスリン、グリセロール 1.6%、16 mM フェノールおよび 16 mM m-クレゾール、亜鉛添加物、塩化ナトリウム 10 mM、リン酸塩 7 mM、pH 7.5 の中性溶解物 | SEC 溶出液:   | Kav<br>ピーク 1 | 相対的面積%<br>ピーク 1 | Kav<br>ピーク 2 | 相対的面積%<br>ピーク 2 |
|--|------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|
| B29Ne-ヘキサデカンジオイル-γ-Glu desB30<br>インスリン 600 μM、0 Zn/6ins、                                       | フェノール無し    | -            | 1               | 0.73         | 99              |
| B29Ne-ヘキサデカンジオイル-γ-Glu desB30<br>インスリン 600 μM、1 Zn/6ins  | フェノール無し    | 0.11         | 25              | 0.73         | 75              |
| B29Ne-ヘキサデカンジオイル-γ-Glu desB30<br>インスリン 600 μM、2 Zn/6ins  | フェノール無し    | 0.08         | 48              | 0.73         | 52              |
| B29Ne-ヘキサデカンジオイル-γ-Glu desB30<br>インスリン 600 μM、3 Zn/6ins、                                       | フェノール無し    | 0.07         | 69              | 0.73         | 31              |
| B29Ne-ヘキサデカンジオイル-γ-Glu desB30<br>インスリン 600 μM、4 Zn/6ins  | フェノール無し    | 0.06         | 86              | 0.74         | 14              |
| B29Ne-ヘキサデカンジオイル-γ-Glu desB30<br>インスリン 600 μM、5 Zn/6ins  | フェノール無し    | 0.01         | 93              | 0.74         | 7               |
| B29Ne-ヘキサデカンジオイル-γ-Glu desB30<br>インスリン 600 μM、6 Zn/6ins  | フェノール無し    | 0.00         | 96              | 0.74         | 4               |
| B29Ne-ヘキサデカンジオイル-γ-Glu desB30<br>インスリン 600 μM、0 Zn/6ins、                                       | フェノール 2 mM | 0.54         | 17              | 0.72         | 83              |
| B29Ne-ヘキサデカンジオイル-γ-Glu desB30<br>インスリン 600 μM、1 Zn/6ins  | フェノール 2 mM | 0.54         | 56              | 0.73         | 44              |
| B29Ne-ヘキサデカンジオイル-γ-Glu desB30<br>インスリン 600 μM、2 Zn/6ins  | フェノール 2 mM | 0.54         | 85              | 0.73         | 15              |

10

20

30

|   |            |      |           |      |              |
|---|------------|------|-----------|------|--------------|
| B29Ne-ヘキサデカンジオイル-γ-Glu desB30<br>インスリン 600 μM、3 Zn/6ins、  | フェノール 2 mM | 0.54 | 94        | 0.73 | 6            |
| B29Ne-ヘキサデカンジオイル-γ-Glu desB30<br>インスリン 600 μM、4 Zn/6ins   | フェノール 2 mM | 0.54 | 97        | -    | 3            |
| B29Ne-ヘキサデカンジオイル-γ-Glu desB30<br>インスリン 600 μM、5 Zn/6ins   | フェノール 2 mM | 0.54 | 98        | -    | 2            |
| B29Ne-ヘキサデカンジオイル-γ-Glu desB30<br>インスリン 600 μM、6 Zn/6ins   | フェノール 2 mM | 0.54 | 98        | -    | 2            |
| B29Ne-ヘキサデカンジオイル-γ-Glu desB30<br>インスリン 600 μM、0 Zn/6ins と、インス<br>リンアスパルト 600 μM、3 Zn/6ins とを 1:1<br>で混合 | フェノール無し    | 0.33 | 誘導体<br>33 | 0.73 | アスパルト<br>94  |
| B29Ne-ヘキサデカンジオイル-γ-Glu desB30<br>インスリン 600 μM、1 Zn/6ins と、インス<br>リンアスパルト 600 μM、3 Zn/6ins とを 1:1<br>で混合 | フェノール無し    | 0.41 | 誘導体<br>34 | 0.74 | アスパルト<br>89  |
| B29Ne-ヘキサデカンジオイル-γ-Glu desB30<br>インスリン 600 μM、2 Zn/6ins と、インス<br>リンアスパルト 600 μM、3 Zn/6ins とを 1:1<br>で混合 | フェノール無し    | 0.41 | 誘導体<br>39 | 0.74 | アスパルト<br>91  |
| B29Ne-ヘキサデカンジオイル-γ-Glu desB30<br>インスリン 600 μM、3 Zn/6ins と、インス<br>リンアスパルト 600 μM、3 Zn/6ins とを 1:1<br>で混合 | フェノール無し    | 0.01 | 誘導体<br>89 | 0.74 | アスパルト<br>98  |
| B29Ne-ヘキサデカンジオイル-γ-Glu desB30<br>インスリン 600 μM、4 Zn/6ins と、インス<br>リンアスパルト 600 μM、3 Zn/6ins とを 1:1<br>で混合 | フェノール無し    | 0.00 | 誘導体<br>98 | 0.73 | アスパルト<br>100 |

10

20

30

40

|  |            |      |           |      |              |
|--|------------|------|-----------|------|--------------|
| B29Ne-ヘキサデカンジオイル-γ-Glu desB30<br>インスリン 600 μM、5 Zn/6ins mixed with<br><br>インスリンアスパルト 600 μM、3 Zn/6ins<br>1:1 | フェノール無し    | 0.00 | 誘導体<br>98 | 0.73 | アスパルト<br>100 |
| B29Ne-ヘキサデカンジオイル-γ-Glu desB30<br>インスリン 600 μM、6Zn/6ins と、インス<br>リンアスパルト 600 μM、3 Zn/6ins とを 1:1<br>で混合       | フェノール無し    | 0.00 | 誘導体<br>97 | 0.73 | アスパルト<br>100 |
| B29Ne-ヘキサデカンジオイル-γ-Glu desB30<br>インスリン 600 μM、0 Zn/6ins と、インス<br>リンアスパルト 600 μM、3 Zn/6ins とを 1:1<br>で混合      | フェノール 2 mM | 0.55 | 誘導体<br>71 | 0.73 | アスパルト<br>77  |
| B29Ne-ヘキサデカンジオイル-γ-Glu desB30<br>インスリン 600 μM、1 Zn/6ins と、インス<br>リンアスパルト 600 μM、3 Zn/6ins とを 1:1<br>で混合      | フェノール 2 mM | 0.55 | 誘導体<br>80 | 0.73 | アスパルト<br>69  |
| B29Ne-ヘキサデカンジオイル-γ-Glu desB30<br>インスリン 600 μM、2 Zn/6ins と、インス<br>リンアスパルト 600 μM、3 Zn/6ins とを 1:1<br>で混合      | フェノール 2 mM | 0.55 | 誘導体<br>88 | 0.73 | アスパルト<br>57  |
| B29Ne-ヘキサデカンジオイル-γ-Glu desB30<br>インスリン 600 μM、3 Zn/6ins と、インス<br>リンアスパルト 600 μM、3 Zn/6ins とを 1:1<br>で混合      | フェノール 2 mM | 0.55 | 誘導体<br>91 | 0.72 | アスパルト<br>73  |

10

20

30

|   |            |      |           |      |             |
|---|------------|------|-----------|------|-------------|
| B29Ne-ヘキサデカンジオイル-γ-Glu desB30<br>インスリン 600 μM、4 Zn/6ins と、インス<br>リンアスパルト 600 μM、3 Zn/6ins とを 1:1<br>で混合 | フェノール 2 mM | 0.54 | 誘導体<br>98 | 0.67 | アスパルト<br>99 |
| B29Ne-ヘキサデカンジオイル-γ-Glu desB30<br>インスリン 600 μM、5 Zn/6ins と、インス<br>リンアスパルト 600 μM、3 Zn/6ins とを 1:1<br>で混合 | フェノール 2 mM | 0.54 | 誘導体<br>98 | 0.66 | アスパルト<br>99 |
| B29Ne-ヘキサデカンジオイル-γ-Glu desB30<br>インスリン 600 μM、6 Zn/6ins と、インス<br>リンアスパルト 600 μM、3 Zn/6ins とを 1:1<br>で混合 | フェノール 2 mM | 0.54 | 誘導体<br>98 | 0.66 | アスパルト<br>99 |

40

結論： 体温で生理食塩水溶出液を用いたSEC（サイズ排除クロマトグラフィー）は、フェノール性保存料が存在しない場合は、皮下組織への注射の後のインスリン自己会合のモデルとして用いられる。溶出液SECにフェノールを含ませることにより、製薬学的製剤中および注射直後のインスリン自己会合の状態を評価することができる。

B29N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B30 インスリン 600 μM は、一例として、0 から 6 Zn / 6 ins と段階的に増加する亜鉛濃度で製剤化され、亜鉛濃度が 5 Zn / 6 ins の際には、SEC 法によれば、超高分子量への自己会合が示され、かつ 90 % より多くがヒトアルブミン以上の自己会合が示された。SEC 溶出液にフェノールを含ませると、二つの鋭いピークが、インスリンジヘキサマーサイズおよびインスリンモノマーサイズに観察され、4 Zn / 6 ins の際には、95 % より多くがジヘキサマーサイズだった。

10

【0218】

全ての製剤を、インスリンアスパルト（3 Zn / 6 ins）と、等濃度および等体積で混合し、集めたピークの内容を具体的に解析した。4 Zn / 6 ins の際には、B29N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B30 インスリンの95 % より多くが、超高分子量で見出され、アスパルトの95 % より多くがモノマーサイズで見出された。溶出液にフェノールを含ませると、二つのピークが、インスリンジヘキサマーサイズおよびインスリンモノマーサイズに観察され、4 Zn / 6 ins の際には、持続型インスリンの95 % より多くが、モノマーおよびヘキサマーサイズの中間のインスリンアスパルトの95 % より多くから離れたジヘキサマーサイズだった。

20

持続型アナログ製剤がモノマー形態の5 % 未満を含む場合、等モル製剤混合物の非鈍化が観察された。

【0219】

実施例 5 .

B29N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B30 インスリンと、インスリンアスパルトとの混和性：ブタにおける正常血糖クランプ研究  
製剤

B29N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B30 インスリン（ins . 誘導体）（1200 μM まで）を水に懸濁し、溶解し、グリセロール 1 . 6 %、および 16 mM のフェノールおよび 16 mM の m - クレゾールを加えた。亜鉛添加の前に、水酸化ナトリウムにより pH を 7 . 5 に調整し、最大 1 Zn / 6 ins から 3 Zn / 6 ins まで（ad I）、5 . 62 Zn / 6 ins まで（ad II）、および 6 Zn / 6 ins まで（III）の少量ずつ酢酸亜鉛を添加した。その後、塩化ナトリウムを 10 mM まで加え、水酸化ナトリウムにより pH を 7 . 5 に調整し、水により体積を調整した。

30

【0220】

インスリンアスパルト（600 μM まで）を水に懸濁し、pH を約 2 . 5 までの塩酸、3 Zn / 6 ins までの酢酸亜鉛、1 . 6 % までのグリセロール、16 mM のフェノールおよび 16 mM の m - クレゾール、10 mM までの塩化ナトリウムを加え、pH を 7 . 5 に調整し、および終体積まで水を加えた（IV）。

最終的に、インスリンアスパルト（IV）は、B29N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B30 インスリンと、1 : 8 のモル関係かつ合計の亜鉛濃度が 3 . 38 Zn / 6 ins . 誘導体（I）（low Zn mix）および 6 Zn / 6 ins . 誘導体（II）（high Zn mix）となるように混合した。

40

【0221】

動物実験

メスのブタ（N = 8、中間体重 80 kg）を研究の 18 時間前に絶食させた。インスリンアスパルトおよび B29N - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B30 インスリンの混合の効果を調べるために、それぞれのブタに、low Zn mix（I）もしくは high Zn mix（II）もしくは二つのアナログ（III および IV）の何れかを順不同で与え、同一のブタに別々に投与した。投与量は、0 . 9 nmol / kg のインスリ

50

ンアスパルトおよび  $7.2 \text{ nmol/kg}$  の B29N - ヘキサデカンジオイル - - Gludes B30 インスリンであった。ブタは、20% グルコース溶液の注入により、個々の空腹時血糖値における正常血糖を保たせた。血漿グルコース濃度の変化に応じて、グルコース注入速度の調整が実験的に行なわれた。血液試料は、免疫反応性のインスリンの特異的 ELISA 血漿分析のために、0 - 24 h で集められ、その薬理学的特性は、図 13 および図 14 に示される。

【0222】

#### 結論

二つの混合処方における双方のインスリン構成成分の鈍化の程度を調べた。インスリンアスパルトおよびインスリン 454 の双方の顕著な鈍化は、混合物中に低亜鉛濃度の場合 ( $3.38 \text{ Zn/6 ins}$  . 誘導体) に観察された。しかしながら、亜鉛濃度が 6 亜鉛 / 6 ins . 誘導体まで増加した場合は、薬理学的特性の鈍化は観察されなかった (非鈍化が観察された)。グルコース注入速度は、個々のインスリンアナログの薬理学的特性の合計とよく匹敵した。

10

【0223】

#### 実施例 6

亜鉛バッファーとしてのクエン酸塩

B29N - ヘキサデカンジオイル - - Gludes B30 インスリン (ins . 誘導体) ( $600 \mu\text{M}$  まで) を水に懸濁し、溶解し、グリセロール 1.6%、およびフェノール 16 mM および m - クレゾール 16 mM を加える。pH を水酸化ナトリウムで 7.5 に調整し、クエン酸塩を、酢酸亜鉛に関してそれぞれ 0.6、1.8 および 6 mM の 6 亜鉛 / 6 インスリン誘導体の三つの製剤に添加した。その後、塩化ナトリウムを 10 mM まで加え、リン酸ナトリウム (pH 7.5) を 5 mM まで加え、続いて pH を水酸化ナトリウムで 7.5 または 7.8 まで調整し、体積を水で調整する。

20

2 mM フェノールを含む溶出液を用いた実施例 4 に記載の SEC 法により、5 保存と比較して、37 2 週間保存後で、製剤について研究した。3、5 および 6 Zn / 6 ins . 誘導体でクエン酸塩を有しない対照製剤も含めた。

インスリンアスパルト ( $3 \text{ Zn/6 ins}$ ) と、持続性インスリン誘導体との 30 : 70 の混和性を、SEC からの分画を集め、HPLC により即効性および持続性のインスリンを、高分子量画分 (ピーク 1) および低分子量画分 (ピーク 2) で定量化することにより測定した。画分カットと定量化は、実施例 4 に従った。

30

【0224】

結果：

【表 2】

| 製剤: インスリン誘導体 600 $\mu$ M、グリセロール 1.6%、フェノール 16 mM、m-クレゾール 16 mM、クエン酸塩および亜鉛添加物、塩化ナトリウム 10 mM、リン酸塩 5 mM、pH 7.5 の中性溶解物 | SEC 溶出液: | Kav<br><br>ピーク 1 | 相対的面积%<br><br>ピーク1 | Kav<br><br>ピーク2 |
|--|----------|------------------|--------------------|-----------------|
| クエン酸塩 0.6 mM、6 Zn/6インスリン誘導体、5℃保存   | + フェノール  | 00.54            | 97                 | 0.73            |
| クエン酸塩 1.8 mM、6 Zn/6インスリン誘導体、5℃保存   | + フェノール  | 00.54            | 96                 | 0.73            |
| クエン酸塩 6.0 mM、6 Zn/6インスリン誘導体、5℃保存   | + フェノール  | 00.54            | 96                 | 0.73            |
| クエン酸塩 0 mM、3 Zn/6インスリン誘導体、5℃保存   | + フェノール  | 00.54            | 94                 | 0.73            |
| クエン酸塩 0 mM、5 Zn/6インスリン誘導体、5℃保存   | + フェノール  | 00.54            | 98                 | 0.73            |
| クエン酸塩 0 mM、6 Zn/6インスリン誘導体、5℃保存   | + フェノール  | 00.54            | 98                 | 0.73            |
| クエン酸塩 0.6 mM、6 Zn/6インスリン誘導体、3 7℃2 週間保存   | + フェノール  | 00.54            | 96                 | 0.73            |
| クエン酸塩 1.8 mM、6 Zn/6インスリン誘導体、3 7℃2 週間保存   | + フェノール  | 00.54            | 96                 | 0.73            |
| クエン酸塩 6.0 mM、6 Zn/6インスリン誘導体、3 7℃2 週間保存   | + フェノール  | 00.54            | 95                 | 0.73            |

10

20

30



|   |         |       |                |      |
|---|---------|-------|----------------|------|
| クエン酸塩 0 mM、3 Zn/6インスリン誘導体、3 7℃ 2週間保存          | + フェノール | 00.54 | 93             | 0.73 |
| クエン酸塩 0 mM、5 Zn/6インスリン誘導体、3 7℃ 2週間保存          | + フェノール | 00.54 | 98             | 0.73 |
| クエン酸塩 0 mM、6 Zn/6インスリン誘導体、3 7℃ 2週間保存          | + フェノール | 00.54 | 98             | 0.73 |
| クエン酸塩 0.6 mM、6 Zn/6インスリン誘導体、pH 7.8、3 7℃ 2週間保存 | + フェノール | 00.54 | 96             | 0.73 |
| クエン酸塩 0.6 mM、6 Zn/6インスリン誘導体、5℃保存              | + フェノール | 00.54 | インスリン誘導体<br>98 | 0.73 |
| クエン酸塩 1.8 mM、6 Zn/6インスリン誘導体、5℃保存              | + フェノール | 00.54 | インスリン誘導体<br>97 | 0.73 |
| クエン酸塩 6.0 mM、6 Zn/6インスリン誘導体、5℃保存              | + フェノール | 00.54 | インスリン誘導体<br>97 | 0.73 |
| クエン酸塩 0 mM、3 Zn/6インスリン誘導体、5℃保存                | + フェノール | 00.54 | インスリン誘導体<br>95 | 0.73 |
| クエン酸塩 0 mM、5 Zn/6インスリン誘導体、5℃保存                | + フェノール | 00.54 | インスリン誘導体<br>98 | 0.73 |
| クエン酸塩 0 mM、6 Zn/6インスリン誘導体、5℃保存                | + フェノール | 00.54 | インスリン誘導体<br>97 | 0.73 |

10

20

30

|   |         |       |                |      |
|---|---------|-------|----------------|------|
| クエン酸塩 0.6 mM、6 Zn/6 インスリン誘導体、3 7℃2 週間保存 | + フェノール | 00.54 | インスリン誘導体<br>97 | 0.73 |
| クエン酸塩 1.8 mM、6 Zn/6 インスリン誘導体、3 7℃2 週間保存 | + フェノール | 00.54 | インスリン誘導体<br>97 | 0.73 |
| クエン酸塩 6.0 mM、6 Zn/6 インスリン誘導体、3 7℃2 週間保存 | + フェノール | 00.54 | インスリン誘導体<br>96 | 0.73 |
| クエン酸塩 0 mM、3 Zn/6 インスリン誘導体、3 7℃2 週間保存   | + フェノール | 00.54 | インスリン誘導体<br>93 | 0.73 |
| クエン酸塩 0 mM、5 Zn/6 インスリン誘導体、3 7℃2 週間保存   | + フェノール | 00.54 | インスリン誘導体<br>98 | 0.73 |
| クエン酸塩 0 mM、6 Zn/6 インスリン誘導体、3 7℃2 週間保存   | + フェノール | 00.54 | インスリン誘導体<br>98 | 0.73 |

10

20

## 【 0 2 2 5 】

結論：

2 mM フェノールを含む S E C 生理食塩水溶出液を用いると、持続型インスリン誘導体は、主に、ジヘキサマー形態（および、より多く会合した形態）に相当するアルブミンのサイズで会合しており、モノマー形態でのインスリン誘導体の量は、3 から 5 および 6 Z n / 6 i n s . 誘導体へと増加する亜鉛濃度で減少する。6 Z n / 6 i n s . 誘導体の亜鉛濃度まで 1、3 もしくは 10 クエン酸塩当量を添加すると、3 Z n / i n s . 誘導体での対照と比較して、モノマーインスリン誘導体の含有量が減少した。自己会合様式は、3 7 で 2 週間の貯蔵の後も変化しなかった。

30

クエン酸塩無しで製剤化されたインスリンアスパルト（3 Z n / 6 i n s ）と、本実施例の上記系に示すように製剤化された持続性インスリン誘導体との 3 0 : 7 0 の混和性を、5 および 3 7 2 週間保存後について、表に示す。3 つのレベルでのクエン酸塩と 6 Z n / 6 i n s とを含むインスリン誘導体製剤は、3 7 2 週間保存の後も、インスリンアスパルトと混合可能であることが示され、インスリンアスパルトは、3 Z n / 6 i n s における通常のレベルの亜鉛の高分子量画分に、部分的に含まれた。

40

## 【 0 2 2 6 】

実施例 7

クエン酸亜鉛を加える。

B 2 9 N - ヘキサデカンジオイル - - G l u d e s B 3 0 インスリン（i n s . 誘導体）（6 0 0 μ M まで）を水に懸濁し、溶解し、グリセロール 1 . 6 %、およびフェノール 1 6 mM および m - クレゾール 1 6 mM を加える。p H を水酸化ナトリウムで 7 . 5 に調整し、クエン酸亜鉛を 0 . 6 mM の亜鉛イオンになるまで添加する。その後、塩化ナトリウムを 1 0 mM まで加え、リン酸ナトリウム（p H 7 . 5 ）を 5 mM まで加え、続いて p H を 7 . 5 まで調整し、体積を水で調整する。

## 【 0 2 2 7 】

50

## 実施例 8

界面活性剤を添加し、即効性アナログと混合する。

B 2 9 N - ヘキサデカンジオイル - - G l u d e s B 3 0 インスリン ( i n s . 誘導体 ) ( 6 0 0 μ M まで ) を水に懸濁し、溶解し、グリセロール 1 . 6 % 、および 1 6 m M のフェノールおよび 1 6 m M の m - クレゾールを加える。p H を水酸化ナトリウムで 7 . 5 に調整し、酢酸亜鉛で 6 亜鉛 / 6 インスリン誘導体にする ( 任意によって、クエン酸塩としての亜鉛 ) 。その後、塩化ナトリウムを 1 0 m M まで加え、界面活性剤、例えば p o l o x a m e r 1 8 8 または p o l y s o r b a t e 2 0 を約 0 . 0 0 2 % まで加え、リン酸ナトリウム ( p H 7 . 5 ) を 5 m M まで加え、続いて p H を 7 . 5 まで調整し、体積を水で調整する。インスリンアスパルト ( A s p B 2 8 ヒトインスリン ) もしくはインスリン L i s P r o ( L y s B 2 8 P r o B 2 9 ヒトインスリン ) もしくはインスリン グルリシン ( L y s B 3 G l u B 2 9 ヒトインスリン ) ( 全て 6 0 0 μ M ) を、実施例 7 または実施例 8 により製剤化される B 2 9 N - ヘキサデカンジオイル - - G l u d e s B 3 0 インスリンと、約 3 / 7 から約 7 / 3 のモル比で混合する。

【 0 2 2 8 】

## 実施例 9

表 3 は、6 のインスリン毎に 2 もしくは 6 の Z n ( I I ) を有する実施例 4 に記載されるようにして測定された S E C を示す。

表に記述される化合物の調製については、国際公開第 2 0 0 6 / 0 8 2 2 0 4 号および国際公開第 2 0 0 6 / 0 8 2 2 0 5 号を参照のこと。

【 0 2 2 9 】

10

20

|   |                              |                      |                              |                      |
|---|------------------------------|----------------------|------------------------------|----------------------|
| 製剤: 600 $\mu$ M インスリン、グリセロール<br>1.6%、フェノール 16 m、m-クレゾール 16<br>mM、もしくは6重鉛/ヘキサマー、塩化ナ<br>トリウム 10 mM、リン酸塩 7 mM、pH 7.5<br>の中性溶解物 | Kav<br><br>2 Zn<br><br>ピーク 1 | 相対的面積 %<br><br>ピーク 1 | Kav<br><br>6 Zn<br><br>ピーク 1 | 相対的面積 %<br><br>ピーク 1 |
| B29Ne-(4-[(2-カルボキシ-エチル)-(15-カル<br>ボキシ-ペンタデカノイル)-アミノ]-メチル)-<br>ベンゾイル) desB30 ヒトインスリン   | 0.01                         | 84                   | 0.00                         | 98                   |
| B29Ne-ヘキサデカンジオイル-ガンマ-Glu-<br>(3-(2-[2-[2-(2-アミノ-エトキシ)-エトキシ]-エ<br>トキシ]-エトキシ)-プロピオニル desB30 ヒ<br>トインスリン                       | 0.09                         | 79                   | 0.06                         | 89                   |
| B29Ne-(4-[(2-カルボキシ-エチル)-(14-カル<br>ボキシ-テトラデカノイル)-アミノ]-メチル)-<br>ベンゾイル) desB30 ヒトインスリン   | 0.09                         | 55                   | 0.00                         | 96                   |
| B29Ne-[(5-[(2-カルボキシ-エチル)-(15-カル<br>ボキシ-ペンタデカノイル)-アミノ]-メチル)-<br>furan-2-カルボニル) desB30 ヒトインスリン                                | 0.02                         | 81                   | 0.03                         | 96                   |
| B29Ne-ヘキサデカンジオイル-ガンマ-Glu-<br>(4-アミノメチル-ベンゾイル) desB30 ヒトイ<br>ンスリン  | 0.15                         | 48                   | 0.00                         | 97                   |
| B29Ne-(2-[(2-カルボキシ-エチル)-(15-カル<br>ボキシ-ペンタデカノイル)-アミノ]-メチル)-<br>ベンゾイル) desB30 ヒトインスリン   | 0.16                         | 54                   | 0.03                         | 93                   |

10

20

30

## 【 0 2 3 0 】

## 実施例 1 0

## 1 , 1 6 - ヘキサデカン二酸 モノベンジルエステルの調製

ヘキサデカン二酸 ( 2 0 . 0 g 、 6 9 . 8 m m o l ) 、 n - オクタンおよび D o w e x  
( 登録商標 ) を懸濁させ、過熱還流する。6 時間後、追加のギ酸ベンジル ( 2 2 . 0 g 、  
1 6 2 m m o l ) を加える。加熱を 5 0 時間続ける。反応混合液を 8 0 で濾過する。濾  
液を 2 0 まで冷却し、沈殿を濾過により集める。粗生成物 ( 2 0 . 2 g ) をジクロロメ  
タン ( 2 2 0 m l ) に 2 0 で 4 時間懸濁させる。懸濁液を濾過し、濾液を排出させて 2  
0 - 3 0 で乾燥させる。結果として生じる固体 ( 1 3 . 9 g ) を 2 - プロパノール ( 1  
4 0 m l ) から再結晶する。

40

生成物を濾過により単離し、 3 0 - 4 0 で減圧下、一定重量まで乾燥させる。収量 1  
0 . 2 g ( 3 9 % ) の白色物質。

## 【 0 2 3 1 】

L - 2 - ( 1 5 - ベンジルオキシカルボニル - ペンタデカノイルアミノ ) - ペンタン二酸  
5 - ベンジルエステル 1 - ( 2 , 5 - ジオキソ - ピロリジン - 1 - イル ) エステルの  
調製

1 , 1 6 - ヘキサデカン二酸 モノベンジルエステル ( 2 0 . 0 g 、 5 3 . 1 m m o l

50

を、35 - 40 でアセトンに溶解する。N - ヒドロキシスクシンイミド (6.42 g / 55.8 mmol) を加える。結果として生じる溶液に、ジシクロヘキシルカルボジミド (DCC) (12.1 g / 58.4 mmol) を加える。反応混合液を35 で3 - 4時間攪拌する。結果として生じた懸濁液に、トリエチルアミン (7.40 ml、53.1 mmol) および L - グルタミン酸 - ベンジルエステル (12.6 g / 53.1 mmol) を加える。反応混合液を35 - 40 で8 - 16時間攪拌する。反応混合液を20 - 25 まで冷却する。メタンスルホン酸 (3.45 ml の / 53.1 mmol) および DCC (12.1 g / 53.1 mmol) を加える。反応混合液を20 - 25 で8 - 16時間攪拌する。反応混合液を濾過し、濾液を排出させて乾燥させる。残留物を、水 (1000 ml) およびトルエン (2000 ml) で分画する。トルエン相を水の蒸留により乾燥させた。シリカゲル (20 g) を残留物に加える。懸濁液を20 - 25 で30分間攪拌し、濾過する。濾液の体積を、減圧下のエバポレーションにより約100 - 120 ml まで減少させた。N - ヘプタン (150 ml) を、15 - 30分間にわたって加える。結果として生じる懸濁液を2時間攪拌する。生成物を濾過により単離し、20 - 25 で減圧下、一定重量まで乾燥させる。収量21 g (58%) の白色物質。

10

# 【0232】

L - 2 - (15 - カルボキシ - ペンタデカノイルアミノ) - ペンタン二酸 5 - (2, 5 - ジオキソ - ピロリジン - 1 - イル) エステル (PC2414) の調製

L - 2 - (15 - ベンジルオキシカルボニル - ペンタデカノイルアミノ) - ペンタン二酸 5 - ベンジルエステル 1 - (2, 5 - ジオキソ - ピロリジン - 1 - イル) エステル (5.0 g、7.3 mmol) を、トリフルオロ酢酸 (95 μl) を含むアセトン (95 ml) に溶解する。パラジウム炭素、10% (0.50 g) を加える。30 - 35 で攪拌しながら水素を加える。水素の消費が停止したとき、反応混合液を濾過する。濾液を20 に冷却し、n - ヘプタン (140 ml) を15 - 30分間にわたって加える。結果として生じる懸濁液を2 - 3時間で0 - 5 に冷却する。生成物を濾過により単離し、20 - 25 で減圧下、一定重量まで乾燥させる。収量3 g (84%) の白色物質。

20

生成物は、アセトン - d<sub>6</sub> を溶媒として用いてプロトン NMR (Bruker 600 MHz) により分析した。

# 【0233】

1Dスペクトルからのプロトン NMR 帰属 (内標準は、0.0 ppm の TMS)

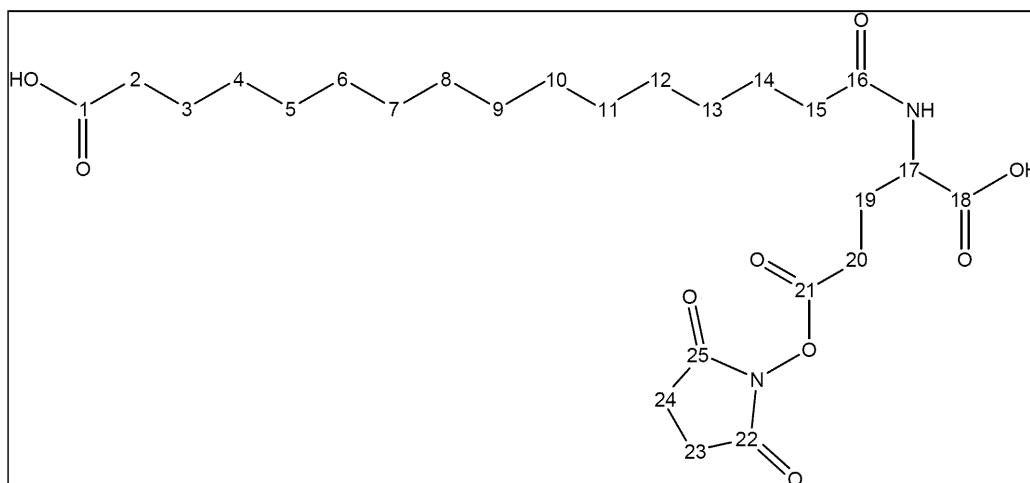
30

| $^1\text{H}$ | 化学シフト<br>$\delta$ (ppm) | 積分  | 結合形態 | 結合定数<br>$^nJ_{\text{HH}}$ (Hz)                      |
|--------------|-------------------------|-----|------|---|
| H2           | 2.28                    | 2H  | t    | $^3J_{\text{HH}} = 7.5$                             |
| H3/H14       | 1.60                    | 4H  | m    | ND  |
| H4-H13       | 1.29                    | 20H | m    | ND  |
| H15          | 2.26                    | 2H  | dt   | $^2J_{\text{HH}}=2.5$ , $^3J_{\text{HH}}=7.5$       |
| H17          | 4.59                    | 1H  | ddd  | $^3J_{\text{HH}}=8.0/7.5/5.2$                       |
| H19          | 2.31/2.10               | 2H  | m    | ND  |
| H20          | 2.82/2.75               | 2H  | ddd  | $^2J_{\text{HH}}=16.5$ , $^3J_{\text{HH}}=10.0/6.0$ |
| H23/H24      | 2.88                    | 4H  | s    | -   |
| NH           | 7.37                    | 1H  | d    | $^3J_{\text{HH}} = 7.5$                             |

10

20

【 0 2 3 4 】



30

40

【 0 2 3 5 】

PC2414を用いたヒトインスリン des B30の位置 B29のリジンの - アミノ基アシル化

4 gの des B30 ヒトインスリンを 64 gの精製水に懸濁する。1.85 mlのトリエチルアミン (TEA) を加えて、des B30 ヒトインスリンを溶解させ、pHを 11.4 - 12.0 まで上げる。溶液を 2 - 5 まで冷却する。

448 mgの PC2414 を、10 - 15 %の硫酸で安定化した 3.5 gの NMP (N - メチル - 2 - ピロリドン) に加える。

des B30 ヒトインスリン溶液を攪拌し、PC2414 溶液を、温度を低く保ちながら 20 分間にわたって加える。

50

## 【0236】

P C 2 4 1 4 の添加後、反応混合液を、T r i s - ヒドロキシメチルアミノメタン ( 2 0 m m o l / k g )、酢酸アンモニウム ( 3 0 m m o l / k g )、エタノール 4 2 , 5 % w / w、残部精製水、p H 7 , 5 からなる 2 . 5 重量の溶液で希釈する。

希釈後、かき混ぜながら、緩やかに 1 M 酢酸を加えることにより、p H を 7 . 5 に調整する。

H P L C による分析により、1 4 , 2 2 % の残留 d e s B 3 0 ヒトインスリンを有する 7 2 , 1 1 % の L y s <sup>B 2 9</sup> ( N - ヘキサデカンジオイル - - グルタミル ) d e s ( B 3 0 ) ヒトインスリンの形成が示される。

## 【0237】

分析 H P L C 法：

オクチルジメチルシリル置換シリカを充填された、約 100 の孔サイズと約 3 . 5 μ m の粒径を有する 1 5 0 X 4 . 6 m m 内径のカラムを、4 0 で 1 m l / 分の流速で、1 : 7 . 8 % ( w / w ) を含む N a O H 水溶液で p H 5 . 9 に調整された 2 0 m M の N a H <sub>2</sub> P O <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O および 1 0 0 m m o l の N a <sub>2</sub> S O <sub>4</sub> バッファー、および 2 : 4 2 , 8 % w / w のアセトニトリルを含むアセトニトリル溶媒からなり、2 5 % ( w / w ) アセトニトリルとなるように調整した混合液を用いて、平衡化する。

L y s <sup>B 2 9</sup> ( N - ヘキサデカンジオイル - - グルタミル ) d e s ( B 3 0 ) ヒトインスリンは、約 2 0 分後にカラムから溶出した。d e s B 3 0 ヒトインスリンは約 6 分後にカラムから溶出した。

## 【0238】

アッセイ ( I I )

ヒトインスリンに対する本発明のインスリン誘導体の効力

実験日の体重が 238-383 g であった S D オスラットを、固定 ( clamp ) 実験に用いた。ラットは、制御された環境条件下で、餌に自由に接近でき、固定実験の前一晩 ( 3 p m から ) 絶食した。

## 【0239】

〔実験プロトコール〕

外科手術の前に少なくとも 1 週間の間、動物施設でラットを馴養した。固定実験の前に、約 1 週間、タイゴン ( Tygon ) カテーテルをハロタン麻酔下で、頸静脈 ( 注入用 ) および頸動脈 ( 血液採取用 ) に挿入し、首部背面で外面化して固定した。術後のラットにストレプトシリン ( Streptocilin vet. ) ( Boehringer Ingelheim ; 0.15 ml / rat , i . m . ) を与え、回復期間の間、動物ケアユニット ( 25 ) に置いた。鎮痛のために、アノルフィン ( Anorphan ) ( 0.06 mg / rat , s . c . ) を、麻酔の間投与し、リマディル ( Rimadyl ) ( 1.5 mg / kg , s . c . ) を、麻酔から完全に回復した後 ( 2-3 h ) に投与し、2 日間、日に一度投与した。

## 【0240】

用いた固定技術は ( 1 ) から適用させた。実験日の 7 a m に、一晩絶食させた ( 前日の 3 p m から ) ラットの体重を量り、サンプリングシリンジおよび注入システム ( Harvard 22 Basic pumps, Harvard, and Perfectum Hypodermic glass syringe, Aldrich ) に接続し、次いで、個々の固定ケージに置き、ここで、実験開始前約 4 5 分安静にさせた。ラットは、全実験期間中、それらの通常の土台 ( beddin ) 上で自由に動くことができ、飲料水に自由に接近できた。血漿グルコースレベルが 10 分間隔で測定される基礎期間 30 分の後、試験されるインスリン誘導体およびヒトインスリン ( ラット当たりの一つの投与レベル、投与レベル当たり n = 6 ~ 7 ) を一定速度で 300 分、注入 ( i . v . ) した。血漿グルコースレベルは、10 分の間隔で終始測定し、20 % グルコース水溶液の注入は正常血糖を維持するために、これに従って調節された。再懸濁した赤血球のサンプルは、各ラットからプールし、頸動脈カテーテルを介して約 1/2 ml 容量で戻された。

## 【0241】

各実験日において、試験される個々のインスリン誘導体およびヒトインスリン溶液の溶液サンプルを、固定実験の前および終了時に採取し、該ペプチドの濃度を H P L C で確かめ

10

20

30

40

50

た。ラットインスリンおよびC-ペプチド並びに試験されるインスリン誘導体およびヒトインスリンの血漿濃度を、実験の前および終了時の関連する時点で測定した。ラットは、ペントバルビタールを過剰投与して実験終了時に殺した。

#### 【0242】

アッセイ ( I I I )

ブタにおける、本発明のインスリン誘導体の  $T_{50\%}$  の測定

$T_{50\%}$  は、外部 - カウンターで測定したとき、試験されるインスリンの A 1 4 T y r [ <sup>1 2 5</sup> I ] 標識化誘導体の注入量の 50% が注入部位から消失する時間である。

実験動物ケアの原則に従い、薬物動態学的研究および薬力学的研究のために、特異的病原体の無い L Y Y D、非糖尿病メスブタ、Danish Landrace、Yorkshire および Duroc の交雑育種を用いた ( Holmenlund、Haarloe v、Denmark )。ブタには意識があり、4 - 5 月齢で体重 70 - 95 kg であった。動物は実験の前に、一晩 18 時間絶食させた。

#### 【0243】

<sup>1 2 5</sup> I を有する T y r A 1 4 で標識したインスリン誘導体の処方された製剤を、前述のようにブタに皮下注射した ( Ribel, U., Jorgensen, K, Brange, J, and Henriksen, U. The pig as a model for subcutaneous insulin absorption in man. Serrano-Rios, M and Lefebvre, P. J. 891-896. 1985. Amsterdam; New York; Oxford, Elsevier Science Publishers. 1985 (Conference Proceeding) )。

実験の開始において、60 nmol の投与量の本発明に係るインスリン誘導体 ( 試験化合物 ) と、60 nmol の投与量インスリンデテミル ( detemir ) ( 何れも T y r A 1 4 で <sup>1 2 5</sup> I 標識されている ) を、それぞれのブタの首の二つの異なる位置で注射した。

#### 【0244】

皮下注射の部位からの放射性標識の消失は、従来の外部ガンマ計測法 ( Ribel, U. Subcutaneous absorption of insulin analogues. Berger, M. and Gries, F. A. 70-77 (1993). Stuttgart; New York, Georg Thime Verlag (Conference Proceeding) ) の改変を用いてモニターした。この改変法により、コードレスの携帯型デバイスを用いて、数日間、皮下貯蔵物からの放射能活性の消失を連続的に測定することができる ( Scancys Laboratorieteknik, Varlose, DK-3500, Denmark )。測定は、1 分間隔で行い、計測値はバックグラウンド活性で補正した。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0245】

全ての図は、L y s <sup>B 2 9</sup> N - ヘキサデカンジオイル - - G l u d e s B 30 ヒトインスリンおよび / またはインスリンアスパルトの製剤の、37 で生理食塩水により溶出された Superose 6 HR でのサイズ排除クロマトグラフィーの結果を上図に、高分子量画分から低分子量画分またはインスリンモノマー画分までをカバーするそれぞれ 14 画分の内容を下図に示したものである。

図中、以下の略語が用いられる：

アスパルト：                      インスリンアスパルト

Z n / 6 I n s :                      6 分子のインスリン 当たりの 亜鉛原子

Z n / アシル - i n s :                      6 分子のアシル化インスリン 当たりの 亜鉛原子

アシル - i n s                      アシル化インスリン

【図 1】6 分子のインスリンアスパルト毎に 3 の亜鉛原子を有するインスリンアスパルト 600 μM

【図 2】6 分子のインスリンアスパルト毎に 6 の亜鉛原子を有するインスリンアスパルト 600 μM

【図 3】6 分子のアシル化インスリン毎に 3 の亜鉛原子を有する L y s <sup>B 2 9</sup> N - ヘキサデカンジオイル - - G l u d e s B 30 ヒトインスリン 600 μM

【図 4】6 分子のアシル化インスリン毎に 4 の亜鉛原子を有する L y s <sup>B 2 9</sup> N - ヘキサデカンジオイル - - G l u d e s B 30 ヒトインスリン 600 μM



【図5】6分子のアシル化インスリン毎に6の亜鉛原子を有する  $\text{Lys}^{\text{B}29}\text{N}$  - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B30 ヒトインスリン  $600\mu\text{M}$

【図6】6分子のアシル化インスリン毎に8の亜鉛原子を有する  $\text{Lys}^{\text{B}29}\text{N}$  - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B30 ヒトインスリン  $600\mu\text{M}$

【図7】6分子のアシル化インスリン毎に3, 6の亜鉛原子の総亜鉛含有量を有するインスリンアスパルト  $180\mu\text{M}$  と  $\text{Lys}^{\text{B}29}\text{N}$  - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B30 ヒトインスリン  $840\mu\text{M}$  との混合物

【図8】6分子のアシル化インスリン毎に4, 3の亜鉛原子の総亜鉛含有量を有するインスリンアスパルト  $180\mu\text{M}$  と  $\text{Lys}^{\text{B}29}\text{N}$  - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B30 ヒトインスリン  $420\mu\text{M}$  との混合物

10

【図9】6分子のアシル化インスリン毎に4, 5の亜鉛原子の総亜鉛含有量を有するインスリンアスパルト  $300\mu\text{M}$  と  $\text{Lys}^{\text{B}29}\text{N}$  - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B30 ヒトインスリン  $600\mu\text{M}$  との混合物

【図10】6分子のアシル化インスリン毎に8, 6の亜鉛原子の総亜鉛含有量を有するインスリンアスパルト  $180\mu\text{M}$  と  $\text{Lys}^{\text{B}29}\text{N}$  - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B30 ヒトインスリン  $420\mu\text{M}$  との混合物

【図11】6分子のアシル化インスリン毎に11, 4の亜鉛原子の総亜鉛含有量を有するインスリンアスパルト  $180\mu\text{M}$  と  $\text{Lys}^{\text{B}29}\text{N}$  - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B30 ヒトインスリン  $420\mu\text{M}$  との混合物

【図12】6分子のアシル化インスリン毎に12の亜鉛原子の総亜鉛含有量を有するインスリンアスパルト  $300\mu\text{M}$  と  $\text{Lys}^{\text{B}29}\text{N}$  - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B30 ヒトインスリン  $300\mu\text{M}$  との混合物

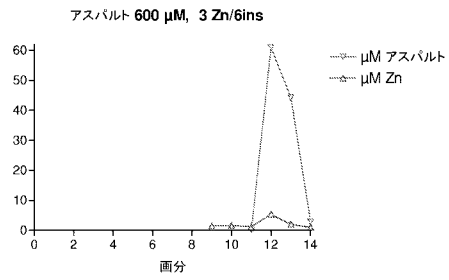
20

【図13】別々に提供されたインスリンアスパルト (IV、破線、 $N=8$ )、および  $\text{B}29\text{N}$  - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B30 インスリンと混合して提供されたインスリンアスパルトの低亜鉛濃度 (I、 $3.38\text{Zn}/6\text{ins}$  誘導体、実線、 $N=8$ ) および高亜鉛濃度 (II、 $6\text{Zn}/6\text{ins}$  誘導体、点線、 $N=7$ ) の血漿特性

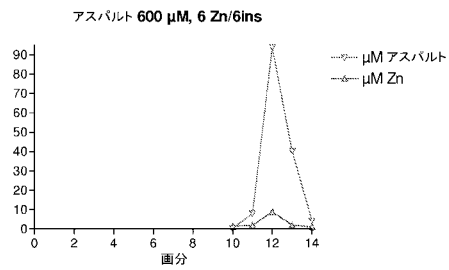
【図14】別々に提供された  $29\text{N}$  - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B30 インスリン (III、破線、 $N=8$ )、およびインスリンアスパルトと混合して提供された  $29\text{N}$  - ヘキサデカンジオイル - - Glu des B30 インスリンの低亜鉛濃度 (I、 $3.38\text{Zn}/6\text{ins}$  誘導体、実線、 $N=8$ ) および高亜鉛濃度 (II、 $6\text{Zn}/6\text{ins}$  誘導体、点線、 $N=7$ ) の血漿特性

30

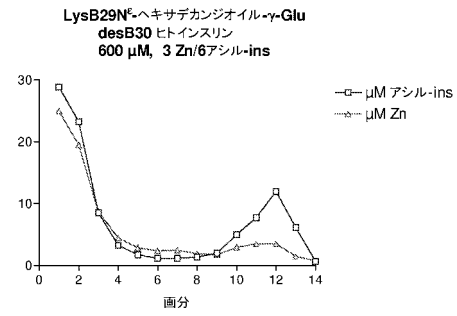
【図 1】



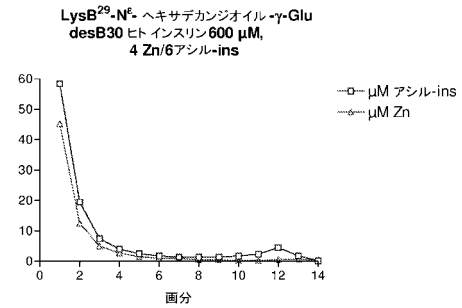
【図 2】



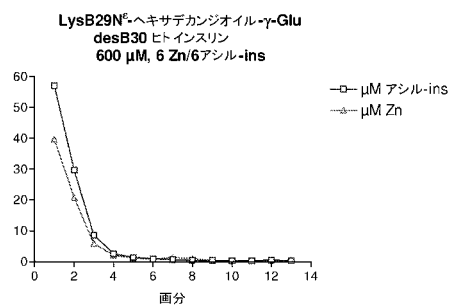
【図 3】



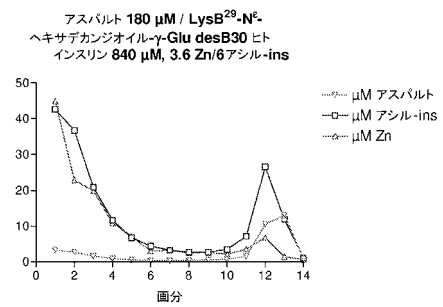
【図 4】



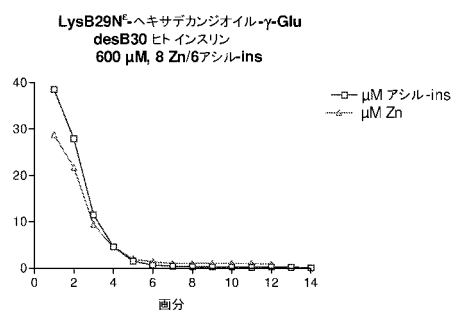
【図 5】



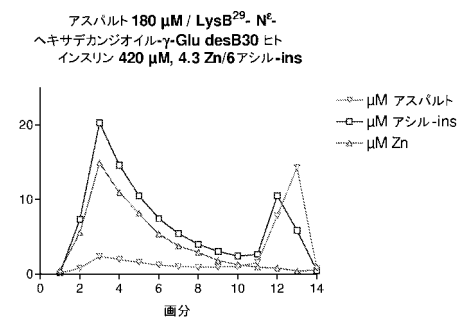
【図 7】



【図 6】

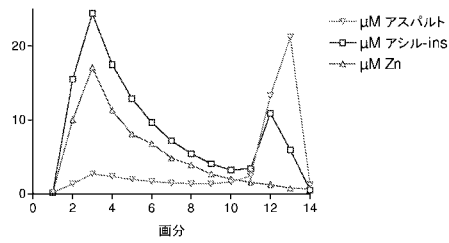


【図 8】



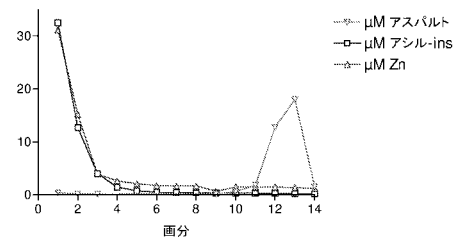
【図 9】

アスパルト 300  $\mu$ M / LysB<sup>29</sup>-N<sup>6</sup>-  
ヘキサデカンジオイル- $\gamma$ -Glu desB30 ヒト  
インスリン 600  $\mu$ M, 4.5 Zn/6 アシル-ins



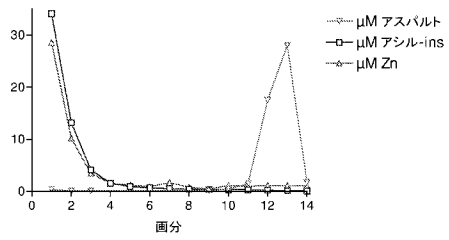
【図 11】

アスパルト 180  $\mu$ M / LysB<sup>29</sup>-N<sup>6</sup>-  
ヘキサデカンジオイル- $\gamma$ -Glu desB30 ヒト  
インスリン 420  $\mu$ M, 11.4 Zn/6 アシル-ins



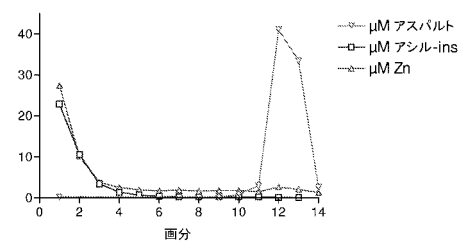
【図 10】

アスパルト 180  $\mu$ M / LysB<sup>29</sup>-N<sup>6</sup>-  
ヘキサデカンジオイル- $\gamma$ -Glu desB30 ヒト  
インスリン 420  $\mu$ M, 8.6 Zn/6 アシル-ins

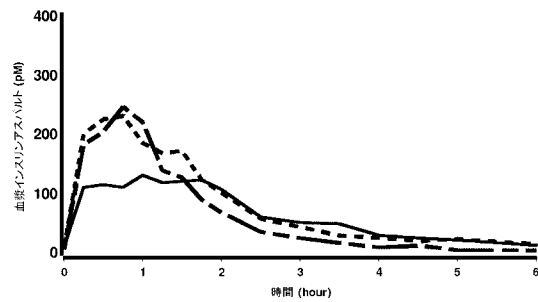


【図 12】

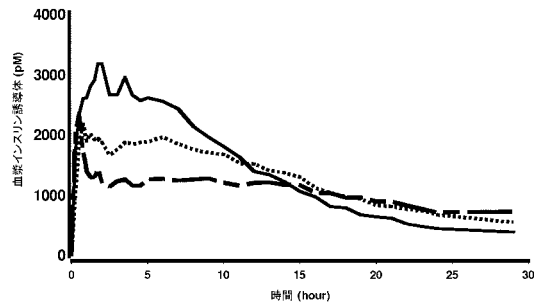
アスパルト 300  $\mu$ M / LysB<sup>29</sup>-N<sup>6</sup>-  
ヘキサデカンジオイル- $\gamma$ -Glu desB30 ヒト  
インスリン 300  $\mu$ M, 12 Zn/6 アシル-ins



【図 13】



【図 14】



---

フロントページの続き

- (72)発明者 オルセン, ヘレ, ビルク  
デンマーク国 ディーケー - 3 4 5 0 アレロド, スコーレロッデン 2 3
- (72)発明者 ヨナセン, イブ  
デンマーク国 ディーケー - 2 5 0 0 ヴァルビー, キルケヴェンゲット 2
- (72)発明者 ヘーグ-イェンセン, トマス  
デンマーク国 ディーケー - 2 9 3 0 クランペンボリ, スコヴヴェイ 8 ビー, 1 .
- (72)発明者 プラム, アンネ  
デンマーク国 ディーケー - 3 4 6 0 ビルクロード, トレカンテン 5
- (72)発明者 リベル-マドセン, ウラ  
デンマーク国 ディーケー - 2 8 3 0 ヴィルム, ビルクリー 1

審査官 関 景輔

- (56)参考文献 特表2004-523589(JP,A)  
特表2002-527487(JP,A)  
特表2001-518915(JP,A)  
国際公開第05/012347(WO,A1)  
国際公開第03/094956(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/28  
A61K 9/08  
A61K 47/10  
A61K 47/34  
A61P 3/10  
CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)