



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2019년08월02일  
 (11) 등록번호 10-2007057  
 (24) 등록일자 2019년07월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 A61K 9/08 (2006.01) A61K 38/28 (2006.01)  
 A61K 47/20 (2017.01) A61K 47/22 (2017.01)
- (21) 출원번호 10-2014-7014882
- (22) 출원일자(국제) 2012년10월31일  
 심사청구일자 2017년10월30일
- (85) 번역문제출일자 2014년06월02일
- (65) 공개번호 10-2014-0107228
- (43) 공개일자 2014년09월04일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2012/062816
- (87) 국제공개번호 WO 2013/067022  
 국제공개일자 2013년05월10일
- (30) 우선권주장  
 61/553,388 2011년10월31일 미국(US)  
 61/609,123 2012년03월09일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
 GB2119248 A  
 KR1020010013700 A  
 KR1020020067040 A  
 KR1020030048419 A

- (73) 특허권자  
 엑스에리스 파머수티클스, 인크.  
 미국 텍사스 78705 오스틴 스위트 300, 3208 레드 리버
- (72) 발명자  
 프리스트렐스키, 스티븐  
 미국 텍사스 78705 오스틴 스위트 300, 3208 레드 리버 엑스에리스 파머수티클스 인크  
 스캇, 낸시  
 미국 텍사스 78705 오스틴 스위트 300, 3208 레드 리버 엑스에리스 파머수티클스 인크
- (74) 대리인  
 남건필, 차상윤

전체 청구항 수 : 총 42 항

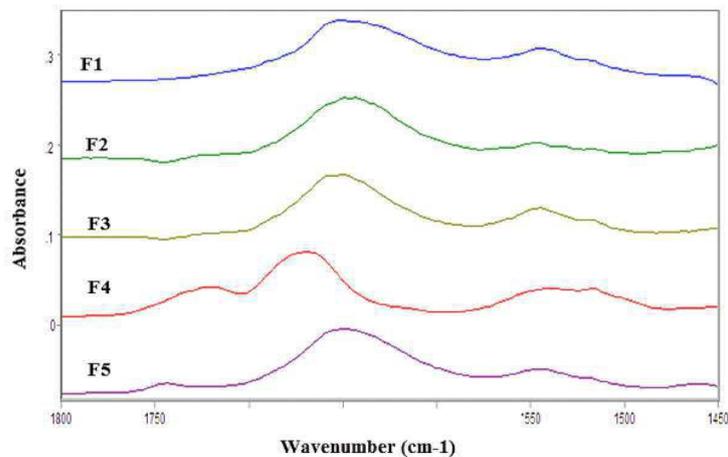
심사관 : 최원철

(54) 발명의 명칭 **당뇨병 치료를 위한 제형물**

**(57) 요약**

1 내지 4 또는 6 내지 8의 pH 메모리를 포함하는 인슐린 및 비양자성 극성 용매를 포함한 비경구 투여용 제형물이 개시되고, 상기 인슐린은 상기 비양자성 극성 용매 내부에 가용화되며, 가용화된 인슐린은 안정적인 인슐린의 단량체 또는 이량체 형태 또는 이들의 조합을 포함하고, 상기 제형물의 수분 함량은 15% w/v와 동일하거나 그 미만이다.

**대표도** - 도1



## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

- (a) 1 내지 4의 pH 메모리(memory)를 포함하고 비휘발성 버퍼로부터 이미 건조되어 있는 인슐린; 및
- (b) 비양자성 극성 용매를 포함하는 비경구 투여를 위한 제형물로서,
- 상기 인슐린은 비양자성 극성 용매에서 용해되어 있고, 상기 용해된 인슐린은 안정화된 단량체 또는 이량체 형태의 인슐린 또는 이의 혼합물을 포함하며,
- 상기 제형의 수분 함량은 15% w/v와 동일 또는 그 미만인,
- 비경구 투여용 제형물.

#### 청구항 2

- (a) 6 내지 8의 pH 메모리(memory)를 포함하고 비휘발성 버퍼로부터 이미 건조되어 있는 인슐린; 및
- (b) 비양자성 극성 용매를 포함하는 비경구 투여를 위한 제형물로서,
- 상기 인슐린은 비양자성 극성 용매에서 용해되어 있고, 상기 용해된 인슐린은 안정화된 단량체 또는 이량체 형태의 인슐린 또는 이의 혼합물을 포함하며,
- 상기 제형의 수분 함량은 15% w/v와 동일 또는 그 미만인,
- 비경구 투여용 제형물.

#### 청구항 3

- 제1항 또는 제2항에 있어서,
- 상기 비양자성 극성 용매는 디메틸설프옥사이드(dimethylsulfoxide : DMSO), 엔-메틸 피롤리돈(n-methyl pyrrolidone : NMP), 에틸 아세테이트(ethyl acetate), 디메틸포름아미드(dimethylformamide : DMF), 디메틸아세트아미드(dimethylacetamide : DMA), 프로필렌 카보네이트(propylene carbonate) 또는 이들의 혼합물인,
- 비경구 투여용 제형물.

#### 청구항 4

- 제1항 또는 제2항에 있어서,
- 상기 제형물은 3 mg/ml 내지 50 mg/ml의 인슐린을 포함하는,
- 비경구 투여용 제형물.

#### 청구항 5

- 제1항 또는 제2항에 있어서,
- 상기 용해된 인슐린의 대부분은 단량체 또는 이량체 형태인,
- 비경구 투여용 제형물.

#### 청구항 6

- 제1항 또는 제2항에 있어서,
- 단량체 또는 이량체 형태의 인슐린의 응집을 감소시킬 수 있는 성분을 더 포함하는,
- 비경구 투여용 제형물.

**청구항 7**

제6항에 있어서,

단량체 또는 이량체 형태의 인슐린의 응집을 감소시킬 수 있는 상기 성분은 요소, 구안디늄 클로라이드 (guanidinium chloride), 아미노산, 설탕, 폴리올(polyol), 폴리머, 산, 계면활성제 또는 이들의 혼합물인,

비경구 투여용 제형물.

**청구항 8**

제7항에 있어서,

상기 산은 아세트산, 아스코브산, 시트르산, 글루타민산, 아스파르트산, 숙신산, 푸마르산, 말레산, 아디프산 또는 이들의 혼합물인,

비경구 투여용 제형물.

**청구항 9**

제1항 또는 제2항에 있어서,

조용매(co-solvent)를 더 포함하는,

비경구 투여용 제형물.

**청구항 10**

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 제형물은 징크를 포함하지 않거나, 상기 제형물 내의 징크는 킬레이트 작용제에 결합되어 있는,

비경구 투여용 제형물.

**청구항 11**

제10항에 있어서,

상기 비휘발성 버퍼는 글리신 버퍼(glycine buffer), 시트레이트 버퍼(citrate buffer), 포스페이트 버퍼(phosphate buffer) 또는 이들의 혼합물인,

비경구 투여용 제형물.

**청구항 12**

제11항에 있어서,

상기 버퍼는 킬레이트 작용제를 포함하는,

비경구 투여용 제형물.

**청구항 13**

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 비양자성 극성 용매의 어는점을 0℃의 ± 10%로 낮출수 있는 성분을 더 포함하는,

비경구 투여용 제형물.

**청구항 14**

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 인슐린은 비개질 사람 인슐린(non-modified human insulin)인,

비경구 투여용 제형물.

**청구항 15**

제1항 또는 제2항에 있어서,  
 상기 제형물에서 용해된 아밀린 유사체(amylin analog)를 더 포함하는,  
 비경구 투여용 제형물.

**청구항 16**

제15항에 있어서,  
 상기 프람린타이드는 2의  $\pm$  10%의 pH 메모리를 가지거나,  
 상기 프람린타이드는 2의  $\pm$  10%의 pH 메모리를 가지고 상기 인슐린은 2의  $\pm$  10%의 pH 메모리를 가지는,  
 비경구 투여용 제형물.

**청구항 17**

제16항에 있어서,  
 상기 프람린타이드는 이전에 비휘발성 버퍼로부터 건조되고, 버퍼는 2의  $\pm$  10%의 pH를 갖는,  
 비경구 투여용 제형물.

**청구항 18**

제15항에 있어서,  
 상기 제형물의 수분 함량은 5 내지 15% w/v인,  
 비경구 투여용 제형물.

**청구항 19**

제1항 또는 제2항에 있어서,  
 상기 제형물은 리퀴드 형태인,  
 비경구 투여용 제형물.

**청구항 20**

제1항 또는 제2항에 있어서,  
 상기 제형물이 실온에서 한달동안 저장될 때, 상기 제형물 내부의 상기 인슐린의 90% 이상은 화학적 및 물리적  
 으로 안정한,  
 비경구 투여용 제형물.

**청구항 21**

제1항 또는 제2항에 있어서,  
 상기 제형물은 컨테이너 내부 포함되는,  
 비경구 투여용 제형물.

**청구항 22**

제1항 또는 제2항에 있어서,  
 상기 비양자성 극성 용매는 상기 제형물의 연속상(contiguous phase)인,  
 비경구 투여용 제형물.

**청구항 23**

제1항 또는 제2항에 있어서,  
 상기 제형물은 적어도 75, 80, 85, 90 또는 95% w/v의 상기 비양자성 극성 용매를 포함하는,  
 비경구 투여용 제형물.

**청구항 24**

제1항 또는 제2항에 있어서,  
 상기 용해된 인슐린은 준안정성인,  
 비경구 투여용 제형물.

**청구항 25**

혈당치를 감소시키기 위한 방법에 사용하기 위한 제1항 또는 제2항의 제형물로서, 상기 방법은 대상의 혈당치를 감소시키기 위한 유효량의 상기 제형물을 이를 필요로 하는 대상에게 투여함을 포함하는 단계를 포함하는,  
 제형물.

**청구항 26**

제25항에 있어서,  
 상기 대상의 혈당치는 투여 후 90분 이내에 감소되는,  
 제형물.

**청구항 27**

제25항에 있어서,  
 대상의 초기 1/2 Tmax 혈중 인슐린 레벨은 투여 후 30 내지 60분 이내에 발생하는,  
 제형물.

**청구항 28**

제25항에 있어서,  
 상기 대상은 Type-I 또는 Type-II 당뇨병으로 진단된,  
 제형물.

**청구항 29**

제25항에 있어서,  
 상기 제형물은 상기 대상에 의한 음식의 섭취 전 10분 이내에 투여되는,  
 제형물.

**청구항 30**

(a) 인슐린 및 1 내지 4 또는 6 내지 8의 pH 메모리를 가진 건조된 인슐린을 얻기 위한 비휘발성 버퍼를 포함한 혼합물을 건조하는 단계; 및  
 (b) 비양자성 극성 용매 내에서 상기 건조된 인슐린을 재구성하는 단계를 포함하는, 제1항 또는 제2항의 제형물을 만드는 방법으로서,  
 여기서 상기 인슐린은 상기 비양자성 극성 용매에 용해되어 있고, 여기서, 상기 용해된 인슐린은 안정한 단량체 또는 이량체 형태의 인슐린 또는 이들의 조합을 포함하며,

상기 제형물의 수분 함량은 15% w/v 또는 그 미만인,  
비경구 투여용 제형물 제조 방법.

**청구항 31**

제30항에 있어서,  
상기 제형물은 3 mg/ml 내지 50 mg/ml의 인슐린을 포함하는,  
비경구 투여용 제형물 제조 방법.

**청구항 32**

제30항에 있어서,  
(c) 아밀린 유사체 및 (a)단계와 동일한 비휘발성 버퍼 또는 건조된 아밀린 유사체를 얻기 위한 두번째 비휘발성 버퍼를 포함한 혼합물을 건조하는 단계; 및  
(d) 상기 건조된 인슐린과 함께 상기 비양자성 극성 용매 내의 건조된 상기 아밀린 유사체를 재구성하는 단계를 더 포함하고, 상기 건조된 아밀린 유사체는 상기 비양자성 극성 용매에 용해된,  
비경구 투여용 제형물 제조 방법.

**청구항 33**

제32항에 있어서,  
상기 아밀린 유사체는 프람린타이드이고, 상기 프람린타이드는 2의  $\pm$  10%의 pH 메모리를 가지거나 상기 프람린타이드는 2의  $\pm$  10%의 pH 메모리를 가지고 상기 인슐린은 2의  $\pm$  10%의 pH 메모리를 가지는,  
비경구 투여용 제형물 제조 방법.

**청구항 34**

제32항에 있어서,  
비휘발성 버퍼는 2의  $\pm$  10%의 pH 범위를 가지는,  
비경구 투여용 제형물 제조 방법.

**청구항 35**

제32항에 있어서,  
상기 제형물의 5 내지 15% w/v의 물을 조용매로서 추가하는 단계를 더 포함하는,  
비경구 투여용 제형물 제조 방법.

**청구항 36**

제1항에 있어서,  
상기 비양자성 극성 용매는 디메틸설프옥사이드(dimethylsulfoxide : DMSO)인,  
비경구 투여용 제형물.

**청구항 37**

제1항에 있어서,  
조용매로서 물을 더 포함하는,  
비경구 투여용 제형물.

**청구항 38**

제1항에 있어서,

상기 버퍼는 에틸렌디아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid : EDTA), 에틸렌 글리콜 테트라아세트산(ethylene glycol tetraacetic acid : EGTA), 주석산, 글리세린 또는 시트르산을 포함하는,

비경구 투여용 제형물.

**청구항 39**

제1항에 있어서,

물, 설탕, 당알코올 또는 이들의 혼합물을 비양자성 극성 용매의 어는점을 0℃의 ± 10%로 낮출수 있는 성분으로서 더 포함하는,

비경구 투여용 제형물.

**청구항 40**

제15항에 있어서,

상기 아밀린 유사체는 프람린타이드(pramlintide)인,

비경구 투여용 제형물.

**청구항 41**

제19항에 있어서,

상기 제형물은 용액인,

비경구 투여용 제형물.

**청구항 42**

제1항에 있어서,

상기 제형은 주사기, 펜 주사장치(pen injection device), 자동 주사장치(auto-injector device), 펌프 또는 살포백(perfusion bag) 내부에 포함되는,

비경구 투여용 제형물.

**청구항 43**

삭제

**청구항 44**

삭제

**청구항 45**

삭제

**청구항 46**

삭제

**청구항 47**

삭제

**청구항 48**

삭제

**청구항 49**

삭제

**청구항 50**

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 미국 가출원 제 61/609,123호(2012년 3월 9일에 출원), 미국 가출원 제 61/553,388(2011년 8월 31일에 출원)의 이익을 청구하며 이의 내용은 참조로서 본 출원에 통합되어 있다.

**배경 기술**

[0002] **A. 본 발명의 분야**

[0003] 본 발명은 비경구 투여용 인슐린 제형물에 관한 것이다. 이러한 제형물은 인슐린의 안정화된 단량체 또는 이량체 형태를 포함할 수 있고, 그렇게 함으로서 대상의 혈류 내부의 인슐린 흡수 속도를 가속화한다.

[0004] **B. 관련 기술의 기재**

[0005] 1형 당뇨병 환자는 거의 인슐린을 생산하지 않고, 따라서 1형 당뇨병에 대한 기본 치료는 외인성 인슐린 치료이다. 또한, 비-인슐린 치료의 한계 때문에 2형 당뇨병을 가진 많은 환자들은 결국 인슐린 치료를 필요로 한다. 역사적으로, 인슐린은 당뇨병 치료를 위해 90년 이상 사용되어 왔다. 일반적인 식이요법으로 매일 인슐린의 여러가지 주사를 투여하는 것이 포함된다: 지속형 작용 기저의 인슐린은 하루 한번 또는 두번, 급속형 작용 인슐린은 식사시간. 이러한 치료 요법은 효과적이라고 인정됨에도 불구하고, 그것은 한계가 있다. 첫째, 환자들은 일반적으로 주사바늘의 고통 및 불편 때문에 인슐린을 그들자신에게 주입하는 것을 꺼려한다. 그 결과 환자들은 미리 정해진 치료 요법에 적절하게 따르지 않는 경향이 있다. 더 중요하게, 적절하게 투여하는 경우에도, 식사 시간에 주입 가능한 인슐린 제품은 인간 인슐린의 자연적인 생리작용을 적절하게 모방하지 않는다. 특히, 당뇨병에 걸리지 않은 사람 내의 첫번째 단계 반응은 식사로부터 혈중 포도당의 유입의 몇 분 이내로 혈중 인슐린 수치가 증가함과 동시에 인슐린 스파이크(insulin spike)로 이루어진다. 혈중 인슐린 수치는 반응의 개시 후 30 내지 60분 사이에 정점이 될 것이다. 대조적으로 혈액으로 인슐린이 천천히 주입되면, 관찰되는 최대 농도(Cmax)는 정규 인간 인슐린의 주입으로부터 90분 또는 그 이상이 일어난다.

[0006] 치료 인슐린 및 인슐린 유사체의 다양한 유형은 반응의 시작 및 반응 동안의 혈장 인슐린의 정점을 위한 시간의 균형을 맞추는 것과 같은 다른 약동학적(Pharmacokinetic : PK) 프로파일을 성취하기 위해 개발되었다. 인슐린 치료의 핵심적인 개선점은 Humalog®, Novolog® 및 Apidra®를 포함하는 초속효성 인슐린(rapid-acting insulin) 유전체의 도입이었다. 그러나 이러한 유사체에 대해 얘기하자면, 인슐린 수치의 빠른 전형적으로 주입 후 60분 정도에 발생한다. 현재 시판되는 인슐린 분비의 첫번째 단계를 적절하게 모방한 인슐린 제품의 실패는 식사의 시작에 부족한 인슐린 수치 및 식간의 과도한 인슐린 수치를 야기하고, 이는 식사시작 후 초기에 저혈당 및 식후 말기에 저혈당의 생리적 효과를 가져올 수 있다. 이러한 상황들은 둘 다 두 잠복은 관리하기 위해 요구되는 복잡한 알고리즘인 인공적인 췌장 기술의 폐회로의 약속에 대한 중요한 문제점을 나타낸다.

[0007] 인슐린을 통한 당뇨병 환자의 치료에 있어서, 외인성 인슐린의 주입의 기본적인 루트는 피하이고, PK 프로파일의 기본적인 파라미터는 피하 흡수에 의존한다. 다수의 변수(예를 들어, 혈류, 확산속도 및 연결상태)들이 피하에 주입되는 인슐린의 흡수에 영향을 끼친다. 혈류가 적절할 때, 용해가능한 인슐린의 흡수를 위한 속도-제한 요소는 (i) 확산에 의한 모세혈관의 사이의 수송 및 (ii) 모세혈관 막 상의 전송의 제한이고 둘 모두 분자의 크기에 의해 지배된다(예를 들어, 인슐린의 연결 상태).

[0008] 전형적으로, 이슐린 제형물은 수성-기반이다. 이러한 이유 중 하나는 사람 신체의 대부분이 수성 환경인 혈장을 포함한 물로 구성되어 있어서이다. 그러므로 약물이 도착하기 위해 의도되는 환경에 호환되는 약 제형물을 주입함은 자연적인 경향이다. 단량체 및 이량체 형태가 인슐린의 육합체 형태와 비교하여 좀 더 작은 크기이기 때문에 좀 더 쉽게 혈류에 흡수되는 반면에, 인슐린은 일반적으로 아연-바운드 육합체의 안정화된 형태로 약제학

적 조성물로서 존재한다. 수용액 내의 단량체 인슐린은 불안정하고, 아밀로이드 섬유를 형성하며, 물을 매개 경로로 하여 이를 통해 분해된다. 육합체 구조는 용액(pH 5-8) 내에서 안정성을 촉진하는 반면에, 그것은 또한 확산 및 이후의 흡수를 방해한다. 추가로, 주사기 저장부의 부피 또한 확산에 영향을 받을 것이고, 그 때문에 부피가 더 커지며, 확산 속도가 더 느려진다. 요소들의 조합은 혈장 인슐린 수치 픽 및 반응의 시작을 지연하는데 주된 책임이 있다.

[0009] 또한 피하 흡수를 촉진하면서 수용액 내 인슐린의 저하 및 섬유화를 방지하기 위하여, 수용체-결합 친화도가 유지되는 동안 자가-연결을 위한 성향을 감소시키기 위해서 아미노산 서열이 변경된 곳에 인슐린 유사체가 발달되어 있다. 인슐린의 이러한 종류는 종종 "이량체" 인슐린으로 언급되나, 그들은 실제로 육합체와 매우 약하게 연결되어 존재한다. 이러한 물질의 흡수는 여전히 지연될 것인데 왜냐하면 그것은 육합체와 이량체/단량체를 분리하기 위해 요구되는 피하 농도 내에서 확산 및 차후의 감소에 따라 달라지기 때문이다. 단량체 상태를 지지하는 평형의 인슐린 유사체(예를 들어, 인슐린 유사체 리스프로(Lispro))는 좀 더 급속한 흡수 및 짧은 반응 시간을 보여준다. 그러나, 이러한 유사체 분자들은 육합체 인슐린과 비교하면 좀 덜 안정하고 열 및 기계적 스트레스 하에서 좀 더 비가역적으로 응집하는 경향이 있다. 게다가, 이러한 응집은 사용가능한 인슐린의 투여량을 감소시킬 뿐만 아니라, 환자의 면역반응 또는 자극을 유도할 수 있다. 또한, 몇몇 새로운 인슐린 유사체에 의한 수용체 조직의 장기간의 신호와 중앙 증식의 유도에 대한 실험 및 역학 연구 또한 나왔다. 이러한 부족함에도 불구하고, 인슐린 유사체는 비싸다-정규 사람 인슐린의 약 2배.

**발명의 내용**

[0010] 본 발명은 인슐린 제형물이 직면한 현재 문제의 솔루션을 제공한다. 본 발명은 비양자성 극성 용매 내에 용해되고 재구성된 후 원하는 pH를 유지하는 인슐린의 건조된 형태를 만들기 위한 버퍼 내의 건조한 인슐린에 있다. 생성된 제형물은 인슐린의 용해되고 안정화된 단량체 및 이량체 형태를 포함한다. 특히, 상기 제형물은 비교적 낮은 양의 물(20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, 1% 또는 그 미만)을 가질 수 있거나 비수성 일 수 있고 추가로 상기 제형물 내에 존재하는 인슐린의 양의 증가를 허용함으로써, 대상에 투여되는 제형물에 포함된 인슐린의 부피를 감소시킨다. 또한, 본 발명은 사용되는 인슐린의 비-변성 또는 천연 및 변성 또는 유사체 형태를 모두 허용한다. 환언하면, 인슐린 유사체는 본 발명에 사용될 수 있는 반면, 비-변성/천연 인슐린도 사용될 수 있고, 인슐린은 모두 안정화된 단량체 및 이량체 형태로 유지된다.

[0011] 발명의 일 측면에서, pH 메모리가 1 내지 4(또는 1 내지 3 또는 약 2) 또는 6 내지 8(또는 6.5 내지 7.5 또는 약 7)인 인슐린 및 비양자성 극성 용매를 포함한 제형물이 개시되고, 상기 인슐린은 상기 비양자성 극성 용매에 용해될 수 있으며, 용해된 상기 인슐린은 인슐린의 안정화된 단량체 또는 이량체 형태 또는 이들의 혼합일 수 있고, 상기 제형물의 수분 함량은 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, 1% w/v 또는 w/w 또는 그 미만(예를 들어, 무수)와 동일하거나 미만일 수 있다. 상기 제형물은 비경구 투여용으로 사용될 수 있다. 특정 실시예에 있어서, 상기 비양자성 극성 용매는 디메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide : DMSO), 엔-메틸 피롤리돈(n-methyl pyrrolidone : NMP), 에틸 아세테이트(ethyl acetate), 디메틸포름아미드(dimethylformamide : DMF), 디메틸아세트아미드 9dimethylacetamide : DMA), 프로필렌 카보네이트(propylene carbonate) 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 특정 실시예에 있어서, 상기 비양자성 극성 용매는 디메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide : DMSO)일 수 있다. 일 실시예에 있어서, 상기 제형물은 3 mg/ml 내지 50 mg/ml, 3 mg/ml 내지 10 mg/ml 또는 10 mg/ml 내지 50 mg/ml의 인슐린을 포함한다. 또 다른 측면에서, 그것은 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100 mg/mL 또는 그 이상 또는 필요한 만큼 또는 그 안에 어떠한 범위도 포함할 수 있다. 일 실시예에 있어서, 상기 제형물 내의 상기 인슐린의 대부분은 단량체 형태 또는 이량체 형태 또는 단량체 및 이량체 형태의 조합이다. 상기 제형물은 인슐린의 단량체 또는 이량체 형태의 집합체를 감소시킬 수 있는 성분을 더 포함할 수 있다. 이러한 성분의 비제한적인 예들로 요소, 구안디늄 클로라이드(guanidinium chloride), 아미노산, 설탕, 폴리올(polyol), 폴리머, 산, 계면활성제 또는 이들의 혼합물을 포함한다. 특정 실시예에 있어서, 상기 산은 아세트산, 아스코브산, 시트르산, 글루타민산, 아스파르트산, 숙신산, 푸마르산, 말레산, 아디프산 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 상기 제형물은 조용매를 포함할 수 있다. 비제한적인 일 실시예에 있어서, 조용매는 물이다. 일 실시예에 있어서, 상기 제형물은 아연을 포함하지 않고, 낮은 양의 징크를 포함하고/포함하거나 육합체 제형물의 가능성을 감소시키기 위한 킬레이트 작용제인 징크를 포함한다. 특정 실시예에 있어서, 상기 인슐린은 비휘발성 버퍼에서 미리 건조될 수 있고, 언급된 버퍼는 1 내지 4 또는 1 내지 3 또는 약 2 또는 6 내지 8 또는 6.5 내지 7.5 또는 약 7의 pH 범위를 가질 수 있다. 비휘발

성 버퍼의 예들은 글리신 버퍼(glycine buffer), 시트레이트 버퍼(citrate buffer), 포스페이트 버퍼(phosphate buffer) 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 일 실시예에 있어서, 상기 버퍼는 킬레이트 작용제를 포함할 수 있다. 킬레이트 작용제의 비제한적인 실시예는 에틸렌디아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid : EDTA), 에틸렌 글리콜 테트라아세트산(ethylene glycol tetraacetic acid : EGTA), 주석산, 글리세린 또는 시트르산 또는 이들의 어떠한 조합을 포함한다. 상기 제형물은 또한 상기 비양자성 극성 용매의 어는점을 약 0°C로 낮출수 있는 성분을 포함할 수 있고, 이러한 성분의 비제한적인 실시예는 물, 설탕, 당알코올 또는 이들의 혼합물을 포함한다. 어떤 경우에는, 상기 인슐린은 비개질 또는 천연 사람 인슐린 일 수 있다. 또 다른 실시예에 있어서, 상기 조성물은 아밀린 유사체와 같은 인슐린 보조체를 더 포함할 수 있다. 상기 아밀린 유사체는 상기 제형물 내부에 용해될 수 있다. 아밀린 유사체의 비제한적인 실시예는 프람린타이드(pramlintide)이다. 상기 프람린타이드는 1 내지 5 또는 2, 3 또는 4 또는 약 2의 pH 메모리를 가지도록 처리될 수 있다. 공동 제형물의 특정 실시예에 있어서, 상기 인슐린의 pH 메모리는 약 2일 수 있고, 상기 프람린타이드의 pH 메모리는 약 2일 수 있다. 특정 실시예에 있어서, 상기 프람린 타이드의 처리단계는 비휘발성 버퍼 내의 언급된 프람린 타이드를 건조하는 단계를 포함할 수 있고, 언급된 버퍼는 1 내지 5 또는 2, 3, 또는 4 또는 약 2의 pH 범위를 가진다. 인슐린 및 프람린타이드를 포함하는 제형물 내의 수분 함량은 5 내지 20% w/v 또는 w/w 또는 5 내지 15% w/v 또는 w/w 또는 7 내지 12% w/v 또는 w/w 또는 8 내지 10% w/v 또는 w/w 또는 약 9% w/v 또는 w/w일 수 있다. 상기 제형물은 리퀴드 형태일 수 있다. 상기 제형물은 용액일 수 있다. 특정 실시예에 있어서, 상기 제형물 내의 상기 인슐린의 적어도 50, 60, 70, 80 또는 90% 또는 그 이상은 상기 제형물이 상온에서 한달동안 저장될 때, 화학적 및 물리적으로 안정화되어 유지될 수 있다. 일 실시예에 있어서, 상기 제형물은 컨테이너 내부에서 구성될 수 있다. 상기 컨테이너는 주사기, 펜 주사장치(pen injection device), 자동 주사장치(auto-injector device), 펌프 또는 살포백(perfusion bag)일 수 있다. 특정 실시예에 있어서, 상기 비양자성 극성 용매는 상기 제형물의 연속상일 수 있다. 상기 제형물은 적어도 상기 비양자성 극성 용매의 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 또는 % w/v 또는 w/w를 포함할 수 있다. 상기 제형물 내의 상기 인슐린은 준안정성일 수 있다.

[0012] 또한, 대상 내부의 혈당치를 감소시키기 위한 효과적인 양으로 본 발명의 상기 제형물의 어느 하나를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는 혈당치를 감소시키기 위한 방법이 개시된다. 상기 대상은 사람(성인 또는 아이), 동물(예를 들어, 침팬치, 말, 소, 돼지, 토끼, 쥐, 생쥐 등)일 수 있다. 특정 실시예에 있어서, 상기 대상의 상기 혈당치는 투여 후 10, 20, 30분, 60분 또는 90분 이내에 감소된다. 일 실시예에 있어서, 대상의 초기 1/2 Tmax 혈중 인슐린 레벨은 투여 후 10, 20, 30, 40, 50 또는 60분 이내 또는 30 내지 60분 이내에 발생한다. 상기 대상은 이미 Type-I 또는 Type-II 당뇨병으로 진단될 수 있고, Type-I 또는 Type-II 당뇨병의 발전에 민감할 수 있다. 일 실시예에 있어서, 상기 제형물은 대상에 의한 음식의 섭취 전 30, 20, 15, 10분, 5분 또는 1분 이내 또는 대상에 의한 음식의 섭취 후 1분, 5분, 10, 15, 20 또는 30분 이내에 주입될 수 있다.

[0013] 또한, 상기 본 발명의 상기 제형물을 제조하는 방법이 개시된다. 상기 방법은 인슐린 및 건조된 인슐린을 건조하기 위한 비휘발성 버퍼를 포함한 건조한 혼합물을 포함할 수 있고, 상기 건조된 인슐린은 1 내지 4(또는 2 내지 3 또는 약 2) 또는 6 내지 8(또는 6.5 내지 7.5 또는 약 7)의 pH 메모리를 가질 수 있으며, 그 이후 비양자성 극성 용매 내부의 상기 건조된 인슐린을 재구성하고, 상기 인슐린은 상기 비양자성 극성 용매 내부에 용해될 수 있으며, 용해된 상기 인슐린은 인슐린의 안정화된 단량체 및 이량체 형태 또는 이들의 혼합을 포함할 수 있고, 상기 제형물의 수분 함량은 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, 1% w/v 또는 w/w 또는 그 미만(예를 들어, 무수)와 동일하거나 미만일 수 있다. 상기 방법은 아밀린 유사체 및 건조된 아밀린 유사체 및 건조된 아밀린 유사체를 얻기 위한 두번째 비휘발성 버퍼를 포함한 건조한 혼합물 더 포함할 수 있고, 건조된 인슐린과 함께 비양자성 극성 용매 내의 건조된 아밀린 유사체를 재구성하였으며, 상기 건조된 아밀린 유사체는 비양자성 극성 용매 내부에 용해될 수 있다. 상기한 바와 같이, 상기 아밀린 유사체는 프람린타이드일 수 있고, 1 내지 5 또는 2, 3 또는 4 또는 약 2의 특정 실시예의 pH 메모리를 가지고 처리될 수 있다. 조제형물의 특정 실시예에 있어서, 상기 인슐린의 pH 메모리는 약 2일 수 있고, 상기 프람린타이드의 pH 메모리는 약 2일 수 있다. 상기 두번째 비휘발성 버퍼는 1 내지 5 또는 약 2, 3 또는 4 또는 특히 약 2의 pH 범위를 가질 수 있다. 이 방법은 상기 제형물의 양의 범위가 5 내지 20% w/v 또는 w/w 또는 5 내지 15% w/v 또는 w/w 또는 7 내지 12% w/v 또는 w/w 또는 8 내지 10% w/v 또는 w/w 또는 약 9% w/v 또는 w/w이도록 물과 같은 조용매를 첨가하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0014] 본 발명의 제형물의 또 다른 특별한 특징은 상기 제형물을 희석시키거나 재구성하는 것 없이 필요에 따라 비경구 투여를 위해 즉시 준비되고, 컨테이너 내부에 함유되며, 저장되는 것이다. 따라서 상기 제형물이 저장될 수 있는 상기 컨테이너는 주사기, 펜 주사장치(pen injection device), 자동 주사장치(auto-injector device), 펌프 또는 살포백(perfusion bag)일 수 있다. 또한 상기 제형물에 사용되기 위해 고려되는 추가적인 첨가물/약학

부형제의 비제한적인 예로 다음을 포함한다: 산화방지제(예는 아스코르브산(ascorbic acid), 시스테인(cysteine), 메티오닌(methionine), 모노티오글리세롤(monothioglycerol), 나트륨 티오설페이트(sodium thiosulfate), 설파이트(sulfites), BHT, BHA, 아스코르빌 팔미테이트(ascorbyl palmitate), 프로필 갈레이트(propyl gallate) 또는 비타민E를 포함한다); 킬레이트 작용제(예는 EDTA, EGTA, 주석산(tartaric acid), 글리세린 또는 구연산(citric acid)을 포함한다); 또는 방부제(예는 알킬 알코올, 벤질 알코올, 메틸 파라벤 또는 프로필 파라벤 또는 이들의 혼합물을 포함한다). 상기 제형물은 리퀴드 형태, 반고체 형태 또는 젤 형태일 수 있다. 아래 설명된 바와 같이, 상기 제형물은 원하는 점도 범위를 가질 수 있다(비제한적인 하나의 실시예로서, 이러한 범위는 0.5 내지 15cps일 수 있다).

- [0015] 본 명세서에서 언급된 임의의 실시예는 본 발명의 임의의 방법 또는 조성물에 관하여 구현될 수 있다고 고려되고, 그 반대도 된다. 추가로, 본 발명의 조성물은 본 발명의 방법을 성취하는데 사용될 수 있다.
- [0016] "인슐린"은 사람, 비사람, 재조합, 정제 및/또는 합성(예를 들어, 개질된 인슐린 또는 인슐린 유사체) 유사체를 의미한다. "사람 인슐린"은 체장으로부터 분비되는 인간의 펩티드 호르몬 인슐린을 의미한다-그것은 합성화학을 통해 제조되거나 구매되는 등의 유기체 조작 유기체로부터 만들어 질 수 있는 천연 소스로부터 분리될 수 있다. "비사람 인슐린"은 동물(예를 들어, 돼지, 소 등)로부터 유래된 인슐린이다.
- [0017] "개질된 인슐린" 또는 "인슐린 유사체"는 인슐린의 변경된 형태이고, 천연(예를 들어, 화학적 변경, 다른 구조, 다른 아미노산배열)과는 다르나, 여전히 대상(예를 들어, 사람)에게 천연/비-개질된 인슐린과 같은 기능을 수행하기 위해 적용가능하다. 예를 들어, DNA 코딩의 유전 공학을 통해, 상기 인슐린의 아미노산배열은 그것의 ADME(흡수(adsorption), 분포(distribution), 대사(metabolism) 및/또는 배설(excretion)) 특성을 변경하기 위해 바뀔 수 있다. 개질된 인슐린 또는 인슐린 유사체는 Lispro®, Aspart®, Glulisine®, Detemir®, Degludec® 등을 포함한다. 비-개질 또는 천연 인슐린은 천연 또는 자연 발생 아미노산 배열을 포함한다.
- [0018] "안정화된 인슐린"은 상기 제형물 내의 비가역적으로 제형물 내에서 집계되지 않거나 제형물이 투여되지 않은 경우 활동을 잃게 되는 인슐린을 의미한다. 상기 인슐린은 혈액 내부에 일단 흡수되면 활동이 유지된다. 이론에 구애되고자 함이 없이, 본 발명의 제형물 내부의 인슐린은 용해된 인슐린의 형태가 변경될 수 있는 동안 "준-안정화"된 상태로 여겨지고, 상기 인슐린은 혈액 내부로 일단 흡수되거나 투여되는 경우 자연적인 형태로 다시 되돌아간다. 추가로, 상기 제형물 내부의 인슐린의 구조적 변화는 상기 제형물 내의 아밀린 유사체와 같은 보조제 또는 다른 인슐린의 단량체 및 이량체 집합의 가능성을 감소시킨다. 단량체 인슐린 형태는 단량체 형태 내부의 인슐린을 의미한다. 이량체 인슐린 형태는 이량체 형태(예를 들어, 두 단량체가 함께 연결되거나 결합된) 내부의 인슐린을 의미한다. 육합체 인슐린 형태는 육합체 형태(예를 들어, 세 이량체 형태가 함께 연결되거나 결합된) 내부의 인슐린을 의미한다.
- [0019] "아연-프리" 또는 "낮은-아연"은 상기 제형물이 인슐린 함량과 관계된 아연이 약 0.6% 또는 그 미만(예를 들어, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0%) 또는 6인슐린 단량체 당 3 아연 이온 또는 그 미만(예를 들어, 2, 1, 0)을 포함하는 것을 의미한다.
- [0020] "비양자성 극성 용매"는 산성 수소를 포함하지 않고 수소결합도너처럼 작용하지 않는 극성 용매를 의미한다. 진술한 바와 같이, 비제한적인 실시예는 는 디메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide : DMSO), 디메틸포름아미드(dimethylformamide : DMF), 에틸 아세테이트(ethyl acetate), 엔-메틸 피롤리돈(n-methyl pyrrolidone : NMP), 디메틸아세트아미드(dimethylacetamide : DMA), 프로필렌 카보네이트(propylene carbonate)를 포함한다.
- [0021] "비경구 투여"는 사람과 같은 동물의 피부 또는 점액세포막의 하나 또는 그 이상의 층을 통하거나 밑으로의 제형물의 주입을 의미한다. 표준 비경구 투여는 예를 들어 사람의 환자와 같은 동물의 피하 또는 근육 지역 내부에 제공된다. 이러한 깊은 위치는 목표가 되는데 왜냐하면 조직이 좀 더 용이하게 팽창되고, 상대적으로 얇은 피부 위치이며, 인슐린 제형물을 제공하기 위한 주입 부피를 수용하기 위해서이다. 투여는 바늘, 펌프, 주사장치, 카테터 등으로 할 수 있다.
- [0022] "약학적으로 수용가능한 캐리어"는 약학적으로 인간 또는 동물과 같은 포유류에게 인슐린을 전달하기 위한 서스펜딩(suspending) 시약 또는 용액인 수용가능한 용매를 의미한다.
- [0023] "약학적으로 수용가능한" 성분, 부형제 또는 구성요소중 합리적인 이익/위험 비율에 상응하는 부작용(독성, 자극 및 알레르기 반응과 같은) 없이 사람 및/또는 동물에게 사용하기에 적합할 수 있는 것이다.
- [0024] "생체 적합성"은 합리적인 이익/위험 비율에 상응하는 부작용(독성, 자극 및 알레르기 반응과 같은) 없이 사람

및/또는 동물에게 사용하기에 적합할 수 있는 것이다.

- [0025] "생체 이용률"은 대상에 상기 제형물로부터 인슐린이 흡수되는 정도를 의미한다.
- [0026] 대상을 향한 인슐린의 투여 또는 전달에 대하여 "전신에 영향을 주는"은 치료제는 대상의 혈장내에서 생물학적으로 상당한 수준에서 검출될 수 있음을 의미한다.
- [0027] "환자", "대상" 또는 "개인"은 포유동물(예를 들어, 사람, 영장류, 개, 고양이, 소, 양, 돼지, 말, 쥐, 속도, 햄스터, 토끼 또는 기니아 피그)를 의미한다.
- [0028] "억제" 또는 "감소" 또는 이러한 용어의 임의적 변화는, 청구항 및/또는 상세한 설명에서 사용될 경우 어떠한 측정할 수 있는 감소 또는 원하는 결과를 달성하기 위한 완전한 억제를 포함한다.
- [0029] "효과적" 또는 "치료" 또는 "방지" 또는 이러한 용어의 임의적 변화는, 청구항 및/또는 상세한 설명에서 사용될 경우 원하는, 기대되는, 의도되는 결과를 달성하기 위해 충분함을 의미한다.
- [0030] 용어 "약" 또는 "대량"은 당업자에 의해 이해되는 것에 가까운 것으로 정의되고, 용어의 비제한적인 일 실시예로서 10%이내, 바람직 하계는 5%이내, 좀 더 바람직하계는 1%이내, 가장 바람직하계는 0.5%이내로 정의된다. 또한, "실질적으로 비수용성"은 물의 불용 또는 체적이 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 또는 그 미만의 보다 작음을 의미한다.
- [0031] "하나" 또는 "하나"라는 용어의 사용이 "포함"이라는 단어와 함께 청구항 및/또는 상세한 설명에서 사용되는 경우 "하나"를 의미하나, 이는 또한 "하나 또는 그 초과", "적어도 하나" 및 "하나 또는 하나의 초과"와 일치한다.
- [0032] 상기 "포함"("comprise" 및 "comprises"과 같이 comprising의 어떠한 형식도), "가짐"("have" 및 "has"과 같이 having의 어떠한 형식도), "내포"("includes" 및 "include"와 같이 including의 어떠한 형식도) 및 "함유"("contains" 및 "contain"과 같이 containing 어떠한 형식도) 용어들은 포함하거나 또는 개방하거나 및 언급되지 않은 구성 또는 방법단계의 추가를 배제하지 않는다.
- [0033] 그들의 사용을 위한 구성요소 및 방법은 본 명세서를 통해 공개된 임의의 성분 또는 단계를 "포함", "필수적으로 구성" 또는 "구성"할 수 있다. 비제한적인 일 실시예에 있어서, "필수적으로 구성"의 변화된 형태에 대하여, 본 명세서에서 공개된 제형물 및 방법의 기본 및 새로운 특징은 언급된 제형물 내부 인슐린의 단량체 및/또는 이량체 형태의 안정성 및 용해도를 포함한다. 그러므로, 제형물 내 인슐린의 단량체 및/또는 이량체 형태의 안정성 또는 용해도에 영향을 미칠 수 있는 성분은 "필수적으로 구성"의 변화된 형태를 사용하는 청구항의 예에서 언급된 제형물로부터 제외될 것이다.
- [0034] 본 발명의 다른 목적, 특징 및 장점은 다음의 상세한 설명에서 명백해질 것이다. 그러나 상세한 설명 및 예는 본 발명의 특정 실시예를 나타내는 동안 단지 예시의 방법으로 주어진 것으로 이해되어야 한다. 추가적으로, 본 발명의 사상 및 범위 내에서의 변경 및 개질은 이 상세한 설명을 통해 당업자에게 명백해질 것으로 고려된다.

**도면의 간단한 설명**

- [0035] 이하의 도면은 본 발명의 명세서의 일부를 형성하고, 본 발명의 특정 태양을 추가적으로 묘사하는데 포함된다. 본 발명은 이하에서 제시되는 특정한 실시예의 상세한 설명과 함께 이러한 도면들 중 하나 이상을 참조하여 더욱 잘 이해될 수 있다.

도 1은 DMSO/인슐린 및 수성/인슐린 제형물들의 FTIR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 2는 DMSO/인슐린 및 수성/인슐린 제형물들의 분자량을 나타낸 것이다.

도 3은 DMSO에서 Ins-E가 50 mg/mL일 때의 유체역학적 반경 분포이다. 상기 수평축은 유체역학적 반경 값(~1.3의 인자에 의해 다른 인접 포인트들)의 대수적 이격격자이다. 분석은 ~0.01nm 내지 ~20nm의 반경 범위를 다루고 있다. 광검출기의 후방필스로부터 발생하는 아티팩트인 0.01 내지 0.1nm의 픽들은 억제되고 있다.

도 4는 DMSO에서 Ins-E가 30 mg/mL일 때의 유체역학적 반경 분포이다.(상기 도 3의 그래프 설명 참조)

도 5는 DMSO에서 Ins-E가 10 mg/mL일 때의 유체역학적 반경 분포이다.(상기 도 3의 그래프 설명 참조)

도 6은 DMSO에서 Ins-E가 3 mg/mL일 때의 유체역학적 반경 분포이다.(상기 도 3의 그래프 설명 참조)

도 7은 버퍼 E에서 Ins-H<sub>2</sub>O가 10 mg/mL일 때의 유체역학적 반경 분포이다.(상기 도 3의 그래프 설명 참조)

도 8은 버퍼 F에서 Ins-H<sub>2</sub>O가 10 mg/mL일 때의 유체역학적 반경 분포이다.(상기 도 3의 그래프 설명 참조)

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0036] 상기 기재된 바와 같이, 비경구 투여를 위한 단량체 또는 이량체 형태의 인슐린의 제형과 관련된 문제점이 잘 설명되어 있다. 이러한 문제점의 현재 해결법은 역시 잘 알려져 있고 제형 분야에서 표준관행으로 허용된다. 예를 들어, 인슐린 유사체/개질된 인슐린은 유도체의 육합체 형성을 방지하기 위해서 자가 결합친화도를 감소시키기 위해서 제조되었다. 이러한 유사체들은 일반적으로 수성환경에서 관리 또는 투여(administered)되며, 이 환경은 자신의 안정성을 감소시키고 응집이 일어나자마자, 비가역 응집이 더욱 잘 일어나도록 만든다. 추가로, 이러한 유사체들은 가격이 많이 들고 환자의 면역반응 또는 자극을 유도할 수 있다.

[0037] 그에 비해 본 발명자는 앞서 언급한 문제점에 대한 해결안을 찾았다. 상기 해결안은 특정 pH 메모리를 가지는 인슐린을 제조하고 상기 인슐린을 비양자성 극성 용매에서 재구성시키고 용해시키는 것에 있다. 이렇게 얻은 인슐린은 소량의 물을 가질 수 있거나 물을 가질 수 없으며, 이 제형물은 용해되고 안정화된 단량체 및 이량체 형태의 인슐린을 포함한다. 또한, 비양자성 극성 용매 내의 인슐린의 증가된 용해도는 많은 양의 단량체 및 이량체 형태의 인슐린을 가지는 낮은 체적의 제형을 야기한다. 특히, 상기 제형물은 개질되거나 비개질된 인슐린을 위해 사용될 수 있다. 비개질된 인슐린의 경우, 염증, 면역반응 및 비용과 같은 개질된/유사체 인슐린 분자의 사용에 따른 문제점을 회피할 수 있다.

[0038] 본 발명의 실시예 및 다른 비제한적인 실시예는 아래에 기재한다.

**[0039] A. 인슐린**

[0040] 인슐린은 음식으로부터 얻는 혈당을 저장하거나 사용하도록 신체를 도와준다. 1형 당뇨병에 걸린 사람은 췌장이 더 이상 인슐린을 만들지 않는다. 2형 당뇨병에 걸린 사람은 인슐린을 만들지만, 이에 대한 그들의 몸의 반응은 효율적이지 않거나 적절하지 않고, 이를 종종 인슐린 저항이라 한다.

[0041] 인슐린 자체는 잘 알려지고 특징적인 펩티드 호르몬이다. 사람 인슐린의 단량체 형태는 이황화결합에 의해 커플링된 B체인 및 A체인으로 불리는 두 개의 펩티드 사슬을 가지는 51 아미노산으로 구성된다. 대부분의 종에서, A 체인은 21개의 아미노산으로 구성되고 B 체인은 30개의 아미노산으로 구성된다. 인슐린의 아미노산 서열이 종마다 다양함에도 불구하고, 분자의 특정 분절은 매우 잘 보존되어 있다. 인슐린의 아미노산 서열 내의 이러한 유사성은 종마다 매우 유사한 인슐린의 삼차원 입체구조를 이끌며, 한 동물로부터의 인슐린은 생물학적으로 다른 종과 반응할 수 있다. 예를 들어 돼지 인슐린은 광범위하게 인간 환자를 위해 사용되고 있다. 단량체 형태의 인슐린은 이량체를 형성하기 위해 함께 연결할 수 있다. 상기 이량체는 아연의 존재하에서 전형적으로 발생하는 육합체를 형성하기 위해 함께 연결할 수 있다.

[0042] 인슐린의 단량체 및 이량체 형태 모두 쉽게 혈액 내부로 확산된다. 대조적으로, 육합체는 그들의 상당히 큰 크기 때문에 많은 부분에서 저조하게 확산된다. 상기 기재한 바와 같이, 이점은 본 발명의 문맥에서 상업적으로 사용가능하고, 상업적으로 이용가능한 개질된 인슐린 또는 인슐린 유사체(예를 들어, 리스프로(Lispro)®, 아스파트(Aspart)®, 글루리신(Glulisine)®, 디터머(Detemir)®, 디글루텍(Degludec®) 등)의 제품을 이끌었다. 또한, 통상의 비개질된 인슐린 또한 쉽게 상업적으로 이용가능(예를 들어, 휴물린(Humulin)® R, 휴물린(Humulin)® N, 휴물린(Humulin)® 70/30, 노볼린(Novolin)® 등.)하고 또는 본 발명의 문맥에서 또한 사용 가능하다. 특정 실시예에 있어서, 통상/비개질된 형태의 인슐린은 제형물의 비용 감소, 면역성 또는 알레르기 비용을 감소시키기 위해 개질된 형태 대신 사용될 수 있다. 인슐린은 현재 제약회사 및 하청 제약회사를 포함하는 다양한 제조업체로부터 생산된다. 제약업체는 엘리 릴리(Eli Lilly), 노보 놀디스크 주식회사(Co., Novo Nordisk) 및 사노피(Sanofi)를 포함한다. 하청 제조업체는 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 론자(Lonza) 및 바이오콘(Biocon)을 포함한다. 본 발명의 상세한 설명의 예로 사용된 인슐린은 시그마-알드리치(세인트 루이스, MO((Saint Louis, MO)))로부터 구매한 제조합 비개질 사람 인슐린 이었다.

**[0043] B. pH 메모리**

[0044] 본 발명자는 또한 제형물에 용해된 인슐린이 좀 더 안정화되어 사용될 수 있도록 제조하는 단계를 발견하였다. 이 단계는 수용액 내의 비휘발성 버퍼와 인슐린을 혼합하는 단계 후 건조된 인슐린을 얻기 위해 혼합물을 건조

하는 단계를 포함한다. 건조하는 단계 이전에, 상기 수용액은 수성환경에서 인슐린의 안정화를 위한 최적 pH인 1 내지 4 또는 6 내지 8의 pH 범위를 가진다. 따라서, 상기 혼합물이 건조되자마자, 그것은 1 내지 4 또는 6 내지 8의 "pH 메모리"를 가지는 건조된 인슐린을 생성하며, 그 결과 비양자성 극성 용매 내에 용해된 인슐린이 건조된 후에 상기 pH 메모리는 유지된다. 프람린타이드(pramlintide)가 추가로 포함되는 특정 실시예에서, 상기 인슐린 pH 메모리는 약 2일 수 있고, 상기 프람린타이드 pH 메모리는 약 2일수 있다.

[0045] 특히, 인슐린의 "pH 메모리"는 완충된 수용액(예를 들어, 비휘발성 버퍼로부터)으로부터 인슐린을 건조하는 단계 후 얻어지는 전하 프로파일(charge profile)(양성자 상태)이다. 상기 양성자 상태, 즉 비양자성 극성 용매 내의 인슐린의 용해도 및 안정성은 건조하는 단계 전의 수성 인슐린 혼합물 또는 용액의 pH에 의한 영향을 받는다. 염기성 및 산 둘다 비휘발성인 버퍼 중에서 인슐린이 건조될 때, 상기 건조된 인슐린의 pH 메모리는 상기 수성 인슐린 혼합물 또는 용액의 pH와 거의 비슷해질 것이다. 예를 들어, *Enzymatic Reactions in Organic Media*, Koskinen, A.M.P., and Klibanov, A.M., eds., Springer (1996)이 참조된다. 또한, 인슐린이 건조된 완충된 수성 용액(비휘발성 버퍼)의 pH는 상기 건조된 인슐린이 상기 비양자성 극성 용매에서 후속적으로 재구성되는 경우 최적의 안정성, 최대 용해도 및 최소 분해의 인슐린을 위한 최적으로 pH 메모리를 제공할 수 있다. 따라서, 이러한 용매 내에서 건조된 인슐린이 재구성될 때, 재구성된 제형물 내의 인슐린은 최적화된 pH 메모리의 용해도 및 안정성 특성을 유지할 것이다.

[0046] 인슐린의 pH 메모리는 다양한 방법으로 측정할 수 있다. 일 방법으로서, 상기 pH 메모리는 비완충된 물 내부에서 건조된 인슐린이 재구성하고, 재구성된 인슐린 혼합물 또는 용액의 pH를 pH용지 또는 보정된 pH전극과 같은 pH 측정기를 통해 측정하는 단계를 통해 측정할 수 있다. 대안적으로, 상기 pH 메모리는 적어도 20% 물을 인슐린/비양자성 극성 용매 제형물에 첨가하고 pH측정기로 제형물의 pH를 측정함으로써 측정될 수 있다. 예를 들어, Baughman and Kreevoy, "Determination of Acidity in 80% Dimethyl Sulfoxide-20% Water," *Journal of Physical Chemistry*, 78(4):421-23 (1974)가 참조된다. 비양자성 극성 용매-수용액 내부의 pH 측정은 작은 교정(예를 들어, 위의 Baughman and Kreevoy 당 0.2pH 단위 이하)이 요구될 수 있다.

[0047] 상기의 관점에서, 여기에 설명된 제형물 내에서 유용한 비휘발성 버퍼는 최대 안정성/최소 분해성의 pH를 설정하는데 유용한 것들 뿐만 아니라 인슐린의 수분함량 또는 잔류수분 제거에 유용한 것들이다. 비휘발성 버퍼는 건조/동결건조한 물과 유사한 방식으로 증발하지 않을 버퍼를 포함한다. 예를 들어, 적합한 비휘발성 버퍼는 글리신 버퍼(glycine buffer), 시트레이트 버퍼(citrate buffer), 포스페이트 버퍼(phosphate buffer) 및 이와 유사한 것들을 포함한다. 특정 실시예로서, 상기 비휘발성 버퍼는 글리신 버퍼 또는 시트레이트 버퍼이다.

[0048] 비휘발성 버퍼와 같이 인슐린을 건조하는 단계는 분사-건조 기술, 냉동-건조 기술, 동결건조 기술, 진공 원심분리 기술 등을 사용하여 실행된다. 분사 건조 기술은 당업자에게 잘 알려져 있다. 분사 건조는 하나 또는 그 초과수의 고체(예를 들어, 치료제)를 함유한 용액을 드롭렛(droplets)으로부터 용매를 증발시켜 노즐 회전 디스크 또는 다른 장치를 통해 분무하는 단계를 포함한다. 결과물인 분말의 본질은 초기 용질 농도생성된 드롭렛의 크기 분포 및 용질 제거 비율을 포함하는 다양한 변수의 함수이다. 제조된 입자는 용질의 제거비율의 상태 및 비율에 따라 결정형 및/또는 무정형(amorphous) 고체로 구성된 주 입자들의 응집체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 약제의 초-미세 분말의 준비를 위한 분무-건조 단계는 미국 특허번호 6,051,256호가 참조된다. 냉동-건조 단계는 당업계에 잘 알려져 있고, 예를 들어, 미국 특허번호 4,608,764호 및 미국 특허번호 4,848,094호가 참조된다. 예를 들어, 분사-냉동-건조 단계는 미국 특허번호 5,208,998호에 참조된다. 다른 분사-건조 기술은 미국 특허번호 6,253,463; 6,001,336; 5,260,306; 및 PCT 국제특허 Nos. WO91/16882 및 WO 96/09814가 참조된다.

[0049] 동결건조 기술은 당업계에 잘 알려져 있다. 동결건조는 제품이 얼려져 있는 상태이고 진공(진공하에서의 얼음 승화) 하에서 가벼운 열처리를 통해 말리는 동안 발생하는 탈수 기술이다. 이러한 조건은 제품을 안정시키고 산화 및 다른 분해과정을 최소화 시킨다. 냉동 건조의 조건은 낮은 온도에서의 과정 진행을 허하고, 따라서 열적으로 불안정한 제품이 보호될 수 있다. 냉동건조의 단계는 전처리, 냉동, 주건조 및 부건조 단계를 포함한다. 전처리는 냉동 전에 제품을 전처리하는 임의의 방법을 포함한다. 이것은 제품을 응집하는 단계, 제형화 개질(예를 들어, 안정성 증가 또는 단계의 향상을 위한 구성의 추가), 증기압이 높은 용매의 감소단계 또는 표면적의 증가를 포함할 수 있다. 전처리의 방법은 냉동 응집, 용액상 응집 및 제품의 외형을 보호하거나 반응성 있는 제품의 리오프로텍션(lyoprotection)을 제공하기 위한 구체적인 제형화를 포함하며, 이들은 예를 들어, 미국 특허출원 6,199,297이 참조된다. "표준" 동결건조 조건은 예를 들어, 미국 특허출원 5,031,336 및 "Freeze Drying of Pharmaceuticals" (DeLuca, Patrick P., *J. Vac. Sci. Technol.*, Vol. 14, No. 1, January/February 1977) 및 "The Lyophilization of Pharmaceuticals: A Literature Review" (Williams, N. A., and G. P. Polli,

Journal of Parenteral Science and Technology, Vol. 38, No. 2, March/April 1984)이 참조된다.

[0050] 특정 실시예에 있어서, 상기 동결건조 사이클은 잔류 수분을 함유하는 조밀한 케이크(cake)를 형성하기 위한 질량의 붕괴를 유도하는 인슐린의 유리전이온도(Tg) 위에서 부분적으로 수행될 수 있다. 다른 실시예에 있어서, 상기 동결건조 사이클은 인슐린 입자의 완전 건조를 달성하기 위한 붕괴를 방지하기 위해 인슐린의 유리전이온도 아래에서 수행되었다.

[0051] **C. 비양자성 극성 용매**

[0052] 선택된 pH 메모리를 가진 건조된 인슐린이 얻어진 다음에, 상기 건조된 인슐린은 비양자성 극성 용매에서 용해되고 재구성될 수 있다. 비양자성 극성 용매는 산의 수소(Acidic Hydrogen)가 부족한 용매를 포함한다. 이러한 특징은 건조된 인슐린의 pH 메모리를 유지시키는데 유용하다. 비양자성 극성 용매의 비제한적인 실시예는 디메틸설프옥사이드(dimethylsulfoxide : DMSO), 디메틸포름아미드(dimethylformamide : DMF), 에틸 아세테이트(ethyl acetate), 엔-메틸 피롤리돈(n-methyl pyrrolidone : NMP), 디메틸아세트아미드(dimethylacetamide : DMA), 프로필렌 카보네이트(propylene carbonate) 또는 이들의 혼합물을 포함한다. 이러한 용매들 각각은 잘 알려져 있고, 다양한 소스로부터 상업적으로 이용가능하다.

[0053] 예에서 보는바와 같이, 용해된 인슐린은 안정화된 단량체 또는 이량체 형태의 인슐린을 야기하며, 초-고속 또는 급속 반응 인슐린 제품을 야기할 수도 있다. 추가로, 상기 언급한 바와 같이, 이론에 제한됨을 바라지 않으며, 비양자성 극성 용매 내에 용해된 인슐린은 "준-안정화"로 생각된다. 이러한 준-안정성은 비양자성 극성 용매 내의 인슐린의 용해도 및 인슐린의 pH 메모리의 조합으로부터 파생된 것으로 생각된다.

[0054] **D. 인슐린의 응집 감소 성분**

[0055] 인슐린의 단량체 및/또는 이량체 형태의 응집의 가능성을 추가로 감소시키는 추가 성분은 제형에 첨가될 수 있다. 이러한 성분들은 투여 전(예를 들어, 보관시) 또는 투여 후(예를 들어, 투여 후 또는 대상의 혈류에 주입하기 전)의 제형물 내부의 응집을 감소하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 성분들은 요소, 구안디니움 클로라이드(guanidinium chloride), 아미노산, 설탕, 폴리올(polyol), 폴리머, 산, 계면활성제 또는 이들의 혼합물을 포함하여 사용될 수 있다. 이러한 성분들은 다양한 소스로부터 상업적으로 이용가능하다.

[0056] **E. 제형물의 수분함량**

[0057] 본 발명의 제형물은 비양자성 극성 용매가 상대적으로 높은 양의 사용됨에 따라 낮은 수분 또는 수분함량을 가질 수 있다. 이것은 단량체 또는 이량체의 응집의 가능성을 감소시킴으로서 제형물 내에 인슐린의 단량체 또는 이량체 형태가 존재할 수 있도록 부가적인 안정성을 제공할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 상기 제형물은 상기 제형물의 부피 또는 중량의 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.25%, 0.1%, 0.05%, 0.025%, 0.01% 내지 0%의 수분함량 또는 수분을 가질 수 있다. 그러나 일 실시예에 있어서 물은 본 발명의 제형물이 인슐린 또는 프람린타이드를 포함하는 경우와 같이 조용매로 사용될 수 있다.

[0058] **F. 인슐린/프람린타이드 공제형물(Co-Formulations)**

[0059] 아밀린, 일반적으로 포도당 섭취를 통해 인슐린과 공동분비되는 β 세포 호르몬 역시 제1형 당뇨병 환자에게는 완벽히 부족하다. 아밀린은 식후 혈당 조절을 위한 인슐린을 그들에게 보완하는 몇몇 포도당 조절 호르몬 효과를 보여준다. 천연 사람 아밀린은 몇몇 물리화학적 특성, 저조한 용해도, 자체-응집 및 아밀로이드 섬유의 형성 및 아밀로이드 플라크(plaques) 때문에 치료용 또는 약학적으로 사용하는 것이 적합하지 않다.

[0060] 프람린타이드는 선택적으로 아라-25(Ala-25), 셀-28(Ser-28) 및 셀29(Ser-29)를 프롤린으로 치환함으로써 발견된 사람 아밀린의 유사체이다. 그것은 중요한 신진대사활동을 유지하는 동안 사람 아밀린의 차선의 물리화학적 특성이다. 프람린타이드는 몇몇 상업적인 소스(예를 들어, 아밀린 파마서티컬스(Amylin Pharmaceuticals)의 심린(SymLin®)로부터 광범위하게 이용가능하다.

[0061] 프람린타이드는 전형적으로 인슐린에 더하여 분리된 피하 주사를 통해 투여된다. 이러한 방법은 환자의 몇몇 모집단에서 허용되나, 추가로 주사를 주입하는 것은 이미 매일 인슐린이 여러번 주입된 환자들에게 큰 부담이 된다. 또한, 몇몇 환자는 실수든 의도적이든 프람린타이드 및 인슐린을 주입 전 같은 주사기 내에 혼합하여, 이상 반응 또는 바람직하지 않은 사건이 발생할 가능성이 있다.

[0062] 프람린타이드 및 인슐린을 별도로 투여하는 이유 중 하나는 이러한 약들은 그것들의 버퍼링 시스템과 충돌하여 혼합된 제형물의 호환성을 어렵게 만든다. 예를 들어, 몇몇 인슐린 및 인슐린 유사체는 5 내지 6의 등전점을 갖

고 따라서 약 7의 pH에서 제형된다. 프람린타이드는 10.5보다 큰 등전점을 가지고, 낮은 pH에서 최적화되게 안정하며, 전형적으로 약 4의 pH에서 제형된다. 다른 pH 및 다른 버퍼링 용량하에서의 프람린타이드 및 인슐린 제형물의 상호작용은 종종 수용성 인슐린 성분의 침전 또는 결정질 인슐린 성분의 가용화를 야기한다. 프람린타이드 및 단기- 및 장기-반응 인슐린 제형물의 체외 연구에 따르면, 다양한 양의 인슐린이 고정된 양의 프람린타이드와 믹스될 때 인슐린 용해도의 상당한 변화를 발견했다.

[0063] 이러한 공동-제형물 이슈의 문제점은 본 발명에서 해결된다. 예를 들어, 1 내지 5 또는 2, 3 또는 4 또는 좀 더 구체적으로는 약 2의 pH 메모리를 갖는 프람린타이드는 버퍼 시스템에서 건조될 수 있다. 1 내지 4, 1 내지 3 또는 약 2 또는 6 내지 8 또는 약 7의 pH 메모리를 가지는 인슐린은 동일한 또는 별도의 버퍼 시스템에서 건조될 수 있다. 그 후 상기 건조된 프람린타이드 및 인슐린은 동일한 비양자성 극성 용매 내에서 용해되거나 재구성될 수 있고, 그들 각각의 용해도 및 안정성 특징을 동일 제형물 내에서 유지시킬 수 있다. 이와 같이, 오직 단일한 제형물은 대상에게 프람린타이드 및 인슐린 모두의 투여를 필요로 한다. 이러한 공동-제형물은 식후 혈당치 상승의 자연 생리적 반응을 좀 더 근접하게 모방한 치료를 함으로서 대상의 저항을 더 낮출 것이다. 상기 공동-제형물의 몇몇 특정한 실시예에서, 인슐린의 pH 메모리는 약 2일 수 있고, 프람린타이드의 pH 메모리는 약 2일 수 있다.

[0064] 프람린타이드 뿐만 아니라, 다른 아밀린 작용제들도 본 발명의 맥락에 따라 사용될 수 있다. 이러한 작용제들은 천연 소스에 의해 정화되거나 재조합할 수 있다. 상기 아밀린 작용제들은 사람 또는 비사람일 수 있다. 또한 상기 아밀린 작용제들은 사람 아밀린의 아미노산 배열에 기초하나 하나 또는 그 초과의 아미노산 차이를 가지는 아밀린 유사체, 또는 화학적으로 개질된 아밀린 또는 아밀린 유사체일 수 있다. 아밀린 작용제의 정량은 그것의 생체이용률 및 치료되는 환자에 따라 달라진다. "사람 아밀린"은 체중에 의해 분비되든지, 천연 소스로부터의 분리든지, 합성펩타이드 화학을 통해 제조되든지, 미생물에 의해 유전적으로 변경되어 만들어지거나 사람 펩타이드 호르몬을 포함한다. "아밀린 유사체"는 변경된 아밀린으로 체중에서 분비되는 아밀린과는 다르나, 천연 아밀린과 동일한 반응을 인체에 수용하는 것이 여전히 유효하다.

[0065] **G. 정량**

[0066] 인슐린, 프람린타이드 또는 둘의 혼합물의 임의의 적합한 정량은 본 발명의 제형물을 사용함으로써 투여될 수 있다. 물론, 투여되는 정량은 널리 다음과 같은 알려진 요소들에 따라 다양하게 의존될 것이다: 특정 약물, 염분 또는 이들의 혼합물의 약동학적 특성; 대상의 나이, 건강 또는 중량; 증상의 정도 및 자연; 동시 치료의 종류, 환자 및 치료제의 대사특성; 치료의 빈도; 또는 원하는 효과. 일반적으로, 인슐린은 약 0.5mg/mL 내지 1 약 00mg/mL의 범위 양의 제형물 내에서 발생할 수 있다. 일 실시예에 있어서, 인슐린은 약 3mg/mL 내지 100mg/mL, 3mg/mL 내지 약100mg/mL, 10mg/mL 내지 약 50mg/mL 또는 약 50mg/mL 내지 약100mg/mL의 범위 양의 제형물 내에서 발생한다. 특정 실시예에 있어서, 제형물과 함께 인슐린의 양의 범위는 약 3mg/mL 내지 약 10mg/mL이고, 단량체 형태로 발생하는 인슐린의 상당 부분을 야기시킬 수 있다(실시예의 데이터가 참조된다). 또 다른 실시예에 있어서, 제형물과 함께 인슐린의 양의 범위는 약 10mg/mL 내지 약 50mg/mL이고, 이량체 형태로 발생하는 인슐린의 대부분을 야기시킬 수 있다(실시예의 데이터가 참조된다). 일 실시예에 있어서, 프람린타이드는 제형물 내에서 0.1 내지 10mg/mL 또는 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9 mg/mL 또는 필요에 따른 범위의 양에서 발생한다. 또한, 약의 정량이 사용되는 약 및 질병, 장애 또는 치료해야할 조건들에 따라 다양해질 수 있다는 것은 당업자에게 명백할 것이고, 제형물 내 약의 농축도는 약의 용해도, 정량 및 투여 방법에 따라 다양해질 것이다.

[0067] **H. 추가적인 성분/약학적 첨가제**

[0068] 본 발명의 제형물은 인슐린 또는 프람린타이드를 추가적으로 보호하거나 바람직한 촉각 속성, 점도 범위를 가지도록 하기위한 추가적인 제형을 개발하기 위해 추가적인 성분/약학적 첨가제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 제형은 임의의 하나, 임의의 조합 또는 모든 산화방지제(비제한적인 예는 아스코르브산(ascorbic acid), 시스테인(cysteine), 메티오닌(methionine), 모노티오글리세롤(monothioglycerol), 나트륨 티오설페이트(sodium thiosulfate), 설파이트(sulfites), BHT, BHA, 아스코르빌 팔미테이트(ascorbyl palmitate), 프로필 갈레이트(propyl gallate) 또는 비타민E 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.); 킬레이팅 시약(비제한적인 실시예는 EDTA, EGTA, 주석산(tartaric acid), 글리세린, 구연산(citric acid) 및 이들의 염분을 포함한다.); 및/또는 방부제(알킬 알코올, 벤질 알코올, 메틸 파라벤 또는 프로필 파라벤 또는 이들의 혼합물을 포함한다.)를 추가로 포함할 수 있다. 추가로, 본 발명의 제형물은 또한 비수성 프로틱 용매(비제한적인 실시예로 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol : PEG), 프로필렌 글리콜(propylene glycol : PG), 폴리비닐피롤리돈

(polyvinylpyrrolidone : PVP), 메타옥시프로필렌 글리콜(methoxypropylene glycol : MPEG), 글리세롤, 글리코푸롤(glycofurol) 및 이들의 혼합물을 포함한다.)를 포함할 수 있다.

[0069] **I. 키트/컨테이너**

[0070] 키트 역시 본 발명의 특정 실시예에서 사용되는 것으로 고려된다. 예를 들어, 본 발명의 제형물은 키트 안에 포함될 수 있다. 키트는 컨테이너를 포함할 수 있다. 예를 들어, 일 실시예에 있어서, 제형물은 제형물을 희석하거나 재구성할 필요 없이 대상에게 비경구적인 투여가 준비되어 있는 컨테이너 내부에 구성될 수 있다. 즉, 투여되는 제형물은 컨테이너 내에 저장될 수 있고 필요에 따라 즉시 사용될 수 있다. 저장 컨테이너는 주사기, 펜 주사장치(pen injection device), 자동 주사장치(auto-injector device), 펌프일 수 있다. 적합한 펜/자동 주사장치는 벡턴-디켄슨(Becton-Dickenson), 스웨덴 헬스케어 주식회사(Swedish Healthcare Limited (SHL Group)), 입소메드 Ag(Ypsomed Ag) 및 이와 유사한 곳에서 제조된 펜/자동 주사장치이나 이에 한정되지 않는다. 적합한 펌프는 탄덤 디아비트 케어(Tandem Diabetes Care, Inc), 델시스 제약회사(Delsys Pharmaceuticals) 및 이와 유사한 곳에서 제조된 펌프이나 이에 한정되지 않는다.

[0071] 대안적으로, 본 발명의 키트는 복수의 컨테이너 또는 컨테이너 내의 복수의 구간을 포함할 수 있다. 각 컨테이너 또는 복수의 구간은 예를 들어, 생체적합성 비수성 용매 및 별도의 소분자 약을 저장하기 위해 사용될 수 있다. 그리고 필요에 따라 용매 및 약은 함께 혼합되어 함께 투여될 수 있거나 필요에 따라 나중을 위해 저장될 수 있다.

[0072] **J. 제형물 제조방법**

[0073] 본 발명의 제형물은 다음 단계들을 사용하여 제작될 수 있다. 다음 단계들은 명세서의 일실시예로서 제형물을 만드는데 사용되었다.

[0074] 1. 10 mg/ml의 인슐린 농도에서 원하는 수성 버퍼(특정 버퍼 중, pH 및 농도; 구연산, pH 2.0을 포함) 내에 인슐린 분말(예를 들어 재조합 사람 인슐린, 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 세인트 루이스(Saint Louis), MO)을 용해함으로써 수성 인슐린을 준비하였다.

[0075] 2. 2 mg/ml의 농도에서 수성 버퍼 내부에 용해될 수 있는 프람린타이드는 제외하고 프람린타이드(예를 들어, 암비오팜(AmbioPharm, Inc.), 피치 아일랜드(Beech Island), SC and C S 바이오(C S Bio, Inc.), 멘로 파크(Menlo Park), CA가 명세서의 일 실시예로서 사용되었다)가 비슷하게 준비될 수 있다.

[0076] 3a. 인슐린 또는 프람린타이드 용액을 깨끗한 HPLC 또는 동결건조 병에 분배하였고, 표 1의 동결건조 사이클과 유사하게 또는 이를 따라 동결건조를 하였다.

**표 1**

단계	온도 조건	속도/기간	진공(mTorr)
선반하중	5 °C	1 hr	N/A
냉동	-50 °C	1 °C/min	N/A
냉동 담금	-50 °C	2 hrs	N/A
어닐링을 위한 램프	-15 °C	1 °C/min	N/A
어닐링	-15 °C	1 hrs	N/A
기초 건조	-15 °C	24 hrs	100
두 번째 램프	25 °C	1 °C/min	100
보조 건조	25 °C	8 hrs	100
스토퍼링	25 °C		100

[0078] 3b. 또한, 수성 인슐린 또는 프람린타이드 용액을 마이크로원심분리 튜브 내에 분배하였고 가벼운 열처리(25 - 30°C) 및 진공 분위기에서 원심분리를 통해 건조시켰다.

[0079] 4. 선택된 pH 메모리에서 건조된 인슐린 또는 프람린타이드 분말을 원하는 농도 또는 특정 버퍼 시스템 및 pH에 의해 허락된 농도에서 적절한 피펫으로 DMSO에 용해시켰다.

[0080] 5. 그 결과 용액은 명확성을 위해 시각적으로 평가되고/되거나 630nm에서의 가시분광기를 사용하여 빛의 산란을 분석하였고, 다양한 다운스트림 어플리케이션을 사용하였다.

[0081] **실시예**

[0082] 본 발명은 특정 실시예의 방법을 더욱더 자세하게 기재할 것이다. 하기 실시예는 예시적인 목적으로 제공되며, 어떠한 방식으로든 본 발명을 제한하지 않는다. 용이하게 변경할 수 있거나 본질적으로 동일한 결과가 산출되도록 변경될 수 있는 비제한적인 다양한 실시예는 당업자가 즉시 인식할 것이다.

**실시예 1**

[0083] 이 실시예는 인슐린/DMSO 제형물이 어떻게 준비되는지에 대한 정보를 제공하고, 여기에서 인슐린은 약 2의 pH 메모리를 가진다. 비교를 위한 인슐린/H<sub>2</sub>O 제형물 역시 제공될 것이고 푸리에 변환 적외선 분광기(Fourier-Transform Infrared Spectroscopic (FTIR)) 및 동적광산란(Dynamic Light Scattering (DLS))분석기가 사용되었다(실시예 2 및 3의 각각의 실시예에서 후술). 이 명세서의 실시예에서 사용된 인슐린은 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)(세인트 루이스(Saint Louis), MO)에서 구입한 비-개질 사람 인슐린의 재조합이다.

[0084] **인슐린/버퍼A/DMSO** : 사람 인슐린(시그마-알드리치, 세인트 루이스, MO)의 재조합은 버퍼 A(예를 들어, 10mM 시트레이트+ 1mM EDTA, pH 2.0) 내에서 10 mg/ml의 농도로 용해되었고, HPLC 병에 0.25mL-분액이 분배되었으며, 위의 "제형물 제조방법" 섹션에서 상기한 1 내지 5 단계의 약술된 절차에 따라 동결건조 시켰다. 각 병 내부의 동결건조된 인슐린은 2.0의 pH 메모리를 가졌고 25 mg/mL의 농도로 100 μL의 DMSO로 재구성되었다(인슐린은 육안 검사로는 DMSO에 용해되었다). 그 다음 추가로 이 저장품의 분액은 시트레이트-버퍼된 인슐린/DMSO/H<sub>2</sub>O 용액을 만들기 위해 원하는만큼 버퍼 A에 희석되었다(예를 들어, DMSO 및 버퍼A 내의 인슐린의 12.5 및 5 mg/mL). 이 제형물들은 "Ins-A/DMSO"로 지칭되거나 이들의 희석물을 나타낸다.

[0085] **인슐린/버퍼A/H<sub>2</sub>O** : 증류수, 탈이온수 내에 10 mg/mL의 농도로 인슐린을 용해시키고, 0.25mL 분액을 동결건조시켰다. 인슐린의 소스 및 동결건조 과정은 상기 언급한 바와 동일하다. 병들은 버퍼A(예를 들어, H<sub>2</sub>O + 10mM 시트레이트 + 1mM EDTA, pH 2.0)의 250 μL와 재구성되고, 10 mg/mL의 버퍼A 용액 내에서 인슐린이 제조되었다. 이 저장품의 분액은 인슐린/버퍼A 용액을 만들기 위해 원하는만큼 버퍼 A에 희석되었다(예를 들어, 버퍼A 내의 인슐린의 5 mg/mL). 인슐린은 육안 검사로는 버퍼A에 용해되었다. 이 제형물들은 "Ins-A/H<sub>2</sub>O"로 지칭된다.

[0086] **인슐린/버퍼E/DMSO** : 버퍼E(예를 들어 H<sub>2</sub>O + 10mM 시트레이트 + 1mM EDTA + 10mM NaCl, pH 2.0) 내에 10 mg/mL의 농도로 인슐린을 용해시키고, 0.5mL 분액을 동결건조시켰다. 인슐린의 소스 및 동결건조 과정은 상기 언급한 바와 동일하다. 각 병 내부의 동결건조된 인슐린은 2.0의 pH 메모리를 가지고, 50 mg/mL의 농도로 DMSO의 100 μL와 함께 재구성된다. 인슐린은 육안 검사로는 DMSO에 용해되었다. 이 저장품의 분액은 인슐린/DMSO 용액을 만들기 위해 원하는만큼 DMSO에 희석되었다(예를 들어, DMSO 내부에 인슐린의 30, 25, 10, 5 및 3 mg/mL). 이 제형물들은 "Ins-E/DMSO"로 언급된다.

[0087] **인슐린/버퍼E 및 F/H<sub>2</sub>O** : 증류수, 탈이온수 내에 10 mg/mL의 농도로 인슐린을 용해시키고, 0.5mL 분액을 동결건조시켰다. 인슐린의 소스 및 동결건조 과정은 상기 언급한 바와 동일하다. 하나의 병은 버퍼E의 500 μL와 함께 재구성되고, 10 mg/mL의 버퍼E 용액 내에서 인슐린이 제조되었다. 다른 병은 버퍼F(예를 들어, H<sub>2</sub>O + 10mM 포스페이트-시트레이트(phosphate-citrate) + 1mM EDTA + 10mM NaCl, pH 7.0)의 500 μL와 함께 재구성되고, 10 mg/mL의 버퍼F 용액 내에서 인슐린이 제조되었다. 인슐린은 육안 검사로는 버퍼 E 및 F에 용해되었다. 이러한 샘플들은 "Ins-E/H<sub>2</sub>O" 및 "Ins-F/H<sub>2</sub>O"로 각각 지칭한다.

**실시예 2**

[0088] 이 실시예는 인슐린 형태에 DMSO의 효과를 나타내는 FTIR 데이터를 제공한다. 바이오툴스(BioTools Inc. (Jupiter, Florida USA))가 FTIR 분석을 수행하고 해당 데이터를 제공하였다(아래 참조).

[0089] **FTIR 분석을 위한 재료 및 방법** : FTIR 분석을 위해 아래의 제형물들을 준비하였다.

[0090] 제형1 (F1) : 12.5 mg/mL로 버퍼A의 1부분에 희석된 Ins-A/DMSO

[0091] 제형2 (F2) : 버퍼A에 5 mg/mL로 희석된 Ins-A/H<sub>2</sub>O

[0092] 제형3 (F3) : 버퍼A에 10 mg/mL로 재구성된 Ins-A/H<sub>2</sub>O

- [0093] 제형4 (F4) : 25 mg/mL의 Ins-A/DMSO
- [0094] 제형5 (F5) : 5 mg/mL로 버퍼A의 4부분에 희석된 Ins-A/DMSO
- [0095] FTIR 스펙트럼들은 DTGS 디텍터와 함께 설치된 PROTA FTIR 스펙트럼미터(spectrometer)(바이오툴스)에 의해 각 샘플 및 완충기의 수집시간은 20분, 4cm-1 해상도로 수집되었다. 건본은 설명된 바와 같이 용해되었고, DMSO 기반의 샘플을 위한 75-마이크론(microns) 및 수용성 샘플을 위한 CaF<sub>2</sub> 윈도우(windows)와 함께 6um 바이오셀 내부에 위치시켰다. 모든 스펙트럼 분석(완충기 삭감 및 구조 설명)은 PROTA 소프트웨어 제품군을 사용하여 수행하였다.

[0096] **결과** : 도 1은 형태에 맞는 아미드 1 지역의 FTIR 스펙트럼을 나타낸 것이다. 이 데이터는 테스트 된 제형 1 내지 5의 인슐린 프로파일 비교적 일정하게 유지될 때, 인슐린은 DMSO 내에서 비가역적으로 퍼지지(unfold) 못함을 확인시켜준다. 특히, 제형 3은 혼합된 α-헬릭스(helix), β-시트프로틴(sheet protein)의 전형적 인슐린 스펙트럼을 나타내는 것을 보여준다. 제형 4는 그 프로파일을 유지하면서 더 높은 주파수로 시프트하는 것을 보여준다. 이것은 DMSO 용매의 강한 수소 결합 특성 또는 형태적 변화의 결과일 것이다. 제형 5는 본질적으로 인슐린의 수성 스펙트럼과 동일하다. 이러한 도 1의 데이터는 인슐린이 DMSO 내에서 비가역적으로 퍼지지 못함을 확인시켜준다.

**실시예 3**

[0097] 이 실시예는 DMSO 내의 인슐린의 연결 상태를 확인하기 위해 샘플을 제어하는 비교와 함께 DLS 분석을 제공한다 (예를 들어, 단량체 형태, 이량체 형태, 육합체 형태). 얼리언스 프로테인 래보러터리(Alliance Protein Laboratories (Thousand Oaks, California USA))가 DLS 분석을 수행하였고 해당 데이터를 제공하였다(아래 참조). 버퍼 E 및 버퍼 F 시스템은 DLS 분석의 수행을 위해 필요한 NaCl의 존재 때문에 사용되었다.

[0098] DLS 분석을 위한 재료 및 방법 : 아래의 제형은 DLS 분석을 위해 준비된 것이다:

[0099] 제형 6(F6) : 50 mg/ml 의 Ins-E/DMSO

[0100] 제형 7(F7) : 30 mg/ml 의 Ins-E/DMSO

[0101] 제형 8(F8) : 10 mg/ml 의 Ins-E/DMSO

[0102] 제형 9(F9) : 3 mg/ml 의 Ins-E/DMSO

[0103] 제형 10(F10) : 10 mg/ml 의 Ins-E/H<sub>2</sub>O

[0104] 제형 11(F11) : 10 mg/ml 의 Ins-F/H<sub>2</sub>O

[0105] DLS(또한 준탄성광산란 또는 광자상관분광법으로 알려져 있는)에서 산란광의 시간에 따른 변동을 측정한다. 이러한 변동은 분자의 브로니안 모션(Brownian motion)과 관련되어 있고, 따라서 확산 계수를 결정하는데 사용될 수 있다. 이러한 확산 계수는 일반적으로 스톡-아인슈타인 관계를 통해 유체역학(스토크) 반경, R<sub>h</sub>로 변환된다:

[0106] 
$$R_h = k_B T / 6\pi\eta D$$

[0107]  $k_B$  는 볼츠만 상수,  $T$  는 절대온도,  $\eta$  는 용매 속도 및  $D$  는 확산 계수이다.

[0108] 정규적인 25°C의 온도에서 12 μL 석영산란세포를 사용한 단백질 솔루션(지금은 위아트테크놀로지(Wyatt Technology)) DaynaPro MS/X기구를 사용하여 데이터가 수집되었다. 샘플은 분석큐벳 내에서 로딩하기 전에 먼지 및 큰 입자를 제거하기 위해 원심분리기(Fisher 모델 235A) 내에서 10분 동안 원심분리시켰다. 전형적으로 25 10초 데이터 축적이 기록되고 신호/노이즈의 향상을 위해 평균내어졌다. 그 결과 데이터는 제조자로부터 제공받은 다이내믹 버전 6.12.0.3 소프트웨어로 분석되었다. 평균(z-평균) 크기는 쿠물란트(cumulants) 방법에 기초하였다. 크기분포는 다이날분석방법(Dynals analysis method)을 사용하여 계산되었다. 계측 기구는 완벽하고, 시간 및 거리의 단위에 기초하였다(빛소스의 파장에 의해 거리가 측정되었다). 그러나, 계측 기구는 교정된 라텍스 구체 크기 기준(지름 21 ± 1.5nm, Thermo Scientific로부터 35266 다수의 제품 3020A)을 사용하여 해마다

확인된다. DMSO의 점도 지수는 1.991cp 및 1.4768로 할당되었다.

[0109] **전체 결과** : DMSO 내의 인슐린의 응집 상태는 다이나믹 산란광(DLS)를 사용하여 실험하였다. 단량체 인슐린은 대략 6kDa의 트루(true)MW를 가진다. 따라서, 이량체 인슐린은 12kDa의 트루MW를, 육합체 인슐린은 36kDa의 트루MW를 가질 것이다. 도 2는 준비된 DMSO 및 수용액에서 측정된 인슐린의 보여지는 분자 중량(MW)을 요약한 것이다(즉, 제형 6 내지 10). pH 7.0 및 10 mg/ml의 농도인 수성 제형물 내부 인슐린의 보여지는 MW는 53kDa이다(제형 10). 이러한 높은 농도에서, 용액은 거의 이상적이지 않고, 분자간 효과는 트루MW보다 큰 겔보기MW를 야기한다. 개의치 않고, 측정된 겔보기MW는 육합체 상태에서 인슐린을 나타낸다.

[0110] 인슐린/DMSO 제형물에 대하여, 10 mg/ml(제형 7)에서 겔보기MW는 대략적으로 10 mg/ml에서 수성 인슐린(제형 10)의 MW의 3분의 1크기인 16kDa이고, 이 농도에서 DMSO 내의 인슐린이 이량체에 가까움을 나타낸다. 이것은 또한 농도 증가와 함께 관찰된 겔보기MW 내의 대략적인 선형차이가 이러한 기술을 위해 전형적인 제외된 부피 효과의 인공물과 비슷하기 때문에, 50 mg/ml(제형 8-9) 이상의 농도를 위한 경우가 될 수 있음을 나타낸다. 그러나, 3 mg/ml에서 겔보기MW의 13kDa(제형 6)로의 감소는 이러한 경향에서 벗어나고, 이 농도에서 단량체가 남아 있어 가역적으로 분리됨을 나타낸다.

[0111] 이러한 DLS 연구는, 적절한 사용 농도의 범위에 걸쳐, DMSO 내의 INS-2E의 가장 큰 다중체 상태는 이량체이고, 농도 범위의 낮은 끝부분에, 단량체-이량체의 평형이 존재함을 제안한다. 이러한 연구 결과는 수성 인슐린 제형물과는 대조적이고, 여기서 육합체는 지배적이고-심지어 아연의 부재에도- 단량체는 불안정하고 급속하게 섬유화 된다. 인슐린 연관 및 흡수의 현재 키네틱 모델에 기초하여, 육합체 인슐린을 제외한 인슐린 제형물은 여전히 육합체 인슐린의 상당한 수를 함유하고 있는 현재의 급속-반응 인슐린(예를 들어, Lispro®, Aspart® 등)보다 더 급속하게 키네틱을 흡수하는 결과를 야기한다고 기대된다. 미루어 볼 때, 이러한 물리화학적 연구는 초-급속 반응 인슐린 제형물을 발전시키기 위해 비수성 용매를 사용한 접근이 수성에 대한 접근보다 거의 더 성공적이었음을 보여준다. 급속-반응 제형물을 포함한 수용액에서, 단량체 인슐린은 불안정하고 육합체는 지배적으로 형성되는데, 반면 DMSO 내에서는 DMSO 내에서 좀 더 급속하게 흡수되는 인슐린 단량체/이량체가 열역학적으로 선호되고, 심지어 상대적으로 높은 농도에서 그러하다. 추가적으로, 이러한 데이터(DLS 및 FTIR 데이터를 포함)는 DMSO에 의해 유도된 것으로 보이는 임의의 구조적 변화는 수성 매체 내에서 가역적으로 재구성되는 것을 보여준다.

[0112] **제형 6의 구체적 결과(50 mg/mL 의 Ins-E/DMSO)** : DMSO 내에서 50 mg/mL 의 Ins-E의 크기 분포(산란광도의 히스토그램 vs 유체역학반경)는 도 3에 도시된다. (중량에 따른) 주된 픽은 2.12nm의 평균 반경을 가지고 전체 산란광도의 34.7%를 나타내는 첫번째 픽이다. 그 반경은 수성 구형 단백질 표준에 기초하여 약 20kDa의 물 질량에 해당한다. 110 nm, 2.29 μm 및 9.85 μm의 평균 반경에서 주된 픽에 추가로 큰 반경의 세 픽이 검출되었다. 이러한 서로 다른 세 픽들은 총 산란 광도의 약 2/3에 기여하고, 아래의 표 2의 예상대로 그것들은 실제로 중량 기준으로 매우 작은 퍼센트의 분율을 나타낸다. 불행하게도 1μm보다 큰 종의 무게를 예상하여 의미있는 분율을 만들 가능성은 없었는데 왜냐하면 (1) 이러한 큰 입자로부터의 산란은 파티클의 자세한 모양에 매우 의존(내부반사 때문에)하고, (2) 거의 모든 산란광은 여기서 관찰된 90° 각도에서 오직 매우 작은 분율로 전방으로 방출되기 때문이다. 몇몇 또는 모든 이러한 다른 종들은 인슐린 응집보다는 오염물질 또는 분원전하게 용해된 버피 요소 때문일 수 있다.

**표 2**

(DMSO에서 50 mg/ml Ins-E의 요약)

[0113]

픽 #	평균반경(nm)	추정된 물 질량	인텐시티의 백분율	중량의 백분율(%)
1	2.12	20 kDa	34.7	99.970
2	110	200 MDa	54.5	0.030
3	2,290	250 GDa	5.6	**
4	9,850	7.4 TDa	5.2	**

[0114] \* z-평균 반경 24.5 nm; 평균 인텐시티 182 kcnt/s.

[0115] \*\*이 큰 종의 중량 분율은 확실하게 예상할 수 없어, 이 픽들은 계산에서 제외하였다.

[0116] **제형 7의 구체적 결과 (30 mg/mL의 Ins-E/DMSO)** : DMSO 내에서 30 mg/mL 의 Ins-E에서 얻어진 크기 분포는 도

4에 도시된다. 이 농도에서 메인픽은 2.02nm(예상질량 17kDa)의 약간 낮은 반경으로 쉬프트하였다. 특히, 2.29 및 9.85 μm 의 종들은 더 이상 검출되지 않았고, 이 것들은 용해된 버퍼 성분들임을 강하게 추정한다. 100nm 근처 종들의 상대적인 인텐시티는 역시 상당히 떨어진다. 이러한 농도에서 17.7nm의 새로운 종이 검출되었다. 종들은 총 산란광의 1.9%만을 나타내었지만, 이 종들은 50mg/mL의 샘플 내에서 같은 수준으로 발생하였다는 것이 가능하였고, 그러나 그것은 섬광(10nm 및 더 큰 종으로부터의 강한 산란)에 의해 잃었기 때문에 검출되지 않았다. DLS로부터의 원시 데이터(자기상관함수)는 동적 범위에서 한계를 가지고, 그것은 총 산란광의 ~1% 미만에서 발생하는 종이 종종 임계값 이하로 떨어지는 것을 의미한다. 이 데이터의 요약은 제형 7의 표 3에 의해 제공된다.

**표 3**

(DMSO 내의 30 mg/ml의 Ins-E 요약)

픽 #	평균반경(nm)	추정된 물 질량	인텐시티의 백분율	중량의 백분율(%)
1	2.02	17 kDa	76.7	99.9932
2	17.7	2.8 MDa	1.9	0.0037
3	102	170 MDa	21.4	0.0031

\* z-평균 반경 2.12 nm; 평균 인텐시티 77.9 kcnt/s.

제형 8의 구체적 결과 (10 mg/mL의 Ins-E/DMSO) : DMSO 내에서 10 mg/mL의 Ins-E에서 얻어진 크기 분포는 도 5에 도시된다. 희석은 1.94nm(예상질량 16kDa) 아래로 쉬프트 된 주요픽을 추가로 가진다. 이 농도에서 17.7nm의 피크는 검출되지 않았고, 100nm 근처 종들의 상대적인 인텐시티는 더 떨어졌다. 5.45 μm의 큰 입자의 흔적 역시 존재하였다(그러나 원심분리에 의한 이러한 종들의 제거는 때때로 완벽하지 않다). 표 4는 제형 8의 데이터 요약을 제공한다.

**표 4**

(DMSO 내의 10 mg/ml의 Ins-E 요약)

픽 #	평균반경(nm)	추정된 물 질량	인텐시티의 백분율	중량의 백분율(%)
1	1.94	16 kDa	87.1	99.9975
2	115	220 kDa	12.2	0.0025
3	5450	1.9 TDa	0.7	**

\* z-평균 반경 1.07 nm; 평균 인텐시티 43.1 kcnt/s.

\*\*이 큰 종의 중량 분율은 확실하게 예상할 수 없어, 이 픽들은 계산에서 제외하였다.

제형 9의 구체적 결과 (3 mg/mL의 Ins-E/DMSO) : DMSO 내에서 3 mg/mL의 Ins-E에서 얻어진 크기 분포는 도 6에 도시된다. 이 농도에서 1.79nm에서 메인픽은 떨어진다(예상 질량 13kDa). 이 농도에서 6.34nm의 새로운 픽이 검출되었고, 인슐린 응집의 미량을 나타낼 수 있었다(아마도 동결건조에 의해 발생). 60.8nm 샘플 내에 보여지는 피크는 아마 높은 농도에서 100-110nm로 측정된 같은 재료이다 -- 이 농도에서 쉬프트 모습은 낮은 신호/노이즈 중 어느 하나 때문일 수 있거나, 6.34nm에서 새로운 피크 해결의 결과 일 수 있다. 표 5는 제형 9의 데이터의 요약을 제공한다.

**표 5**

(DMSO 내의 3 mg/ml의 Ins-E 요약)

픽 #	평균반경(nm)	추정된 물 질량	인텐시티의 백분율	중량의 백분율(%)
1	1.79	13 kDa	84.7	99.9393
2	6.34	250 kDa	2.2	0.060
3	60.8	50 MDa	13.1	0.0009

[0125] \* z-평균 반경 0.24 nm; 평균 인텐시티 31.4 kcnt/s.

[0126] 제형 10의 구체적 결과 (Ins-E/H<sub>2</sub>O) : 버퍼E(pH 2.0) 내의 Ins-H<sub>2</sub>O의 크기 분포는 도 7에 도시된다. 메인픽은 3.08nm의 반경에서 발생한다. 그 반경은 47kDa의 예상질량에 해당하고, 이 낮은 pH에서 샘플은 여전히 대부분이 육합체(또는 그 초과)임을 제안한다. 비이상성("분자 크라우딩(crowding)")인 10 mg/mL 용액의 농도 효과는 몇몇 사이즈의 왜곡을 야기할 수 있고, 그러나 그 왜곡이 상, 하로 일어나는 것은 정전 또는 제외된 볼륨 효과의 지배 중 어느 하나에 따라 달라진다. 27nm 및 165nm에서 큰 종의 흔적은 역시 검출되었고, 그러나 이것이 인슐린의 응집 또는 미세입자 오염물질을 나타내는 것인지 불명확하다. 표 6은 제형 10의 데이터 요약을 제공한다.

**표 6**

[0127] (버퍼E 내의 10 mg/ml의 Ins-H<sub>2</sub>O 요약)

픽 #	평균반경(nm)	추정된 몰 질량	인텐시티의 백분율	중량의 백분율(%)
1	3.08	47 kDa	67.5	99.894
2	27.0	7.5 MDa	20.5	0.053
3	165	520 MDa	12.0	0.053

[0128] \* z-평균 반경 4.06 nm; 평균 인텐시티 375kcnt/s.

[0129] 제형 11의 구체적 결과 (Ins-F/H<sub>2</sub>O) : 버퍼F(pH 7.0) 내의 Ins-H<sub>2</sub>O의 크기 분포는 도 7에 도시된다. 메인픽은 3.26nm의 반경에서 발생한다. 그 반경은 53kDa의 예상질량에 해당한다. 여기서 다시 10mg/mL 비이상성 용액의 효과는 사이즈의 몇몇 왜곡을 야기하고, 그러나 중성 pH에서 낮은 전하는 제외된 볼륨 지배와 비슷하게 의미할 수 있으며 따라서 사이즈의 외관은 실제 크기보다 약간 더 크다. 35nm 및 238nm에서 큰 종의 흔적이 역시 검출되었다. 표 7은 제형 11의 데이터 요약을 제공한다.

**표 7**

[0130] (버퍼F 내의 10 mg/ml의 Ins-H<sub>2</sub>O 요약)

픽 #	평균반경(nm)	추정된 몰 질량	인텐시티의 백분율	중량의 백분율(%)
1	3.26	53 kDa	77.2	99.9688
2	35.0	14 MDa	18.2	0.023
3	238	1.2 GDa	4.6	0.0078

[0131] \* z-평균 반경 3.80nm; 평균 인텐시티 447kcnt/s.

**실시예 4**

[0132] 이 예는 본 발명의 제형물의 문맥 내의 프람린타이드 및 인슐린/프람린타이드 공동제형물과 관련한 데이터를 제공한다.

[0133] DMSO 및 DMSO-물 조용매에서 프람린타이드 용해성 : 프람린타이드의 용액은 pH 2.0의 10mM 시트레이트 또는 pH 4.0의 10mM 시트레이트를 각각 2 mg/mL의 트레할로스(trehalose)와 함께 또는 제외하고 2mg/mL의 농도에서 준비되었다. 용액은 진공상태에서 원심분리기로 25-30℃에서 약 3.5시간 건조시키거나, 상기 설명된 바와 같이 동결 건조시켰다.

[0134] 건조된 2.0의 pH 메모리(트레할로스를 함께 또는 제외하고)의 시트레이트-버퍼된 프람린타이드를 깨끗한 DMSO 내에 20 mg/mL에서 간헐적인 부드러운 피펫으로 수분간 완전히 용해시켰다(가장 높은 농도 실험). 그 결과 용액은 육안으로 유동가능하였고 완전히 깨끗했다.

[0135] 건조된 4.0의 pH 메모리의 시트레이트-버퍼된 프람린타이드는 깨끗한 DMSO 내에서 2 mg/mL의 농도로 시작하기 위한 재구성을 하기 위해 상당한 저항이 있었고, 특히 물에서 불용성이었다. 명목상의 프람린타이드의 농도는 2 내지 5 mg/mL에서 DMSO 내의 프람린타이드에 6% 내지 10%의 물을 첨가하면 육안으로 측정 가능한 향상되거나 거의 완벽한 펩타이드의 용해성을 야기한다.

[0136] **인슐린 및 프람린타이드의 공동제형물** : 인슐린 및 프람린타이드의 공동제형물은 아래와 같이 준비된다 : 재조합한 사람 인슐린을 농도 10mg/mL의 10mM 시트레이트/ pH 2의 1.0mM EDTA 버퍼에 용해시켰다. 프람린타이드는 농도 2 mg/mL의 pH 2.0, 10mM 시트레이트에 2 mg/mL의 트레할로스와 함께 또는 제외하고 용해시켰다. 상기 설명된 바와 같이 0.5-mL 분액의 진공 상태에서 원심분리하여 용액을 건조시켰다. 인슐린은 20mg/mL농도의 50 μL의 DMSO와 함께 재구성되었다. 펩타이드-DMSO 용액의 동일 부피는 50mg/ml 인슐린 및 10mg/mL 프람린타이드가 혼합된 용액을 얻기 위해 약 10mg/mL의 트레할로스와 함께 또는 제외하고 혼합되었다. 용액은 육안 검사에 의해 유동성이 있고 완전히 깨끗하다. 인슐린:프람린타이드의 5:1(w/w)의 비율은 하나의 대표적인 치료 투약 비율임이 가능하고, 펩타이드는 단일체, 6시간 이상 고도로 농축된 육안 검사의 솔루션 내에 안정하게 유지된다. 기존의 제형물 기술을 통해, 이러한 펩타이드는 분리 및 호환될 수 없는 버퍼 시스템을 필요로 하고, 신체의 분리 위치에 별도의 주사를 통해 다시 관리를 요구한다 - 이 유익한 치료의 구현에 중요한 장벽.

**실시예 5**

[0137] 이것은 기존의 급속-작용 인슐린 제품(아스파트®, 글루리신®, 리스프로®)과 비교할 때, 본 발명의 제형물의 생체활성, 약리 및 약동학적 능력을 결정하기 위한 예언적인 실시예다.

[0138] **생체활성** : 세포 수준에서의 인슐린 반응은 인슐린 수용체(insulin receptor (IR))에 바인딩, 수용체의 인산화, 인슐린 수용체 물질의 IR-매개인산화 및 PI3 키나아제-Akt 캐스케이드(PI3 kinase-Akt cascade)의 차후 활성화를 포함한다. 수용체 바인딩은 인슐린 분자의 연관 상태에 의해 부분적으로 결정되고, 따라서 인슐린 제형물의 전체 생체활성 뿐만 아니라 펩타이드의 복수-(또는 이량-)체 형태를 측정할 수 있다. 본 발명의 제형물의 생체활성은 R&D 시스템으로부터의 효소결합면역분석(enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA)키트를 사용하여 IR-B 이소폼(인슐린에 민감한 조직에서 발견되는 주요형태를 나타내는 쥐배아섬유아세포 내의 IR 인산화를 유도하기 위한 그들의 능력을 측정하고 비교할 수 있다. IR 바인딩은 단독으로 글루코스 조절 및 지방산 흡수 및 지방분해, 세포 용해물이 인산화된 Akt(Marks, A.G., et al. (2011), "Plasma distribution and signaling activities of IGF-II precursors. Endocrinology," 152:922-930; Denley, A., et al. (2007), "Differential activation of insulin receptor substrates (IRS)-1 and 2 by IGF-activated insulin receptors," Mol. Cell. Biol. 27:3569-3577; and Denley, A., et al. (2006), "Differential activation of insulin receptor isoforms by insulin-like growth factors is determined by the C domain," Endocrinology, 147:1029-1036, 참조로 포함된 모든것이 참조된다)를 위해 유사하게 정량화될 수 있는 궁극적인 생물학적 반응에 좀 더 인접한 다운스트림 신호를 받드시 예측하지 않는다.

[0139] **약리학** : 약리학 연구는 피하 내재 혈관 액세스 포트(vascular access port : VAP)와 함께 옥트레오타이드를 주입한 의식이 있는 돼지 모델을 사용해 수행될 수 있다. 의식이 있는 돼지 모델 비당뇨성 요크셔는 다음에 기초하여 사용될 수 있다 : (a) 인간과 유사한 탄수화물 생리학, (b) IV 카테터의 배치에 적합한 큰 정맥, (c) 장시간 마취(폐확장부전, 폐렴, 어려운 입관/삽관)의 문제점이 제거된 의식있는 모델 및 (d) 복수의 연구를 위해 사용될 수 있는 하나의 돼지. 연구는 허용될 수 있는 인슐린 용량(예를 들어, 0.2 mg/kg)을 갖는 본 발명의 제형물을 테스트하기 위하여 0, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180 및 240분의 시간 지점을 사용하여 설계될 수 있다.

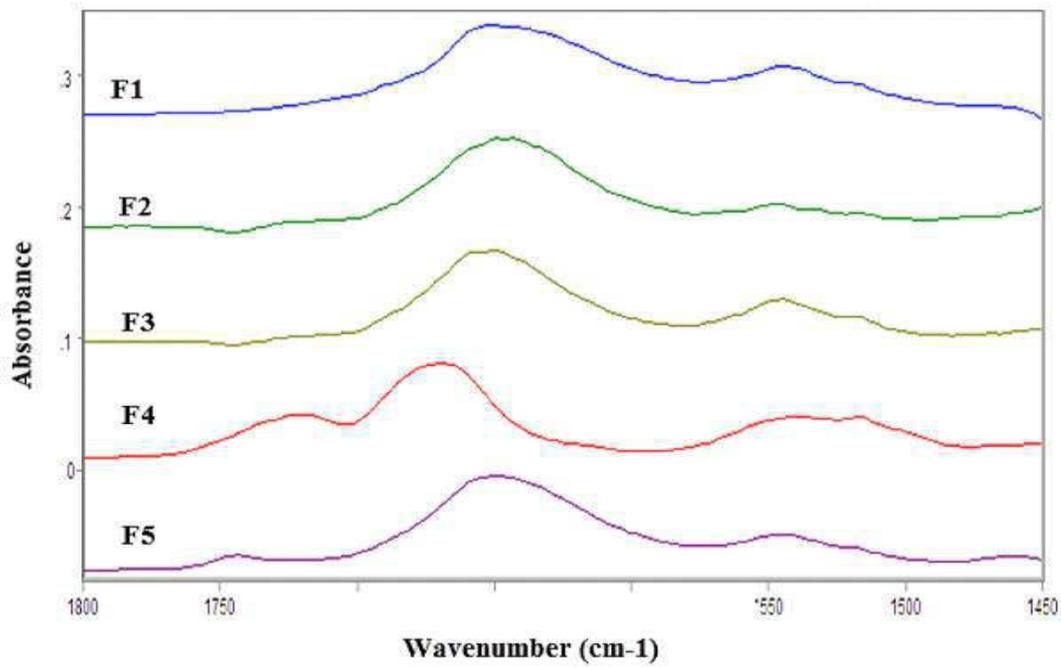
[0140] **약동학** : 혈액 샘플은 OHSU에서 돼지 혈청의 천연 및 유사체 인슐린의 이전의 검증된 분석을 사용하여 분석될 수 있다(Mercodia Iso-Insulin ELISA, Product number 10-1128-01, manufactured by Merckodia AB Uppsala, Sweden가 참조된다). 인슐린 유사체 뿐만 아니라 사람 인슐린의 혈액 수치(예를 들어, 본 발명의 제형물 및 비교되는 수성 제형물)는 지정된 시간의 경과를 통해 정량될 수 있고, 곡선 아래 영역, Cmax, Tmax, 초기 1/2 Tmax값 및 말기 1/2 Tmax값을 비교될 수 있다. 주요 중점은 Tmax 보다는 PK의 변화에 실질적으로 더 민감한 초기- 또는 말기-1/2 Tmax 값일 수 있다. Tmax는 종종 긴 정체가 발생하여 초기 및 말기의 값이 급속하게 상승 및 하강 및 따라서 훨씬 더 신뢰할 수 있는 반면에, 측정하기 어려울 수 있고 잘못된 결과를 산출할 수 있다.

[0141] \* \* \* \* \*

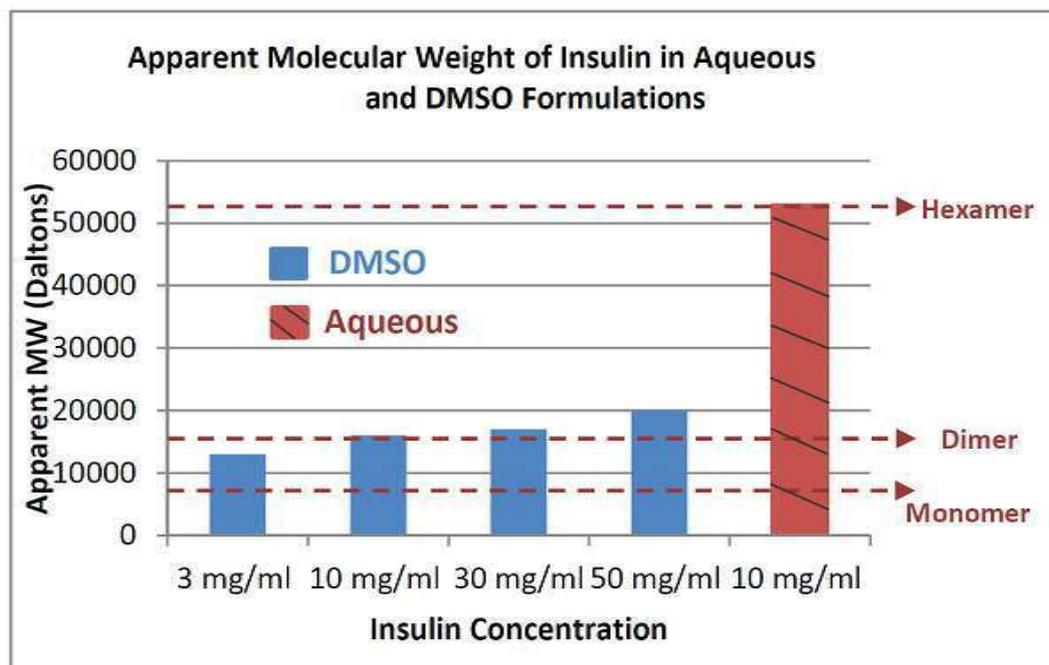
[0142] 본 발명의 명세서에 기재되고 청구된 모든 성분, 구성 또는 방법은 본 발명의 기재 내용의 견지에서 과도한 실험 없이 만들어질 수 있고 수행될 수 있다. 본 발명의 성분, 구성 또는 방법이 특정 실시예로 기재되어 있지만, 본 발명의 내용, 취지 및 범위에서 벗어남 없이 본원에 기재된 방법의 단계의 순서에서 또는 단계에서 그리고 조성물 및/또는 방법에서 성분의 반응을 적용 시킬 수 있는 변화가 있을 수 있음은 당업자에 명백할 것이다.

도면

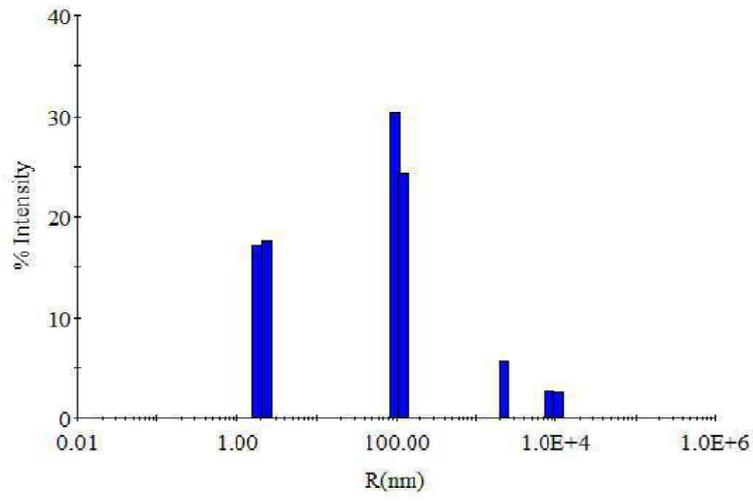
도면1



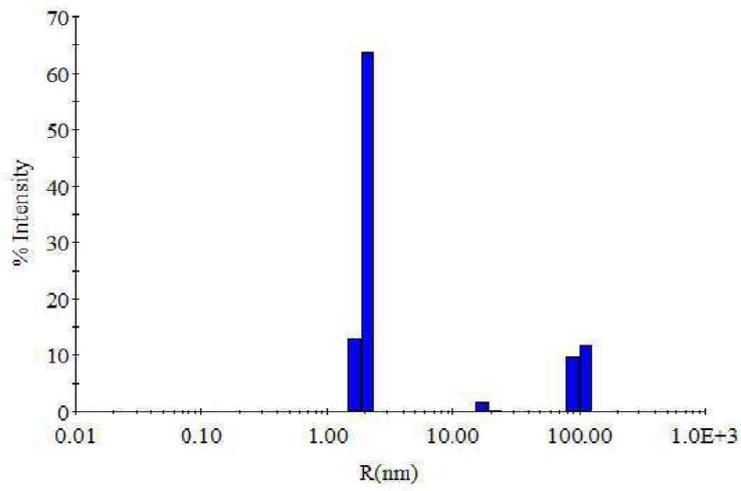
도면2



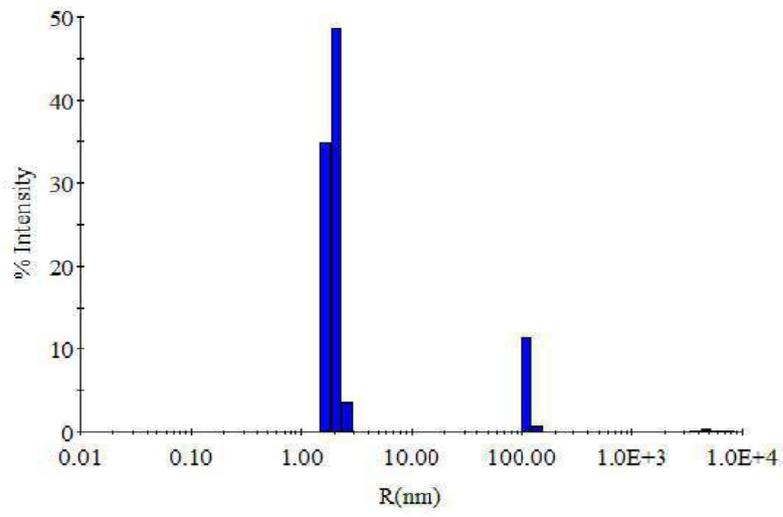
도면3



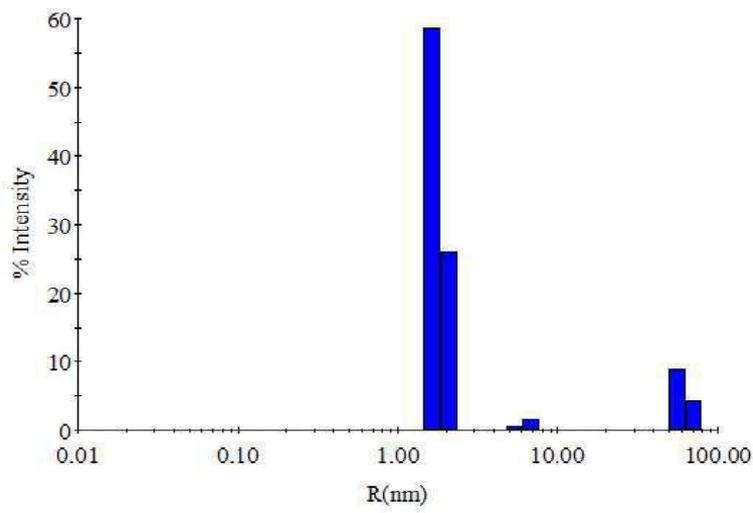
도면4



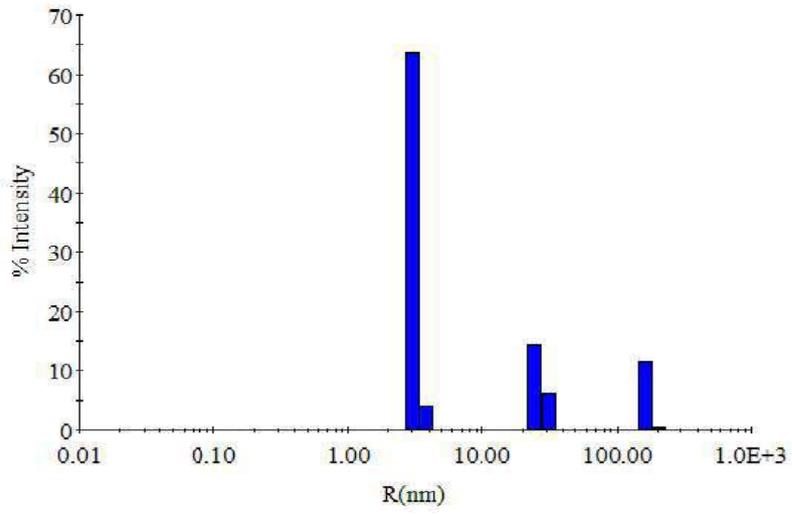
도면5



도면6



도면7



도면8

