(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0054404
(43) 공개일자 2014년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C07K 14/62* (2006.01) *A61K 38/28* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7008437(분할)
(22) 출원일자(국제) 2010년01월27일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2011-7017642
원출원일자(국제) 2010년01월27일
심사청구일자 2011년07월27일
(85) 번역문제출일자 2014년03월28일
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/022277
(87) 국제공개번호 WO 2010/088300
국제공개일자 2010년08월05일
(30) 우선권주장
61/147,878 2009년01월28일 미국(US)
*(뒷면에 계속)*

(71) 출원인
**스마트셀스, 인크.**
미국 01915 매사추세스 베버리 스위트 419이 커밍스 센터 100
(72) 발명자
**자이온, 토드, 씨.**
미국 01945 매사추세스 마블헤드 에반스 로드 45
**랜캐스터, 토마스, 엠.**
미국 02180 매사추세스 스톤햄 엘엠 스트리트 65
(74) 대리인
**양영준, 양영환**

전체 청구항 수 : 총 17 항

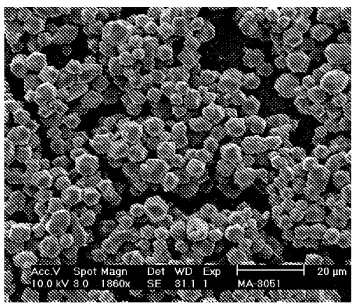
(54) 발명의 명칭 **결정질 인슐린-접합체**

## (57) 요 약

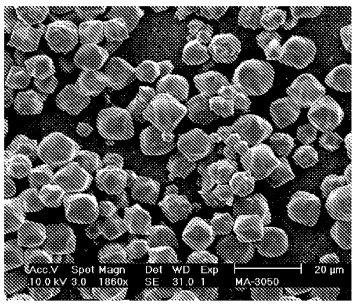
본 개시내용은 결정질 인슐린-접합체를 제공한다. 본 개시내용은 또한 상기 결정질 인슐린-접합체를 포함하는 제제, 치료 방법, 투여 방법 및 제조 방법을 제공한다.

*대 표 도* - 도28

TSAT-$C_6$-AETM-2 (B29)



TSAT-$C_6$-AEM-2 (B29)



(30) 우선권주장
61/159,643 2009년03월12일 미국(US)
61/162,107 2009년03월20일 미국(US)
61/163,084 2009년03월25일 미국(US)
61/219,896 2009년06월24일 미국(US)
61/219,897 2009년06월24일 미국(US)
61/223,572 2009년07월07일 미국(US)
61/252,857 2009년10월19일 미국(US)

## *특허청구의 범위*

### 청구항 1

하기 화학식 IIIb를 갖는 결정질 인슐린-접합체.

<화학식 IIIb>



(상기 식에서,

-B는 $-T-L^{B}-X$이고;

각 경우의 X는 독립적으로 사카라이드를 포함하는 리간드이고;

각 경우의 $L^{B}$는 독립적으로 공유 결합, 또는 T와 X의 공유 접합으로부터 유도된 기이고;

-D는 $-T-L^{D}-W^{I}$이고;

$W^{I}$는 인슐린 분자이고;

각 경우의 $L^{D}$는 독립적으로 공유 결합, 또는 T와 $W^{I}$의 공유 접합으로부터 유도된 기이고;

각 경우의 T는 독립적으로 공유 결합 또는 2가의 직쇄형 또는 분지형, 포화 또는 불포화의 임의로 치환된 $C_{1-30}$ 탄화수소 쇄이고, 여기서 T의 1개 이상의 메틸렌 단위는 -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, $-S(O)_2-$, $-N(R)SO_2-$, $-SO_2N(R)-$, 질소, 산소 및 황으로부터 선택되는 1 내지 5개의 헤테로원자를 갖는 5 내지 10-원 헤테로시클릭 기, $C_{5-10}$ 아릴 기, 또는 질소, 산소 및 황으로부터 선택되는 1 내지 5개의 헤테로원자를 갖는 5 내지 10-원 헤테로아릴 기에 의해 임의로 및 독립적으로 대체되고;

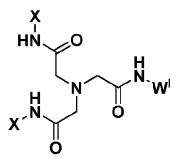
각 경우의 R은 독립적으로 수소, 아미노 또는 히드록실 보호기, 또는 아실 잔기, $C_{5-10}$ 아릴-$C_{1-6}$ 알킬 잔기, $C_{1-12}$ 지방족 잔기, $C_{5-10}$ 아릴 잔기, 질소, 산소 및 황으로부터 선택되는 1 내지 5개의 헤테로원자를 갖는 5 내지 10-원 헤테로아릴 잔기, 또는 1 내지 6개의 탄소 원자를 함유하며, 여기서 1 내지 3개의 탄소 원자가 독립적으로 질소, 산소 및 황으로부터 선택되는 헤테로원자로 대체된 헤테로지방족 잔기이고;

상기 아실은 일반식 $-C(=O)R^{X1}$, $-C(=O)OR^{X1}$, $-C(=O)-O-C(=O)R^{X1}$, $-C(=O)SR^{X1}$, $-C(=O)N(R^{X1})_2$, $-C(=S)R^{X1}$, $-C(=S)N(R^{X1})_2$, $-C(=S)S(R^{X1})$, $-C(=NR^{X1})R^{X1}$, $-C(=NR^{X1})OR^{X1}$, $-C(=NR^{X1})SR^{X1}$ 또는 $-C(=NR^{X1})N(R^{X1})_2$를 갖는 기이고, 여기서 $R^{X1}$은 수소; 할로겐; 치환 또는 비치환된 히드록실이다)

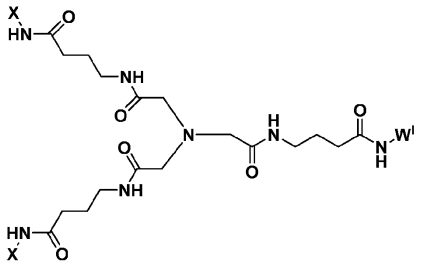
### 청구항 2

제1항에 있어서, 하기 화학식 IIIb-1, IIIb-2, IIIb-3, IIIb-4, IIIb-5, IIIb-6 또는 IIIb-7을 갖는 결정질 인슐린-접합체.

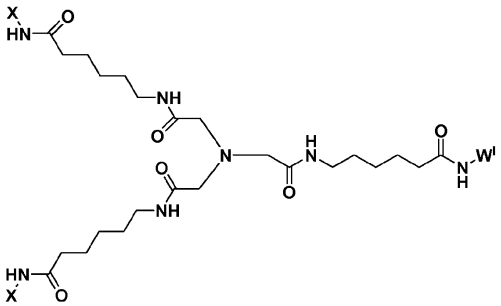
<화학식 IIIb-1>



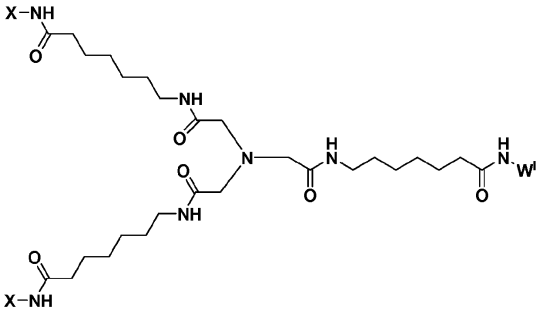
<화학식 IIIb-2>



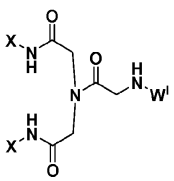
<화학식 IIIb-3>



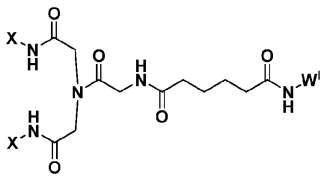
<화학식 IIIb-4>



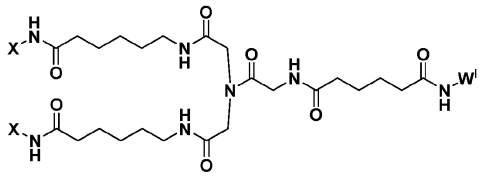
<화학식 IIIb-5>



<화학식 IIIb-6>



<화학식 IIIb-7>



**청구항 3**

하기 화학식 IIIc를 갖는 결정질 인슐린-접합체.

<화학식 IIIc>



(상기 식에서,

-B는 -T-$L^B$-X이고;

각 경우의 X는 독립적으로 사카라이드를 포함하는 리간드이고;

각 경우의 $L^B$는 독립적으로 공유 결합, 또는 T와 X의 공유 접합으로부터 유도된 기이고;

-D는 -T-$L^D$-$W^I$이고;

$W^I$는 인슐린 분자이고;

각 경우의 $L^D$는 독립적으로 공유 결합, 또는 T와 $W^I$의 공유 접합으로부터 유도된 기이고;

각 경우의 T는 독립적으로 공유 결합 또는 2가의 직쇄형 또는 분지형, 포화 또는 불포화의 임의로 치환된 $C_{1-30}$ 탄화수소 쇄이고, 여기서 T의 1개 이상의 메틸렌 단위는 -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -$S(O)_2$-, -N(R)$SO_2$-, -$SO_2$N(R)-, 질소, 산소 및 황으로부터 선택되는 1 내지 5개의 헤테로원자를 갖는 5 내지 10-원 헤테로시클릭 기, $C_{5-10}$ 아릴 기, 또는 질소, 산소 및 황으로부터 선택되는 1 내지 5개의 헤테로원자를 갖는 5 내지 10-원 헤테로아릴 기에 의해 임의로 및 독립적으로 대체되고;

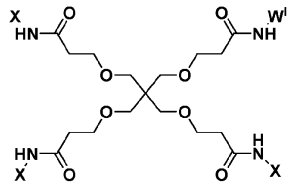
각 경우의 R은 독립적으로 수소, 아미노 또는 히드록실 보호기, 또는 아실 잔기, $C_{5-10}$ 아릴-$C_{1-6}$ 알킬 잔기, $C_{1-12}$ 지방족 잔기, $C_{5-10}$ 아릴 잔기, 질소, 산소 및 황으로부터 선택되는 1 내지 5개의 헤테로원자를 갖는 5 내지 10-원 헤테로아릴 잔기, 또는 1 내지 6개의 탄소 원자를 함유하며, 여기서 1 내지 3개의 탄소 원자가 독립적으로 질소, 산소 및 황으로부터 선택되는 헤테로원자로 대체된 헤테로지방족 잔기이고;

상기 아실은 일반식 -C(=O)$R^{X1}$, -C(=O)O$R^{X1}$, -C(=O)-O-C(=O)$R^{X1}$, -C(=O)S$R^{X1}$, -C(=O)N($R^{X1}$)$_2$, -C(=S)$R^{X1}$, -C(=S)N($R^{X1}$)$_2$, -C(=S)S($R^{X1}$), -C(=N$R^{X1}$)$R^{X1}$, -C(=N$R^{X1}$)O$R^{X1}$, -C(=N$R^{X1}$)S$R^{X1}$ 또는 -C(=N$R^{X1}$)N($R^{X1}$)$_2$를 갖는 기이고, 여기서 $R^{X1}$은 수소; 할로겐; 치환 또는 비치환된 히드록실이다)

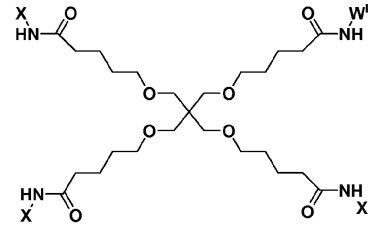
**청구항 4**

제3항에 있어서, 하기 화학식 IIIc-1 또는 IIIc-2를 갖는 결정질 인슐린-접합체.

<화학식 IIIc-1>



<화학식 IIIc-2>



**청구항 5**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 인슐린 분자가 인슐린 리스프로, 인슐린 아스파르트 및 인슐린 글루리신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 결정질 인슐린-접합체.

**청구항 6**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 인슐린 분자가 인슐린 글라진 또는 인슐린 데테미르인 결정질 인슐린-접합체.

**청구항 7**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 인슐린 분자가 $Lys^{B29}$의 엡실론-아미노 기를 통해 접합되는 것인 결정질 인슐린-접합체.

**청구항 8**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 각 경우의 X가 비만노스, 트리만노스, 분지형 트리만노스, 또는 선형 만노스를 포함하는 리간드인 결정질 인슐린-접합체.

**청구항 9**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 각 경우의 X가 독립적으로 아미노에틸글루코스 (AEG), 아미노에틸만노스 (AEM), 아미노에틸비만노스 (AEBM) 또는 아미노에틸트리만노스 (AETM)를 포함하는 리간드인 결정질 인슐린-접합체.

**청구항 10**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 각 경우의 X가 아노머 탄소를 통해 접합된 사카라이드를 포함하는 리간드인 결정질 인슐린-접합체.

**청구항 11**

제10항에 있어서, 아노머 탄소가 알파 아노머인 결정질 인슐린-접합체.

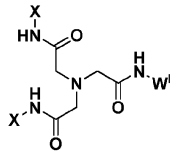
**청구항 12**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 각 경우의 X가 알파 아노머 탄소를 통해 접합체 프레임워크에 접합된 아미노에틸트리만노스 (AETM)이고; $W^{I}$가 $Lys^{B29}$의 엡실론 아미노 기를 통해 접합체 프레임워크에 접합된 인슐린 분자인 결정질 인슐린-접합체.

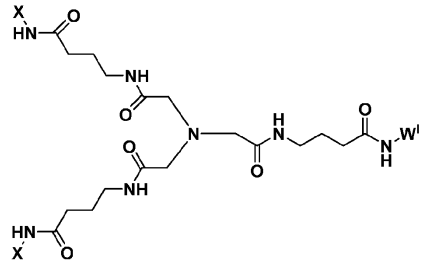
**청구항 13**

하기 화학식 IIIb-1, IIIb-2, IIIb-3, IIIb-4, IIIb-5, IIIb-6, IIIb-7, IIIc-1 또는 IIIc-2의 결정질 인슐린-접합체.

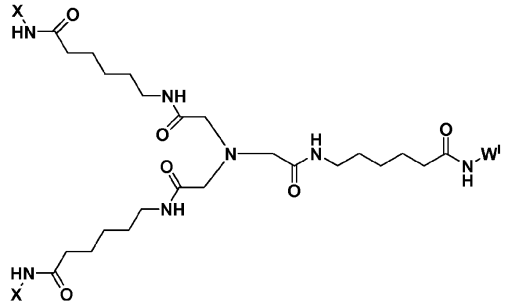
<화학식 IIIb-1>



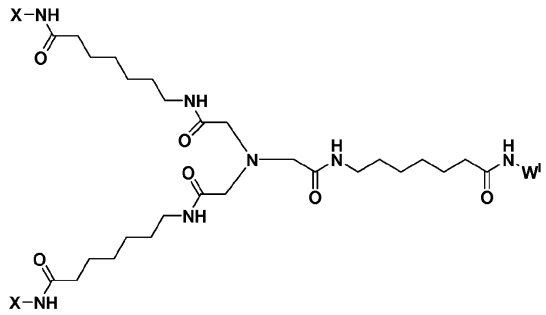
<화학식 IIIb-2>



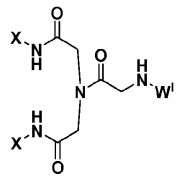
<화학식 IIIb-3>



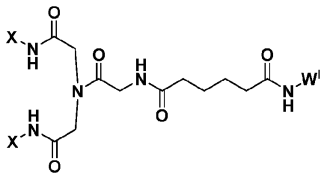
<화학식 IIIb-4>



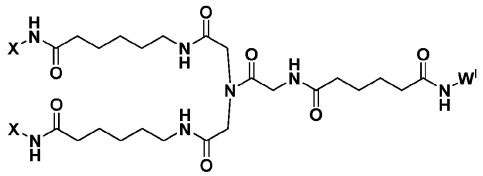
<화학식 IIIb-5>



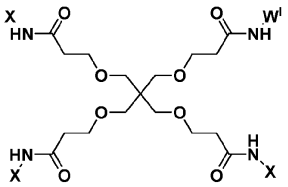
<화학식 IIIb-6>



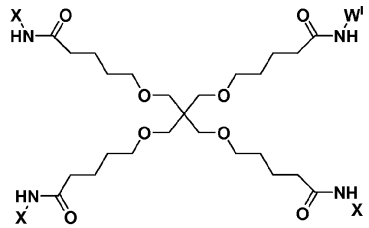
<화학식 IIIb-7>



<화학식 IIIc-1>

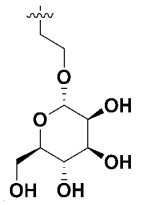
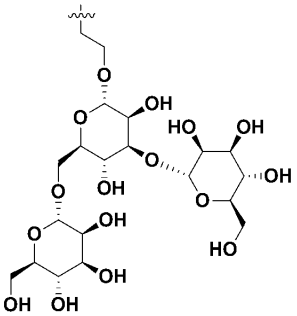
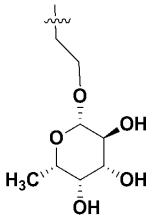


<화학식 IIIc-2>



(상기 식에서,

$W^I$는 $Lys^{B29}$의 엡실론 아미노 기를 통해 접합된 인슐린 분자이고;

각 경우의 -X는  ,  또는  이다)

**청구항 14**

제1항 내지 제4항 및 제13항 중 어느 한 항의 결정질 인슐린-접합체를 포함하는 지속 방출 제제.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 프로타민을 포함하는 제제.

**청구항 16**

제1항 내지 제4항 및 제13항 중 어느 한 항의 결정질 인슐린-접합체의 현탁액을 포함하며, 포유동물로의 결정질 인슐린-접합체의 주입에 의해 효과를 나타내는 펌프 전달 시스템.

**청구항 17**

제1항 내지 제4항 및 제13항 중 어느 한 항에 따른 결정질 인슐린-접합체를 포함하는, 고혈당증의 치료를 위한 제제.

# 명 세 서

## 기 술 분 야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2009년 1월 28일 출원된 U.S. 가출원 번호 61/147,878, 2009년 3월 12일 출원된 U.S. 가출원 번호 61/159,643, 2009년 3월 20일 출원된 U.S. 가출원 번호 61/162,107, 2009년 3월 25일 출원된 U.S. 가출원 번호 61/163,084, 2009년 6월 24일 출원된 U.S. 가출원 번호 61/219,896, 2009년 6월 24일 출원된 U.S. 가출원 번호 61/219,897, 2009년 7월 7일 출원된 U.S. 가출원 번호 61/223,572 및 2009년 10월 19일 출원된 U.S. 가출원 번호 61/252,857을 우선권 주장하며, 이들 각각의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

## 배 경 기 술

[0003] 선행 기술에 공지되어 있는 대다수의 "제어-방출" 약물 전달 시스템 (예를 들어, 효소적으로 불안정한 캡슐로부터의 약물 방출을 기재하고 있는 U.S. 특허 번호 4,145,410 (Sears))은 인간 신체 내에 존재하는 분자 인디케이터 (예를 들어, 대사물)의 양에 정비례하는 농도 및 간격으로 환자에게 약물을 제공할 수 있다. 따라서, 이들 선행 기술 시스템의 약물은 문자 그대로 "제어된" 것이지만, 외부 또는 내부 인자와는 독립적으로 단순히 서방성 포맷으로 제공되는 것이다.

[0004] 주사가능한 인슐린을 사용하는 진성 당뇨병의 치료는 널리 공지되어 있으며, 비제어 서방성 인슐린이 바람직하지 않은 경우의 예가 연구되었다. 사실상, 호르몬의 단순한 대체는 이러한 질환과 관련된 병리학적 후유증을 방지하는데 충분하지 않다는 것이 명백하다. 이들 후유증의 발생은, 환자가 겪는 가변적인 혈액 글루코스 농도에 비례하는 외인성 인슐린을 제공할 수 없다는 것을 반영하는 것으로 여겨진다. 이러한 문제를 해결하기 위하여, 보다 생리학적인 인슐린 전달 시스템을 개발하기 위한 몇몇 생물학적 및 생체공학적 접근법이 제안되어 왔다 (예를 들어, U.S. 특허 번호 4,348,387 (Brownlee et al.); U.S. 특허 번호 5,830,506, 5,902,603 및 6,410,053 (Taylor et al.); 및 U.S. 특허 출원 간행물 번호 2004-0202719 (Zion et al.) 참조).

[0005] 각각의 이들 시스템은 다가 글루코스 결합 분자 (예를 들어, 렉틴 Con A), 및 다가 글루코스 결합 분자에 의해 가역적으로 결합되는 당 기재 성분의 조합에 의존한다. 불행하게도, Con A 및 수많은 다른 쉽게 이용가능한 렉틴은 림프구 증식을 자극하는 잠재력을 갖는다. 특정 유형의 림프구의 표면 상의 탄수화물 수용체에 결합함으로써, 이러한 소위 "분열촉진" 렉틴은 잠재적으로 림프구의 유사분열을 유도하여, 이들의 증식을 유발할 수 있다. Con A를 비롯한 대부분의 분열촉진 렉틴은 선택적 T-세포 미토겐이다. 소수의 렉틴은 덜 선택적이며, T-세포 및 B-세포를 둘 다 자극한다. 분열촉진 렉틴에 대한 생체내 국부 또는 전신 노출은 염증, 세포독성, 대식세포 소화 및 알레르기 반응 (아나필락시스 포함)을 일으킬 수 있다. 또한, 식물 렉틴은 특히 면역원성으로써, 높은 역가의 항-렉틴 특이적 항체의 생성을 일으키는 것으로 공지되어 있다. 따라서, 고도의 주의로 분열촉진 렉틴의 방출을 막지 않는 한, 분열촉진 렉틴이 생체내 방법 및 장치에 그의 천연 그대로의 형태로 사용될 수 없음을 인지할 것이다. 예를 들어, U.S. 특허 번호 5,830,506 (Taylor)에서는 Con A의 사용과 관련된 독성 위험을 강조하고, 약물 전달 장치 (글루코스 및 인슐린 분자가 장치 내외로 자유롭게 퍼지도록 하는 것을 또한 필요로 함) 내에 Con A를 함유하는 것의 중요성 및 어려움을 강조한다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006] 렉틴을 필요로 하지 않는 대안적 제어 약물 전달 시스템을 제공할 수 있다면 렉틴의 이러한 및 다른 생체내 사용과 관련된 위험 및 어려움은 유의하게 감소될 수 있다.

## 과제의 해결 수단

[0007] 한 측면에서, 본 개시내용은 사카라이드, 예컨대 글루코스의 전신 농도에 반응하는 방식으로 인슐린의 약동학 (PK) 및/또는 약력학 (PD) 프로파일을 조절하는 방법을 제공한다. 실시예에서 논의되는 바와 같이, 본 발명자들은 인슐린이 고 친화성 사카라이드 리간드에 접합되는 경우에, 심지어 외인성 다가 사카라이드-결합 분자, 예컨대 Con A의 부재하에서도 사카라이드 농도 변화에 반응하는 PK/PD 프로파일을 나타내도록 할 수 있음을 발견하였다. 이러한 발견은 예상치 못한 것이었고, 단순한 렉틴-무함유 사카라이드-반응성 인슐린 시스템을 생성하기 위한 전례없는 기회를 제공한다.

[0008] 통상적인 인슐린의 지속 방출 제제는 체순환 내로 인슐린을 서서히 방출시키기 위해 일반적으로 사용된다. 예를 들어, PZI (프로타민 아연 인슐린) 제제를 이러한 목적을 위해 사용할 수 있다. 통상적인 인슐린이 프로타민 및 아연과 함께 제제화되는 경우, 일반적으로 결정질 지속 방출 제제를 생성한다. 반면에, 본원에 기재된 인슐린-접합체가 유사한 방법을 이용하여 프로타민 및 아연과 함께 제제화되는 경우, 무정형 제제가 생성되며, 지속 방출을 제공하기 위하여 통상적인 인슐린 (예를 들어, RHI)에 대해 요구되는 것보다 훨씬 많은 프로타민 및 아연을 필요로 한다. 본 발명자들은 놀랍게도 본원에 기재된 특정 인슐린-접합체가 결정화될 수 있음을 발견하였다. 인슐린-접합체는, 사카라이드를 함유하여 입체적으로 다루기 힘든 그의 구조로 인해 표준 인슐린 결정화 조건을 이용하여 결정화시키기 힘들다. 본원에 기재된 바와 같이, 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체는 후속으로 결정질 지속 방출 제제를 제공하기 위해 제제화될 수 있다. 본 개시내용은 결정질 인슐린-접합체 및 그의 제제를 제공한다. 또한, 결정질 인슐린-접합체의 제조 및 사용 방법을 제공한다. 인슐린-접합체의 결정질 제제는 배치 대 배치 재현성 개선, 제제 안정성 증진, 및 장기간의 보관에 걸친 입자 응집의 감소에 있어서 유리할 수 있다.

[0009] <정의>

[0010] 명세서 전반에 걸쳐 사용된 특정 관능기, 화학적 용어 및 일반적 용어의 정의가 하기에 보다 상세히 기재되어 있다. 본 발명의 목적을 위해, 화학 원소는 문헌 [Handbook of Chemistry and Physics, 75th Ed.]의 표지 안쪽의 원소 주기율표 (CAS 버전)에 따라 확인하며, 특정 관능기는 일반적으로 거기에 기재된 바와 같이 정의된다. 추가로, 유기 화학의 일반적 원리, 뿐만 아니라 특정 관능 잔기 및 반응성은 문헌 [Organic Chemistry, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito, 1999]; [Smith and March March's Advanced Organic Chemistry, 5th Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2001]; [Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers, Inc., New York, 1989]; [Carruthers, Some Modern Methods of Organic Synthesis, 3rd Edition, Cambridge University Press, Cambridge, 1987]에 기재되어 있다.

[0011] 아실 - 본원에 사용된 용어 "아실"은 일반 화학식 $-C(=O)R^{X1}$, $-C(=O)OR^{X1}$, $-C(=O)-O-C(=O)R^{X1}$, $-C(=O)SR^{X1}$, $-C(=O)N(R^{X1})_2$, $-C(=S)R^{X1}$, $-C(=S)N(R^{X1})_2$ 및 $-C(=S)S(R^{X1})$, $-C(=NR^{X1})R^{X1}$, $-C(=NR^{X1})OR^{X1}$, $-C(=NR^{X1})SR^{X1}$ 및 $-C(=NR^{X1})N(R^{X1})_2$를 갖는 기를 지칭하고, 여기서 $R^{X1}$은 수소; 할로겐; 치환 또는 비치환된 히드록실; 치환 또는 비치환된 티올; 치환 또는 비치환된 아미노; 치환 또는 비치환된 아실; 시클릭 또는 비-시클릭, 치환 또는 비치환된, 분지형 또는 비분지형 지방족; 시클릭 또는 비-시클릭, 치환 또는 비치환된, 분지형 또는 비분지형 헤테로지방족; 시클릭 또는 비-시클릭, 치환 또는 비치환된, 분지형 또는 비분지형 알킬; 시클릭 또는 비-시클릭, 치환 또는 비치환된, 분지형 또는 비분지형 알케닐; 치환 또는 비치환된 알키닐, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 지방족옥시, 헤테로지방족옥시, 알킬옥시, 헤테로알킬옥시, 아릴옥시, 헤테로아릴옥시, 지방족티옥시, 헤테로지방족티옥시, 알킬티옥시, 헤테로알킬티옥시, 아릴티옥시, 헤테로아릴티옥시, 모노- 또는 디- 지방족아미노, 모노- 또는 디- 헤테로지방족아미노, 모노- 또는 디- 알킬아미노, 모노- 또는 디- 헤테로알킬아미노, 모노- 또는 디- 아릴아미노, 또는 모노- 또는 디- 헤테로아릴아미노이거나; 또는 2개의 $R^{X1}$ 기는 함께 5- 내지 6-원 헤테로시클릭 고리를 형성한다. 예시적인 아실 기에는 알데히드 (-CHO), 카르복실산 ($-CO_2H$), 케톤, 아실 할라이드, 에스테르, 아미드, 이민, 카르보네이트, 카르바메이트 및 우레아가 포함된다. 아실 치환기에는 본원에 기재된 임의의 치환기가 포함되며 (이에 제한되지는 않음), 이는 안정한 잔기 (예를 들어, 각각이 추가로 치환되거나 치환되지 않을 수 있는 지방족, 알킬, 알케닐, 알키닐, 헤테로지방족, 헤테로시클릭, 아릴, 헤테로아릴, 아실, 옥소, 이미노, 티오옥소, 시아노, 이소시아노, 아미노, 아지도, 니트로, 히드록실, 티올, 할로, 지방족아미노, 헤테로지방족아미노, 알킬아미노, 헤테로알킬아미노, 아릴아미노, 헤테로아릴아

미노, 알킬아릴, 아릴알킬, 지방족옥시, 헤테로지방족옥시, 알킬옥시, 헤테로알킬옥시, 아릴옥시, 헤테로아릴옥시, 지방족티옥시, 헤테로지방족티옥시, 알킬티옥시, 헤테로알킬티옥시, 아릴티옥시, 헤테로아릴티옥시, 아실옥시 등)의 형성을 초래한다.

[0012] 지방족 - 본원에 사용된 용어 "지방족" 또는 "지방족 기"는 직쇄 (즉, 비분지형), 분지형 또는 시클릭 ("카르보시클릭")일 수 있고, 완전히 포화될 수 있거나, 또는 하나 이상의 단위의 불포화를 포함할 수 있지만 방향족이 아닌 임의로 치환된 탄화수소 잔기를 나타낸다. 달리 명시되지 않는 한, 지방족 기는 1 내지 12개의 탄소 원자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 지방족 기는 1 내지 6개의 탄소 원자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 지방족 기는 1 내지 4개의 탄소 원자를 함유하고, 또 다른 실시양태에서 지방족 기는 1 내지 3개의 탄소 원자를 함유한다. 적합한 지방족 기에는 선형 또는 분지형, 알킬, 알케닐 및 알키닐 기, 및 그의 하이브리드, 예컨대 (시클로알킬)알킬, (시클로알케닐)알킬 또는 (시클로알킬)알케닐이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다.

[0013] 알케닐 - 본원에 사용된 용어 "알케닐"은 단일 수소 원자의 제거에 의해 하나 이상의 탄소-탄소 이중 결합을 갖는 직쇄 또는 분지쇄 지방족 잔기로부터 유도된 임의로 치환된 1가 기를 나타낸다. 특정 실시양태에서, 본 발명에 사용된 알케닐 기는 2 내지 6개의 탄소 원자를 함유한다. 특정 실시양태에서, 본 발명에 사용된 알케닐 기는 2 내지 5개의 탄소 원자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 본 발명에 사용된 알케닐 기는 2 내지 4개의 탄소 원자를 함유한다. 또 다른 실시양태에서, 사용된 알케닐 기는 2 내지 3개의 탄소 원자를 함유한다. 알케닐 기에는, 예를 들어, 에테닐, 프로페닐, 부테닐, 1-메틸-2-부텐-1-일 등이 포함된다.

[0014] 알킬 - 본원에 사용된 용어 "알킬"은 단일 수소 원자의 제거에 의해 1 내지 6개의 탄소 원자를 함유하는 지방족 잔기로부터 유도된 임의로 치환된 포화, 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소 라디칼을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 본 발명에 사용된 알킬 기는 1 내지 5개의 탄소 원자를 함유한다. 또 다른 실시양태에서, 사용된 알킬 기는 1 내지 4개의 탄소 원자를 함유한다. 또 다른 실시양태에서, 알킬 기는 1 내지 3개의 탄소 원자를 함유한다. 또 다른 실시양태에서, 알킬 기는 1 내지 2개의 탄소를 포함한다. 알킬 라디칼의 예에는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소-부틸, sec-부틸, sec-펜틸, 이소-펜틸, tert-부틸, n-펜틸, 네오펜틸, n-헥실, sec-헥실, n-헵틸, n-옥틸, n-데실, n-운데실, 도데실 등이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다.

[0015] 알키닐 - 본원에 사용된 용어 "알키닐"은 단일 수소 원자의 제거에 의해 하나 이상의 탄소-탄소 삼중 결합을 갖는 직쇄 또는 분지쇄 지방족 잔기로부터 유도된 임의로 치환된 1가 기를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 본 발명에 사용된 알키닐 기는 2 내지 6개의 탄소 원자를 함유한다. 특정 실시양태에서, 본 발명에 사용된 알키닐 기는 2 내지 5개의 탄소 원자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 본 발명에 사용된 알키닐 기는 2 내지 4개의 탄소 원자를 함유한다. 또 다른 실시양태에서, 사용된 알키닐 기는 2 내지 3개의 탄소 원자를 함유한다. 대표적 알키닐 기에는 에티닐, 2-프로피닐 (프로파르길), 1-프로피닐 등이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다.

[0016] 아릴 - 본원에 사용된 바와 같이, 단독으로 또는 더 큰 잔기의 일부로서 ("아르알킬", "아르알콕시" 또는 "아릴옥시알킬"에서와 같이) 사용된 용어 "아릴"은 총 5 내지 10개의 고리 구성원을 갖는 임의로 치환된 모노시클릭 및 비시클릭 고리계를 지칭하며, 여기서 계 내의 하나 이상의 고리는 방향족이고, 계 내의 각각의 고리는 3 내지 7개의 고리 구성원을 함유한다. 용어 "아릴"은 용어 "아릴 고리"와 상호교환적으로 사용될 수 있다. 본 발명의 특정 실시양태에서, "아릴"은 페닐, 비페닐, 나프틸, 안트라실 등을 비롯한 (이에 제한되지는 않음) 방향족 고리계를 지칭하며, 이는 1개 이상의 치환기를 가질 수 있다.

[0017] 아릴알킬 - 본원에 사용된 용어 "아릴알킬"은 아릴 기 (예를 들어, 방향족 또는 헤테로방향족 기)로 치환된 알킬 기를 지칭한다.

[0018] 2가 탄화수소 쇄 - 본원에 사용된 용어 "2가 탄화수소 쇄" (또한 "2가 알킬렌 기"로 지칭됨)는, 폴리메틸렌 기, 즉 $-(CH_2)_z-$이고, 여기서 z는 1 내지 30, 1 내지 20, 1 내지 12, 1 내지 8, 1 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 3, 1 내지 2, 2 내지 30, 2 내지 20, 2 내지 10, 2 내지 8, 2 내지 6, 2 내지 4, 또는 2 내지 3의 양의 정수이다. 치환된 2가 탄화수소 쇄는 하나 이상의 메틸렌 수소 원자가 치환기로 대체된 폴리메틸렌 기이다. 적합한 치환기에는 치환된 지방족 기에 대해 하기 기재된 것들이 포함된다.

[0019] 카르보닐 - 본원에 사용된 용어 "카르보닐"은 탄소-산소 이중 결합을 함유하는 1가 또는 2가 잔기를 지칭한다. 카르보닐 기의 비제한적 예에는 알데히드, 케톤, 카르복실산, 에스테르, 아미드, 에논, 아실 할라이드, 무수물, 우레아, 카르바메이트, 카르보네이트, 티오에스테르, 락톤, 락탐, 히드록사메이트, 이소시아네이트 및 클로로포르메이트가 포함된다.

[0020] 시클로지방족 - 본원에 사용된 바와 같이, 단독으로 또는 더 큰 잔기의 일부로서 사용된 용어 "시클로지방족",

"카르보사이클" 또는 "카르보시클릭"은 3 내지 10개의 구성원을 갖는, 본원에 기재된 바와 같은 임의로 치환된 포화 또는 부분 불포화 시클릭 지방족 모노시클릭 또는 비시클릭 고리계를 지칭한다. 시클로지방족 기에는 비제한적으로 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로펜테닐, 시클로헥실, 시클로헥세닐, 시클로헵틸, 시클로헵테닐, 시클로옥틸, 시클로옥테닐 및 시클로옥타디에닐이 포함된다. 일부 실시양태에서, 시클로알킬은 3 내지 6개의 탄소를 갖는다.

[0021] 할로겐 - 본원에 사용된 용어 "할로" 및 "할로겐"은 불소 (플루오로, -F), 염소 (클로로, -Cl), 브롬 (브로모, -Br) 및 요오드 (요오도, -I)로부터 선택된 원자를 지칭한다.

[0022] 헤테로지방족 - 본원에 사용된 용어 "헤테로지방족" 또는 "헤테로지방족 기"는 탄소 원자 뿐만 아니라 1 내지 5개의 헤테로원자를 갖는, 직쇄 (즉, 비분지형), 분지형 또는 시클릭 ("헤테로시클릭")일 수 있고, 완전히 포화될 수 있거나, 또는 하나 이상의 단위의 불포화를 함유할 수 있지만 방향족이 아닌 임의로 치환된 탄화수소 잔기를 나타낸다. 달리 명시되지 않는 한, 헤테로지방족 기는 1 내지 6개의 탄소 원자를 함유하며, 여기서 1 내지 3개의 탄소 원자가 임의로 및 독립적으로 산소, 질소 및 황으로부터 선택된 헤테로원자로 대체된다. 일부 실시양태에서, 헤테로지방족 기는 1 내지 4개의 탄소 원자를 함유하며, 여기서 1 내지 2개의 탄소 원자가 임의로 및 독립적으로 산소, 질소 및 황으로부터 선택된 헤테로원자로 대체된다. 또 다른 실시양태에서, 헤테로지방족 기는 1 내지 3개의 탄소 원자를 함유하며, 여기서 1개의 탄소 원자가 임의로 및 독립적으로 산소, 질소 및 황으로부터 선택된 헤테로원자로 대체된다. 적합한 헤테로지방족 기에는 선형 또는 분지형, 헤테로알킬, 헤테로알케닐 및 헤테로알키닐 기가 포함되나, 이에 제한되지는 않는다.

[0023] 헤테로아르알킬 - 본원에 사용된 용어 "헤테로아르알킬"은 헤테로아릴에 의해 치환된 알킬 기를 지칭하며, 여기서 알킬 및 헤테로아릴 부분은 독립적으로 임의로 치환된다.

[0024] 헤테로아릴 - 본원에 사용된 바와 같이, 단독으로 또는 더 큰 잔기의 일부로서 (예를 들어, "헤테로아르알킬" 또는 "헤테로아르알콕시") 사용된 용어 "헤테로아릴"은 5 내지 10개의 고리 원자, 바람직하게는 5, 6 또는 9개의 고리 원자를 가지며, 고리 배열 내에 공유하는 6, 10 또는 14개의 π 전자를 가지며, 탄소 원자 뿐만 아니라 1 내지 5개의 헤테로원자를 갖는 임의로 치환된 기를 지칭한다. 헤테로아릴 기에는 비제한적으로, 티에닐, 푸라닐, 피롤릴, 이미다졸릴, 피라졸릴, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 옥사졸릴, 이속사졸릴, 옥사디아졸릴, 티아졸릴, 이소티아졸릴, 티아디아졸릴, 피리딜, 피리다지닐, 피리미디닐, 피라지닐, 인돌리지닐, 퓨리닐, 나프티리디닐 및 프테리디닐이 포함된다. 본원에 사용된 용어 "헤테로아릴" 및 "헤테로아르-"는 또한 헤테로방향족 고리가 하나 이상의 아릴, 카르보시클릭 또는 헤테로시클릭 고리에 융합되고, 여기서 라디칼 또는 부착 지점이 헤테로방향족 고리에 있는 기를 포함한다. 비 제한적인 예에는 인돌릴, 이소인돌릴, 벤조티에닐, 벤조푸라닐, 디벤조푸라닐, 인다졸릴, 벤즈이미다졸릴, 벤즈티아졸릴, 퀴놀릴, 이소퀴놀릴, 신놀리닐, 프탈라지닐, 퀴나졸리닐, 퀴녹살리닐, 4H-퀴놀리지닐, 카르바졸릴, 아크리디닐, 페나지닐, 페노티아지닐, 페녹사지닐, 테트라히드로퀴놀리닐 및 테트라히드로이소퀴놀리닐이 포함된다. 헤테로아릴 기는 모노- 또는 비시클릭일 수 있다. 용어 "헤테로아릴"은 용어 "헤테로아릴 고리", "헤테로아릴 기" 또는 "헤테로방향족"과 상호교환적으로 사용될 수 있고, 이들 중 임의의 용어는 임의로 치환된 고리를 포함한다.

[0025] 헤테로원자 - 본원에 사용된 용어 "헤테로원자"는 질소, 산소 또는 황을 지칭하며, 질소 또는 황의 임의의 산화된 형태, 및 염기성 질소의 임의의 4급화된 형태를 포함한다. 용어 "질소"는 또한 치환된 질소를 포함한다.

[0026] 헤테로시클릭 - 본원에 사용된 용어 "헤테로사이클", "헤테로시클릴", "헤테로시클릭 라디칼" 및 "헤테로시클릭 고리"는 상호교환적으로 사용되고, 상기 정의된 바와 같이 포화 또는 부분 불포화이며 탄소 원자 뿐만 아니라 1개 이상의 헤테로원자를 갖는 임의로 치환된 안정한 5- 내지 7-원 모노시클릭 또는 7- 내지 10-원 비시클릭 헤테로시클릭 잔기를 지칭한다. 헤테로시클릭 고리는 임의의 헤테로원자 또는 탄소 원자에서 그의 펜던트 기에 부착되어 안정한 구조를 생성할 수 있고, 임의의 고리 원자는 임의로 치환될 수 있다. 이러한 포화 또는 부분 불포화 헤테로시클릭 라디칼의 예에는 비제한적으로, 테트라히드로푸라닐, 테트라히드로티에닐, 피롤리디닐, 피롤리도닐, 피페리디닐, 피롤리닐, 테트라히드로퀴놀리닐, 테트라히드로이소퀴놀리닐, 데카히드로퀴놀리닐, 옥사졸리디닐, 피페라지닐, 디옥사닐, 디옥솔라닐, 디아제피닐, 옥사제피닐, 티아제피닐, 모르폴리닐 및 퀴누클리디닐이 포함된다. 용어 "헤테로사이클", "헤테로시클릴", "헤테로시클릴 고리", "헤테로시클릭 기", "헤테로시클릭 잔기" 및 "헤테로시클릭 라디칼"은 본원에서 상호교환적으로 사용되고, 또한 헤테로시클릴 고리가 하나 이상의 아릴, 헤테로아릴 또는 카르보시클릭 고리에 융합된 기, 예컨대 인돌리닐, 3H-인돌릴, 크로마닐, 페난트리디닐 또는 테트라히드로퀴놀리닐 (여기서, 라디칼 또는 부착 지점은 헤테로시클릴 고리 상에 있음)을 포함한다. 헤테로시클릴 기는 모노- 또는 비시클릭일 수 있다. 용어 "헤테로시클릴알킬"은 헤테로시클릴에 의해 치환된

알킬 기를 지칭하며, 여기서 알킬 및 헤테로시클릴 부분은 독립적으로 임의로 치환된다.

[0027] 불포화 - 본원에 사용된 용어 "불포화"는 잔기가 하나 이상의 이중 또는 삼중 결합을 갖는다는 것을 의미한다.

[0028] 부분 불포화 - 본원에 사용된 용어 "부분 불포화"는 하나 이상의 이중 또는 삼중 결합을 포함하는 고리 잔기를 지칭한다. 본원에 정의된 바와 같이, 용어 "부분 불포화"는 다중 부위의 불포화를 갖는 고리를 포함하도록 의도되지만, 아릴 또는 헤테로아릴 잔기를 포함하는 것으로 의도되지는 않는다.

[0029] 임의로 치환된 - 본원에 기재된 바와 같이, 본 발명의 화합물은 "임의로 치환된" 잔기를 함유할 수 있다. 일반적으로, 용어 "치환된"은, 용어 "임의로"가 앞에 있든 없든, 지정된 잔기의 1개 이상의 수소가 적합한 치환기로 대체된다는 것을 의미한다. 달리 나타내지 않는 한, "임의로 치환된" 기는 기의 각각의 치환가능한 위치에 적합한 치환기를 가질 수 있고, 임의의 주어진 구조 내의 하나 초과의 위치가 특정 군으로부터 선택된 1개의 초과의 치환기로 치환될 수 있는 경우, 치환기는 모든 위치에서 동일하거나 상이할 수 있다. 본 발명에 의해 계획된 치환기의 조합은 바람직하게는 안정하거나 화학적으로 사용가능한 화합물의 형성을 일으키는 것이다. 본원에 사용된 용어 "안정한"은 그의 생성, 검출, 특정 실시양태에서는 그의 회수, 정제, 및 하나 이상의 본원에 개시된 목적을 위한 용도가 허용되는 조건에 적용시킬 경우에 실질적으로 변경되지 않는 화합물을 지칭한다.

[0030] "임의로 치환된" 기의 치환가능한 탄소 원자 상의 적합한 1가 치환기는 독립적으로 할로겐; $-(CH_2)_{0-4}R^{\circ}$; $-(CH_2)_{0-4}OR^{\circ}$; $-O-(CH_2)_{0-4}C(O)OR^{\circ}$; $-(CH_2)_{0-4}CH(OR^{\circ})_2$; $-(CH_2)_{0-4}SR^{\circ}$; $R^{\circ}$로 치환될 수 있는 $-(CH_2)_{0-4}Ph$; $R^{\circ}$로 치환될 수 있는 $-(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-1}Ph$; $R^{\circ}$로 치환될 수 있는 -CH=CHPh; $-NO_2$; -CN; $-N_3$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^{\circ})_2$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^{\circ})C(O)R^{\circ}$; $-N(R^{\circ})C(S)R^{\circ}$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^{\circ})C(O)NR^{\circ}_2$; $-N(R^{\circ})C(S)NR^{\circ}_2$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^{\circ})C(O)OR^{\circ}$; $-N(R^{\circ})N(R^{\circ})C(O)R^{\circ}$; $-N(R^{\circ})N(R^{\circ})C(O)NR^{\circ}_2$; $-N(R^{\circ})N(R^{\circ})C(O)OR^{\circ}$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)R^{\circ}$; $-C(S)R^{\circ}$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)OR^{\circ}$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)SR^{\circ}$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)OSiR^{\circ}_3$; $-(CH_2)_{0-4}OC(O)R^{\circ}$; $-OC(O)(CH_2)_{0-4}SR-$, $SC(S)SR^{\circ}$; $-(CH_2)_{0-4}SC(O)R^{\circ}$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)NR^{\circ}_2$; $-C(S)NR^{\circ}_2$; $-C(S)SR^{\circ}$; $-SC(S)SR^{\circ}$; $-(CH_2)_{0-4}OC(O)NR^{\circ}_2$; $-C(O)N(OR^{\circ})R^{\circ}$; $-C(O)C(O)R^{\circ}$; $-C(O)CH_2C(O)R^{\circ}$; $-C(NOR^{\circ})R^{\circ}$; $-(CH_2)_{0-4}SSR^{\circ}$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)_2R^{\circ}$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)_2OR^{\circ}$; $-(CH_2)_{0-4}OS(O)_2R^{\circ}$; $-S(O)_2NR^{\circ}_2$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)R^{\circ}$; $-N(R^{\circ})S(O)_2NR^{\circ}_2$; $-N(R^{\circ})S(O)_2R^{\circ}$; $-N(OR^{\circ})R^{\circ}$; $-C(NH)NR^{\circ}_2$; $-P(O)_2R^{\circ}$; $-P(O)R^{\circ}_2$; $-OP(O)R^{\circ}_2$; $-OP(O)(OR^{\circ})_2$; $SiR^{\circ}_3$; $-(C_{1-4}$ 직쇄형 또는 분지형 알킬렌)O-$N(R^{\circ})_2$; 또는 $-(C_{1-4}$ 직쇄형 또는 분지형 알킬렌)C(O)O-$N(R^{\circ})_2$이고, 여기서 각각의 $R^{\circ}$는 하기 정의된 바와 같이 치환될 수 있고, 독립적으로 수소, $C_{1-6}$ 지방족, $-CH_2Ph$, $-O(CH_2)_{0-1}Ph$, 또는 질소, 산소 또는 황으로부터 독립적으로 선택된 0 내지 4개의 헤테로원자를 갖는 5 내지 6원 포화, 부분 불포화, 또는 아릴 고리이며, 또는 상기 정의와 같더라도 2개의 독립적인 경우의 $R^{\circ}$는 이들의 개재 원자(들)과 함께 질소, 산소 또는 황으로부터 독립적으로 선택된 0 내지 4개의 헤테로원자를 갖는 3 내지 12원 포화, 부분 불포화, 또는 아릴 모노- 또는 비시클릭 고리(하기 정의된 바와 같이 치환될 수 있음)를 형성한다.

[0031] $R^{\circ}$ (또는 2개의 독립적인 경우의 $R^{\circ}$와 이들의 개재 원자에 의해 함께 형성된 고리)에 대한 적합한 1가 치환기는 독립적으로 할로겐, $-(CH_2)_{0-2}R^{\bullet}$, -(할로$R^{\bullet}$), $-(CH_2)_{0-2}OH$, $-(CH_2)_{0-2}OR^{\bullet}$, $-(CH_2)_{0-2}CH(OR^{\bullet})_2$; -O(할로$R^{\bullet}$), -CN, $-N_3$, $-(CH_2)_{0-2}C(O)R^{\bullet}$, $-(CH_2)_{0-2}C(O)OH$, $-(CH_2)_{0-2}C(O)OR^{\bullet}$, $-(CH_2)_{0-2}SR^{\bullet}$, $-(CH_2)_{0-2}SH$, $-(CH_2)_{0-2}NH_2$, $-(CH_2)_{0-2}NHR^{\bullet}$, $-(CH_2)_{0-2}NR^{\bullet}_2$, $-NO_2$, $-SiR^{\bullet}_3$, $-OSiR^{\bullet}_3$, $-C(O)SR^{\bullet}$, $-(C_{1-4}$ 직쇄형 또는 분지형 알킬렌)$C(O)OR^{\bullet}$, 또는 $-SSR^{\bullet}$이고, 여기서 각각의 $R^{\bullet}$는 비치환되거나, 또는 "할로"가 앞에 있는 경우에 1개 이상의 할로겐으로만 치환되고, $C_{1-4}$ 지방족, $-CH_2Ph$, $-O(CH_2)_{0-1}Ph$, 또는 질소, 산소 또는 황으로부터 독립적으로 선택된 0 내지 4개의 헤테로원자를 갖는 5 내지 6원 포화, 부분 포화, 또는 아릴 고리로부터 독립적으로 선택된다. $R^{\circ}$의 포화 탄소 원자에 대해 적합한 2가 치환기에는 =O 및 =S가 포함된다.

[0032] "임의로 치환된" 기의 포화 탄소 원자에 대해 적합한 2가 치환기에는 =O, =S, $=NNR^*_2$, $=NNHC(O)R^*$, $=NNHC(O)OR^*$, $=NNHS(O)_2R^*$, $=NR^*$, $=NOR^*$, $-O(C(R^*_2))_{2-3}O-$ 또는 $-S(C(R^*_2))_{2-3}S-$가 포함되며; 여기서 각각의 독립적인 경우의 $R^*$은 수소, 하기 정의된 바와 같이 치환될 수 있는 $C_{1-6}$ 지방족, 또는 질소, 산소 또는 황으로부터 독립적으로 선택된 0 내지 4개의 헤테로원자를 갖는 비치환된 5 내지 6원 포화, 부분 불포화 또는 아릴 고리로부터 선택된다. "임의로 치환된" 기의 인접 치환가능한 탄소에 결합된 적합한 2가 치환기에는 $-O(CR^*_2)_{2-3}O-$가 포함되며, 여기서 각각의 독립적인 경우의 $R^*$이 수소, 하기 정의된 바와 같이 치환될 수 있는 $C_{1-6}$ 지방족, 또는 질소, 산소 또는 황으로부터 독립적으로 선택된 0 내지 4개의 헤테로원자를 갖는 비치환된 5 내지 6원 포화, 부분 불포화 또는 아릴 고리로부터 선택된다.

[0033] $R^*$의 지방족 기에 대해 적합한 치환기에는 할로겐, $-R^\bullet$, -(할로$R^\bullet$), -OH, $-OR^\bullet$, -O(할로$R^\bullet$), -CN, -C(O)OH, $-C(O)OR^\bullet$, $-NH_2$, $-NHR^\bullet$, $-NR^\bullet_2$, 또는 $-NO_2$가 포함되고, 여기서 각각의 $R^\bullet$는 비치환되거나, 또는 "할로"가 앞에 있는 경우에 1개 이상의 할로겐으로만 치환되고, 독립적으로 $C_{1-4}$ 지방족, $-CH_2Ph$, $-O(CH_2)_{0-1}Ph$, 또는 질소, 산소 또는 황으로부터 독립적으로 선택된 0 내지 4개의 헤테로원자를 갖는 5 내지 6원 포화, 부분 불포화, 또는 아릴 고리이다.

[0034] "임의로 치환된" 기의 치환가능한 질소에 대해 적합한 치환기에는 $-R^\dagger$, $-NR^\dagger_2$, $-C(O)R^\dagger$, $-C(O)OR^\dagger$, $-C(O)C(O)R^\dagger$, $-C(O)CH_2C(O)R^\dagger$, $-S(O)_2R^\dagger$, $-S(O)_2NR^\dagger_2$, $-C(S)NR^\dagger_2$, $-C(NH)NR^\dagger_2$ 또는 $-N(R^\dagger)S(O)_2R^\dagger$가 포함되고; 여기서 각각의 $R^\dagger$는 독립적으로 수소, 하기 정의된 바와 같이 치환될 수 있는 $C_{1-6}$ 지방족, 비치환된 -Oph, 또는 질소, 산소 또는 황으로부터 독립적으로 선택된 0 내지 4개의 헤테로원자를 갖는 비치환된 5 내지 6원 포화, 부분 불포화, 또는 아릴 고리이거나, 또는 상기 정의와 같더라도 2개의 독립적인 경우의 $R^\dagger$는 이들의 개재 원자(들)과 함께 질소, 산소 또는 황으로부터 독립적으로 선택된 0 내지 4개의 헤테로원자를 갖는 비치환된 3 내지 12원 포화, 부분 불포화, 또는 아릴 모노- 또는 비시클릭 고리를 형성한다.

[0035] $R^\dagger$의 지방족 기에 대해 적합한 치환기는 독립적으로 할로겐, $-R^\bullet$, -(할로$R^\bullet$), -OH, $-OR^\bullet$, -O(할로$R^\bullet$), -CN, -C(O)OH, $-C(O)OR^\bullet$, $-NH_2$, $-NHR^\bullet$, $-NR^\bullet_2$ 또는 $-NO_2$이고, 여기서 각각의 $R^\bullet$는 비치환되거나, 또는 "할로"가 앞에 있는 경우 1개 이상의 할로겐으로만 치환되고, 독립적으로 $C_{1-4}$ 지방족, $-CH_2Ph$, $-O(CH_2)_{0-1}Ph$, 또는 질소, 산소 또는 황으로부터 독립적으로 선택된 0 내지 4개의 헤테로원자를 갖는 5 내지 6원 포화, 부분 불포화, 또는 아릴 고리이다.

[0036] 적합한 보호기 - 본원에 사용된 용어 "적합한 보호기"는 화합물 내의 그의 위치 따라 달라지는 아미노 보호기 또는 히드록실 보호기를 지칭하고, 문헌 [Protecting Groups in Organic Synthesis, T. W. Greene and P. G. M. Wuts, 3rd edition, John Wiley & Sons, 1999]에 상세히 기재되어 있는 것들을 포함한다.

[0037] 적합한 아미노-보호기에는 메틸 카르바메이트, 에틸 카르바메이트, 9-플루오레닐메틸 카르바메이트 (Fmoc), 9-(2-술포)플루오레닐메틸 카르바메이트, 9-(2,7-디브로모)플루오로에닐메틸 카르바메이트, 2,7-디-t-부틸-[9-(10,10-디옥소-10,10,10,10-테트라히드로티옥산틸)]메틸 카르바메이트 (DBD-Tmoc), 4-메톡시페나실 카르바메이트 (Phenoc), 2,2,2-트리클로로에틸 카르바메이트 (Troc), 2-트리메틸실릴에틸 카르바메이트 (Teoc), 2-페닐에틸 카르바메이트 (hZ), 1-(1-아다만틸)-1-메틸에틸 카르바메이트 (Adpoc), 1,1-디메틸-2-할로에틸 카르바메이트, 1,1-디메틸-2,2-디브로모에틸 카르바메이트 (DB-t-BOC), 1,1-디메틸-2,2,2-트리클로로에틸 카르바메이트 (TCBOC), 1-메틸-1-(4-비페닐릴)에틸 카르바메이트 (Bpoc), 1-(3,5-디-t-부틸페닐)-1-메틸에틸 카르바메이트 (t-Bumeoc), 2-(2'- 및 4'-피리딜)에틸 카르바메이트 (Pyoc), 2-(N,N-디시클로헥실카르복스아미도)에틸 카르바메이트, t-부틸 카르바메이트 (BOC), 1-아다만틸 카르바메이트 (Adoc), 비닐 카르바메이트 (Voc), 알릴 카르바메이트 (Alloc), 1-이소프로필알릴 카르바메이트 (Ipaoc), 신나밀 카르바메이트 (Coc), 4-니트로신나밀 카르바메이트 (Noc), 8-퀴놀릴 카르바메이트, N-히드록시피페리디닐 카르바메이트, 알킬디티오 카르바메이트, 벤질 카르바메이트 (Cbz), p-메톡시벤질 카르바메이트 (Moz), p-니트로벤질 카르바메이트, p-브로모벤질 카르바메이트, p-클로로벤질 카르바메이트, 2,4-디클로로벤질 카르바메이트, 4-메틸술피닐벤질 카르바메이트 (Msz),

9-안트릴메틸 카르바메이트, 디페닐메틸 카르바메이트, 2-메틸티오에틸 카르바메이트, 2-메틸술포닐에틸 카르바메이트, 2-(p-톨루엔술포닐)에틸 카르바메이트, [2-(1,3-디티아닐)]메틸 카르바메이트 (Dmoc), 4-메틸티오페닐 카르바메이트 (Mtpc), 2,4-디메틸티오페닐 카르바메이트 (Bmpc), 2-포스포니오에틸 카르바메이트 (Peoc), 2-트리페닐포스포니오이소프로필 카르바메이트 (Ppoc), 1,1-디메틸-2-시아노에틸 카르바메이트, m-클로로-p-아실옥시벤질 카르바메이트, p-(디히드록시보릴)벤질 카르바메이트, 5-벤즈이속사졸릴메틸 카르바메이트, 2-(트리플루오로메틸)-6-크로모닐메틸 카르바메이트 (Tcroc), m-니트로페닐 카르바메이트, 3,5-디메톡시벤질 카르바메이트, o-니트로벤질 카르바메이트, 3,4-디메톡시-6-니트로벤질 카르바메이트, 페닐(o-니트로페닐)메틸 카르바메이트, 페노티아지닐-(10)-카르보닐 유도체, N'-p-톨루엔술포닐아미노카르보닐 유도체, N'-페닐아미노티오카르보닐 유도체, t-아밀 카르바메이트, S-벤질 티오카르바메이트, p-시아노벤질 카르바메이트, 시클로부틸 카르바메이트, 시클로헥실 카르바메이트, 시클로펜틸 카르바메이트, 시클로프로필메틸 카르바메이트, p-데실옥시벤질 카르바메이트, 2,2-디메톡시카르보닐비닐 카르바메이트, o-(N,N-디메틸카르복스아미도)벤질 카르바메이트, 1,1-디메틸-3-(N,N-디메틸카르복스아미도)프로필 카르바메이트, 1,1-디메틸프로피닐 카르바메이트, 디(2-피리딜)메틸 카르바메이트, 2-푸라닐메틸 카르바메이트, 2-요오도에틸 카르바메이트, 이소보르닐 카르바메이트, 이소부틸 카르바메이트, 이소니코티닐 카르바메이트, p-(p'-메톡시페닐아조)벤질 카르바메이트, 1-메틸시클로부틸 카르바메이트, 1-메틸시클로헥실 카르바메이트, 1-메틸-1-시클로프로필메틸 카르바메이트, 1-메틸-1-(3,5-디메톡시페닐)에틸 카르바메이트, 1-메틸-1-(p-페닐아조페닐)에틸 카르바메이트, 1-메틸-1-페닐에틸 카르바메이트, 1-메틸-1-(4-피리딜)에틸 카르바메이트, 페닐 카르바메이트, p-(페닐아조)벤질 카르바메이트, 2,4,6-트리-t-부틸페닐 카르바메이트, 4-(트리메틸암모늄)벤질 카르바메이트, 2,4,6-트리메틸벤질 카르바메이트, 포름아미드, 아세트아미드, 클로로아세트아미드, 트리클로로아세트아미드, 트리플루오로아세트아미드, 페닐아세트아미드, 3-페닐프로판아미드, 피콜린아미드, 3-피리딜카르복스아미드, N-벤조일페닐알라닐 유도체, 벤즈아미드, p-페닐벤즈아미드, o-니트로페닐아세트아미드, o-니트로페녹시아세트아미드, 아세토아세트아미드, (N'-디티오벤질옥시카르보닐아미노)아세트아미드, 3-(p-히드록시페닐)프로판아미드, 3-(o-니트로페닐)프로판아미드, 2-메틸-2-(o-니트로페녹시)프로판아미드, 2-메틸-2-(o-페닐아조페녹시)프로판아미드, 4-클로로부탄아미드, 3-메틸-3-니트로부탄아미드, o-니트로신나미드, N-아세틸메티오닌 유도체, o-니트로벤즈아미드, o-(벤조일옥시메틸)벤즈아미드, 4,5-디페닐-3-옥사졸린-2-온, N-프탈이미드, N-디티아숙신이미드 (Dts), N-2,3-디페닐말레이미드, N-2,5-디메틸피롤, N-1,1,4,4-테트라메틸디실릴아자시클로펜탄 부가물 (STABASE), 5-치환된 1,3-디메틸-1,3,5-트리아자시클로헥산-2-온, 5-치환된 1,3-디벤질-1,3,5-트리아자시클로헥산-2-온, 1-치환된 3,5-디니트로-4-피리돈, N-메틸아민, N-알릴아민, N-[2-(트리메틸실릴)에톡시]메틸아민 (SEM), N-3-아세톡시프로필아민, N-(1-이소프로필-4-니트로-2-옥소-3-프롤린-3-일)아민, 4급 암모늄 염, N-벤질아민, N-디(4-메톡시페닐)메틸아민, N-5-디벤조수베릴아민, N-트리페닐메틸아민 (Tr), N-[(4-메톡시페닐)디페닐메틸]아민 (MMTr), N-9-페닐플루오레닐아민 (PhF), N-2,7-디클로로-9-플루오레닐메틸렌아민, N-페로세닐메틸아미노 (Fcm), N-2-피콜릴아미노 N'-옥시드, N-1,1-디메틸티오메틸렌아민, N-벤질리덴아민, N-p-메톡시벤질리덴아민, N-디페닐메틸렌아민, N-[(2-피리딜)메시틸]메틸렌아민, N-(N',N'-디메틸아미노메틸렌)아민, N,N'-이소프로필리덴디아민, N-p-니트로벤질리덴아민, N-살리실리덴아민, N-5-클로로살리실리덴아민, N-(5-클로로-2-히드록시페닐)페닐메틸렌아민, N-시클로헥실리덴아민, N-(5,5-디메틸-3-옥소-1-시클로헥세닐)아민, N-보란 유도체, N-디페닐보린산 유도체, N-[페닐(펜타카르보닐크로뮴- 또는 텅스텐)카르보닐]아민, N-구리 킬레이트, N-아연 킬레이트, N-니트로아민, N-니트로소아민, 아민 N-옥시드, 디페닐포스핀아미드 (Dpp), 디메틸티오포스핀아미드 (Mpt), 디페닐티오포스핀아미드 (Ppt), 디알킬 포스포르아미데이트, 디벤질 포스포르아미데이트, 디페닐 포스포르아미데이트, 벤젠술펜아미드, o-니트로벤젠술펜아미드 (Nps), 2,4-디니트로벤젠술펜아미드, 펜타클로로벤젠술펜아미드, 2-니트로-4-메톡시벤젠술펜아미드, 트리페닐메틸술펜아미드, 3-니트로피리딘술펜아미드 (Npys), p-톨루엔술폰아미드 (Ts), 벤젠술폰아미드, 2,3,6,-트리메틸-4-메톡시벤젠술폰아미드 (Mtr), 2,4,6-트리메톡시벤젠술폰아미드 (Mtb), 2,6-디메틸-4-메톡시벤젠술폰아미드 (Pme), 2,3,5,6-테트라메틸-4-메톡시벤젠술폰아미드 (Mte), 4-메톡시벤젠술폰아미드 (Mbs), 2,4,6-트리메틸벤젠술폰아미드 (Mts), 2,6-디메톡시-4-메틸벤젠술폰아미드 (iMds), 2,2,5,7,8-펜타메틸크로만-6-술폰아미드 (Pmc), 메탄술폰아미드 (Ms), β-트리메틸실릴에탄술폰아미드 (SES), 9-안트라센술폰아미드, 4-(4',8'-디메톡시나프틸메틸)벤젠술폰아미드 (DNMBS), 벤질술폰아미드, 트리플루오로메틸술폰아미드 및 페나실술폰아미드가 포함된다.

[0038] 적절한 히드록실 보호기에는 메틸, 메톡실메틸 (MOM), 메틸티오메틸 (MTM), t-부틸티오메틸, (페닐디메틸실릴)메톡시메틸 (SMOM), 벤질옥시메틸 (BOM), p-메톡시벤질옥시메틸 (PMBM), (4-메톡시페녹시)메틸 (p-AOM), 구아야콜메틸 (GUM), t-부톡시메틸, 4-펜테닐옥시메틸 (POM), 실록시메틸, 2-메톡시에톡시메틸 (MEM), 2,2,2-트리클로로에톡시메틸, 비스(2-클로로로에톡시)메틸, 2-(트리메틸실릴)에톡시메틸 (SEMOR), 테트라히드로피라닐 (THP), 3-브로모테트라히드로피라닐, 테트라히드로티오피라닐, 1-메톡시시클로헥실, 4-메톡시테트라히드로피라닐

(MTHP), 4-메톡시테트라히드로티오피라닐, 4-메톡시테트라히드로티오피라닐 S,S-디옥시드, 1-[(2-클로로-4-메틸)페닐]-4-메톡시피페리딘-4-일 (CTMP), 1,4-디옥산-2-일, 테트라히드로푸라닐, 테트라히드로티오푸라닐, 2,3,3a,4,5,6,7,7a-옥타히드로-7,8,8-트리메틸-4,7-메타노벤조푸란-2-일, 1-에톡시에틸, 1-(2-클로로로에톡시)에틸, 1-메틸-1-메톡시에틸, 1-메틸-1-벤질옥시에틸, 1-메틸-1-벤질옥시-2-플루오로에틸, 2,2,2-트리클로로에틸, 2-트리메틸실릴에틸, 2-(페닐셀레닐)에틸, t-부틸, 알릴, p-클로로페닐, p-메톡시페닐, 2,4-디니트로페닐, 벤질, p-메톡시벤질, 3,4-디메톡시벤질, o-니트로벤질, p-니트로벤질, p-할로벤질, 2,6-디클로로벤질, p-시아노벤질, p-페닐벤질, 2-피콜릴, 4-피콜릴, 3-메틸-2-피콜릴 N-옥시도, 디페닐메틸, p,p'-디니트로벤즈히드릴, 5-디벤조수베릴, 트리페닐메틸, α-나프틸디페닐메틸, p-메톡시페닐디페닐메틸, 디(p-메톡시페닐)페닐메틸, 트리(p-메톡시페닐)메틸, 4-(4'-브로모페나실옥시페닐)디페닐메틸, 4,4',4"-트리스(4,5-디클로로프탈이미도페닐)메틸, 4,4',4"-트리스(레불리노일옥시페닐)메틸, 4,4',4"-트리스(벤조일옥시페닐)메틸, 3-(이미다졸-1-일)비스(4',4"-디메톡시페닐)메틸, 1,1-비스(4-메톡시페닐)-1'-피레닐메틸, 9-안트릴, 9-(9-페닐)크산테닐, 9-(9-페닐-10-옥소)안트릴, 1,3-벤조디티올란-2-일, 벤즈이소티아졸릴 S,S-디옥시도, 트리메틸실릴 (TMS), 트리에틸실릴 (TES), 트리이소프로필실릴 (TIPS), 디메틸이소프로필실릴 (IPDMS), 디에틸이소프로필실릴 (DEIPS), 디메틸헥실실릴, t-부틸디메틸실릴 (TBDMS), t-부틸디페닐실릴 (TBDPS), 트리벤질실릴, 트리-p-크실릴실릴, 트리페닐실릴, 디페닐메틸실릴 (DPMS), t-부틸메톡시페닐실릴 (TBMPS), 포르메이트, 벤조일포르메이트, 아세테이트, 클로로아세테이트, 디클로로아세테이트, 트리클로로아세테이트, 트리플루오로아세테이트, 메톡시아세테이트, 트리페닐메톡시아세테이트, 페녹시아세테이트, p-클로로페녹시아세테이트, 3-페닐프로피오네이트, 4-옥소펜타노에이트 (레불리네이트), 4,4-(에틸렌디티오)펜타노에이트 (레불리노일디티오아세탈), 피발로에이트, 아다만토에이트, 크로토네이트, 4-메톡시크로토네이트, 벤조에이트, p-페닐벤조에이트, 2,4,6-트리메틸벤조에이트 (메시토에이트), 알킬 메틸 카르보네이트, 9-플루오레닐메틸 카르보네이트 (Fmoc), 알킬 에틸 카르보네이트, 알킬 2,2,2-트리클로로에틸 카르보네이트 (Troc), 2-(트리메틸실릴)에틸 카르보네이트 (TMSEC), 2-(페닐술포닐)에틸 카르보네이트 (Psec), 2-(트리페닐포스포니오) 에틸 카르보네이트 (Peoc), 알킬 이소부틸 카르보네이트, 알킬 비닐 카르보네이트 알킬 알릴 카르보네이트, 알킬 p-니트로페닐 카르보네이트, 알킬 벤질 카르보네이트, 알킬 p-메톡시벤질 카르보네이트, 알킬 3,4-디메톡시벤질 카르보네이트, 알킬 o-니트로벤질 카르보네이트, 알킬 p-니트로벤질 카르보네이트, 알킬 S-벤질 티오카르보네이트, 4-에톡시-1-나프틸 카르보네이트, 메틸 디티오카르보네이트, 2-요오도벤조에이트, 4-아지도부티레이트, 4-니트로-4-메틸펜타노에이트, o-(디브로모메틸)벤조에이트, 2-포르밀벤젠술포네이트, 2-(메틸티오메톡시)에틸, 4-(메틸티오메톡시)부티레이트, 2-(메틸티오메톡시메틸)벤조에이트, 2,6-디클로로-4-메틸페녹시아세테이트, 2,6-디클로로-4-(1,1,3,3-테트라메틸부틸)페녹시아세테이트, 2,4-비스(1,1-디메틸프로필)페녹시아세테이트, 클로로디페닐아세테이트, 이소부티레이트, 모노숙시노에이트, (E)-2-메틸-2-부테노에이트, o-(메톡시카르보닐)벤조에이트, α-나프토에이트, 니트레이트, 알킬 N,N,N',N'-테트라메틸포스포로디아미데이트, 알킬 N-페닐카르바메이트, 보레이트, 디메틸포스피노티오일, 알킬 2,4-디니트로페닐술페네이트, 술페이트, 메탄술포네이트 (메실레이트), 벤질술포네이트 및 토실레이트 (Ts)가 포함된다. 1,2- 또는 1,3-디올을 보호하기 위한 보호기에는 메틸렌 아세탈, 에틸리덴 아세탈, 1-t-부틸에틸리덴 케탈, 1-페닐에틸리덴 케탈, (4-메톡시페닐)에틸리덴 아세탈, 2,2,2-트리클로로에틸리덴 아세탈, 아세토니드, 시클로펜틸리덴 케탈, 시클로헥실리덴 케탈, 시클로헵틸리덴 케탈, 벤질리덴 아세탈, p-메톡시벤질리덴 아세탈, 2,4-디메톡시벤질리덴 케탈, 3,4-디메톡시벤질리덴 아세탈, 2-니트로벤질리덴 아세탈, 메톡시메틸렌 아세탈, 에톡시메틸렌 아세탈, 디메톡시메틸렌 오르토 에스테르, 1-메톡시에틸리덴 오르토 에스테르, 1-에톡시에틸리덴 오르토 에스테르, 1,2-디메톡시에틸리덴 오르토 에스테르, α-메톡시벤질리덴 오르토 에스테르, 1-(N,N-디메틸아미노)에틸리덴 유도체, α-(N,N'-디메틸아미노)벤질리덴 유도체, 2-옥사시클로펜틸리덴 오르토 에스테르, 디-t-부틸실릴렌 기 (DTBS), 1,3-(1,1,3,3-테트라이소프로필디실록사닐리덴) 유도체 (TIPDS), 테트라-t-부톡시디실록산-1,3-디일리덴 유도체 (TBDS), 시클릭 카르보네이트, 시클릭 보로네이트, 에틸 보로네이트 및 페닐 보로네이트가 포함된다.

[0039] 화학 가변기 (예를 들어, R 기)가 고리의 결합을 가로지르는 결합에 부착된 것으로 나타나는 모든 경우에, 이는 1개 이상의 이러한 가변기가 교차 결합을 갖는 고리에 임의로 부착된 것을 의미한다. 이러한 고리 상의 각각의 R 기는 임의의 적합한 위치에 부착될 수 있고, 이는 일반적으로 상기 기가 모 고리 상의 수소 원자 대신에 부착된다는 것을 의미하는 것으로 이해된다. 여기에는 2개의 R 기가 동일한 고리 원자에 부착될 수 있는 가능성이 포함된다. 또한, 1개 초과의 R 기가 고리 상에 존재하는 경우, 각각은 그에 부착된 다른 R 기와 동일하거나 상이할 수 있고, 각각의 기는 이들이 동일한 식별자로 표시될 수 있더라도 동일한 분자 상의 어디에든 부착될 수 있는 다른 기와 독립적으로 정의된다.

[0040] 생체분자 - 본원에 사용된 용어 "생체분자"는 자연 발생되었든 인위적으로 생성되었든 (예를 들어, 합성 또는

재조합 방법에 의해) 간에 세포 및 조직에서 일반적으로 발견되는 분자 (예를 들어, 폴리펩티드, 아미노산, 폴리뉴클레오티드, 뉴클레오티드, 폴리사카라이드, 당, 지질, 핵단백질, 당단백질, 지단백질, 스테로이드, 대사물 등)를 지칭한다. 생체분자의 특정 클래스에는 효소, 수용체, 신경전달물질, 호르몬, 시토카인, 세포 반응 조절자, 예컨대 성장 인자 및 화학주성 인자, 항체, 백신, 합텐, 독소, 인터페론, 리보자임, 안티센스 작용제, 플라스미드, DNA 및 RNA가 포함되나, 이에 제한되지는 않는다.

[0041] 약물 - 본원에 사용된 용어 "약물"은 생물학적 사건을 변경하고, 억제하고, 활성화시키거나, 다르게는 그에 영향을 미치는 소분자 또는 생체분자를 지칭한다. 예를 들어, 약물은 항-AIDS 물질, 항암 물질, 항생제, 항당뇨병 물질, 면역억제제, 항-바이러스성 물질, 효소 억제제, 신경독소, 오피오이드, 수면제, 항-히스타민, 윤활제, 신경안정제, 항-경련제, 근이완제 및 항-파킨슨 물질, 항-연축제 및 근육 수축제, 예를 들어 채널 차단제, 축동제 및 항-콜린제, 항-녹내장 화합물, 항-기생충 및/또는 항-원충성 화합물, 세포-세포외 매트릭스 상호작용의 조절제, 예를 들어 세포 성장 억제제 및 항-유착 분자, 혈관확장제, DNA, RNA 또는 단백질 합성의 억제제, 항-고혈압제, 진통제, 항-발열제, 스테로이드성 및 비-스테로이드성 항염증제, 항혈관신생 인자, 항-분비 인자, 항응고제 및/또는 항-혈전성 작용제, 국소 마취제, 안약, 프로스타글란딘, 항우울제, 항-정신병 물질, 항-구토제 및 영상화제를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에 사용하기에 적합한 예시적인 약물의 보다 완전한 목록은 문헌 ["Pharmaceutical Substances: Syntheses, Patents, Applications" by Axel Kleemann and Jurgen Engel, Thieme Medical Publishing, 1999]; [the "Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals", edited by Susan Budavari et al., CRC Press, 1996] 및 [the United States Pharmacopeia-25/National Formulary-20, published by the United States Pharmcopeial Convention, Inc., Rockville MD, 2001]에서 찾아볼 수 있다.

[0042] 외인성 - 본원에 사용된 바와 같이, "외인성" 분자는 환자에게 투여되지 않는 한, 환자 내에서 유의한 수준으로 존재하지 않는 것이다. 특정 실시양태에서, 환자는 포유동물, 예를 들어 인간, 개, 고양이, 래트 등이다. 본원에 사용된 바와 같이, 분자는 환자에 대한 정상 혈청이 0.1 mM 미만의 분자를 포함하는 경우에 상기 유형의 환자에서 유의한 수준으로 존재하지 않는다. 특정 실시양태에서, 환자에 대한 정상 혈청은 0.08 mM 미만, 0.06 mM 미만, 또는 0.04 mM 미만의 분자를 포함할 수 있다.

[0043] 초분지형 - 본원에 사용된 바와 같이, "초분지형" 구조는 하나 이상의 분지형 분지를 포함하는 공유 구조 (예를 들어, 덴드리머 구조)이다. 초분지형 구조는 중합체 및/또는 비-중합체 하위구조를 포함할 수 있다.

[0044] 정상 혈청 - 본원에 사용된 바와 같이, "정상 혈청"은 5명 이상의 비-당뇨병 환자로부터의 응고된 전혈의 액체 부분의 대략 동등한 양을 수집하여 얻은 혈청이다. 비-당뇨병 인간 환자는 혈액 채취 시점에 어떠한 당뇨병 증상도 나타내지 않은 무작위로 선택된 18 내지 30세 연령이다.

[0045] 중합체 - 본원에 사용된 바와 같이, "중합체" 또는 "중합체 구조"는 일련의 공유 결합 단량체를 포함하는 구조이다. 중합체는 한가지 유형의 단량체 또는 한가지 초과의 유형의 단량체로부터 만들어질 수 있다. 따라서, 용어 "중합체"는 다양한 유형의 단량체가 전체 중합체 내에서 개별적으로 배치되는 블록-공중합체를 비롯한 공중합체를 포함한다. 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있다.

[0046] 폴리사카라이드 - 본원에 사용된 바와 같이, "폴리사카라이드"는 사카라이드의 중합체이다. 용어 "폴리사카라이드", "탄수화물" 및 "올리고사카라이드"는 상호교환적으로 사용될 수 있다. 중합체는 천연 사카라이드 (예를 들어, 아라비노스, 릭소스, 리보스, 크실로스, 리불로스, 크실룰로스, 알로스, 알트로스, 갈락토스, 글루코스, 굴로스, 이도스, 만노스, 탈로스, 프룩토스, 프시코스, 소르보스, 타가토스, 만노헵툴로스, 세도헵툴로스, 옥톨로스 및 시알로스) 및/또는 변형 사카라이드 (예를 들어, 2'-플루오로리보스, 2'-데옥시리보스 및 헥소스)를 포함할 수 있다. 예시적인 디사카라이드에는 수크로스, 락토스, 말토스, 트레할로스, 겐티오비오스, 이소말토스, 코지비오스, 라미나리비오스, 만노비오스, 멜리비오스, 니게로스, 루티노스 및 크실로비오스가 포함된다.

[0047] 소분자 - 본원에 사용된 용어 "소분자"는 자연 발생되었든 인위적으로 생성되었든 (예를 들어, 화학적 합성을 통해) 간에 상대적으로 낮은 분자량을 갖는 분자를 지칭한다. 전형적으로, 소분자는 단량체이고, 약 1500 Da 미만의 분자량을 갖는다. 바람직한 소분자는 그것이 동물, 바람직하게는 포유동물, 보다 바람직하게는 인간에서 국부 또는 전신 효과를 생성시킨다는 점에서 생물학적으로 활성이다. 특정 바람직한 실시양태에서, 소분자는 약물이다. 바람직하게는 (반드시 그러하지는 않음), 약물은 적절한 정부 기관 또는 기구에 의해 사용하기에 안전하고 효과적이라고 이미 간주된 것이다. 예를 들어, 인간 용도를 위한 약물이 FDA에 의해 21 C.F.R. §§ 330.5, 331-361 및 440-460하에 열거되어 있고; 수의학적 용도를 위한 약물이 FDA에 의해 21 C.F.R. §§ 500-589하에 열거되어 있다 (이들 모두는 본 발명에 따른 용도에 허용되는 것으로 간주함).

[0048] 치료하다 - 본원에 사용된 용어 "치료하다" (또는 "치료하는", "치료된", "치료" 등)는 치료가 필요한 대상체에게 본 개시내용의 인슐린-접합체를, 상태 (예를 들어, 당뇨병), 상태의 증상 또는 증상들 (예를 들어, 고혈당), 또는 상태에 대한 질병소질을 완화, 경감, 변경, 개선, 증진시키거나, 또는 그에 영향을 미치기 위한 목적으로 투여하는 것을 지칭한다.

## *발명의 효과*

[0049] 본원발명은 단순한 렉틴-무함유 사카라이드-반응성 인슐린 시스템을 생성하기 위한 전례없는 기회를 제공한다. 본원발명은 결정질 인슐린-접합체 및 그의 제제를 제공한다. 또한, 결정질 인슐린-접합체의 제조 및 사용 방법을 제공한다. 인슐린-접합체의 결정질 제제는 배치 대 배치 재현성 개선, 제제 안정성 증진, 및 장기간의 보관에 걸친 입자 응집의 감소에 있어서 유리할 수 있다.

## *도면의 간단한 설명*

[0050] 도 1: 예시적인 인슐린-접합체 프레임워크 및 리간드의 화학 구조.

도 2: 예시적인 B29 인슐린-접합체의 구조. 실시예에 기재되어 있는 바와 같이, 이들 접합체는 각각 재조합 야생형 인간 인슐린을 사용하여 제조하였다 (야생형 인간 인슐린의 구조에 대해 도 33 참조). 따라서, 도 2에 나타낸 타원형 내부의 기호 "인슐린"은 우선적으로 야생형 인간 인슐린을 나타내는 것으로 의도된다. 본원에서 논의되는 바와 같이, 본 개시내용이 또한 특히 이들 버전의 접합체, 및 야생형 인간 인슐린 이외의 인슐린 분자를 포함하는 다른 접합체를 포함한다는 것을 이해해야 한다.

도 3: 시간 0에 접합체 I-7 (5 U/kg)을 비-당뇨병의 수컷 SD 래트에 피하 주사한 후의 (◆) 혈청 인슐린 및 (○) 혈액 글루코스 수준의 플롯. 데이터는 n = 3 래트에 대한 평균 및 표준 편차를 나타낸다.

도 4: 시간 0에 접합체 I-7을 비-당뇨병의 수컷 SD 래트 (n=3)에 피하 주사하고, 이어서 15분 후에 알파-메틸 만노스 (좌측) 또는 염수 (우측)를 복강내 주사한 후의 혈청 인슐린 및 혈액 글루코스 수준의 플롯.

도 5: 시간 0에 접합체 I-5를 비-당뇨병의 수컷 SD 래트 (n=3)에 피하 주사하고, 이어서 15분 후에 알파-메틸 만노스 (좌측) 또는 염수 (우측)을 복강내 주사한 후의 혈청 인슐린 및 혈액 글루코스 수준의 플롯.

도 6: 시간 0에 접합체 I-8을 비-당뇨병의 수컷 SD 래트 (n=3)에 피하 주사하고, 이어서 15분 후에 알파-메틸 만노스 (좌측) 또는 염수 (우측)을 복강내 주사한 후의 혈청 인슐린 및 혈액 글루코스 수준의 플롯.

도 7: 시간 0에 접합체 I-9를 비-당뇨병의 수컷 SD 래트 (n=3)에 피하 주사하고, 이어서 15분 후에 알파-메틸 만노스 (좌측) 또는 염수 (우측)을 복강내 주사한 후의 혈청 인슐린 및 혈액 글루코스 수준의 플롯.

도 8: 시간 0에 접합체 I-10을 비-당뇨병의 수컷 SD 래트 (n=3)에 피하 주사하고, 이어서 15분 후에 알파-메틸 만노스 (좌측) 또는 염수 (우측)을 복강내 주사한 후의 혈청 인슐린 및 혈액 글루코스 수준의 플롯.

도 9: 시간 0에 접합체 I-11을 비-당뇨병의 수컷 SD 래트 (n=3)에 피하 주사하고, 이어서 15분 후에 알파-메틸 만노스 (좌측) 또는 염수 (우측)을 복강내 주사한 후의 혈청 인슐린 및 혈액 글루코스 수준의 플롯.

도 10: 비-당뇨병의 수컷 SD 래트 (군 당 n=3)로의 (◆) RHI 및 (▲) 접합체 I-6의 0.4 mg/kg 정맥내 주사에 대한 시간의 함수로서의 혈청 인슐린 농도의 플롯. 데이터 (n=3의 평균)는 2-구획 이중-지수 모델을 이용하여 적합화하였다.

도 11: 시간 0에 장시간-작용 접합체 I-6을 비-당뇨병의 수컷 SD 래트 (용량 당 n=3)에 피하 주사하고, 이어서 240 분에 글루코스 (4 g/kg)를 복강내 주사한 후의 혈청 인슐린 (◆) 및 혈액 글루코스 (○) 수준의 플롯. 제제는 실시예 20에 기재된 바와 같이 제조하였다: (a) 1xP-1xZ, (b) 4xP-4xZ 및 (c) 10xP-4xZ.

도 12: 시간 0에 장시간-작용 접합체 I-6을 비-당뇨병의 수컷 SD 래트 (용량 당 n=3)에 피하 주사하고, 이어서 240 분에 글루코스 (4 g/kg)를 복강내 주사한 후의 혈청 인슐린 (◆) 및 혈액 글루코스 (○) 수준의 플롯. 제제는 실시예 21에 기재된 바와 같이 제조하였다: (a) 4xP-1xZ 및 (b) 4xP-2xZ.

도 13: 시간 0에 장시간-작용 접합체 I-6을 비-당뇨병의 수컷 SD 래트 (용량 당 n=3)에 피하 주사하고, 이어서 240 분에 글루코스 (4 g/kg)를 복강내 주사한 후의 혈청 인슐린 (◆) 및 혈액 글루코스 (○) 수준의 플롯. 제제는 실시예 21에 기재된 바와 같이 제조하였다: (a) 10xP-1xZ 및 (b) 10xP-2xZ.

도 14: 시간 0에 장시간-작용 접합체 I-6을 비-당뇨병의 수컷 SD 래트 (용량 당 n=3)에 피하 주사하고, 이어서

240 분에 글루코스 (4 g/kg)를 복강내 주사한 후의 혈청 인슐린 (◆) 및 혈액 글루코스 (○) 수준의 플롯. 제제는 실시예 22에 기재된 바와 같이 제조하였다: (a) 크레졸 무함유 및 (b) 4x 크레졸.

도 15: 시간 0에 장시간-작용 접합체 I-6을 비-당뇨병의 수컷 SD 래트 (용량 당 n=3)에 피하 주사하고, 이어서 240 분에 글루코스 (4 g/kg)를 복강내 주사한 후의 혈청 인슐린 (◆) 및 혈액 글루코스 (○) 수준의 플롯. 제제는 실시예 23에 기재된 바와 같이 제조하였다: (a) 염 무함유, (b) 3.3x 염 및 (c) 글리세롤.

도 16: 시간 0에 장시간-작용 접합체 I-6을 비-당뇨병의 수컷 SD 래트 (용량 당 n=3)에 피하 주사하고, 이어서 240 분에 글루코스 (4 g/kg)를 복강내 주사한 후의 혈청 인슐린 (◆) 및 혈액 글루코스 (○) 수준의 플롯. 증가하는 양의 비변형 인슐린을 함유하는 제제를 실시예 24에 기재된 바와 같이 제조하였다: (a) 1/24, (b) 1/12 및 (c) 1/6.

도 17: 시간 0에 실시예 25에 따라 제조한 장시간-작용 접합체 I-6을 비-당뇨병의 수컷 SD 래트 (용량 당 n=3)에 피하 주사하고, 이어서 240 분에 글루코스 (4 g/kg)를 복강내 주사한 후의 혈청 인슐린 (◆) 및 혈액 글루코스 (○) 수준의 플롯.

도 18: 시간 0에 실시예 26에 따라 제조한 장시간-작용 접합체 I-6을 비-당뇨병의 수컷 SD 래트 (용량 당 n=3)에 피하 주사하고, 이어서 240 분에 글루코스 (4 g/kg)를 복강내 주사한 후의 혈청 인슐린 (◆) 및 혈액 글루코스 (○) 수준의 플롯. 물질을 2 내지 8 ℃에서 (a) 1주 또는 (b) 2주 동안 보관한 후에 주사하였다.

도 19: 시간 0에 실시예 26에 따라 제조한 장시간-작용 접합체 I-6을 비-당뇨병의 수컷 SD 래트 (용량 당 n=3)에 피하 주사하고, 이어서 240 분에 글루코스 (4 g/kg)를 복강내 주사한 후의 혈청 인슐린 (◆) 및 혈액 글루코스 (○) 수준의 플롯. 물질을 실온에서 (a) 1주 또는 (b) 2주 동안 보관한 후에 주사하였다.

도 20: 시간 0에 실시예 27에 따라 제조한 장시간-작용 접합체 제제 (I-8, I-10, I-7, I-17, I-9, I-11)를 비-당뇨병의 수컷 SD 래트 (용량 당 n=3)에 피하 주사하고, 이어서 240 분에 글루코스 (4 g/kg)를 복강내 주사한 후의 혈청 인슐린 (◆) 및 혈액 글루코스 (○) 수준의 플롯.

도 21: 시간 0에 실시예 28에 따라 제조한 장시간-작용 접합체 I-6 (a) 및 I-5 (b)의 제제를 비-당뇨병의 수컷 SD 래트 (용량 당 n=3)에 피하 주사하고, 이어서 240 분에 알파-메틸 만노스 (4 g/kg)를 복강내 주사한 후의 혈청 인슐린 (◆) 및 혈액 글루코스 (○) 수준의 플롯.

도 22: 시간 0에 PZI 접합체 I-6을 비-당뇨병 (정상) 및 당뇨병 (DM's) 수컷 SD 래트에 피하 주사한 후의 혈액 글루코스 수준의 플롯. 접합체는 5, 10 및 20 U/kg으로 투여하였다. 나타낸 바와 같이, 당뇨병 수컷 SD 래트의 글루코스 수준은 최고 용량에서 8 시간에 걸쳐 지속된 명백한 용량 비례 반응을 나타낸 반면에, 비-당뇨병 수컷 SD 래트는 어떠한 저혈당도 나타내지 않았다.

도 23: 시간 0에 PZI 접합체 I-6을 비-당뇨병 (정상) 및 당뇨병 (DM's) 수컷 SD 래트에 피하 주사한 후의 24 시간에 걸친 혈액 글루코스 수준의 플롯. 접합체는 7, 14 및 28 U/kg으로 투여하였다.

도 24: 접합체 I-6 또는 RHI (글루코스 또는 α-메틸 만노스 없이 또는 그와 함께)의 주사 후의 시간의 함수로서의 혈청 인슐린 농도의 플롯.

도 25: 처음 두 패널은 비-당뇨병의 수컷 SD 래트 (n=3)에 RHI (3.5 mU/분) 또는 I-6 (15 mU/분)을 일정하게 정맥내 (i.v.) 주입함에 따른 혈청 인슐린 (◆) 및 혈액 글루코스 (○) 수준의 플롯을 나타낸다. 글루코스 (4 g/kg)의 복강내 주사는 240 분에 이루어졌다. 다음의 3개의 패널은 글루코스 (4, 2 또는 1 g/kg)의 복강내 주사가 240 분에 이루어진 경우, 비-당뇨병의 수컷 SD 래트 (n=3)에 RHI (3.5 mU/분) 또는 I-6 (15 mU/분)을 일정하게 정맥내 (i.v.) 주입한 후의 혈청 인슐린 (◆) 및 혈액 글루코스 (○) 수준의 플롯을 비교한다.

도 26: 접합체 (글루코스 또는 α-메틸 만노스 없이 또는 그와 함께)의 주사 후의 시간의 함수로서의 혈청 인슐린 농도의 플롯. 래트에게 당 용액을 t = -60 분에, 그리고 연구 전반에 걸쳐 정맥내 주입하였다. 각각의 접합체를 시간 0에 10 U/kg으로 정맥내 주사하고, 혈청 접합체 농도를 측정하였다.

도 27: 결정화를 위한 인덱스(Index) 완충제 용액 및 현미경 검사를 이용하여 얻은 시각적 관찰.

도 28: 인덱스 완충제 19를 동일 부피의 탈이온수 중 접합체의 2.5 mg/ml 용액 (좌측: I-6; 우측: I-7)과 혼합하여 형성한 대표적인 결정의 SEM 현미경사진.

도 29: 시간 0에 접합체 I-6 결정 분산액 (프로타민 또는 m-크레졸 무함유)을 15 U/kg 피하 주사하고, 이어서

240 분에 4 g/kg 복강내 글루코스 내성 시험 (IPGTT)하여 생성한 금식시킨 비-당뇨병 수컷 SD 래트 (n=2)에서의 (◆) 혈청 인슐린-접합체 농도 및 (○) 혈액 글루코스 수준의 플롯. 이소-인슐린 ELISA를 이용하여 혈청 인슐린 수준을 측정하였다. 데이터를 평균 값 ± 1의 표준 편차로서 플롯팅하였다.

도 30: 시간 0에 프로타민 및 m-크레졸을 함유하는 접합체 I-6 결정 분산액을 15 U/kg 피하 주사하고, 이어서 240 분에 4 g/kg 복강내 글루코스 내성 시험 (IPGTT)하여 생성한 금식시킨 비-당뇨병 수컷 SD 래트 (n=2)에서의 (◆) 혈청 인슐린-접합체 농도 및 (○) 혈액 글루코스 수준의 플롯. 이소-인슐린 ELISA를 이용하여 혈청 인슐린 수준을 측정하였다. 데이터를 평균 값 ± 1의 표준 편차로서 플롯팅하였다.

도 31: 시간 0에 프로타민 및 m-크레졸을 함유하는 접합체 I-7 결정 분산액을 15 U/kg 피하 주사하고, 이어서 240 분에 4 g/kg 복강내 글루코스 내성 시험 (IPGTT)하여 생성한 금식시킨 비-당뇨병 수컷 SD 래트 (n=3)에서의 (◆) 혈청 인슐린-접합체 농도 및 (○) 혈액 글루코스 수준의 플롯. 이소-인슐린 ELISA를 이용하여 혈청 인슐린 수준을 측정하였다. 데이터를 평균 값 ± 1의 표준 편차로서 플롯팅하였다.

도 32: 시간 0에 접합체 I-9 결정 분산액 (프로타민 및 m-크레졸을 함유하는 1x PBS 중에서 숙성)을 15 U/kg 피하 주사하고, 이어서 240 분에 4 g/kg 복강내 글루코스 내성 시험 (IPGTT)하여 생성한 금식시킨 비-당뇨병 수컷 SD 래트 (n=3)에서의 (◆) 혈청 인슐린-접합체 농도 및 (○) 혈액 글루코스 수준의 플롯. 이소-인슐린 ELISA를 이용하여 혈청 인슐린 수준을 측정하였다. 데이터를 평균 값 ± 1의 표준 편차로서 플롯팅하였다.

도 33: 야생형 인간 인슐린의 구조.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0051] 본 출원은 특허 및 비-특허 문헌을 비롯한 수많은 문헌을 언급한다. 이들 문헌 각각의 전문은 본원에 참조로 포함된다.

[0052] 한 측면에서, 본 개시내용은 사카라이드, 예컨대 글루코스의 전신 농도에 반응하는 방식으로 인슐린의 약동학 (PK) 및/또는 약력학 (PD) 프로파일을 조절하는 방법을 제공한다. 본원에 논의되는 바와 같이, 이들 방법은 고친화성 사카라이드 리간드를 포함하는 특정 합성 인슐린-접합체 (예를 들어, 도 1의 것들 참조)가, 심지어 외인성 다가 사카라이드-결합 분자, 예컨대 Con A의 부재하에서도 사카라이드 농도 변화에 반응하는 PK/PD 프로파일을 나타낸다는 발견에 부분적으로 기초한다. 이러한 발견은 예상치 못한 것이었고, 단순한 렉틴-무함유 사카라이드-반응성 인슐린 시스템을 생성하기 위한 전례없는 기회를 제공한다.

[0053] 이러한 인슐린-접합체의 한가지 예 (I-6으로 공지됨)가 도 2에 나타나 있다. 접합체 I-6은 별개의 저 분자량 합성 프레임워크 (트리스-숙신이미딜(6-아미노카프로일)아미노트리아세테이트 또는 TSAT-C6)와 2개의 아미노에틸트리만노스 (AETM) 사카라이드 잔기를 포함한다. 프레임워크는 B29 엡실론-아미노 기를 통해 인슐린에 공유적으로 접합한다 (야생형 인간 인슐린는 위치 B29에서 리신 잔기를 가짐). 실시예에서 논의되는 바와 같이, 인슐린-접합체, 예컨대 I-6은 글루코스-반응성 약동학을 나타낸다. 결과적으로, 인슐린-접합체, 예컨대 I-6의 유용성 및 그에 따른 생물활성은 내인성 글루코스 수준에 반응하여 가변적이다. 본 발명자들은 저혈당증을 유도하지 않으면서 요구가 있는 즉시 기저 및 볼루스 인슐린 "전달"을 둘 다 제공하는, 프로타민 및 아연을 사용한 접합체 I-6의 지속 방출 제제 (PZI 제제)를 제조하였다. 대조적으로, 통상적인 인슐린은 빠르게-작용하거나 (예를 들어, RHI), 또는 느리게-작용하고 (예를 들어, 란투스(Lantus)), 글루코스 수준의 변화에 반응하여 프로파일을 변화시킬 수 없다. 당뇨병 래트 및 정상 래트에서 통상적인 인슐린과 비교하였을 때, 접합체 I-6은 4배의 치료 용량에서 저혈당증의 최소 위험을 가지면서 실질적으로 개선된 적정 약물 농도를 나타낸다.

[0054] 유의하게, 본 발명자들의 연구는 접합체 I-6에 의해 사용된 TSAT-C6 프레임워크가 글루코스-반응 활성을 위해 필요하지 않다는 것을 보여주었다. 사실상, 실시예에 나타낸 바와 같이, 본 발명자들은 다른 인슐린-접합 프레임워크, 예컨대 도 1 및 2에 도시된 것들이 유사한 결과를 제공할 수 있음을 발견하였다. 또한, 본 발명자들의 연구는 접합된 당의 유형 및 개수, 및 특정 상황에서 인슐린 분자 상의 접합 지점이 생체내 글루코스-반응의 조절에 있어서 보다 중요한 역할을 담당한다는 것을 시사한다.

[0055] 어떠한 특정 이론에 경계를 두지 않기를 바라면서, 접합체, 예컨대 I-6에 의해 나타나는 글루코스-반응성이 내인성 렉틴에 대한 결합에 의해 매개되는 것으로 여겨진다. 따라서, 본 발명자들은 체내 글루코스 수준이 낮은 경우에 내인성 렉틴이 합성 인슐린-접합체에 의한 결합에, 본질적으로는 접합체의 인슐린-유사 활성의 불활성화에 이용가능한 글루코스 결합 부위를 갖는 것으로 이론을 세웠다. 반대로, 체내 글루코스 수준이 높은 경우에 렉틴 상의 결합 부위는 내인성 글루코스에 의해 충족되어, 합성 인슐린-접합체가 순환하고 그의 효과를 발휘하

도록 한다. 도 1은 4개의 당의 상대적 렉틴 결합 친화성을 보여주며; AETM이 나타낸 4개의 당 중 가장 높은 친화성으로 렉틴에 결합한다. 본 발명자들은 특정 당의 렉틴 결합 친화성이 본 발명자들의 합성 인슐린-접합체의 생체내 글루코스-반응성의 조절에 있어서 적어도 부분적으로 역할을 하는 것으로 이론을 세웠다.

[0056] 통상적인 인슐린의 지속 방출 제제는 체순환 내로의 인슐린 방출을 느리게 하기 위해 통상적으로 사용된다. 예를 들어, PZI (프로타민 아연 인슐린) 제제가 상기 목적을 위해 사용될 수 있다. 통상적인 인슐린이 프로타민 및 아연과 함께 제제화되는 경우, 일반적으로 결정질 지속 방출 제제가 생성된다. 대조적으로, 인슐린-접합체, 예컨대 I-6이 유사한 방법을 이용하여 프로타민 및 아연과 함께 제제화되는 경우, 무정형 제제가 생성되고, 통상적인 인슐린, 예를 들어 RHI에 대해 필요한 것보다 훨씬 많은 프로타민 및 아연을 필요로 하여 지속 방출을 제공한다. 놀랍게도, 본 발명자들은 인슐린-접합체, 예컨대 I-6이 통상적인 인슐린과는 달리 첨가제, 예컨대 프로타민 또는 아연의 부재하에 결정화될 수 있음을 발견하였다. 본원에 기재된 바와 같이, 이들 결정질 인슐린-접합체는 후속으로 제제화되어 결정질 지속 방출 제제를 생성한다. 인슐린-접합체의 결정질 제제는 배치 대 배치 재현성 개선, 제제 안정성 증진, 및 장기간의 보관에 걸친 입자 응집의 감소에 있어서 유리할 수 있다.

[0057] **접합체**

[0058] 한 측면에서, 본 개시내용은 인슐린 분자 및 리간드 (제1 사카라이드 포함)를 포함하는 결정질 접합체를 제공한다. 리간드 또는 리간드들은, 결정질 인슐린-접합체를 포유동물에게 투여하는 경우에 접합체의 하나 이상의 약동학 또는 약력학 특성이 제2 사카라이드의 혈청 농도에 민감성이도록 한다. 특정 실시양태에서, 접합체의 PK 및/또는 PD 특성은 내인성 사카라이드, 예컨대 글루코스의 혈청 농도에 민감성이다. 특정 실시양태에서, 접합체의 PK 및/또는 PD 특성은 외인성 사카라이드, 예를 들어 비제한적으로 만노스, L-푸코스, N-아세틸 글루코사민 및/또는 알파-메틸 만노스의 혈청 농도에 민감성이다.

[0059] 특정 실시양태에서, 인슐린 부재하의 접합체의 분자량은 약 10,000 Da 미만이다. 예를 들어, 인슐린 부재하의 접합체의 분자량은 약 250 내지 약 5,000 Da, 약 450 내지 약 3,500 Da, 약 750 내지 약 2,500 Da, 또는 약 900 내지 약 2,000 Da의 범위일 수 있다.

[0060] 특정 실시양태에서, 인슐린을 포함하는 접합체의 분자량은 약 20,000 Da 미만이다. 예를 들어, 인슐린을 포함하는 접합체의 분자량은 약 2,000 내지 약 18,000 Da, 약 4,000 내지 약 15,000 Da, 약 5,000 내지 약 10000 Da, 또는 약 6,500 내지 약 8,000 Da의 범위일 수 있다.

[0061] 특정 실시양태에서, 접합체는 유일 분자량을 갖는다 (즉, 1의 다분산 지수를 가짐).

[0062] *PK 및 PD 특성*

[0063] 다양한 실시양태에서, 결정질 인슐린-접합체의 약동학 및/또는 약력학 거동은 사카라이드의 혈청 농도의 변화에 의해 변경될 수 있다.

[0064] 예를 들어, 약동학 (PK) 관점으로부터, 혈청 농도 곡선은 사카라이드 (예를 들어, 글루코스)의 혈청 농도가 증가하는 경우, 또는 사카라이드의 혈청 농도가 역치에 교차되는 경우 (예를 들어, 정상 글루코스 수준보다 높음) 상향 이동될 수 있다.

[0065] 특정 실시양태에서, 결정질 인슐린-접합체의 혈청 농도 곡선은 금식 및 고혈당 조건하의 포유동물에게 투여되는 경우에 실질적으로 상이하다. 본원에 사용된 용어 "실질적으로 상이한"은 2개의 곡선이 스튜던트 t-검정 ($p < 0.05$)에 의해 측정시 실질적으로 상이함을 의미한다. 본원에 사용된 용어 "금식 조건"은, 혈청 농도 곡선이 5명 이상의 금식시킨 비-당뇨병 개체로부터의 데이터를 조합함으로써 얻어진다는 것을 의미한다. 특정 실시양태에서, 금식시킨 비-당뇨병 개체는 혈액 채취 시점에 당뇨병 증상을 나타내지 않고 혈액 채취 시점의 12 시간 이내에 아무것도 먹지 않은, 무작위로 선택된 18 내지 30세의 인간이다. 본원에 사용된 용어 "고혈당 조건"은, 혈청 농도 곡선이, 접합체 및 글루코스의 동시 투여에 의해 고혈당 조건 (금식 조건하에 관찰된 평균 글루코스 농도를 초과하여 100 mg/dL 이상의 글루코스 $C_{max}$)이 유도된 5명 이상의 금식시킨 비-당뇨병 개체로부터의 데이터를 조합함으로써 얻어진다는 것을 의미한다. 접합체 및 글루코스의 동시 투여는 단순하게, 접합체가 혈청 내에 검출가능한 수준으로 존재하는 경우의 기간 동안 글루코스 $C_{max}$가 나타나는 것을 필요로 한다. 예를 들어, 글루코스 주사 (또는 섭취)는 접합체 투여 직전에, 그와 동시에, 또는 직후에 일어나도록 시기를 조절할 수 있다. 특정 실시양태에서, 접합체 및 글루코스는 상이한 경로로, 또는 상이한 위치에서 투여된다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 접합체는 피하로 투여되는 반면, 글루코스는 경구로 또는 정맥내로 투여된다.

[0066] 특정 실시양태에서, 접합체의 혈청 $C_{max}$는 금식 조건과 비교하여 고혈당 조건하에 더 높다. 부가적으로 또는 대안적으로, 특정 실시양태에서, 접합체의 혈청 곡선 아래 면적 (AUC)은 금식 조건과 비교하여 고혈당 조건하에 더 높다. 다양한 실시양태에서, 접합체의 혈청 제거 속도는 금식 조건과 비교하여 고혈당 조건하에 더 느리다. 실시예에서 논의되는 바와 같이, 본 발명자들은 특정 실시양태에서 접합체의 혈청 농도 곡선이 하나의 짧은 반감기 및 하나의 긴 반감기를 나타내는 2-구획 이중-지수 모델을 이용하여 적합화될 수 있음을 발견하였다. 긴 반감기는 글루코스 농도에 특히 민감성인 것으로 보인다. 따라서, 특정 실시양태에서, 긴 반감기는 금식 조건과 비교하여 고혈당 조건하에 더 길다. 특정 실시양태에서, 금식 조건은 100 mg/dL 미만 (예를 들어, 80 mg/dL, 70 mg/dL, 60 mg/dL, 50 mg/dL 등)의 글루코스 $C_{max}$를 포함한다. 특정 실시양태에서, 고혈당 조건은 200 mg/dL 초과 (예를 들어, 300 mg/dL, 400 mg/dL, 500 mg/dL, 600 mg/dL 등)의 글루코스 $C_{max}$를 포함한다. 다른 PK 파라미터, 예컨대 평균 혈청 잔류 시간 (MRT), 평균 혈청 흡수 시간 (MAT) 등이 상기 언급된 파라미터 중 임의의 것 대신에 또는 그와 함께 사용될 수 있음을 인지할 것이다.

[0067] 인간, 개, 고양이 및 래트에서의 글루코스의 정상 범위는 60 내지 200 mg/dL이다. 당업자는 상이한 정상 범위 (예를 들어, 소형 돼지의 정상 범위의 글루코스 농도는 40 내지 150 mg/dl임)를 갖는 종에 대해 하기 값을 추정할 수 있을 것이다. 60 mg/dL 미만의 글루코스 농도는 저혈당으로 간주한다. 200 mg/dL 초과의 글루코스 농도는 고혈당으로 간주한다. 특정 실시양태에서, 접합체의 PK 특성은 글루코스 클램프 방법을 이용하여 시험할 수 있고, 접합체의 혈청 농도 곡선은 50 및 200 mg/dL, 50 및 300 mg/dL, 50 및 400 mg/dL, 50 및 500 mg/dL, 50 및 600 mg/dL, 100 및 200 mg/dL, 100 및 300 mg/dL, 100 및 400 mg/dL, 100 및 500 mg/dL, 100 및 600 mg/dL, 200 및 300 mg/dL, 200 및 400 mg/dL, 200 및 500 mg/dL, 200 및 600 mg/dL 등의 글루코스 농도로 투여시 실질적으로 상이할 수 있다. 부가적으로 또는 대안적으로, 혈청 $T_{max}$, 혈청 $C_{max}$, 평균 혈청 잔류 시간 (MRT), 평균 혈청 흡수 시간 (MAT) 및/또는 혈청 반감기는 두 글루코스 농도에서 실질적으로 상이할 수 있다. 하기 논의되는 바와 같이, 특정 실시양태에서, 100 mg/dL 및 300 mg/dL가 비교 글루코스 농도로서 사용될 수 있다. 그러나, 본 개시내용이 비제한적으로 하기 쌍 중 임의의 하나를 비롯한 대안적 쌍의 비교 글루코스 농도를 사용하는 각각의 이들 실시양태를 포함한다는 것을 이해해야 한다: 50 및 200 mg/dL, 50 및 300 mg/dL, 50 및 400 mg/dL, 50 및 500 mg/dL, 50 및 600 mg/dL, 100 및 200 mg/dL, 100 및 400 mg/dL, 100 및 500 mg/dL, 100 및 600 mg/dL, 200 및 300 mg/dL, 200 및 400 mg/dL, 200 및 500 mg/dL, 200 및 600 mg/dL 등.

[0068] 따라서, 특정 실시양태에서, 접합체의 $C_{max}$는 포유동물에게 두 글루코스 농도 (예를 들어, 300 대 100 mg/dL 글루코스) 중 더 높은 농도로 투여하는 경우에 더 높다. 특정 실시양태에서, 접합체의 $C_{max}$는 포유동물에게 두 글루코스 농도 (예를 들어, 300 대 100 mg/dL 글루코스) 중 더 높은 농도로 투여하는 경우에 50% 이상 (예를 들어, 100% 이상, 200% 이상 또는 400% 이상) 더 높다.

[0069] 특정 실시양태에서, 접합체의 AUC는 포유동물에게 두 글루코스 농도 (예를 들어, 300 대 100 mg/dL 글루코스) 중 더 높은 농도로 투여하는 경우에 더 크다. 특정 실시양태에서, 접합체의 AUC는 포유동물에게 두 글루코스 농도 (예를 들어, 300 대 100 mg/dL 글루코스) 중 더 높은 농도로 투여하는 경우에 50% 이상 (예를 들어, 100% 이상, 200% 이상 또는 400% 이상) 더 크다.

[0070] 특정 실시양태에서, 접합체의 혈청 제거 속도는 포유동물에게 두 글루코스 농도 (예를 들어, 300 대 100 mg/dL 글루코스) 중 더 높은 농도로 투여하는 경우에 더 느리다. 특정 실시양태에서, 접합체의 혈청 제거 속도는 포유동물에게 두 글루코스 농도 (예를 들어, 100 대 300 mg/dL 글루코스) 중 더 낮은 농도로 투여하는 경우에 25% 이상 (예를 들어, 50% 이상, 100% 이상, 200% 이상 또는 400% 이상) 빠르다.

[0071] 실시예에서 논의되는 바와 같이, 본 발명자들은 특정 실시양태에서 접합체의 혈청 농도 곡선이 하나의 짧은 반감기 및 하나의 긴 반감기를 나타내는 2-구획 이중-지수 모델을 이용하여 적합화될 수 있다는 것을 발견하였다. 긴 반감기는 글루코스 농도에 특히 민감성인 것으로 보여졌다. 따라서, 특정 실시양태에서, 긴 반감기는 포유동물에게 두 글루코스 농도 (예를 들어, 300 대 100 mg/dL 글루코스) 중 더 높은 농도로 투여하는 경우에 더 길다. 특정 실시양태에서, 긴 반감기는 포유동물에게 두 글루코스 농도 (예를 들어, 300 대 100 mg/dL 글루코스) 중 더 높은 농도로 투여하는 경우에 50% 이상 (예를 들어, 100% 이상, 200% 이상 또는 400% 이상) 더 길다.

[0072] 특정 실시양태에서, 접합체의 혈청 농도 곡선은 고혈당 조건하의 포유동물에게 투여하는 경우에 비접합된 버전의 인슐린의 혈청 농도 곡선과 실질적으로 동일하다. 본원에 사용된 용어 "실질적으로 동일한"은 스튜던트 t-검정 ($p > 0.05$)에 의한 측정시 두 곡선 사이에 유의한 차이가 없음을 의미한다. 특정 실시양태에서, 접합체의 혈청 농도 곡선은 금식 조건하에 투여되는 경우에 비접합된 버전의 인슐린의 혈청 농도 곡선과 실질적으로 상이

하다. 특정 실시양태에서, 접합체의 혈청 농도 곡선은 고혈당 조건하에 투여시 비접합된 버전의 인슐린의 혈청 농도 곡선과 실질적으로 동일하고, 금식 조건하에 투여시 실질적으로 상이하다. 특정 실시양태에서, 고혈당 조건은 200 mg/dL 초과 (예를 들어, 300 mg/dL, 400 mg/dL, 500 mg/dL, 600 mg/dL 등)의 글루코스 $C_{max}$를 포함한다. 특정 실시양태에서, 금식 조건은 100 mg/dL 미만 (예를 들어, 80 mg/dL, 70 mg/dL, 60 mg/dL, 50 mg/dL 등)의 글루코스 $C_{max}$를 포함한다. 상기 언급된 PK 파라미터, 예컨대 혈청 $T_{max}$, 혈청 $C_{max}$, AUC, 평균 혈청 잔류 시간 (MRT), 평균 혈청 흡수 시간 (MAT) 및/또는 혈청 반감기 중 임의의 것이 비교될 수 있음을 인지할 것이다.

[0073] 약력학 (PD) 관점으로부터, 접합체의 생물활성은 글루코스 농도가 증가하는 경우, 또는 글루코스 농도가 역치에 교차되는 경우 (예를 들어, 정상 글루코스 수준보다 높음) 증가할 수 있다. 특정 실시양태에서, 접합체의 생물활성은 고혈당 조건과 비교하여 금식 조건하에 투여하는 경우에 더 낮다. 특정 실시양태에서, 금식 조건은 100 mg/dL 미만 (예를 들어, 80 mg/dL, 70 mg/dL, 60 mg/dL, 50 mg/dL 등)의 글루코스 $C_{max}$를 포함한다. 특정 실시양태에서, 고혈당 조건은 200 mg/dL 초과 (예를 들어, 300 mg/dL, 400 mg/dL, 500 mg/dL, 600 mg/dL 등)의 글루코스 $C_{max}$를 포함한다.

[0074] 특정 실시양태에서, 접합체의 PD 특성은 일정한 글루코스 농도를 유지하는데 요구되는 글루코스 주입 속도 (GIR)를 측정함으로써 시험할 수 있다. 이러한 실시양태에 따라서, 접합체의 생물활성은 50 및 200 mg/dL, 50 및 300 mg/dL, 50 및 400 mg/dL, 50 및 500 mg/dL, 50 및 600 mg/dL, 100 및 200 mg/dL, 100 및 300 mg/dL, 100 및 400 mg/dL, 100 및 500 mg/dL, 100 및 600 mg/dL, 200 및 300 mg/dL, 200 및 400 mg/dL, 200 및 500 mg/dL, 200 및 600 mg/dL 등의 글루코스 농도로 투여하는 경우에 실질적으로 상이할 수 있다. 따라서, 특정 실시양태에서, 접합체의 생물활성은 포유동물에게 두 글루코스 농도 (예를 들어, 300 대 100 mg/dL 글루코스) 중 더 높은 농도로 투여하는 경우에 더 높다. 특정 실시양태에서, 접합체의 생물활성은 포유동물에게 두 글루코스 농도 (예를 들어, 300 대 100 mg/dL 글루코스) 중 더 높은 농도로 투여하는 경우에 25% 이상 (예를 들어, 50% 이상 또는 100% 이상) 더 높다.

[0075] 특정 실시양태에서, 인슐린의 PD 거동은 최소 혈액 글루코스 농도 ($T_{nadir}$)에 도달하는 시간, 혈액 글루코스 수준이 초기 값의 특정 백분율 미만 (예를 들어, 초기 값의 70% 또는 $T_{70\%\ BGL}$)으로 남아있는 지속기간 등을 비교하여 관찰할 수 있다.

[0076] 일반적으로, 본 섹션에서 논의된 PK 및 PD 특징화 중 어느 것은 발표되어 있는 다양한 약동학 및 약력학 방법 중 임의의 것에 따라 측정할 수 있음을 인지할 것이다 (예를 들어, 문헌 [Baudys et al., Bioconjugate Chem. 9: 176-183, 1998 for methods suitable for subcutaneous delivery] 참조). 또한, PK 및/또는 PD 특성이 임의의 포유동물 (예를 들어, 인간, 래트, 고양이, 미니돼지, 개 등)에서 측정될 수 있음을 이해해야 한다. 특정 실시양태에서, PK 및/또는 PD 특성은 인간에서 측정된다. 특정 실시양태에서, PK 및/또는 PD 특성은 래트에서 측정된다. 특정 실시양태에서, PK 및/또는 PD 특성은 미니돼지에서 측정된다. 특정 실시양태에서, PK 및/또는 PD 특성은 개에서 측정된다.

[0077] 또한, 상기 내용이 글루코스-반응성 접합체의 문맥에 기재되어 있지만, 동일한 특성 및 검정이 다른 사카라이드, 예를 들어 외인성 사카라이드, 예를 들어 만노스, L-푸코스, N-아세틸 글루코사민, 알파-메틸 만노스 등에 반응성인 접합체에 적용됨을 인지할 것이다. 하기 및 실시예에 보다 상세하게 논의되는 바와 같이, 금식 및 고혈당 조건하의 PK 및/또는 PD 특성을 비교하는 것 대신에, PK 및/또는 PD 특성을 금식 조건하의 외인성 사카라이드의 투여 경우 및 비투여 경우를 비교할 수 있다. 접합체가 주어진 외인성 사카라이드의 상이한 $C_{max}$ 값에 반응하도록 설계될 수 있음을 이해해야 한다.

[0078] *리간드(들)*

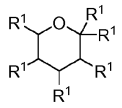
[0079] 일반적으로, 제공되는 결정질 인슐린-접합체는 1개 이상의 리간드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 접합체는 단일 리간드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 접합체는 2개 이상의 별개의 리간드, 예를 들어 2, 3, 4, 5개 이상의 리간드를 포함한다. 1개 초과의 리간드가 존재하는 경우, 리간드는 동일하거나 상이한 화학 구조를 가질 수 있다.

[0080] 특정 실시양태에서, 리간드는 내인성 사카라이드-결합 분자 (예를 들어, 비제한적으로 계면활성제 단백질 A 및 D, 또는 셀렉틴 패밀리의 구성원)에 결합하기 위해 사카라이드 (예를 들어, 글루코스 또는 만노스)와 경쟁할 수 있다. 특정 실시양태에서, 리간드는 세포-표면 당 수용체 (예를 들어, 비제한적으로 대식세포 만노스 수용체, 글루코스 수송체 리간드, 내피 세포 당 수용체 또는 간세포 당 수용체)에 결합하기 위해 사카라이드 (예를

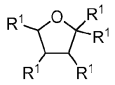
들어, 글루코스 또는 만노스)와 경쟁할 수 있다. 특정 실시양태에서, 리간드는 내인성 글루코스-결합 분자 (예를 들어, 비제한적으로 계면활성제 단백질 A 및 D, 또는 셀렉틴 패밀리의 구성원)에 결합하기 위해 글루코스와 경쟁할 수 있다. 특정 실시양태에서, 리간드는 비-인간 렉틴 (예를 들어, Con A)에 결합하기 위해 사카라이드와 경쟁할 수 있다. 특정 실시양태에서, 리간드는 비-인간 렉틴 (예를 들어, Con A)에 결합하기 위해 글루코스 또는 만노스와 경쟁할 수 있다. 예시적인 글루코스-결합 렉틴에는 칼넥신, 칼레티쿨린, N-아세틸글루코사민 수용체, 셀렉틴, 아시알로당단백질 수용체, 콜렉틴 (만노스-결합 렉틴), 만노스 수용체, 아그레칸, 베르시칸, 피숨 사티붐 응집소 (PSA), 비시아 파바 렉틴, 렌즈 쿨리나리스 렉틴, 대두 렉틴, 땅콩 렉틴, 라티루스 오크루스 렉틴, 잠두 렉틴, 소포라 자포니카 렉틴, 보우링기아 밀브라에디이 렉틴, 콘카나발린 A (Con A) 및 미국자리공 미토겐이 포함된다.

[0081] 특정 실시양태에서, 리간드는 하기 화학식 IVa 또는 IVb를 갖는다.

[0082] <화학식 IVa>

[0083] 

[0084] <화학식 IVb>

[0085] 

[0086] 상기 식에서,

[0087] 각각의 $R^1$은 독립적으로 수소, $-OR^y$, $-N(R^y)_2$, $-SR^y$, -O-Y, -G-Z 또는 $-CH_2R^x$이고;

[0088] 각각의 $R^x$는 독립적으로 수소, $-OR^y$, $-N(R^y)_2$, $-SR^y$ 또는 -O-Y이고;

[0089] 각각의 $R^y$는 독립적으로 $-R^2$, $-SO_2R^2$, $-S(O)R^2$, $-P(O)(OR^2)_2$, $-C(O)R^2$, $-CO_2R^2$ 또는 $-C(O)N(R^2)_2$ 이고;

[0090] 각각의 Y는 독립적으로 모노사카라이드, 디사카라이드 또는 트리사카라이드이고;

[0091] 각각의 G는 독립적으로 공유 결합 또는 임의로 치환된 $C_{1-9}$ 알킬렌이고, 여기서 G의 1개 이상의 메틸렌 단위는 -O-, -S-, $-N(R^2)-$, -C(O)-, -OC(O)-, -C(O)O-, $-C(O)N(R^2)-$, $-N(R^2)C(O)-$, $-N(R^2)C(O)N(R^2)-$, $-SO_2-$, $-SO_2N(R^2)-$, $-N(R^2)SO_2-$ 또는 $-N(R^2)SO_2N(R^2)-$에 의해 임의로 대체되고;

[0092] 각각의 Z는 독립적으로 할로겐, $-N(R^2)_2$, $-OR^2$, $-SR^2$, $-N_3$, $-C\equiv CR^2$, $-CO_2R^2$, $-C(O)R^2$ 또는 $-OSO_2R^2$이고;

[0093] 각각의 $R^2$는 독립적으로 수소; 또는 $C_{1-6}$ 지방족, 페닐, 질소, 산소 또는 황으로부터 선택된 1 내지 2개의 헤테로원자를 갖는 4 내지 7원 헤테로시클릭 고리, 또는 질소, 산소 또는 황으로부터 선택된 1 내지 4개의 헤테로원자를 갖는 5 내지 6원 모노시클릭 헤테로아릴 고리로부터 선택된 임의로 치환된 기이다.

[0094] 특정 실시양태에서, 화학식 IVa 또는 IVb의 리간드는 모노사카라이드이다. 특정 실시양태에서, 리간드는 디사카라이드이다. 특정 실시양태에서, 리간드는 트리사카라이드이다. 특정 실시양태에서, 리간드는 테트라사카라이드이다. 특정 실시양태에서, 리간드는 총 4개 이하의 모노사카라이드 잔기를 포함한다.

[0095] 상기 일반적으로 정의된 바와 같이, 각각의 $R^1$은 독립적으로 수소, $-OR^y$, $-N(R^y)_2$, $-SR^y$, -O-Y, -G-Z 또는 $-CH_2R^x$이다. 특정 실시양태에서, $R^1$은 수소이다. 특정 실시양태에서, $R^1$은 -OH이다. 다른 실시양태에서, $R^1$은 $-NHC(O)CH_3$이다. 특정 실시양태에서, $R^1$은 -O-Y이다. 다른 특정 실시양태에서, $R^1$은 -G-Z이다. 일부 실시양태에서, $R^1$은 $-CH_2OH$이다. 다른 실시양태에서, $R^1$은 $-CH_2$-O-Y이다. 또 다른 실시양태에서, $R^1$은 $-NH_2$이다. 당업

자는 화학식 IVa 또는 IVb 내의 각각의 $R^1$ 치환기가 (R) 또는 (S) 입체화학으로 존재할 수 있음을 인지할 것이다.

[0096] 상기 일반적으로 정의된 바와 같이, 각각의 $R^x$는 독립적으로 수소, $-OR^y$, $-N(R^y)_2$, $-SR^y$ 또는 -O-Y이다. 일부 실시양태에서, $R^x$는 수소이다. 특정 실시양태에서, $R^x$는 -OH이다. 다른 실시양태에서, $R^x$는 -O-Y이다.

[0097] 상기 일반적으로 정의된 바와 같이, 각각의 $R^y$는 독립적으로 $-R^2$, $-SO_2R^2$, $-S(O)R^2$, $-P(O)(OR^2)_2$, $-C(O)R^2$, $-CO_2R^2$ 또는 $-C(O)N(R^2)_2$ 이다. 일부 실시양태에서, $R^y$는 수소이다. 다른 실시양태에서, $R^y$는 $-R^2$이다. 일부 실시양태에서, $R^y$는 $-C(O)R^2$이다. 특정 실시양태에서, $R^y$는 아세틸이다. 다른 실시양태에서, $R^y$는 $-SO_2R^2$, $-S(O)R^2$, $-P(O)(OR^2)_2$, $-CO_2R^2$ 또는 $-C(O)N(R^2)_2$이다.

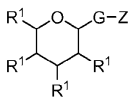
[0098] 상기 일반적으로 정의된 바와 같이, Y는 모노사카라이드, 디사카라이드 또는 트리사카라이드이다. 특정 실시양태에서, Y는 모노사카라이드이다. 일부 실시양태에서, Y는 디사카라이드이다. 다른 실시양태에서, Y는 트리사카라이드이다. 일부 실시양태에서, Y는 만노스, 글루코스, 프룩토스, 갈락토스, 람노스 또는 크실로피라노스이다. 일부 실시양태에서, Y는 수크로스, 말토스, 투라노스, 트레할로스, 셀로비오스 또는 락토스이다. 특정 실시양태에서, Y는 만노스이다. 특정 실시양태에서, Y는 D-만노스이다. 당업자는 사카라이드 Y가 아노머 탄소를 통해 -O-Y의 산소 기에 부착되어 글리코시드 결합을 형성함을 인지할 것이다. 글리코시드 결합은 알파 또는 베타 배위로 존재할 수 있다.

[0099] 상기 일반적으로 정의된 바와 같이, 각각의 G는 독립적으로 공유 결합 또는 임의로 치환된 $C_{1-9}$ 알킬렌이며, 여기서 G의 1개 이상의 메틸렌 단위는 -O-, -S-, $-N(R^2)-$, -C(O)-, -OC(O)-, -C(O)O-, $-C(O)N(R^2)-$, $-N(R^2)C(O)-$, $-N(R^2)C(O)N(R^2)-$, $-SO_2-$, $-SO_2N(R^2)-$, $-N(R^2)SO_2-$ 또는 $-N(R^2)SO_2N(R^2)-$에 의해 임의로 대체된다. 일부 실시양태에서, G는 공유 결합이다. 특정 실시양태에서, G는 $-O-C_{1-8}$ 알킬렌이다. 특정 실시양태에서, G는 $-OCH_2CH_2-$이다.

[0100] 상기 일반적으로 정의된 바와 같이, 각각의 Z는 독립적으로 할로겐, $-N(R^2)_2$, $-OR^2$, $-SR^2$, $-N_3$, $-C\equiv CR^2$, $-CO_2R^2$, $-C(O)R^2$ 또는 $-OSO_2R^2$이다. 일부 실시양태에서, Z는 할로겐 또는 $-OSO_2R^2$이다. 다른 실시양태에서, Z는 $-N_3$ 또는 $-C\equiv CR^2$이다. 특정 실시양태에서, Z는 $-N(R^2)_2$, $-OR^2$ 또는 $-SR^2$이다. 특정 실시양태에서, Z는 -SH이다. 특정 실시양태에서, Z는 $-NH_2$이다. 특정 실시양태에서, -G-Z는 $-OCH_2CH_2NH_2$이다.

[0101] 일부 실시양태에서, 화학식 IVa의 C1 탄소 상의 $R^1$ 치환기는 -G-Z이다 (하기 화학식 IVa-i의 화합물을 제공함).

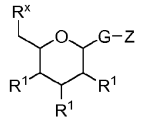
[0102] <화학식 IVa-i>

[0103] 

[0104] 상기 식에서, $R^1$, G 및 Z는 본원에 정의되고 기재된 바와 같다.

[0105] 일부 실시양태에서, 리간드는 하기 화학식 IVa-ii를 갖는다.

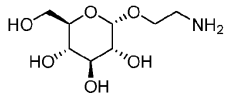
[0106] <화학식 IVa-ii>

[0107] 

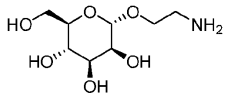
[0108] 상기 식에서, $R^1$, $R^x$, G 및 Z는 본원에 정의되고 기재된 바와 같다.

[0109] 특정 실시양태에서, 리간드(들)은 글루코스로서 동일한 화학 구조를 가질 수 있거나, 또는 글루코스의 화학적으로 관련된 종일 수 있다. 다양한 실시양태에서, 리간드(들)이 글루코스와 상이한 화학 구조를 갖는 것이, 예를 들어 접합체의 글루코스 반응을 미세 조정하기 위하여 유리할 수 있다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 글루코스, 만노스, L-푸코스, 또는 이들의 유도체 (예를 들어, 알파-L-푸코피라노시드, 만노사민, 베타-연결된 N-아세틸 만노사민, 메틸글루코스, 메틸만노스, 에틸글루코스, 에틸만노스, 프로필글루코스, 프로필만노스 등) 및/또는 이들의 고급 조합물 (예를 들어, 비만노스, 선형 및/또는 분지형 트리만노스 등)를 포함하는 것이 리간드로 사용될 수 있다.

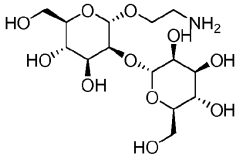
[0110] 특정 실시양태에서, 리간드는 모노사카라이드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 리간드는 디사카라이드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 리간드는 트리사카라이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 리간드는 사카라이드 및 1개 이상의 아민 기를 포함한다. 특정 실시양태에서, 사카라이드 및 아민 기는 $C_1$-$C_6$ 알킬 기, 예를 들어 $C_1$-$C_3$ 알킬 기에 의해 분리된다. 일부 실시양태에서, 리간드는 아미노에틸글루코스 (AEG)이다. 일부 실시양태에서, 리간드는 아미노에틸만노스 (AEM)이다. 일부 실시양태에서, 리간드는 아미노에틸비만노스 (AEBM)이다. 일부 실시양태에서, 리간드는 아미노에틸트리만노스 (AETM)이다. 일부 실시양태에서, 리간드는 β-아미노에틸-N-아세틸글루코사민 (AEGA)이다. 일부 실시양태에서, 리간드는 아미노에틸푸코스 (AEF)이다. 특정 실시양태에서, 사카라이드 리간드는 "D" 배위로 존재한다. 다른 실시양태에서, 사카라이드 리간드는 "L" 배위로 존재한다. 본 발명자들은 하기에 이들 예시적인 리간드의 구조를 나타내었다. 다른 예시적인 리간드는 당업자에 의해 인식될 것이다.



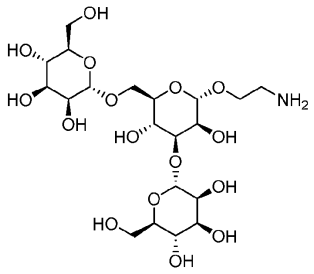
AEG



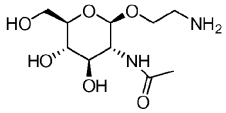
AEM



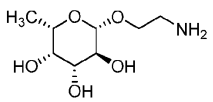
AEBM



AETM



AEGA



AEF

[0111]

[0112] 일반적으로, 리간드는 인슐린 분자에 직접적으로 또는 간접적으로 접합될 수 있다 (즉, 링커 또는 프레임워크를 통해). 하기 보다 상세히 논의되는 바와 같이, 리간드는 접합체 프레임워크 내에 (예를 들어, 중합체 주쇄의 일부로서 또는 단량체의 측기로서) 자연적으로 존재할 수 있다. 대안적으로 (또는 부가적으로), 리간드는 접합체 프레임워크에 인위적으로 도입될 수 있다 (예를 들어, 접합체 프레임워크에 합성적으로 첨가된 화학 기의 형태로). 특정 실시양태에서, 접합체는 5개 이상, 10개 이상 또는 20개 이상의 리간드를 포함하는 프레임워크를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 접합체는 단지 1, 2, 3, 4 또는 5개의 별개의 리간드를 포함할 수 있다.

[0113] 특정 실시양태에서, 2개 이상의 별개의 리간드는 상이한 접합 지점을 통해 인슐린 분자에 접합된다. 특정 실시양태에서, 2개 이상의 별개의 리간드는 인슐린 분자에도 접합되는 단일 접합체 프레임워크에 접합된다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 리간드, 예컨대 AETM, AEG, AEM, AEBM, AEGA 또는 AEF는 1개의 인슐린 분자에 접합된다. 특정 실시양태에서, 1개 이상의 AETM 리간드는 1개의 인슐린 분자에 접합된다. 일부 실시양태에서, 2개 이상의 리간드, 예컨대 AETM, AEG, AEM, AEBM, AEGA 또는 AEF는 1개의 접합 지점 또는 다중 접합 지점을 통해 1개의 인슐린 분자에 접합된다. 특정 실시양태에서, 2개 이상의 리간드는 동일한 리간드가 아니다. 특정 실시양태에서, 2개 이상의 리간드는 동일한 리간드이다. 특정 실시양태에서, 2개 이상의 AETM 리간드는 1개의 접합

지점 또는 다중 접합 지점을 통해 1개의 인슐린 분자에 접합된다.

[0114] 특정 실시양태에서, 1개 이상의 리간드 내의 사카라이드는 C1, C2 또는 C6 위치를 통해 접합된다 (링커에 의해 직접적으로 또는 간접적으로). 특정 실시양태에서, 접합은 C1 위치를 포함한다. 사카라이드의 C1 위치는 또한 아노머 탄소로서 지칭되며, 알파 또는 베타 입체구조로 인슐린 분자 또는 접합체 프레임워크에 연결될 수 있다. 특정 실시양태에서, C1 위치는 알파 아노머로서 배열된다. 다른 실시양태에서, C1 위치는 베타 아노머로서 배열된다.

[0115] *인슐린*

[0116] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "인슐린" 또는 "인슐린 분자"는 모든 염 및 비-염 형태의 인슐린 분자를 포함한다. 염 형태가 인슐린 분자에 따라 음이온성일 수도 있고 양이온성일 수도 있다는 것을 알 것이다. 본 발명자들은 "인슐린" 또는 "인슐린 분자"에 야생형 인슐린과 변형된 형태의 인슐린 둘 다를 이것들이 생물활성인 한은 (즉, 생체내 투여시에 검출가능한 글루코스 감소를 야기할 수 있음) 포함시키고자 한다. 야생형 인슐린은 정제된 형태, 합성 형태 또는 재조합 형태이든 간에 임의의 종으로부터의 인슐린 (예를 들어, 인간 인슐린, 돼지 인슐린, 소 인슐린, 토끼 인슐린, 양 인슐린 등)을 포함한다. 이것들 중 많은 것들이 시판되며, 예를 들어 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich) (미국 미주리주 세인트 루이스)에서 시판된다. 다양한 변형된 형태의 인슐린은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Crotty and Reynolds, Pediatr. Emerg. Care. 23:903-905, 2007] 및 [Gerich, Am. J. Med. 113:308-16, 2002] 및 상기 문헌에서 인용된 참조문헌 참조). 변형된 형태의 인슐린은 화학적으로 변형 (예를 들어, 하기 기재된 바와 같이 화학적 잔기, 예컨대 PEG 기 또는 지방 아실 쇄의 부가에 의함)될 수도 있고/있거나 돌연변이될 수도 있다 (즉, 1개 이상의 아미노산의 부가, 결실 또는 치환에 의함).

[0117] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 1-10 (예를 들어, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 5-9, 5-8, 5-7, 5-6, 6-9, 6-8, 6-7, 7-9, 7-8, 8-9, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1)개의 아미노산 치환, 부가 및/또는 결실에 의해 야생형 인슐린과 상이할 것이다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 오직 아미노산 치환에 의해서만 야생형 인슐린과 상이할 것이다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 오직 아미노산 부가에 의해서만 야생형 인슐린과 상이할 것이다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 아미노산 치환과 부가 둘다에 의해 야생형 인슐린과 상이할 것이다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 아미노산 치환과 결실 둘다에 의해 야생형 인슐린과 상이할 것이다.

[0118] 특정 실시양태에서, 아미노산 치환은 관여하는 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성 성질에 있어서의 유사성을 기초로 이루어질 수 있다. 특정 실시양태에서, 치환은 보존적일 수 있고, 즉, 1개의 아미노산이 유사한 형태 및 전하의 아미노산으로 대체된다. 보존적 치환은 당업계에 공지되어 있고, 전형적으로 하기 군 내에서의 치환을 포함한다: 글리신, 알라닌; 발린, 이소류신, 류신; 아스파르트산, 글루탐산; 아스파라진, 글루타민; 세린, 트레오닌; 리신, 아르기닌; 및 티로신, 페닐알라닌. 특정 실시양태에서, 적합한 돌연변이 선택시에 아미노산의 소수성 지수가 고려될 수 있다. 폴리펩티드에 상호작용하는 생물학적 기능을 부여하는데 있어서 소수성 아미노산 지수의 중요성은 당업계에서 일반적으로 이해된다. 대안적으로, 유사 아미노산의 치환은 친수성을 기초로 하여 효과적으로 이루어질 수 있다. 폴리펩티드의 상호작용하는 생물학적 기능 부여에 있어서 친수성의 중요성은 당업계에서 일반적으로 이해된다. 폴리펩티드 디자인에 있어서 소수성 지수 또는 친수성의 용도는 미국 특허 번호 5,691,198에서 추가로 논의된다.

[0119] 인간 인슐린 (A-쇄 및 B-쇄)의 야생형 서열을 하기 및 도 33에 나타냈다.

A-쇄 (서열 1) : GIVEQCCTSICSLYQLENYCN

[0120] B-쇄 (서열 2) : FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT

[0121] 인간 인슐린은 토끼, 돼지, 소 및 양의 인슐린과 오직 아미노산 A8, A9, A10 및 B30에서만 상이하다 (하기 표 참조).

| 인슐린 | 아미노산 위치 | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **A8** | **A9** | **A10** | **B30** |
| 인간 | Thr | Ser | Ile | Thr |
| 토끼 | Thr | Ser | Ile | Ser |
| 돼지 | Thr | Ser | Ile | Ala |
| 소 | Ala | Ser | Val | Ala |
| 양 | Ala | Gly | Val | Ala |

[0122]

[0123] 다양한 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 B-펩티드 서열의 B28 및/또는 B29 위치에서 돌연변이된다. 예를 들어, 인슐린 리스프로 (휴말로그(HUMALOG)®)는 B-펩티드의 C-말단의 끝에서 두번째 리신 및 프롤린 잔기가 역전된 ($Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린), 신속하게 작용하는 인슐린 돌연변이체이다. 이러한 변형은 인슐린 다량체의 형성을 차단한다. 인슐린 아스파르트 (노볼로그(NOVOLOG)®)는 위치 B28의 프롤린이 아스파르트산으로 치환된 ($Asp^{B28}$-인간 인슐린), 또 다른 신속하게 작용하는 인슐린 돌연변이체이다. 이 돌연변이체 역시 다량체의 형성을 방지한다. 일부 실시양태에서, 위치 B28 및/또는 B29에서의 돌연변이는 인슐린 폴리펩티드 내 다른 부위에서의 1개 이상의 돌연변이를 수반한다. 예를 들어, 인슐린 글루리신 (아피드라(APIDRA)®)은 위치 B3에서의 아스파르트산이 리신 잔기로 대체되고 위치 B29에서의 리신이 글루탐산 잔기로 대체된 ($Lys^{B3}Glu^{B29}$-인간 인슐린), 또 다른 신속하게 작용하는 인슐린 돌연변이체이다.

[0124] 다양한 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 인간 인슐린에 비해 이동된 등전점을 갖는다. 일부 실시양태에서, 등전점의 이동은 1개 이상의 아르기닌 잔기를 인슐린 A-펩티드의 N-말단 및/또는 인슐린 B-펩티드의 C-말단에 부가하여 달성된다. 이러한 인슐린 폴리펩티드의 예는 $Arg^{A0}$-인간 인슐린, $Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $Arg^{A0}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, 및 $Arg^{A0}Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린을 포함한다. 추가의 예로서, 인슐린 글라진 (란투스(LANTUS)®)은 $Asp^{A21}$이 글리신으로 대체되고 2개의 아르기닌 잔기가 B-펩티드의 C-말단에 부가된 예시적인 장시간 작용 인슐린 돌연변이체이다. 이러한 변화의 효과는 등전점의 이동이며, 이에 따라 pH 4에서 완벽하게 가용성인 용액을 생성한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 A21이 Gly인 A-펩티드 서열 및 B31이 Arg-Arg인 B-펩티드 서열을 포함한다. 본 개시내용은 이들 돌연변이 및 본원에 기재된 임의의 다른 돌연변이의 모든 단일 및 다중 조합 (예를 들어, $Gly^{A21}$-인간 인슐린, $Gly^{A21}Arg^{B31}$-인간 인슐린, $Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $Arg^{B31}$-인간 인슐린)을 포함한다는 것을 이해해야 한다.

[0125] 다양한 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 말단절단형이다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 폴리펩티드의 B-펩티드 서열에는 B1, B2, B3, B26, B27, B28, B29 및/또는 B30이 결실되어 있다. 특정 실시양태에서, 잔기들의 조합이 본 개시내용의 인슐린 폴리펩티드의 B-펩티드 서열에서 결실된다. 예를 들어, B-펩티드 서열에서 잔기 B(1-2), B(1-3), B(29-30), B(28-30), B(27-30) 및/또는 B(26-30)이 결실될 수 있다. 일부 실시양태에서, 이들 결실 및/또는 말단절단은 임의의 상기 언급된 인슐린 분자에 적용된다 (예를 들어, des(B30)-인슐린 리스프로, des(B30)-인슐린 아스파르트, des(B30)-인슐린 글루리신, des(B30)-인슐린 글라진 등을 생성하지만 이에 제한되지 않음).

[0126] 일부 실시양태에서, 인슐린 분자는 A 또는 B-펩티드 서열의 N- 또는 C-말단에 추가의 아미노산 잔기를 함유한다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 아미노산 잔기가 위치 A0, A21, B0 및/또는 B31에 위치한다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 아미노산 잔기가 위치 A0에 위치한다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 아미노산 잔기가 위치 A21에 위치한다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 아미노산 잔기가 위치 B0에 위치한다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 아미노산 잔기가 위치 B31에 위치한다. 특정 실시양태에서, 인슐린 분자는 위치 A0, A21, B0 또는 B31에서 임의의 추가의 아미노산 잔기를 포함하지 않는다.

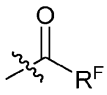
[0127] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 1개 이상의 아미드화 아미노산이 산성 형태로 대체되도록 돌연변이된다. 예를 들어, 아스파라진은 아스파르트산 또는 글루탐산으로 대체될 수 있다. 마찬가지로, 글루타민은 아스파르트산 또는 글루탐산으로 대체될 수 있다. 특히, $Asn^{A18}$, $Asn^{A21}$ 또는 $Asn^{B3}$ 또는 이들 잔기의 임의의 조합이 아스파르트산 또는 글루탐산으로 대체될 수 있다. $Gln^{A15}$ 또는 $Gln^{B4}$ 또는 이것들 둘다 아스파르트산

또는 글루탐산으로 대체될 수 있다. 특정 실시양태에서, 인슐린 분자는 위치 A21에서 아스파르트산을 가질 수도 있고 위치 B3에서 아스파르트산을 가질 수도 있으며 둘다 가질 수도 있다.

[0128] 당업자는 인슐린 분자 내의 다른 아미노산을 돌연변이시키면서도 생물학적 활성은 유지시키는 것이 가능함을 인식할 것이다. 예를 들어, 하기하는 변형이 또한 당업계에서 널리 수용되지만 이에 제한되지 않는다: 위치 B10의 히스티딘 잔기의 아스파르트산으로의 대체 ($His^{B10}$→$Asp^{B10}$), 위치 B1의 페닐알라닌 잔기의 아스파르트산으로의 대체 ($Phe^{B1}$→$Asp^{B1}$), 위치 B30의 트레오닌 잔기의 알라닌으로의 대체 ($Thr^{B30}$→$Ala^{B30}$), 위치 B26의 티로신 잔기의 알라닌으로의 대체 ($Tyr^{B26}$→$Ala^{B26}$), 및 위치 B9의 세린 잔기의 아스파르트산으로의 대체 ($Ser^{B9}$→$Asp^{B9}$).

[0129] 다양한 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 연장된 작용 프로파일을 갖는다. 따라서, 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 지방산으로 아실화될 수 있다. 즉, 아미드 결합이 인슐린 분자의 아미노 기와 지방산의 카르복실산 기 사이에 형성된다. 아미노 기는 인슐린 분자의 N-말단 아미노산의 알파-아미노 기일 수도 있고, 또는 인슐린 분자의 리신 잔기의 엡실론-아미노 기일 수도 있다. 본 개시내용의 인슐린 분자는 야생형 인슐린에 존재하는 3개의 아미노 기 중 1개 이상에서 아실화될 수도 있고, 또는 야생형 서열에 도입된 리신 잔기에서 아실화될 수도 있다. 특정 실시양태에서, 인슐린 분자는 위치 B1에서 아실화될 수 있다. 특정 실시양태에서, 인슐린 분자는 위치 B29에서 아실화될 수 있다. 특정 실시양태에서, 지방산은 미리스트산 (C14), 펜타데실산 (C15), 팔미트산 (C16), 헵타데실산 (C17) 및 스테아르산 (C18)으로부터 선택된다. 예를 들어, 인슐린 데테미르 (레베미르(LEVEMIR)®)는 $Thr^{B30}$이 결실되고 C14 지방산 쇄 (미리스트산)가 $Lys^{B29}$에 부착된 장시간 작용 인슐린 돌연변이체이다.

[0130] 일부 실시양태에서, A-펩티드의 N-말단, B-펩티드의 N-말단, 위치 B29의 Lys의 엡실론-아미노 기 또는 본 개시내용의 인슐린 분자의 임의의 다른 이용가능한 아미노 기는 하기 일반식의 지방산 잔기에 공유 연결된다:



(여기서, $R^F$는 수소 또는 $C_{1-30}$ 알킬 기임). 일부 실시양태에서, $R^F$는 $C_{1-20}$ 알킬 기, $C_{3-19}$ 알킬 기, $C_{5-18}$ 알킬 기, $C_{6-17}$ 알킬 기, $C_{8-16}$ 알킬 기, $C_{10-15}$ 알킬 기 또는 $C_{12-14}$ 알킬 기이다. 특정 실시양태에서, 인슐린 폴리펩티드는 A1 위치의 잔기에서 접합된다. 특정 실시양태에서, 인슐린 폴리펩티드는 B1 위치의 잔기에서 접합된다. 특정 실시양태에서, 인슐린 폴리펩티드는 위치 B29의 Lys의 엡실론-아미노 기의 잔기에서 접합된다. 특정 실시양태에서, 인슐린 분자의 위치 B28은 Lys이고 $Lys^{B28}$의 엡실론-아미노 기가 지방산 잔기에 접합된다. 특정 실시양태에서, 인슐린 분자의 위치 B3은 Lys이고 $Lys^{B3}$의 엡실론-아미노 기가 지방산 잔기에 접합된다. 일부 실시양태에서, 지방산 쇄는 8개 내지 20개 탄소 길이이다. 일부 실시양태에서, 지방산은 옥탄산 (C8), 노난산 (C9), 데칸산 (C10), 운데칸산 (C11), 도데칸산 (C12) 또는 트리데칸산 (C13)이다. 특정 실시양태에서, 지방산은 미리스트산 (C14), 펜타데칸산 (C15), 팔미트산 (C16), 헵타데칸산 (C17), 스테아르산 (C18), 노나데칸산 (C19) 또는 아라키드산 (C20)이다. 예를 들어, 인슐린 데테미르 (레베미르®)는 $Thr^{B30}$이 결실되고 C14 지방산 쇄 (미리스트산)가 $Lys^{B29}$에 부착된 장시간 작용 인슐린 돌연변이체이다.

[0131] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린 (인슐린 리스프로), $Asp^{B28}$-인간 인슐린 (인슐린 아스파르트), $Lys^{B3}Glu^{B29}$-인간 인슐린 (인슐린 글루리신), $Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린 (인슐린 글라진), $N^{\varepsilon B29}$-미리스토일-des(B30)-인간 인슐린 (인슐린 데테미르), $Ala^{B26}$-인간 인슐린, $Asp^{B1}$-인간 인슐린, $Arg^{A0}$-인간 인슐린, $Asp^{B1}Glu^{B13}$-인간 인슐린, $Gly^{A21}$-인간 인슐린, $Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $Arg^{A0}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $Arg^{A0}Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, des(B30)-인간 인슐린, des(B27)-인간 인슐린, des(B28-B30)-인간 인슐린, des(B1)-인간 인슐린, des(B1-B3)-인간 인슐린.

[0132] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B29}$-팔미토일-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-미리스토일-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-팔미토일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-미리스토일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린.

[0133] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B29}$-팔미토일-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B30}$-미리스토일-$Thr^{B29}Lys^{B30}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B30}$-팔미토일-$Thr^{B29}Lys^{B30}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-(N-팔미토일-ɣ-글루타밀)-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-(N-리토콜릴-ɣ-글루타밀)-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-(ω-카르복시헵타데카노일)-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-(ω-카르복시헵타데카노일)-인간 인슐린.

[0134] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B29}$-옥타노일-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-미리스토일-$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B31}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-미리스토일-$Gly^{A21}Gln^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-미리스토일-$Arg^{A0}Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-$Arg^{A0}Gly^{A21}Gln^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-미리스토일-$Arg^{A0}Gly^{A21}Asp^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-미리스토일-$Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-미리스토일-$Arg^{A0}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-옥타노일-$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-옥타노일-$Gly^{A21}Gln^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-옥타노일-$Arg^{A0}Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-옥타노일-$Arg^{A0}Gly^{A21}Gln^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-옥타노일-$Arg^{B0}Gly^{A21}Asp^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-옥타노일-$Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-옥타노일-$Arg^{A0}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린.

[0135] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 폴리펩티드 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B28}$-미리스토일-$Gly^{A21}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-미리스토일-$Gly^{A21}Gln^{B3}Lys^{B28}Pro^{B30}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-미리스토일-$Arg^{A0}Gly^{A21}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-미리스토일-$Arg^{A0}Gly^{A21}Gln^{B3}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-미리스토일-$Arg^{A0}Gly^{A21}Asp^{B3}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-미리스토일-$Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-미리스토일-$Arg^{A0}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-옥타노일-$Gly^{A21}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린.

[0136] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B28}$-옥타노일-$Gly^{A21}Gln^{B3}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-옥타노일-$Arg^{A0}Gly^{A21}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-옥타노일-$Arg^{A0}Gly^{A21}Gln^{B3}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-옥타노일-$Arg^{A0}Gly^{A21}Asp^{B3}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-옥타노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-옥타노일-$Arg^{A0}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린.

[0137] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B29}$-트리데카노일-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-테트라데카노일-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-데카노일-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-도데카노일-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-트리데카노일-$Gly^{A21}$-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-테트라데카노일-$Gly^{A21}$-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-데카노일-$Gly^{A21}$-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-도데카노일-$Gly^{A21}$-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-트리데카노일-$Gly^{A21}Gln^{B3}$-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-테트라데카노일-$Gly^{A21}Gln^{B3}$-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-데카노일-$Gly^{A21}$-$Gln^{B3}$-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-도데카노일-$Gly^{A21}$-$Gln^{B3}$-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-트리데카노일-$Ala^{A21}$-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-테트라데카노일-$Ala^{A21}$-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-데카노일-$Ala^{A21}$-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-도데카노일-$Ala^{A21}$-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-트리데카노일-$Ala^{A21}$-$Gln^{B3}$-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-테트라데카노일-$Ala^{A21}Gln^{B3}$-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-데카노일-$Ala^{A21}Gln^{B3}$-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-도데카노일-$Ala^{A21}Gln^{B3}$-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-트리데카노일-$Gln^{B3}$-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-테트라데카노일-$Gln^{B3}$-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-데카노일-$Gln^{B3}$-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-도데카노일-$Gln^{B3}$-des(B30)-인간 인슐린.

[0138] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적

변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B29}$-트리데카노일-$Gly^{A21}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-테트라데카노일-$Gly^{A21}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-데카노일-$Gly^{A21}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-도데카노일-$Gly^{A21}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-트리데카노일-$Ala^{A21}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-테트라데카노일-$Ala^{A21}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-데카노일-$Ala^{A21}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-도데카노일-$Ala^{A21}$-인간 인슐린.

[0139] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B29}$-트리데카노일-$Gly^{A21}Gln^{B3}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-테트라데카노일-$Gly^{A21}Gln^{B3}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-데카노일-$Gly^{A21}Gln^{B3}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-도데카노일-$Gly^{A21}Gln^{B3}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-트리데카노일-$Ala^{A21}Gln^{B3}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-테트라데카노일-$Ala^{A21}Gln^{B3}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-데카노일-$Ala^{A21}Gln^{B3}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-도데카노일-$Ala^{A21}Gln^{B3}$-인간 인슐린.

[0140] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B29}$-트리데카노일-$Gln^{B3}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-테트라데카노일-$Gln^{B3}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-데카노일-$Gln^{B3}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-도데카노일-$Gln^{B3}$-인간 인슐린.

[0141] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B29}$-트리데카노일-$Glu^{B30}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-테트라데카노일-$Glu^{B30}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-데카노일-$Glu^{B30}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-도데카노일-$Glu^{B30}$-인간 인슐린.

[0142] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B29}$-트리데카노일-$Gly^{A21}Glu^{B30}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-테트라데카노일-$Gly^{A21}Glu^{B30}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-데카노일-$Gly^{A21}Glu^{B30}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-도데카노일-$Gly^{A21}Glu^{B30}$-인간 인슐린.

[0143] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B29}$-트리데카노일-$Gly^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-테트라데카노일-$Gly^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-데카노일-$Gly^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-도데카노일-$Gly^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-트리데카노일-$Ala^{A21}Glu^{B30}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-테트라데카노일-$Ala^{A21}Glu^{B30}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-데카노일-$Ala^{A21}Glu^{B30}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-도데카노일-$Ala^{A21}Glu^{B30}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-트리데카노일-$Ala^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-테트라데카노일-$Ala^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-데카노일-$Ala^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-도데카노일-$Ala^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$-인간 인슐린.

[0144] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B29}$-트리데카노일-$Gln^{B3}Glu^{B30}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-테트라데카노일-$Gln^{B3}Glu^{B30}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-데카노일-$Gln^{B3}Glu^{B30}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-도데카노일-$Gln^{B3}Glu^{B30}$-인간 인슐린.

[0145] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B29}$-포르밀-인간 인슐린, $N^{\alpha B1}$-포르밀-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-포르밀-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-포르밀-$N^{\alpha B1}$-포르밀-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-포르밀-$N^{\alpha A1}$-포르밀-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-포르밀-$N^{\alpha B1}$-포르밀-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-포르밀-$N^{\alpha A1}$-포르밀-$N^{\alpha B1}$-포르밀-인간 인슐린.

[0146] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B29}$-아세틸-인간 인슐린, $N^{\alpha B1}$-아세틸-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-아세틸-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-아세틸-$N^{\alpha B1}$-아세틸-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-아세틸-$N^{\alpha A1}$-아세틸-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-아세틸-$N^{\alpha B1}$-아세틸-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-아세틸-$N^{\alpha A1}$-아세틸-$N^{\alpha B1}$-아세틸-인간 인슐린.

[0147] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B29}$-프로피오닐-인간 인슐린, $N^{\alpha B1}$-프로피오닐-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-프로피오닐-인간 인슐린,

$N^{\varepsilon B29}$-아세틸-$N^{\alpha B1}$-프로피오닐-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-프로피오닐-$N^{\alpha A1}$-프로피오닐-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-프로피오닐-$N^{\alpha B1}$-프로피오닐-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-프로피오닐-$N^{\alpha A1}$-프로피오닐-$N^{\alpha B1}$-프로피오닐-인간 인슐린.

[0148] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B29}$-부티릴-인간 인슐린, $N^{\alpha B1}$-부티릴-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-부티릴-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-부티릴-$N^{\alpha B1}$-부티릴-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-부티릴-$N^{\alpha A1}$-부티릴-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-부티릴-$N^{\alpha B1}$-부티릴-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-부티릴-$N^{\alpha A1}$-부티릴-$N^{\alpha B1}$-부티릴-인간 인슐린.

[0149] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B29}$-펜타노일-인간 인슐린, $N^{\alpha B1}$-펜타노일-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-펜타노일-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-펜타노일-$N^{\alpha B1}$-펜타노일-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-펜타노일-$N^{\alpha A1}$-펜타노일-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-펜타노일-$N^{\alpha B1}$-펜타노일-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-펜타노일-$N^{\alpha A1}$-펜타노일-$N^{\alpha B1}$-펜타노일-인간 인슐린.

[0150] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B29}$-헥사노일-인간 인슐린, $N^{\alpha B1}$-헥사노일-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-헥사노일-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-헥사노일-$N^{\alpha B1}$-헥사노일-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-헥사노일-$N^{\alpha A1}$-헥사노일-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-헥사노일-$N^{\alpha B1}$-헥사노일-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-헥사노일-$N^{\alpha A1}$-헥사노일-$N^{\alpha B1}$-헥사노일-인간 인슐린.

[0151] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B29}$-헵타노일-인간 인슐린, $N^{\alpha B1}$-헵타노일-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-헵타노일-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-헵타노일-$N^{\alpha B1}$-헵타노일-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-헵타노일-$N^{\alpha A1}$-헵타노일-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-헵타노일-$N^{\alpha B1}$-헵타노일-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-헵타노일-$N^{\alpha A1}$-헵타노일-$N^{\alpha B1}$-헵타노일-인간 인슐린.

[0152] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $N^{\alpha B1}$-옥타노일-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-옥타노일-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-옥타노일-$N^{\alpha B1}$-옥타노일-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-옥타노일-$N^{\alpha A1}$-옥타노일-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-옥타노일-$N^{\alpha B1}$-옥타노일-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-옥타노일-$N^{\alpha A1}$-옥타노일-$N^{\alpha B1}$-옥타노일-인간 인슐린.

[0153] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B29}$-노나노일-인간 인슐린, $N^{\alpha B1}$-노나노일-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-노나노일-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-노나노일-$N^{\alpha B1}$-노나노일-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-노나노일-$N^{\alpha A1}$-노나노일-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-노나노일-$N^{\alpha B1}$-노나노일-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-노나노일-$N^{\alpha A1}$-노나노일-$N^{\alpha B1}$-노나노일-인간 인슐린.

[0154] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B29}$-데카노일-인간 인슐린, $N^{\alpha B1}$-데카노일-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-데카노일-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-데카노일-$N^{\alpha B1}$-데카노일-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-데카노일-$N^{\alpha A1}$-데카노일-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-데카노일-$N^{\alpha B1}$-데카노일-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-데카노일-$N^{\alpha A1}$-데카노일-$N^{\alpha B1}$-데카노일-인간 인슐린.

[0155] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B28}$-포르밀-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\alpha B1}$-포르밀-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-포르밀-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-포르밀-$N^{\alpha B1}$-포르밀-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-포르밀-$N^{\alpha A1}$-포르밀-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-포르밀-$N^{\alpha B1}$-포르밀-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-포르밀-$N^{\alpha A1}$-포르밀-$N^{\alpha B1}$-포르밀-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-아세틸-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\alpha B1}$-아세틸-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-아세틸-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-아세틸-$N^{\alpha B1}$-아세틸-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린.

[0156] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적

변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B28}$-아세틸-$N^{\alpha A1}$-아세틸-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-아세틸-$N^{\alpha B1}$-아세틸-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-아세틸-$N^{\alpha A1}$-아세틸-$N^{\alpha B1}$-아세틸-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린.

[0157] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B28}$-프로피오닐-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\alpha B1}$-프로피오닐-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-프로피오닐-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-프로피오닐-$N^{\alpha B1}$-프로피오닐-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-프로피오닐-$N^{\alpha A1}$-프로피오닐-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-프로피오닐-$N^{\alpha B1}$-프로피오닐-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-프로피오닐-$N^{\alpha A1}$-프로피오닐-$N^{\alpha B1}$-프로피오닐-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린.

[0158] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B28}$-부티릴-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\alpha B1}$-부티릴-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-부티릴-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-부티릴-$N^{\alpha B1}$-부티릴-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-부티릴-$N^{\alpha A1}$-부티릴-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-부티릴-$N^{\alpha B1}$-부티릴-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-부티릴-$N^{\alpha A1}$-부티릴-$N^{\alpha B1}$-부티릴-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린.

[0159] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B28}$-펜타노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\alpha B1}$-펜타노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-펜타노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-펜타노일-$N^{\alpha B1}$-펜타노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-펜타노일-$N^{\alpha A1}$-펜타노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-펜타노일-$N^{\alpha B1}$-펜타노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-펜타노일-$N^{\alpha A1}$-펜타노일-$N^{\alpha B1}$-펜타노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린.

[0160] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B28}$-헥사노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\alpha B1}$-헥사노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-헥사노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-헥사노일-$N^{\alpha B1}$-헥사노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-헥사노일-$N^{\alpha A1}$-헥사노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-헥사노일-$N^{\alpha B1}$-헥사노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-헥사노일-$N^{\alpha A1}$-헥사노일-$N^{\alpha B1}$-헥사노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린.

[0161] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B28}$-헵타노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\alpha B1}$-헵타노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-헵타노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-헵타노일-$N^{\alpha B1}$-헵타노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-헵타노일-$N^{\alpha A1}$-헵타노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-헵타노일-$N^{\alpha B1}$-헵타노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-헵타노일-$N^{\alpha A1}$-헵타노일-$N^{\alpha B1}$-헵타노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린.

[0162] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B28}$-옥타노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\alpha B1}$-옥타노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-옥타노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-옥타노일-$N^{\alpha B1}$-옥타노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-옥타노일-$N^{\alpha A1}$-옥타노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-옥타노일-$N^{\alpha B1}$-옥타노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-옥타노일-$N^{\alpha A1}$-옥타노일-$N^{\alpha B1}$-옥타노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린.

[0163] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B28}$-노나노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\alpha B1}$-노나노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-노나노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-노나노일-$N^{\alpha B1}$-노나노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-노나노일-$N^{\alpha A1}$-노나노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-노나노일-$N^{\alpha B1}$-노나노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-노나노일-$N^{\alpha A1}$-노나노일-$N^{\alpha B1}$-노나노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린.

[0164] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B28}$-데카노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\alpha B1}$-데카노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-데카노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-데카노일-$N^{\alpha B1}$-데카노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-데카노일-$N^{\alpha A1}$-데카노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-데카노일-$N^{\alpha B1}$-데카노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B28}$-데카노일-$N^{\alpha A1}$-데카노일-$N^{\alpha B1}$-데카노일-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-인간 인슐린.

[0165] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 하기하는 인슐린 분자 중 하나의 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체를 포함한다: $N^{\varepsilon B29}$-펜타노일-$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $N^{\alpha B1}$-헥사노일-$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-헵타노일-$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-옥타노일-$N^{\alpha B1}$-옥타노일-$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-프로피오닐-$N^{\alpha A1}$-프로피오닐-$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-아세틸-$N^{\alpha B1}$-아세틸-$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-포르밀-$N^{\alpha A1}$-포르밀-$N^{\alpha B1}$-포르밀-$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-포르밀-des(B26)-인간 인슐린, $N^{\alpha B1}$-아세틸-$Asp^{B28}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-프로피오닐-$N^{\alpha A1}$-프로피오닐-$N^{\alpha B1}$-프로피오닐-$Asp^{B1}Asp^{B3}Asp^{B21}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-펜타노일-$Gly^{A21}$-인간 인슐린, $N^{\alpha B1}$-헥사노일-$Gly^{A21}$-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-헵타노일-$Gly^{A21}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-옥타노일-$N^{\alpha B1}$-옥타노일-$Gly^{A21}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-프로피오닐-$N^{\alpha A1}$-프로피오닐-$Gly^{A21}$-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-아세틸-$N^{\alpha B1}$-아세틸-$Gly^{A21}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-포르밀-$N^{\alpha A1}$-포르밀-$N^{\alpha B1}$-포르밀-$Gly^{A21}$-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-부티릴-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\alpha B1}$-부티릴-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-부티릴-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-부티릴-$N^{\alpha B1}$-부티릴-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-부티릴-$N^{\alpha A1}$-부티릴-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\alpha A1}$-부티릴-$N^{\alpha B1}$-부티릴-des(B30)-인간 인슐린, $N^{\varepsilon B29}$-부티릴-$N^{\alpha A1}$-부티릴-$N^{\alpha B1}$-부티릴-des(B30)-인간 인슐린.

[0166] 본 개시내용은 또한 상기 언급된 돌연변이체 및/또는 화학적 변형체 중 임의의 것을 포함하는 변형된 형태의 비-인간 인슐린 (예를 들어, 돼지 인슐린, 소 인슐린, 토끼 인슐린, 양 인슐린 등)을 포함한다.

[0167] 이들 및 기타 변형된 인슐린 분자는 하기 문헌에 상세하게 기재되어 있다 (이들 문헌의 전체 개시내용은 본원에 참고로 포함됨):

미국 특허 번호

6,906,028; 6,551,992; 6,465,426; 6,444,641; 6,335,316; 6,268,335; 6,051,551; 6,034,054;
5,952,297; 5,922,675; 5,747,642; 5,693,609; 5,650,486; 5,547,929; 5,504,188; 5,474,978;
5,461,031 및 4,421,685;및 미국 특허 번호 7,387,996; 6,869,930; 6,174,856; 6,011,007;

[0168] 5,866,538 및 5,750,497.

[0169] 다양한 실시양태에서, 본 개시내용의 인슐린 분자는 3개의 야생형 디술피드 브릿지 (즉, A-쇄의 위치 7과 B-쇄의 위치 7 사이에 하나, A-쇄의 위치 20과 B-쇄의 위치 19 사이에 하나, 및 A-쇄의 위치 6과 위치 11 사이에 하나)를 포함한다.

[0170] 일부 실시양태에서, 인슐린 분자는 인슐린 수용체에 대한 그의 친화도가 감소되도록 변형 및/또는 돌연변이된다. 특정 이론에 얽매이고 싶지 않지만, 변형 (예를 들어, 아실화) 또는 돌연변이를 통해 인슐린 분자의 수용체 친화도를 감쇠시키는 것이 인슐린 분자가 혈청으로부터 제거되는 속도를 감소시킬 수 있다고 여겨진다. 일부 실시양태에서, 인슐린-접합체의 시험관내 감소된 인슐린 수용체 친화도는 보다 우수한 생체내 활성으로 해석된다. 특정 실시양태에서, 인슐린 분자를 돌연변이시켜서 돌연변이 부위가 접합 지점으로 사용되도록 하고, 돌연변이된 부위에서의 접합은 인슐린 수용체에 대한 결합을 감소시킨다 (예를 들어, $Lys^{A3}$). 다른 특정 실시양태에서, 기존 야생형 아미노산 또는 말단에서의 접합은 인슐린 수용체에 대한 결합을 감소시킨다 (예를 들어, $Gly^{A1}$). 일부 실시양태에서, 인슐린 분자는 위치 A4, A5, A8, A9 또는 B30에서 접합된다. 특정 실시양태에서, 위치 A4, A5, A8, A9 또는 B30에서의 접합은 야생형 아미노산 측쇄를 통해 일어난다 (예를 들어, $Glu^{A4}$). 다른 특정 실시양태에서, 인슐린 분자는 위치 A4, A5, A8, A9 또는 B30에서 돌연변이되어 접합 부위를 제공한다 (예를 들어, $Lys^{A4}$, $Lys^{A5}$, $Lys^{A8}$, $Lys^{A9}$ 또는 $Lys^{B30}$).

[0171] 인슐린 분자를 접합시키는 방법을 하기 기재한다. 특정 실시양태에서, 인슐린 분자는 A1 아미노산 잔기를 통해

리간드 또는 접합체 프레임워크에 접합된다. 특정 실시양태에서, A1 아미노산 잔기는 글리신이다. 그러나, 본 개시내용이 N-말단 접합으로 제한되지 않으며 특정 실시양태에서는 인슐린 분자가 비-말단 A-쇄 아미노산 잔기를 통해 접합될 수 있음을 이해해야 한다. 특히, 본 개시내용은 A-쇄의 임의의 위치에 존재하는 리신 잔기 (야생형 또는 부위-지정 돌연변이유발로 도입됨)의 엡실론-아민 기를 통한 접합을 포함한다. A-쇄에서의 상이한 접합 위치가 인슐린 활성의 상이한 감소를 야기할 수 있음을 알 것이다. 특히, 본 개시내용은 B-쇄의 임의의 위치에 존재하는 리신 잔기 (야생형 또는 부위-지정 돌연변이유발로 도입됨)의 엡실론-아민 기를 통한 접합을 포함한다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 인슐린 분자는 B29 리신 잔기를 통해 접합될 수 있다.

[0172] *예시적인 인슐린-접합체*

[0173] 다양한 실시양태에서, 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체는 아미노에틸글루코스 (AEG), 아미노에틸만노스 (AEM), 아미노에틸비만노스 (AEBM), 아미노에틸트리만노스 (AETM), β-아미노에틸-N-아세틸글루코사민 (AEGA) 및 아미노에틸푸코스 (AEF)로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 1종 이상의 리간드에 접합된 인슐린 분자를 포함한다. 특정 실시양태에서, 인슐린 분자는 $Lys^{B29}$의 엡실론-아미노 기를 통해 접합된다.

[0174] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체는 1개 이상의 아미노에틸글루코스 (AEG) 리간드에 접합된 인슐린 분자를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체는 1개 이상의 아미노에틸만노스 (AEM) 리간드에 접합된 인슐린 분자를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체는 1개 이상의 아미노에틸비만노스 (AEBM) 리간드에 접합된 인슐린 분자를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체는 1개 이상의 아미노에틸트리만노스 (AETM) 리간드에 접합된 인슐린 분자를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체는 1개 이상의 β-아미노에틸-N-아세틸글루코사민 (AEGA) 리간드에 접합된 인슐린 분자를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체는 1개 이상의 아미노에틸푸코스 (AEF) 리간드에 접합된 인슐린 분자를 포함한다.

[0175] 다양한 실시양태에서, 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체는 2개 이상의 별개의 리간드에 접합된 인슐린 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체는 2개의 별개의 리간드에 접합된 인슐린 분자를 포함한다. 다른 실시양태에서, 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체는 3개의 별개의 리간드에 접합된 인슐린 분자를 포함한다. 특정 실시양태에서, 이러한 결정질 인슐린-접합체의 2개 이상의 별개의 리간드는 아미노에틸글루코스 (AEG)이다. 특정 실시양태에서, 이러한 결정질 인슐린-접합체의 2개 이상의 별개의 리간드는 아미노에틸만노스 (AEM)이다. 특정 실시양태에서, 이러한 결정질 인슐린-접합체의 2개 이상의 별개의 리간드는 아미노에틸비만노스 (AEBM)이다. 특정 실시양태에서, 이러한 결정질 인슐린-접합체의 2개 이상의 별개의 리간드는 아미노에틸트리만노스 (AETM)이다. 특정 실시양태에서, 이러한 결정질 인슐린-접합체의 2개 이상의 별개의 리간드는 β-아미노에틸-N-아세틸글루코사민 (AEGA)이다. 특정 실시양태에서, 이러한 결정질 인슐린-접합체의 2개 이상의 별개의 리간드는 아미노에틸푸코스 (AEF)이다.

[0176] 다양한 실시양태에서, 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체는 인슐린 분자에도 접합된 단일 접합체 프레임워크에 접합된 2개 이상의 별개의 리간드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 결정질 인슐린-접합체의 2개 이상의 별개의 리간드 및 인슐린 분자는 단일 분지형 접합체 프레임워크의 별개의 분지에 각각 위치한다. 일부 실시양태에서, 이러한 결정질 인슐린-접합체의 2개 이상의 별개의 리간드 및 인슐린 분자는 단일 분지형 접합체 프레임워크의 별개의 분지의 말단에 각각 위치한다.

[0177] 다양한 실시양태에서, 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체는 아미노에틸글루코스 (AEG)에 접합된 인슐린 분자를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체는 $Lys^{B29}$의 엡실론-아미노 기를 통해 아미노에틸글루코스 (AEG)에 접합된 인슐린 분자를 포함한다.

[0178] 다양한 실시양태에서, 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체는 아미노에틸만노스 (AEM)에 접합된 인슐린 분자를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체는 $Lys^{B29}$의 엡실론-아미노 기를 통해 아미노에틸만노스 (AEM)에 접합된 인슐린 분자를 포함한다.

[0179] 다양한 실시양태에서, 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체는 아미노에틸비만노스 (AEBM)에 접합된 인슐린 분자를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체는 $Lys^{B29}$의 엡실론-아미노 기를 통해 아미노에틸비만노스 (AEBM)에 접합된 인슐린 분자를 포함한다.

[0180] 다양한 실시양태에서, 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체는 아미노에틸트리만노스 (AETM)에 접합된 인슐린 분

자를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체는 $Lys^{B29}$의 엡실론-아미노 기를 통해 아미노에틸트리만노스 (AETM)에 접합된 인슐린 분자를 포함한다.

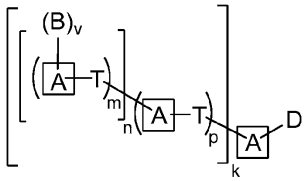
[0181] 다양한 실시양태에서, 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체는 β-아미노에틸-N-아세틸글루코사민 (AEGA)에 접합된 인슐린 분자를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체는 $Lys^{B29}$의 엡실론-아미노 기를 통해 β-아미노에틸-N-아세틸글루코사민 (AEGA)에 접합된 인슐린 분자를 포함한다.

[0182] 다양한 실시양태에서, 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체는 아미노에틸푸코스 (AEF)에 접합된 인슐린 분자를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체는 $Lys^{B29}$의 엡실론-아미노 기를 통해 아미노에틸푸코스 (AEF)에 접합된 인슐린 분자를 포함한다.

[0183] *접합체 프레임워크*

[0184] 본 섹션은 일부 예시적인 접합체 프레임워크를 기재한다. 다양한 실시양태에서, 본 개시내용의 접합체는 하기 화학식 I을 가질 수 있다:

[0185] <화학식 I>

[0186] 


[0187] 상기 식에서,

[0188] 각 경우의 $\left[\left(\boxed{A}-T\right)\right]$는 접합체 내의 잠재적 분지를 나타내고,

[0189] 각 경우의 $\left(\boxed{A}-T\right)$는 접합체 분지 내의 잠재적 반복부를 나타내고,

[0190] 각 경우의 $\boxed{A}$는 독립적으로 공유 결합, 탄소 원자, 헤테로원자, 또는 아실, 지방족, 헤테로지방족, 아릴, 헤테로아릴 및 헤테로시클릭으로 이루어진 군으로부터 선택된 임의로 치환된 기이고,

[0191] 각 경우의 T는 독립적으로 공유 결합 또는 2가의 직쇄형 또는 분지형의 포화 또는 불포화의 임의로 치환된 $C_{1-30}$ 탄화수소 쇄이고, 여기서 T의 1개 이상의 메틸렌 단위는 -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, $-S(O)_2-$, $-N(R)SO_2-$, $-SO_2N(R)-$, 헤테로시클릭 기, 아릴 기 또는 헤테로아릴 기에 의해 임의로 및 독립적으로 대체되고,

[0192] 각 경우의 R은 독립적으로 수소, 적합한 보호기, 또는 아실 잔기, 아릴알킬 잔기, 지방족 잔기, 아릴 잔기, 헤테로아릴 잔기 또는 헤테로지방족 잔기이고,

[0193] -B는 $-T-L^{B}-X$이고,

[0194] 각 경우의 X는 독립적으로 사카라이드를 포함하는 리간드이고,

[0195] 각 경우의 $L^{B}$는 독립적으로 공유 결합, 또는 T와 X의 공유 접합으로부터 유도된 기이고,

[0196] -D는 $-T-L^{D}-W^{I}$이고,

[0197] $W^{I}$은 인슐린 분자이고,

[0198] 각 경우의 $L^{D}$는 독립적으로 공유 결합, 또는 T와 $W^{I}$의 공유 접합으로부터 유도된 기이고,

[0199] k는 1 내지 12의 정수이고,

[0200] 각 경우의 p는 독립적으로 1 내지 5의 정수이고,

[0201] 각 경우의 n은 독립적으로 0 내지 5의 정수이고,

[0202] 각 경우의 m은 독립적으로 1 내지 5의 정수이고,

[0203] 각 경우의 v는 독립적으로 0 내지 5의 정수이지만,

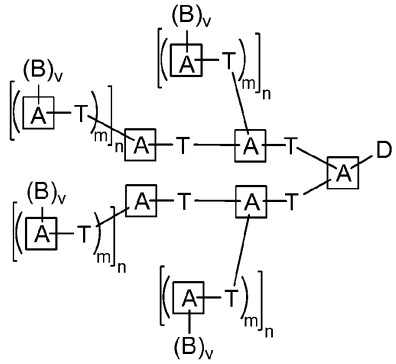
[0204] 단, 각각의 k-분지 내에서 적어도 1개 경우의 n은 ≥ 1이고 적어도 1개 경우의 v는 ≥ 1이다.

[0205] 화학식 I (및 본원의 다른 화학식)이 명백하게 모두 수소를 나타내는 것은 아님을 이해해야 한다. 예를 들어, 중앙의 A가 $C_6$ 아릴 기이고 k < 5인 경우에는 상기 $C_6$ 아릴 고리의 비어있는 위치(들)이 수소를 포함한다는 것을 알 것이다.

[0206] 일반적으로, 각 경우의 A가 잠재적인 분지점을 나타내고, 각 분지점에서의 분지 수는 중앙의 A의 경우에는 k 값에 따라, 중앙의 것이 아닌 A의 경우에는 n의 값에 따라 결정된다는 것을 알 것이다. 당업자는 각 경우의 n이 0 내지 5의 정수일 수 있기 때문에 본 개시내용이 이들 접합체의 직쇄형, 분지형 및 초분지형 (예를 들어, 덴드리머-유사) 실시양태를 고려한다는 것을 알 것이다. 각각의 k-분지 내에서 적어도 1개 경우의 n은 ≥ 1이고 적어도 1개 경우의 v는 ≥ 1일 것을 요구하는 조건부는, 모든 접합체가 적어도 1개의 B (즉, 리간드)를 포함하게 한다.

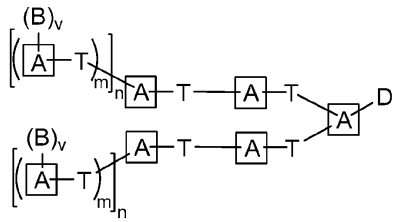
[0207] 특정 실시양태에서, p-괄호 표시된 잔기 내 각 경우의 A는 n ≥ 1의 값에 상응하는 수의 n-괄호 표시된 잔기로 치환된다. 예를 들어, k = 2이고 2개의 k-분지 모두에서 p = 2인 경우에 상기 접합체는 하기 화학식 Ia를 가질 수 있다:

[0208] <화학식 Ia>

[0209] 

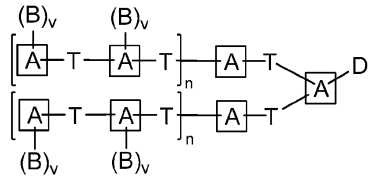
[0210] 다른 실시양태에서, p-괄호 표시된 잔기 내에서 오직 말단의 A만이 n ≥ 1의 값에 상응하는 수의 n-괄호 표시된 잔기로 치환된다. 예를 들어, k = 2이고 2개의 k-분지 모두에서 p = 2 (및 2개의 k-분지 모두에서 제1 p-괄호 표시된 잔기는 n = 0)인 경우에 상기 접합체는 하기 화학식 Ib를 가질 수 있다:

[0211] <화학식 Ib>

[0212] 

[0213] 특정 실시양태에서, m-괄호 표시된 잔기 내 각 경우의 A는 v ≥ 1의 값에 상응하는 수의 B 잔기로 치환된다. 예를 들어, k = 2, 각 경우의 p = 1, 및 각 경우의 m = 2인 경우에 상기 접합체는 하기 화학식 Ic를 가질 수 있다:

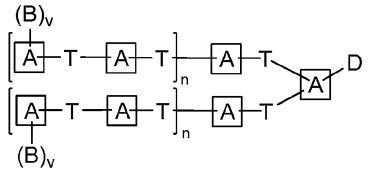
[0214] <화학식 Ic>



[0215]

[0216] 다른 실시양태에서, m-괄호 표시된 잔기 내에서 오직 말단의 [A] 만이 v ≥ 1의 값에 상응하는 수의 B 잔기로 치환된다. 예를 들어, k = 2, 각 경우의 p = 1, 및 각 경우의 m = 2 (및 각각의 n-분지에서 제1 m-괄호 표시된 잔기는 v = 0)인 경우에 상기 접합체는 하기 화학식 Id를 가질 수 있다:

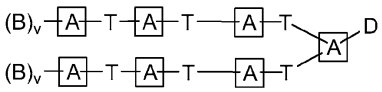
[0217] <화학식 Id>



[0218]

[0219] 추가의 예로서, 상기 화학식의 2개의 k-분지 모두에서 n = 1인 경우에 상기 접합체는 하기 화학식 Ie를 가질 수 있다:

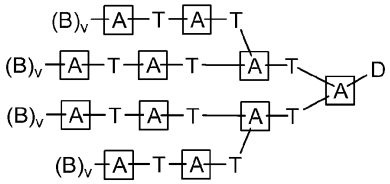
[0220] <화학식 Ie>



[0221]

[0222] 대안적으로, 상기 화학식의 2개의 k-분지 모두에서 n = 2인 경우에 상기 접합체는 하기 화학식 If를 가질 수 있다:

[0223] <화학식 If>



[0224]

[0225] ***예시적인 기에 대한 설명***

[0226] [A] *(분지점)*

[0227] 특정 실시양태에서, 각 경우의 [A] 는 아실, 지방족, 헤테로지방족, 아릴, 헤테로아릴 및 헤테로시클릭으로 이루어진 군으로부터 선택된 임의로 치환된 기이다. 일부 실시양태에서, 각 경우의 [A]는 동일하다. 일부 실시양태에서, 중앙의 [A] 는 모든 다른 경우의 [A] 와 상이하다. 특정 실시양태에서, 중앙의 [A]를 제외한 모든 경우의 [A] 는 동일하다.

[0228] 일부 실시양태에서, [A] 는 임의로 치환된 아릴 또는 헤테로아릴 기이다. 일부 실시양태에서, [A]는 6원 아릴이다. 특정 실시양태에서, [A] 는 페닐이다.

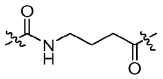
[0229] 특정 실시양태에서, [A] 는 N, O 또는 S로부터 선택된 헤테로원자이다. 일부 실시양태에서, [A]는 질소 원자이

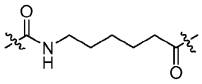
다. 일부 실시양태에서, [A]는 산소 원자이다. 일부 실시양태에서, [A]는 황 원자이다. 일부 실시양태에서, [A]는 탄소 원자이다.

[0230] *T (스페이서)*

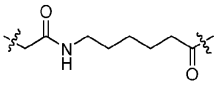
[0231] 특정 실시양태에서, 각 경우의 T는 독립적으로 2가의 직쇄형 또는 분지형의 포화 또는 불포화의 임의로 치환된 $C_{1-20}$ 탄화수소 쇄이고, 여기서 T의 1개 이상의 메틸렌 단위는 -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, $-S(O)_2-$, $-N(R)SO_2-$, $-SO_2N(R)-$, 헤테로시클릭 기, 아릴 기 또는 헤테로아릴 기에 의해 임의로 및 독립적으로 대체된다. 특정 실시양태에서, T의 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 메틸렌 단위가 임의로 및 독립적으로 대체된다. 특정 실시양태에서, T는 $C_{1-10}$, $C_{1-8}$, $C_{1-6}$, $C_{1-4}$, $C_{2-12}$, $C_{4-12}$, $C_{6-12}$, $C_{8-12}$ 또는 $C_{10-12}$ 탄화수소 쇄로부터 구축되고, 여기서 T의 1개 이상의 메틸렌 단위는 -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, $-S(O)_2-$, $-N(R)SO_2-$, $-SO_2N(R)-$, 헤테로시클릭 기, 아릴 기 또는 헤테로아릴 기에 의해 임의로 및 독립적으로 대체된다. 일부 실시양태에서, T의 1개 이상의 메틸렌 단위가 헤테로시클릭 기에 의해 대체된다. 일부 실시양태에서, T의 1개 이상의 메틸렌 단위가 트리아졸 잔기에 의해 대체된다. 특정 실시양태에서, T의 1개 이상의 메틸렌 단위가 -C(O)-에 의해 대체된다. 특정 실시양태에서, T의 1개 이상의 메틸렌 단위가 -C(O)N(R)-에 의해 대체된다. 특정 실시양태에서, T의 1개 이상의 메틸렌 단위가 -O-에 의해 대체된다.

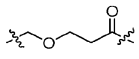
[0232] 일부 실시양태에서, T는  이다.

[0233] 일부 실시양태에서, T는  이다.

[0234] 일부 실시양태에서, T는  이다.

[0235] 일부 실시양태에서, T는  이다.

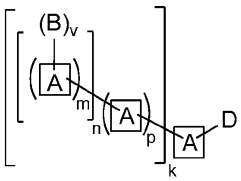
[0236] 일부 실시양태에서, T는  이다.

[0237] 일부 실시양태에서, T는  이다.

[0238] 특정 실시양태에서, 각 경우의 T는 동일하다.

[0239] 특정 실시양태에서, 각 경우의 T (기 B 및 D 외부의 T)는 공유 결합이고, 접합체는 하기 화학식 II를 갖는다:

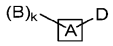
[0240] <화학식 II>

[0241] 


[0242] 상기 식에서, [A], B, D, v, m, n, p, k 및 j는 본원에서 정의되고 기재된 바와 같다.

[0243] 화학식 II의 특정 실시양태에서, 중앙의 [A]를 제외한 각 경우의 [A]는 공유 결합이고 각 경우의 v = 1이며, 접합체는 하기 화학식 III를 갖는다:

[0244] <화학식 III>

[0245] 

[0246] 상기 식에서, A, B, D, q, k 및 j는 본원에서 정의되고 기재된 바와 같다.

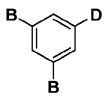
[0247] 화학식 III의 이러한 특정 실시양태에서, k = 1이다.

[0248] 다른 실시양태에서, k = 2이다.

[0249] 다른 실시양태에서, k = 3이다.

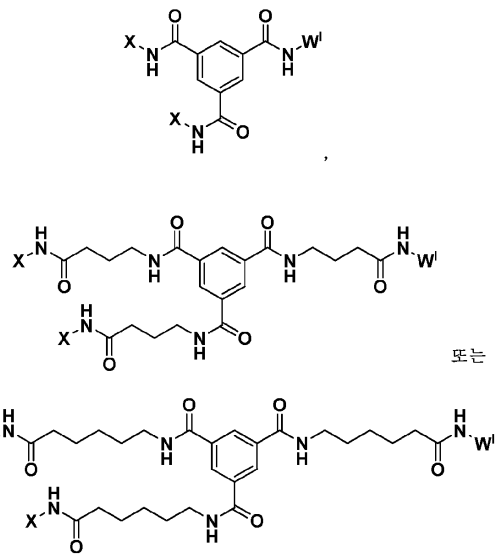
[0250] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 하기 화학식 IIIa의 접합체를 제공한다:

[0251] <화학식 IIIa>

[0252] 

[0253] 상기 식에서, B 및 D는 본원에서 정의되고 기재된 바와 같다.

[0254] 예를 들어, 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 하기 화학식의 접합체를 제공한다:

[0255] 

[0256] 상기 식에서, $W^I$ 및 X는 본원에서 정의되고 기재된 바와 같다.

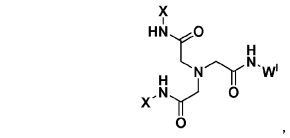
[0257] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 하기 화학식 IIIb의 접합체를 제공한다

[0258] <화학식 IIIb>

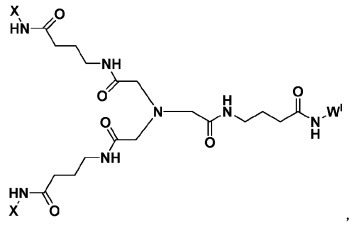
[0259] 

[0260] 상기 식에서, B 및 D는 본원에서 정의되고 기재된 바와 같다.

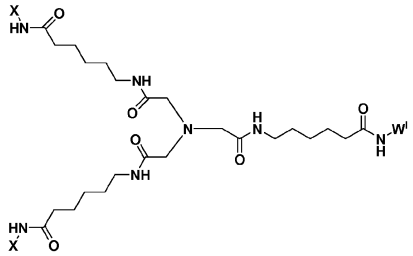
[0261] 예를 들어, 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 하기 화학식의 접합체를 제공한다:



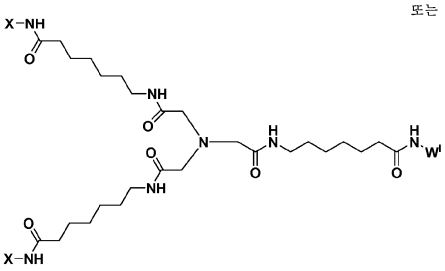
,



,



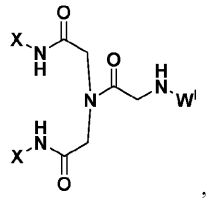
또는



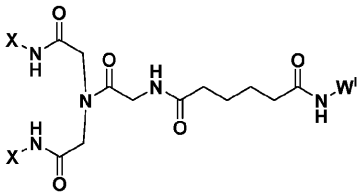
[0262]

[0263] 상기 식에서, $W^I$ 및 X는 본원에서 정의되고 기재된 바와 같다.

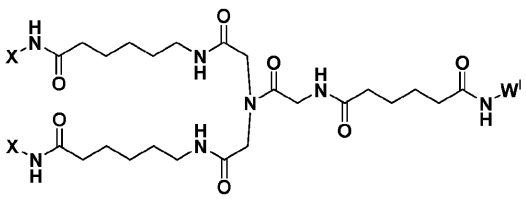
[0264] 예를 들어, 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 하기 화학식의 접합체를 제공한다:



,



또는



[0265]

[0266] 상기 식에서, $W^I$ 및 X는 본원에서 정의되고 기재된 바와 같다.

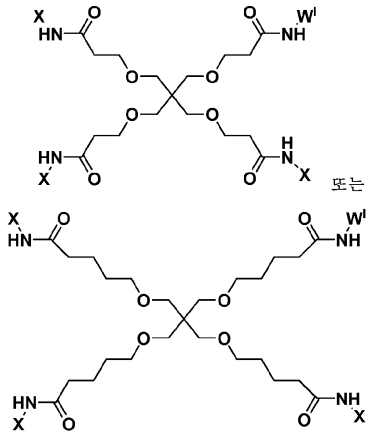
[0267] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 하기 화학식 IIIc의 접합체를 제공한다:

[0268] <화학식 IIIc>

[0269] 

[0270] 상기 식에서, B 및 D는 본원에서 정의되고 기재된 바와 같다.

[0271] 예를 들어, 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 하기 화학식의 접합체를 제공한다:

[0272] 


[0273] 상기 식에서, $W^I$ 및 X는 본원에서 정의되고 기재된 바와 같다.

[0274] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 하기 화학식 IIId 및 IIIe의 접합체를 제공한다:

[0275] <화학식 IIId>

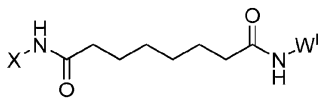
[0276] 

[0277] <화학식 IIIe>

[0278] 

[0279] 상기 식에서, B 및 D는 본원에서 정의되고 기재된 바와 같다.

[0280] 예를 들어, 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 하기 화학식의 접합체를 제공한다:

[0281] 

[0282] 상기 식에서, $W^I$ 및 X는 본원에서 정의되고 기재된 바와 같다.

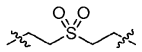
[0283] *B (리간드)*

[0284] -B는 -T-$L^B$-X (여기서, X는 사카라이드를 포함하는 리간드이고, $L^B$는 공유 결합, 또는 X와 T의 공유 접합으로부터 유도된 기임)이다. 예시적인 리간드 및 그의 사카라이드 성분은 본원에 기재되어 있다.

[0285] *D (인슐린)*

[0286] -D는 -T-$L^D$-$W^I$ (여기서, $W^I$는 인슐린 분자이고, $L^D$는 공유 결합, 또는 $W^I$와 T의 공유 접합으로부터 유도된 기임)이다. 예시적인 인슐린 분자는 본원에 기재되어 있다.

[0287] *$L^B$ 및 $L^D$ (공유 접합)*

[0288] 당업자는 다양한 접합 화학을 이용하여 X를 T와 및/또는 $W^I$를 T와 (일반적으로 "성분들"을) 공유 접합시킬 수 있음을 알 것이다. 이러한 기술은 당업계에 널리 공지되어 있고, 예시적인 기술은 하기에서 논의된다. 성분들은 직접 결합될 수도 있고 (즉, 개입하는 화학적 기 없이), 또는 스페이서 (예를 들어, 접합된 요소와 접합체 프레임워크의 나머지 부분 사이에 약간의 물리적 분리를 제공하는 커플링제 또는 공유 쇄)를 통해 간접적으로 결합될 수도 있다. 성분들이 임의의 수의 화학적 결합, 예를 들어 (이에 제한되지 않음) 아미드, 아민, 에스테르, 에테르, 티오에테르, 이소우레아, 이민 등의 결합을 통해 접합체 프레임워크에 공유 결합될 수 있음을 이해해야 한다. 특정 실시양태에서, $L^B$ 및/또는 $L^D$ (일반적으로, 본 섹션의 목적상 "L")는 공유 결합이다. 일부 실시양태에서, L은 T의 임의로 치환된 카르보닐-반응성, 티올-반응성, 아민-반응성 또는 히드록실-반응성 잔기를 X 또는 $W^I$의 카르복실, 티올, 아민 또는 히드록실 기와 접합시키는 것으로부터 유도된 임의로 치환된 잔기이다. 일부 실시양태에서, L은 X 또는 $W^I$의 임의로 치환된 카르복실-반응성, 티올-반응성, 아민-반응성 또는 히드록실-반응성 잔기를 T의 카르복실, 티올, 아민 또는 히드록실 기와 접합시키는 것으로부터 유도된 임의로 치환된 잔기이다. 일부 실시양태에서, L은  이다. 일부 실시양태에서, L은 숙신이미드 잔기이다.

[0289] 다양한 실시양태에서, 성분들은 당업계에 공지되어 있는 바와 같은 "클릭 화학" 반응을 이용하여 접합체 프레임워크에 공유 결합될 수 있다. 이것은 예를 들어 고리화첨가 반응, 친핵성 개환 반응, 및 탄소-탄소 다중 결합으로의 부가를 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Kolb and Sharpless, Drug Discovery Today 8:1128-1137, 2003] 및 상기 문헌에서 인용된 참조문헌, 및 또한 문헌 [Dondoni, Chem. Asian J. 2:700-708, 2007] 및 상기 문헌에서 인용된 참조문헌 참조). 상기 논의된 바와 같이, 다양한 실시양태에서, 성분들은 자연적인 또는 화학적으로 부가된 팬던트 기를 통해 접합체 프레임워크에 결합될 수 있다. 일반적으로, 반응성 기의 쌍의 제1 및 제2 구성원 (예를 들어, 반응하여 아미드 결합을 생성하는 카르복실 기 및 아민 기)이 성분 및 프레임워크 중 하나에 존재할 수 있음을 알 것이다 (즉, 2개 구성원의 상대적인 위치는 이것들이 반응하여 접합체를 생성하는 한은 상관없음). 예시적인 연결부는 하기에서 보다 상세하게 논의된다.

[0290] 다양한 실시양태에서, 카르복실 (또는 반응성 에스테르) 보유 성분이 문헌 [Kim et al., Biomaterials 24:4843-4851 (2003)]에 약술된 절차를 이용하여 -OH 보유 프레임워크 (OBF)에 접합될 수 있다. 간략하게 설명하면, OBF를 카르복실 보유 성분과 함께 DMSO 중에 용해하고 N',N'-디시클로헥실카르보디이미드 (DCC) 및 4-디메틸아미노피리딘 (DMAP)을 촉매로 사용하여 무수 분위기하에 반응시킨다. 카르복실 보유 성분을 $-NH_2$ 보유 프레임워크 (NBF)에 카르보디이미드 (EDAC) 커플링 절차를 이용하여 접합시킬 수 있다. 이 절차를 이용하여, 카르복실 보유 성분을 pH 5 완충제 중 EDAC와의 반응 및 NBF의 첨가로 관능화시킨다. 이러한 경우 중 임의의 것 (및 임의의 하기 경우)에서, 생성된 생성물은 당업자에게 이용가능한 임의의 수의 수단, 예를 들어 (이에 제한되지 않음) 크기 배제 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피, 실리카 겔 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 한외여과, 및 선택적 침전에 의해 정제될 수 있다.

[0291] 다양한 실시양태에서, 아민 보유 성분을 -COOH 보유 프레임워크 (CBF)에 커플링시킬 수 있다. CBF는 활성화된 에스테르 잔기를 이용한다 (예를 들어, 문헌 [Hermanson in Bioconjugate Techniques, 2nd edition, Academic Press, 2008] 및 상기 문헌에서 인용된 참조문헌 참조). 간략하게 설명하면, 말단 활성화된 카르복실산 에스테르, 예컨대 -NHS, -SSC, -NPC 등을 갖는 CBF를 무수 유기 용매, 예컨대 DMSO 또는 DMF 중에 용해한다. 이후, 원하는 당량수의 아민 보유 성분을 첨가하고, 수시간 동안 실온에서 혼합한다. 문헌 [Baudys et al., Bioconj. Chem. 9:176-183, 1998]에 기재된 바와 같이, 아민 보유 성분은 또한 CBF에 접합되어 안정적인 아미드 결합을 생성할 수도 있다. 이 반응은 트리부틸아민 (TBA) 및 이소부틸클로로포르메이트를 디메틸술폭시드 (DMSO) 중 CBF 및 아민 보유 성분의 용액에 무수 조건하에 첨가하여 달성될 수 있다. 대안적으로, 아민 보유 성분은 브롬화시아노겐 (CNBr), N-시아노트리에틸암모늄 테트라플루오로보레이트 (CTEA), 1-시아노-4-(디메틸아미노)-피리디늄 테트라플루오르보레이트 (CDAP) 및 p-니트로페닐시아네이트 (pNPC)를 포함하지만 이에 제한되지 않는 시약을 이용한 시안화를 통해 OBF에 커플링될 수 있다. CNBr 반응은 수용액 중에서 온화하게 염기성인 pH에서 수행될 수 있다. CDAP 반응은 DMSO 및 물의 혼합물 중에서 온화하게 염기성인 pH에서 트리에틸아민 (TEA)을 촉매로서 사용하여 수행된다. 특정 실시양태에서, 아민 보유 성분은 예를 들어 피리딘을 함유하는 수성 완충 용액 중에서의 글루타르알데히드 커플링 및 이후 글리신을 사용한 켄칭(quenching)을 통해 NBF에 접합될 수 있다. 특정 실시양태에서, 아민 보유 성분은 쉬프 염기 커플링 절차 및 이후 환원을 이용하여 알데히드 보유 프레임워크에 접합될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Hermanson in Bioconjugate Techniques, 2nd edition, Academic Press,

2008] 및 상기 문헌에서 인용된 참조문헌, 및 또한 문헌 [Mei et al., in Pharm. Res. 16: 1680-1686, 1999] 및 상기 문헌에서 인용된 참조문헌 참조). 간략하게 설명하면, 말단 활성화된 알데히드 (예를 들어, 아세트알데히드, 프로피온알데히드, 부티르알데히드 등)를 갖는 프레임워크를 중성 또는 산성 pH의 수성 완충제 중에 용해하여 원치않는 알데히드 가수분해를 방지한다. 이후, 원하는 당량수의 아민 보유 성분을 첨가하여 실온에서 혼합한 후에 과량의 적합한 환원제 (예를 들어, 수소화붕소나트륨, 시아노수소화붕소나트륨, 트리아세톡시수소화붕소나트륨 피리딘 보란, 트리에틸아민 보란 등)를 첨가한다.

[0292] 다양한 실시양태에서, 히드록실 보유 성분을 디비닐술폰 (DVS) 절차에 따라 OBF에 접합시킬 수 있다. 이 절차를 이용하여, OBF를 pH 11.4의 비카르보네이트 완충제에 첨가하고, DVS로 활성화한 후에 히드록실 보유 성분을 첨가하고, 이후에 글리신을 첨가하여 반응물을 중화시키고 켄칭시킨다. 히드록실 보유 성분은 또한 상기 기재된 바와 같이 활성화된 에스테르 잔기를 사용하여 OBF에 커플링되어 에스테르 결합을 생성할 수도 있다.

[0293] 다양한 실시양태에서, 술피드릴 보유 성분을 비교적 온화한 절차를 이용하여 말레이미드 보유 프레임워크 (MBF)에 커플링시켜서 티오에테르 결합을 생성할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Hermanson in Bioconjugate Techniques, 2nd edition, Academic Press, 2008] 및 상기 문헌에서 인용된 참조문헌 참조). 말레이미드 기는 활성화된 에스테르보다 가수분해에 대한 감수성이 훨씬 덜하기 때문에, 상기 반응은 수성 조건하에 수행될 수 있다. 간략하게 설명하면, MBF를 pH 6.5 내지 7.5의 완충 수용액 중에 용해한 후에 원하는 당량수의 술피드릴 보유 성분을 첨가한다. 실온에서 수시간 동안 혼합한 후, 티오에테르 커플링된 접합체를 정제할 수 있다. 술피드릴 보유 성분은 또한 문헌 [Thoma et al., J. Am. Chem. Soc. 121:5919-5929, 1999]에 기재된 방법에 따라 NBF에 접합될 수도 있다. 이 반응은 NBF를 무수 디메틸포름아미드 (DMF) 중에 현탁시킨 후에 2,6-루티딘 및 산무수물을 첨가하고 이후에 반응성 중간체를 정제하는 것을 포함한다. 이후, 술피드릴 보유 성분을 DMF 중 상기 중간체의 용액에 트리에틸아민과 함께 첨가한다.

[0294] 다양한 실시양태에서, 아지드 보유 성분을 휘스겐(Huisgen)-유형 아지드-알킨 고리화첨가의 구리(I)-촉매된 최신 버전을 이용하여 알킨 보유 프레임워크 (ABF)에 커플링시켜서 1,4-이치환된 1,2,3-트리아졸을 생성할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Dondoni, Chem. Asian J. 2:700-708, 2007] 및 상기 문헌에서 인용된 참조문헌, 및 또한 문헌 [Dedola et al., Org. Biomol. Chem. 5: 1006-1017, 2007] 참조). 통상적으로 "클릭" 반응이라 지칭되는 상기 반응은 예를 들어 촉매 시스템으로서 N,N-디이소프로필에틸아민 및 $Cu(PPh_3)_3Br$을 사용하여 순수(neat) THF 중에서 수행될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Wu et al., Chem. Commun. 5775-5777, 2005] 참조). 상기 반응은 또한 촉매 시스템으로서 나트륨 아스코르베이트 및 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$를 사용하여 3:1 (THF:물) 혼합물 중에서 수행될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Wu et al., 상기 문헌] 참조). 어떠한 경우에서든지, 아지드 보유 성분을 원하는 당량수의 ABF에 첨가한 후에 12시간 내지 48시간 동안 실온에서 혼합한다. 대안적으로, 알킨 보유 성분을 상기와 정확하게 동일한 조건을 이용하여 아지드 보유 프레임워크에 접합시킬 수 있다.

[0295] 특정 성분들은 자연적으로 1개 초과의 동일한 화학적 반응성 잔기를 보유할 수 있다. 일부 예에서, 성분을 오직 해당 부위 중 1개에서만 선택적으로 반응시키기 위한 화학적 반응 유형 및 조건을 선택하는 것이 가능하다. 예를 들어, 인슐린이 반응성 아민을 통해 접합되는 경우에 특정 실시양태에서는 인슐린 생물활성 보존에 N-말단 α-Phe-B1이 N-말단 α-Gly-A1 및 ε-Lys-B29보다 바람직한 부착 부위이다 (예를 들어, 문헌 [Mei et al., Pharm. Res. 16: 1680-1686, 1999] 및 상기 문헌에서 인용된 참조문헌, 및 또한 문헌 [Tsai et al., J. Pharm. Sci. 86: 1264-1268, 1997] 참조). 인슐린과 헥사데세날 (알데히드-종결 분자) 사이의 예시적인 반응에서, 연구가들은 상기 2개 성분을 54% 이소프로판올을 함유하는 1.5 M pH 6.8 나트륨 살리실레이트 수용액 중에서 1:6 (인슐린:알데히드 mol/mol)의 비율로 시아노수소화붕소나트륨의 존재하에 밤새 혼합하면 단일-치환된 Phe-B1 2급 아민-접합된 생성물로의 80% 초과의 전환이 달성됨을 발견하였다 ([Mei et al., Pharm. Res. 16: 1680-1686, 1999]). 이들의 연구는 용매, pH, 및 인슐린:알데히드 비율의 선택 모두가 반응의 선택성 및 수율에 영향을 미쳤다는 것을 보여주었다. 그러나, 대부분의 경우, 화학적 반응 조건을 선택하여 선택성을 달성하는 것은 어려운 일이다. 따라서, 특정 실시양태에서, 성분 (예를 들어, 인슐린)을 원하는 반응 부위 이외의 모든 다른 부위에서는 선택적으로 보호한 후에 해당 물질이 반응하여 정제된 후에는 탈보호 단계를 수행하는 것이 이로울 수 있다. 예를 들어, 문헌에는 산성 (BOC), 약간 산성 (시트라콘산 무수물) 및 염기성 (MSC) 조건하에 탈보호될 수 있는 것들을 포함하는, 인슐린 아민 기의 선택적 보호에 관한 수많은 이용가능한 예가 기재되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Tsai et al., J. Pharm. Sci. 86: 1264-1268, 1997], [Dixon et al., Biochem. J. 109: 312-314, 1968] 및 [Schuettler et al., D. Brandenburg Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 360: 1721, 1979] 참조). 한 예에서, Gly-A1 및 Lys-B29 아민은 tert-부톡시카르보닐 (BOC) 기로 선택적으로 보호될 수 있고, 이

것은 이후에 90% 트리플루오로아세트산 (TFA)/10% 아니솔 용액 중 4℃에서 1시간 동안의 인큐베이션에 의한 접합 후에 제거된다. 한 실시양태에서, 인슐린의 건조 분말을 무수 DMSO 중에 용해한 후에 과량의 트리에틸아민을 첨가한다. 이 용액에, THF 중 대략 2 당량의 디-tert-부틸 디카르보네이트 용액을 서서히 첨가하고, 상기 용액이 30분 내지 60분 동안 혼합되게 한다. 반응 후에, 조 용액을 과량의 아세톤에 부은 후에 묽은 HCl을 적가하여 반응된 인슐린을 침전시킨다. 침전된 물질을 원심분리하여 아세톤으로 세척하고 진공하에 완전히 건조시킨다. 정제용 역상 HPLC 또는 이온 교환 크로마토그래피를 이용하여, 원하는 디-BOC 보호된 생성물을 미반응 인슐린, 원치않는 디-BOC 이성질체, 및 모노-BOC 및 트리-BOC 부산물로부터 분리할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Tsai et al., J. Pharm. Sci. 86: 1264-1268, 1997] 참조). 역상 HPLC의 경우, 0.1% TFA를 함유하는 70% 물/30% 아세토니트릴 중 조 생성물의 용액을 C8 컬럼에 로딩하고, 증가하는 아세토니트릴 구배로 용출시킨다. 원하는 디-BOC 피크를 수집하고 회전증발시켜서 아세토니트릴을 제거하고, 동결건조시켜서 순수한 생성물을 수득한다.

[0296] *k*

[0297] k는 1 내지 12의 정수이다. 특정 실시양태에서, k = 1 내지 6, 예를 들어 1, 2 또는 3이다.

[0298] *p* 및 *m*

[0299] 각 경우의 p는 독립적으로 1 내지 5의 정수이다. 특정 실시양태에서, 각 경우의 p는 동일하다. 특정 실시양태에서, p = 1, 2 또는 3이다. 특정 실시양태에서, p = 1이다.

[0300] 각 경우의 m은 독립적으로 1 내지 5의 정수이다. 특정 실시양태에서, 각 경우의 m은 동일하다. 특정 실시양태에서, m = 1, 2 또는 3이다. 특정 실시양태에서, m = 1이다.

[0301] *n* 및 *v*

[0302] 각 경우의 n은 독립적으로 0 내지 5의 정수이지만, 단, 각각의 k-분지 내에서 적어도 1개 경우의 n은 ≥ 1이다. 주어진 k-분지 내의 분지는 본원에서 n-분지로 지칭된다.

[0303] 특정 실시양태에서, p-괄호 표시된 잔기 내 각 경우의 [A] 는 n ≥ 1의 값에 상응하는 수의 n-괄호 표시된 잔기로 치환되며, 예를 들어 상기 화학식 Ia를 참조한다. 일부 이러한 실시양태에서, 접합체 내 각 경우의 n은 동일하다. 이러한 실시양태의 일부에서, n = 1 또는 2이다.

[0304] 다른 실시양태에서, p-괄호 표시된 잔기 내에서 오직 말단의 [A] 만이 n ≥ 1의 값에 상응하는 수의 n-괄호 표시된 잔기로 치환되며, 예를 들어 상기 화학식 Ib를 참조한다. 특정 실시양태에서, 각각의 k-분지는 단지 1개 경우의 n ≥ 1을 포함한다 (즉, 모든 다른 경우에는 n = 0). 일부 이러한 실시양태에서, 접합체 내 각 경우의 n은 동일하다. 이러한 실시양태의 일부에서, n = 1 또는 2이다.

[0305] 각 경우의 v는 독립적으로 0 내지 5의 정수이지만, 단, 각각의 k-분지 내에서 적어도 1개 경우의 v는 ≥ 1이다.

[0306] 특정 실시양태에서, m-괄호 표시된 잔기 내 각 경우의 [A] 는 v ≥ 1의 값에 상응하는 수의 B 잔기로 치환되며, 예를 들어 상기 화학식 Ic를 참조한다. 일부 이러한 실시양태에서, 접합체 내 각 경우의 v는 동일하다. 이러한 실시양태의 일부에서, v = 1 또는 2이다.

[0307] 다른 실시양태에서, m-괄호 표시된 잔기 내에서 오직 말단의 [A] 만이 v ≥ 1의 값에 상응하는 수의 B 잔기로 치환되며, 예를 들어 상기 화학식 Id를 참조한다. 특정 실시양태에서, 각각의 k-분지는 단지 1개 경우의 v ≥ 1을 포함한다 (즉, 모든 다른 경우에는 v = 0). 일부 이러한 실시양태에서, 접합체 내 각 경우의 v는 동일하다. 이러한 실시양태의 일부에서, v = 1 또는 2이다. 특정 실시양태에서, 각각의 n-분지는 적어도 1개 경우의 v ≥ 1을 포함한다. 특정 실시양태에서, 각각의 n-분지는 단지 1개 경우의 v ≥ 1을 포함한다 (즉, 모든 다른 경우에는 v = 0). 일부 이러한 실시양태에서, 접합체 내 각 경우의 v는 동일하다. 이러한 실시양태의 일부에서, v = 1 또는 2이다.

[0308] *약물 로딩*

[0309] 일반적으로, 접합체에 로딩되는 약물의 양은 접합체 프레임워크의 분자량 및/또는 화학적 활성화의 수준 (즉, 팬던트 기가 프레임워크에 부가되는 경우)을 조정하여 제어될 수 있다. 다양한 실시양태에서, 약물 로딩 수준은 접합체에 대하여 약물 5% 내지 99% w/w의 범위일 수 있다. 다양한 실시양태에서, 50% 내지 99%의 더 좁

은 범위 내, 예를 들어 80% 내지 99% 범위 내의 로딩 수준이 사용될 수 있다.

[0310] *기타*

[0311] 이전 섹션이 접합체 성분들 (예를 들어, 리간드, 약물, 프레임워크)을 별개의 소제목하에 기재하지만, 본 개시 내용은 임의의 및 모든 개시된 리간드, 약물 및 프레임워크로 이루어진 접합체를 포함한다는 것을 이해해야 한다.

[0312] **인슐린-접합체의 제조 방법**

[0313] 실시예에 기재된 바와 같이, 본 발명자들은 예시적인 인슐린 분자로서 인간 재조합 인슐린을 사용하고 예시적인 리간드로서 아미노에틸글루코스 (AEG), 아미노에틸만노스 (AEM), 아미노에틸비만노스 (AEBM), 아미노에틸트리만노스 (AETM), 아미노에틸푸코스 (AEF), β-아미노에틸-N-아세틸글루코사민 (AEGA) 및/또는 글루코사민 (GA)을 사용하여 상기 언급된 접합체를 제조하는 방법을 예시하였다. 비-제한적으로, 접합 부위 1개 당 2개의 리간드를 가지며 모든 프레임워크 성분들 사이의 거리가 짧은 접합체는 트리스(히드록시메틸) 아미노메탄 (Tris), 트리스-숙신이미딜 아미노트리아세테이트 (TSAT), 트리스-숙신이미딜-1,3,5-벤젠트리카르복실레이트 (TSB) 및 벤젠-1,3,5-트리카르복시-(N-4-부티르산-NHS-에스테르)아미드 (TSB-C4)를 접합체 프레임워크로서 사용하여 제조될 수 있다. 프레임워크 성분들 사이에 더 많은 공간을 원한다면, 숙신이미딜 (6-아미노카프로일)아미노트리아세테이트 (TSAT-C6), 숙신이미딜 (6-아미노(PEO-6))아미노트리아세테이트 (TSAT-PEO-6), 벤젠-1,3,5-트리카르복시-(N-6-아미노카프로산-NHS 에스테르)아미드 (TSB-C6) 및 벤젠-1,3,5-트리카르복시-(N-10-아미노데칸산-NHS 에스테르)아미드 (TSB-C10)를 사용할 수 있다. TSAT-C6 스페이서 아암 화학은 TSAT-PEO-6보다 접합체에 보다 높은 소수성 특징을 부여한다.

[0314] 예를 들어, 예시 목적을 위해, 한 실시양태에서, 리간드 (예를 들어, AEG, AEM, AEMB 및 AETM)와 인슐린 둘다 말단 활성화된 에스테르를 통해 TSAT-C6 프레임워크와 반응하여 인슐린-TSAT-C6-AEG-2, 인슐린-TSAT-C6-AEM-2, 인슐린-TSAT-C6-AEMB-2 및 인슐린-TSAT-C6-AETM-2 접합체를 생성할 수 있다. 다양한 리간드는 실시예에서 논의된 바와 같이 사전에 합성된다. 일부 실시양태에서, 인슐린의 A1 및 B29 아미노 기는 실시예에 기재된 바와 같이 BOC-보호되어 각각의 인슐린은 오직 Phe-B1 α-아미노 기에서 반응할 수 있다. 일부 실시양태에서, 인슐린의 B1 및 B29 아미노 기는 실시예에 기재된 바와 같이 BOC-보호되어 각각의 인슐린은 오직 Gly-A1 α-아미노 기에서 반응할 수 있다. DMSO 중 40 내지 50 mg/mL 용액으로서의 대략 1 당량의 BOC-인슐린을 과량의 트리에틸아민을 함유하는 DMSO 중 TSAT-C6의 50 mg/mL 용액에 실온에서 첨가하고 대략 1시간 동안 반응시킨다. 다음으로, DMSO 중 100 mg/mL 용액으로서의 과량의 AEG, AEM, AEBM 및/또는 AETM (2 내지 10 당량)을 첨가하고, 2시간 더 반응시킨다. 반응 후, 상기 DMSO 용액을 pH 5 염수 완충제에 10배 과다희석하고, 이후에 pH를 8.0으로 조정하고, 상기 용액을 바이오겔(Biogel) P2 컬럼에 통과시켜서 저분자량의 반응물 및 염을 제거한다. 공극 분획으로 용출된 물질을 3K 한외여과 장치로 농축시킨 후에 이것을 정제 스케일의 역상 HPLC 컬럼 (C8, 아세토니트릴/물 이동 상 (0.1% TFA 함유))에 주입하여 원하는 생성물을 미반응 BOC2-인슐린으로부터 정제한다. 원하는 용출 피크를 수집하여 모으고 회전증발시켜서 아세토니트릴을 제거한 후에 동결건조시켜서 건조 분말을 수득한다. 마지막으로, 동결건조된 분말을 90% TFA/10% 아니솔 중에 1시간 동안 4℃에서 용해시킨 후에 0.150 M NaCl을 함유하는 HEPES pH 8.2 완충제에 10배 과다희석하여 BOC 보호기를 제거한다. NaOH 용액을 사용하여 pH를 7.0과 8.0 사이로 조정한 후, 상기 물질을 바이오겔 P2 컬럼에 통과시켜서 아니솔, BOC, 및 임의의 다른 오염 염을 제거한다. 이어서, 탈보호된 정제된 수성 접합체 용액을 원하는 수준으로 농축시키고, 필요시까지 4℃에서 저장한다.

[0315] 또 다른 측면에서, 반응은 카르보네이트 완충제 중 보호되지 않은 인슐린을 사용하여 B29 엡실론-아미노 기에서 일어날 수 있는데, 이는 이러한 조건하에서는 B29 아미노 기가 야생형 인슐린에 존재하는 3개의 아미노 기 중 가장 반응성이기 때문이다. 예시적인 합성에서, N-말단 활성화된 에스테르를 함유하는 프레임워크를 무수 DMSO 중에 60 mM로 용해한 후에 트리에틸아민 (TEA)을 첨가한다. 상기 용액을 10분 동안 실온에서 신속하게 교반한다. 이와 대등하게, 448 mM 리간드 용액을 적절한 부피의 무수 DMSO 중에서 제조한다. 일단 용해되면, 충분한 리간드 용액을 10분의 기간에 걸쳐 적가하여 프레임워크상의 활성화된 에스테르 기의 수인 N에서 1을 감한 값의 1.5배에 해당하는 수의 반응성 당량을 제공한다. 예를 들어, 프레임워크 1개 당 N = 3의 초기 활성화된 에스테르 기가 존재한다면 (3×(3-1)×60 mM/370 mM) = 0.973 mL의 리간드 용액을 첨가한다. 프레임워크 1개 당 N = 4의 초기 활성화된 에스테르 기가 존재한다면 (3×(4-1)×60 mM/370 mM) = 1.46 mL의 리간드 용액을 첨가하는 식이다. 리간드 용액을 첨가한 후, 상기 용액을 1시간 동안 실온에서 교반한다.

[0316] 이후, 인슐린 분자를 탄산나트륨 완충제 (0.1 M, pH 11) 중에 17.2 mM로 별도로 용해한 후에 1.0 N 수산화나트

튬으로 pH를 10.8이 되도록 조정한다. 일단 용해되면, 전체 프레임워크/DMSO/리간드/TEA 용액을 75분의 기간에 걸쳐 인슐린/카르보네이트 완충제 용액에 적가한다. 적가하는 동안, 필요한 경우에는 묽은 HCl 또는 NaOH를 사용하여 생성된 혼합물의 pH를 5분 마다 10.8로 조정한다. 적가 후에 상기 용액을 15분 더 교반하여 반응이 완료되도록 한다.

[0317] 이어서, 생성된 용액을 0.150 M NaCl을 함유하는 20 mM pH 5.0 HEPES 완충 염수 용액에 10배 과다희석한 후에 묽은 HCl을 사용하여 최종 pH 8.0이 될 때까지 pH를 조정한다. 상기 수용액을 적절한 고체 상을 사용한 크기 배제로 우선 정제하여 접합 물질 및 비접합 물질의 원하는 분리를 달성한다. 이후, 컬럼 공극 부피를 통과한 용액을 적절한 크기의 한외여과 막으로 대략 40 mL가 되도록 농축시킨다. 이 용액을 정제용 역상 HPLC로 추가로 정제하여 원하는 생성물을 수득한다. 일단 수집되면, 상기 용액을 회전증발시켜서 아세토니트릴을 제거하고 동결건조시켜서 순수한 접합체를 수득한다.

[0318] 또 다른 측면에서, B29-일치환 인슐린-접합체를 미국 특허 번호 7,402,565에서 보고된 것과 유사한 방법을 이용하여 N-말단 보호 아미노산 서열을 사용하여 합성한다. 구체적으로, N-말단 펩티드 서열을 인슐린 A-쇄 및 B-쇄로 조작하여 상기 보호 아미노산 서열이 $Arg^{A0}$ 및 $Arg^{B0}$을 함유하여 인슐린 중간체를 생성하게 한다. 접합을 인슐린 중간체의 $Lys^{B29}$에서 수행하면서 N-말단을 접합 부산물로부터 보호한다. 접합된 인슐린 중간체를 트립신으로 처리하여 N-말단 보호 아미노산 서열을 절단하여 오직 $Lys^{B29}$만이 접합된 인슐린-접합체를 수득한다. 일부 실시양태에서, 인슐린 중간체는 미국 특허 번호 7,402,565에 기재된 바와 같이 단일 쇄 인슐린 전구체로부터 유도된다. 일부 실시양태에서, 인슐린 중간체는 $Lys^{B29}$ 이외의 접합 부위를 함유하는 돌연변이체이고, $Lys^{B29}$에 대해 기재된 것과 유사한 합성법이 수행된다.

[0319] 하기 기재된 바와 같이, 이러한 예시적인 절차를 이용하여 TSAT-C6 프레임워크를 상이한 프레임워크로 치환시키면 상이한 리간드 및 인슐린 분자, 상이한 접합 화학, 프레임워크 성분들 사이의 상이한 분리, 및/또는 상이한 결합가를 갖는 다른 접합체가 생성될 수 있다는 것을 알 것이다.

[0320] 예를 들어, 프레임워크 성분들 사이에 보다 먼 거리가 필요하고/하거나 접합 부위에 보존된 전하가 필요한 경우에는 적절한 크기의 아민-보유 디에틸 아세탈 (예를 들어, 아미노프로피온알데히드 디에틸 아세탈 (APDA) 또는 아미노부티르알데히드 디에틸 아세탈 (ABDA))이 본원에 기재된 프레임워크상의 반응성 기 중 하나와 접합된 후에 나머지 반응성 기와 관심 리간드 (예를 들어, AEM, AEBM 또는 AETM)의 반응이 완료될 수 있다. 이후, 반응성 알데히드 기는 산성 조건하에서 디에틸 아세탈로부터 노출될 수 있고, 이후에 인슐린과의 환원적 아미노화로 인슐린 접합 단계가 완료된 후에 ABDA-TSAT, ABDA-LCTSAT 등이 사용될 수 있다.

[0321] 또 다른 예에서, 테트라키스-(N-숙신이미딜 카르복시프로필)펜타에리트리톨 (TSPE)이 다중결합가 증가를 위해서 접합 부위 1개 당 3개의 리간드를 부착시키는데 사용될 수 있다. 또한, 당업자는 상기 중 임의의 교시내용을 이용하여 훨씬 더 높은 차수의 결합가를 갖는 초분지형 (예를 들어, 덴드리머-유사) 접합체를 생성할 수 있다는 것을 알 것이다. 예를 들어, 뢰켄도르프(Roeckendorf) 및 린드호르스트(Lindhorst)는 문헌 [Topics in Current Chemistry. 217: 202-238, 2001]에서 초분지형 구조를 생성하는 최근의 접근법에 관한 포괄적인 검토를 제공한다.

[0322] 추가로, 소정의 정도의 다중결합가를 이미 함유하는 리간드를 상기 기재된 절차에 따라 다시 반응시켜서 훨씬 더 높은 차수의 리간드 다중도를 생성할 수 있다. 예를 들어, 말단 반응성 아민을 함유하는 2가 AEM-2, AEBM-2 또는 AETM-2 분자는 각각의 리간드 2개를 반응성 아민이 또한 접합된 적합한 프레임워크에 접합시켜 제조될 수 있다. 말단 반응성 아민을 함유하는 3가 AEM-3, AEBM-3 또는 AETM-3 분자는 각각의 리간드 3개를 반응성 아민이 또한 접합된 적합한 프레임워크에 접합시켜 제조될 수 있다. $NH_2$-2가 사카라이드는 상기 기재된 것과 동일한 프레임워크와 반응시켜서 인슐린 분자 1개 당 4개 및 6개의 리간드를 갖는 인슐린-접합체를 생성시킬 수 있다. $NH_2$-3가 사카라이드는 상기 기재된 것과 동일한 프레임워크와 반응시켜서 인슐린 분자 1개 당 6개 및 9개의 리간드를 갖는 약물 접합체를 생성시킬 수 있다.

[0323] 모든 경우에서, 프레임워크 화학, 결합가, 및 리간드:프레임워크 화학량론을 조정함으로써 상이한 리간드의 혼합물이 다중결합가의 프레임워크를 통해 동일 인슐린 분자에 접합될 수 있다는 것을 인지해야 한다. 예를 들어, 인슐린-AEM-1-AEBM-1, 인슐린-AEBM-1-AETM-1, 인슐린-AEM-2-AETM-2 및 인슐린-AEM-1-AETM-2는 모두가 이러한 혼합 리간드 방법에 따라 합성될 수 있다.

[0324] 일부 경우에서, 인슐린 분자 이외의 다른 수단을 통해 리간드를 프레임워크에 접합시키는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 2가 말레이미드/1가 활성화 에스테르 관능화된 프레임워크 (예를 들어, 숙신이미딜-3,5-디말레이미도페닐 벤조에이트 (SDMB))를 사용하여 2개의 술피드릴 관능화된 리간드 및 1개의 인슐린 분자를 별개의 단계에서 접합시킬 수 있다. 예를 들어, 인슐린 분자를 본원에 기재된 방법을 이용하여 프레임워크의 활성화된 에스테르 부분에 접합시킬 수 있다. 별개의 단계에서, 아미노에틸 사카라이드 (AEM, AEBM, AETM)는 4-이미노티올란과의 반응을 통해 말단 술피드릴-보유 리간드로 전환시킬 수 있다. 마지막으로, 프레임워크-디-말레이미드-인슐린 접합체를 과량의 술피드릴-관능화된 사카라이드와 혼합하여 2가-리간드-인슐린 접합체를 생성할 수 있다.

[0325] **인슐린-접합체의 결정화**

[0326] 놀랍게도, 본원에 기재된 특정 인슐린-접합체가 첨가제, 예컨대 프로타민 또는 아연의 사용 없이 결정화될 수 있다는 것이 발견되었다. 인슐린-접합체의 결정질 제제는 배치 마다의 재현성 개선, 제제 안정성의 증가, 및 오랜 저장 기간에 걸친 입자 응집의 감소에서 이로울 수 있다.

[0327] 실시예에 기재된 바와 같이, 스크리닝 실험을 수행하여 적절한 결정화 조건을 결정할 수 있다. 일반적으로, 결정화할 인슐린-접합체의 용액을 물 중에 용해하고 완충제에 현탁시켜, 상기 용액을 결정화 증거에 대해 관찰한다. 이후에는 스크리닝 실험에서 확인된 적절한 완충제를 사용하여 결정질 인슐린-접합체를 보다 대규모로 제조할 수 있다.

[0328] 특정 실시양태에서, 결정질 인슐린-접합체의 프레임워크를 $Lys^{B29}$ 위치에서 접합시킨다. 특정 실시양태에서, 결정질 인슐린-접합체는 도 2에 나타낸 접합체 중 하나이다. 특정 실시양태에서, 결정질 인슐린-접합체는 I-6, I-7 또는 I-9이다.

[0329] 특정 실시양태에서, 결정화에 사용되는 완충제는 pH가 7 초과이다. 특정 실시양태에서, 완충제는 약 7.5와 약 8.5 사이의 pH를 갖는다. 특정 실시양태에서, 완충제는 포스페이트, TRIS 또는 HEPES 완충제이다.

[0330] 특정 실시양태에서, 결정화에 사용되는 완충제는 포스페이트 완충제이다. 특정 실시양태에서, 완충제는 나트륨보다 칼륨을 더 높은 농도로 갖는다. 특정 실시양태에서, 완충제는 일염기성 인산나트륨보다 이염기성 인산칼륨을 더 높은 농도로 갖는다. 특정 실시양태에서, 완충제는 약 6 내지 9 범위의 pH를 갖는다. 특정 실시양태에서, 완충제는 약 8의 pH를 갖는다. 특정 실시양태에서, 완충제는 약 8.2의 pH를 갖는다. 특정 실시양태에서, 완충제는 pH 약 8.2의 일염기성 인산나트륨 일수화물, 이염기성 인산칼륨이다.

[0331] 특정 실시양태에서, 결정화는 1종 이상의 첨가제의 존재하에 일어난다. 특정 실시양태에서, 첨가제는 m-크레졸, 페놀, 프로타민, 폴리(아르기닌), 글리세롤, 염화아연 또는 아세트산아연이다. 특정 실시양태에서, 첨가제는 폴리에틸렌 글리콜이다.

[0332] 특정 실시양태에서, 결정화를 용이하게 하기 위해 유기 용매가 첨가된다. 특정 실시양태에서, 유기 용매는 메탄올, 에탄올 또는 이소프로판올이다. 특정 실시양태에서, 유기 용매는 제약 조성물의 최종 제조 전에 제거된다.

[0333] **결정질 인슐린-접합체의 제제**

[0334] 실시예에서 논의된 바와 같이, 특정 실시양태에서, 결정질 인슐린-접합체를 지속적인 방식으로 (즉, 가용성 재조합 인간 인슐린보다 더 지속적인 흡수 프로파일을 나타내는 형태로) 투여하여 전형적인 글루코스 변동 기간에 보다 밀접한 관련이 있는 시간 척도 (즉, 분이 아닌 시간)로 글루코스 변동에 반응할 수 있는 지속적인 수준의 접합체를 제공하는 것이 이로울 수 있다. 특정 실시양태에서, 지속 방출 제제는 비-고혈당 조건 (즉, 금식 조건)하에 포유동물에게 투여되는 경우에 접합체의 0차 방출을 나타낼 수 있다.

[0335] 지속적인 흡수 프로파일을 제공하는 임의의 제제가 사용될 수 있다는 것을 알 것이다. 특정 실시양태에서, 지속적인 흡수는 결정질 인슐린-접합체를 이것이 전신 순환되게 하는 방출 특성을 저속화하는 다른 성분과 조합하여 달성될 수 있다. 예를 들어, PZI (프로타민 아연 인슐린) 제제가 이러한 목적을 위해 사용될 수 있다. 실시예에 기재된 바와 같이, 본 발명자들은 특정 실시양태에서는 무정형 인슐린-접합체를 사용하여 제조된 PZI 제제의 흡수 프로파일 및 안정성이 제제 내에 포함된 프로타민 및 아연의 절대적 및 상대적 양에 민감하다는 것을 발견하였다. 예를 들어, 시판 PZI 및 NPH (중성 프로타민 하게도른(Hagedorn)) 인슐린 제제는 흡수 프로파일을 효과적으로 지속시키기 위해서 인슐린 1 mg 당 단지 약 0.05 내지 약 0.2 mg의 프로타민만이 필요하지만, 일부 PZI-접합체 제제는 접합체 1 mg 당 약 1 내지 약 5 mg의 프로타민이 필요하다. 추가로, 시판 프로타민 인슐린

제제는 인슐린 1 mg 당 약 0.006 mg의 아연을 함유하지만, 본 발명자들은 아연 농도를 프로타민 농도와 함께 증가시키면 특정 실시양태에서 보다 더 안정적인 쉽게 분산가능한 제제가 생성될 수 있음을 알아냈다. 일부 경우에, 아연 함량은 접합체 1 mg 당 약 0.05 내지 약 0.5 mg 아연의 범위이다. 추가로, 본 발명자들은 또한 예상치못하게도 특정 실시양태에서 방출 프로파일을 효과적으로 지속시키기 위해서는 B1-아민 기에서 치환된 인슐린-접합체가 B29-아민 기에서 치환된 인슐린-접합체에 비해 보다 많은 프로타민 및 아연을 필요로 한다는 것을 알아냈다.

[0336] 특정 실시양태에서, 사전 결정화된 인슐린-접합체 분산액을 프로타민과 혼합하여 결정질 인슐린-접합체 프로타민 제제를 형성한다. 일부 실시양태에서, 상기 분산액을 제제화 동안에 생리적 완충제 농도로 중화시킨다.

[0337] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 제제는 접합체 1 mg 당 약 0.05 내지 약 10 mg 프로타민을 포함한다. 예를 들어, 접합체 1 mg 당 약 0.2 내지 약 10 mg 프로타민, 예를 들어 접합체 1 mg 당 약 1 내지 약 5 mg 프로타민을 포함한다.

[0338] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 제제는 접합체 1 mg 당 약 0.006 내지 약 0.5 mg 아연을 포함한다. 예를 들어, 접합체 1 mg 당 약 0.05 내지 약 0.5 mg 아연, 예를 들어 접합체 1 mg 당 약 0.1 내지 약 0.25 mg 아연을 포함한다.

[0339] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 제제는 약 100:1 내지 약 5:1, 예를 들어 약 50:1 내지 약 5:1, 예를 들어 약 40:1 내지 약 10:1 범위 비율 (w/w)의 프로타민 및 아연을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 PZI 제제는 약 20:1 내지 약 5:1, 예를 들어 약 20:1 내지 약 10:1, 약 20:1 내지 약 15:1, 약 15:1 내지 약 5:1, 약 10:1 내지 약 5:1, 약 10:1 내지 약 15:1 범위 비율 (w/w)의 프로타민 및 아연을 포함한다.

[0340] 특정 실시양태에서, 1종 이상의 하기 성분이 제제에 첨가된다: 항미생물 보존제, 등장화제 및/또는 비접합 인슐린 분자.

[0341] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 제제는 항미생물 보존제 (예를 들어, m-크레졸, 페놀, 메틸파라벤 또는 프로필파라벤)를 포함한다. 특정 실시양태에서, 항미생물 보존제는 m-크레졸이다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 제제는 약 0.1% 내지 약 1.0% v/v m-크레졸을 포함할 수 있다. 예를 들어, 약 0.1% 내지 약 0.5% v/v m-크레졸, 예를 들어 약 0.15% 내지 약 0.35% v/v m-크레졸을 포함한다.

[0342] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 제제는 등장화제로서 폴리올 (예를 들어, 만니톨, 프로필렌 글리콜 또는 글리세롤)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 등장화제는 글리세롤이다. 특정 실시양태에서, 등장화제는 염, 예를 들어 NaCl이다. 예를 들어, 제제는 약 0.05 내지 약 0.5 M NaCl, 예를 들어 약 0.05 내지 약 0.25 M NaCl 또는 약 0.1 내지 약 0.2 M NaCl을 포함할 수 있다.

[0343] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 제제는 소정량의 비접합 인슐린 분자를 포함한다. 특정 실시양태에서, 제제는 접합된 인슐린 분자:비접합 인슐린 분자 몰비 약 100:1 내지 1:1, 예를 들어 약 50:1 내지 2:1 또는 약 25:1 내지 2:1 범위의 접합된 인슐린 분자 및 비접합 인슐린 분자를 포함한다.

[0344] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 결정질 접합체를 포함하는 지속 방출 제제를 제공하며, 여기서 상기 제제는 프로타민 및 아연을 포함한다. 특정 실시양태에서, 결정질 인슐린-접합체의 프레임워크는 $Lys^{B29}$ 위치에서 접합된다. 특정 실시양태에서, 결정질 인슐린-접합체는 도 2에 나타난 접합체 중 하나이다. 특정 실시양태에서, 결정질 인슐린-접합체는 I-6, I-7 또는 I-9이다.

[0345] 특정 실시양태에서, 제제는 접합체 1 mg 당 약 1 내지 약 5 mg 프로타민, 및 접합체 1 mg 당 약 0.1 내지 약 0.25 mg 아연을 포함한다.

[0346] 특정 실시양태에서, 제제는 약 40:1 내지 약 10:1 범위 비율 (w/w)의 프로타민 및 아연을 포함한다.

[0347] 특정 실시양태에서, 제제는 소정량의 비접합 인슐린 분자를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 제제는 접합된 인슐린 분자 및 비접합 인슐린 분자를 접합된 인슐린 분자:비접합 인슐린 분자 몰비 약 25:1 내지 약 2:1 범위로 포함한다.

[0348] 특정 실시양태에서, 제제는 항미생물 보존제를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 항미생물 보존제는 m-크레졸이다. 특정 실시양태에서, 제제는 약 0.15% 내지 약 0.35% v/v m-크레졸을 포함한다.

[0349] 특정 실시양태에서, 제제는 등장화제를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 등장화제는 글리세롤이다. 특정

실시양태에서, 등장화제는 NaCl이다. 특정 실시양태에서, 제제는 약 0.1 내지 약 0.2 M NaCl을 포함한다.

[0350] 특정 실시양태에서, 제제는 다음을 포함한다:

[0351] 약 40:1 내지 약 10:1 범위 비율 (w/w)의 프로타민 및 아연,

[0352] 접합된 인슐린 분자:비접합 인슐린 분자 몰비 약 25:1 내지 약 2:1 범위의 접합된 인슐린 분자 및 비접합 인슐린 분자,

[0353] 약 0.15% 내지 약 0.35% v/v m-크레졸, 및

[0354] 글리세롤 또는 약 0.1 내지 약 0.2 M NaCl.

[0355] 특정 실시양태에서, 제제는 다음을 포함한다:

[0356] 접합체 1 mg 당 약 3.6 mg 프로타민, 및

[0357] 접합체 1 mg 당 약 0.2 mg 아연.

[0358] 특정 실시양태에서, 제제는 다음을 포함한다:

[0359] 접합체 1 mg 당 약 3.6 mg 프로타민,

[0360] 접합체 1 mg 당 약 0.2 mg 아연, 및

[0361] 접합된 인슐린 분자:비접합 인슐린 분자 몰비 약 5:1의 접합된 인슐린 분자 및 비접합 인슐린 분자.

[0362] 특정 실시양태에서, 제제는 다음을 포함한다:

[0363] 접합체 1 mg 당 약 3.6 mg 프로타민,

[0364] 접합체 1 mg 당 약 0.2 mg 아연,

[0365] 접합된 인슐린 분자:비접합 인슐린 분자 몰비 약 5:1의 접합된 인슐린 분자 및 비접합 인슐린 분자, 및

[0366] 약 0.2% v/v m-크레졸.

[0367] 특정 실시양태에서, 제제는 다음을 포함한다:

[0368] 접합체 1 mg 당 약 3.6 mg 프로타민,

[0369] 접합체 1 mg 당 약 0.2 mg 아연,

[0370] 접합된 인슐린 분자:비접합 인슐린 분자 몰비 약 5:1의 접합된 인슐린 분자 및 비접합 인슐린 분자,

[0371] 약 0.2% v/v m-크레졸, 및

[0372] 글리세롤 또는 약 0.15 M NaCl.

[0373] **결정질 인슐린-접합체의 용도**

[0374] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 결정질 인슐린-접합체의 사용 방법을 제공한다. 일반적으로, 결정질 접합체를 사용하여 사카라이드 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 글루코스 또는 외인성 사카라이드, 예컨대 만노스, 알파-메틸 만노스, L-푸코스 등)에 대한 반응으로 생물활성 인슐린을 제어가능하게 제공할 수 있다. 본 개시내용은 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체를 투여하여 질환 또는 상태를 치료하는 것을 포함한다. 접합체는 임의의 환자 (예를 들어, 개, 고양이, 소, 말, 양, 돼지, 마우스 등) 치료에 사용될 수 있지만, 가장 바람직하게는 인간의 치료에 사용된다. 결정질 인슐린-접합체는 환자에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 일반적으로, 가장 적절한 투여 경로는 치료할 질환 또는 상태의 성질, 환자의 상태 등과 같은 다양한 인자에 따라 달라질 것이다. 일반적으로, 본 개시내용은 경구, 근육내, 피하, 경피, 직장, 질내, 복강내, 국소 (산제, 연고제 또는 점적제에 의함), 협측 투여되거나 또는 경구 또는 비측 분무제 또는 에어로졸제로 투여되는 것을 포함한다. 이러한 다양한 경로를 위한 제약 조성물의 제제화 및 제조에 있어서의 일반적인 고려사항은 예를 들어 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995]에서 찾을 수 있다. 다양한 실시양태에서, 결정질 인슐린-접합체 현탁액을 예를 들어 주사에 의해 피하 투여할 수 있다. 현탁액의 담체는 멸균수, 염수 또는 완충 염수를 포함하지만 이에 제한되지 않는 수용액일 수 있다.

[0375] 일반적으로, 치료 유효량의 결정질 인슐린-접합체가 투여될 것이다. "치료 유효량"은, 접합체의 효능 및 독성이 균형을 이루는 것을 포함하는 합리적인 이익/위험 비율로 질환 또는 상태를 치료하는데 충분한 결정질 인슐린-접합체의 양을 의미한다. 일반적으로, 치료 효능 및 독성은 세포 배양물 또는 실험 동물에서의 표준 약리 절차, 예를 들어 $ED_{50}$ (처치 대상체의 50%에서 치료상 효과적인 용량) 및 $LD_{50}$ (처치 대상체의 50%에게 치명적인 용량)을 계산하여 결정될 수 있다. $ED_{50}/LD_{50}$은 인슐린의 치료 지수를 나타낸다. 당업계에 공지된 바와 같이 일반적으로 높은 치료 지수가 바람직하지만, 중증의 질환 또는 상태의 경우, 특히 대안적으로 선택할 수 있는 치료법이 없는 경우에는 더 낮은 치료 지수가 허용될 수 있다. 인간에게 투여할 적절한 용량 범위의 궁극적 선택은 임상 시험 동안에 결정된다.

[0376] 다양한 실시양태에서, 인슐린의 평균 1일 용량은 10 내지 200 U, 예를 들어 25 내지 100 U의 범위이다 (여기서, 인슐린 1 유닛은 약 0.04 mg임). 특정 실시양태에서, 이러한 인슐린 용량을 갖는 양의 접합체가 1일 단위로 투여된다. 특정 실시양태에서, 이러한 인슐린 용량의 5배 내지 10배를 갖는 양의 접합체가 주 단위로 투여된다. 특정 실시양태에서, 이러한 인슐린 용량의 10배 내지 20배를 갖는 양의 접합체가 격주 단위로 투여된다. 특정 실시양태에서, 이러한 인슐린 용량의 20배 내지 40배를 갖는 양의 접합체가 월 단위로 투여된다.

[0377] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체는 환자 (예를 들어, 포유동물 환자)에서 고혈당증을 치료하는데 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 환자는 당뇨병 환자이다. 그러나, 본 발명의 방법은 당뇨 환자의 치료로 제한되지 않는다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 접합체는 혈당 조절 장애와 관련이 있는 감염을 갖는 환자에서 고혈당증을 치료하는데 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 결정질 인슐린-접합체는 당뇨병을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0378] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체 또는 그의 제제가 환자 (예를 들어, 포유동물 환자)에게 투여되는 경우, 이것은 비접합 버전의 인슐린 분자보다 저혈당증을 덜 유도한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체 제제는 환자 (예를 들어, 포유동물 환자)에서 비접합 버전의 인슐린 분자를 포함하는 제제보다 더 낮은 HbA1c 값을 유도한다. 특정 실시양태에서, 제제는 비접합 버전의 인슐린 분자를 포함하는 제제보다 적어도 10% 더 낮은 (예를 들어, 적어도 20% 더 낮거나, 적어도 30% 더 낮거나, 적어도 40% 더 낮거나, 적어도 50% 더 낮음) HbA1c 값을 유도한다. 특정 실시양태에서, 제제는 7% 미만, 예를 들어 약 4% 내지 약 6% 범위의 HbA1c 값을 유도한다. 특정 실시양태에서, 비접합 버전의 인슐린 분자를 포함하는 제제는 7% 초과, 예를 들어 약 8% 내지 약 12%의 HbA1c 값을 유도한다.

[0379] 임의의 주어진 환자에게 제공되는 접합체의 총 1일 사용량은 분별있는 의학적 판단 범위 내에서 담당 의사에 의해 결정된다는 것을 이해할 것이다. 임의의 특정 환자에 대해 구체적인 치료 유효량은 치료할 질환 또는 상태, 사용되는 특정 인슐린 분자의 활성, 사용되는 특정 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별 및 식단, 사용되는 특정 인슐린 분자의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 속도, 처치 기간, 사용되는 특정 인슐린 분자와 조합되거나 동시에 사용되는 약물, 및 의학 분야에 공지된 유사 인자를 포함하는 다양한 인자에 따라 달라질 것이다. 다양한 실시양태에서, 본 개시내용의 접합체는 1회 초과로 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용은 결정질 인슐린-접합체 현탁액을 피하 주사로 환자에게 연속 스케줄 (예를 들어, 1일 당 1회, 2일마다 1회, 1주 당 1회, 2주 마다 1회, 1개월 당 1회 등)로 투여하는 방법을 구체적으로 포함한다.

[0380] 다양한 실시양태에서, 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체는 1종 이상의 추가의 요법을 받고 있는 환자에게 투여될 수 있다. 다양한 실시양태에서, 1종 이상의 추가의 요법은 투여되는 접합체와 동일한 질환 또는 장애를 치료하기 위한 것이다.

[0381] 인슐린 감작제 (예를 들어, 비구아니드, 예컨대 메트포르민, 글리타존)는 주어진 양의 인슐린에 대한 환자 반응을 증가시켜 작용한다. 따라서, 인슐린 감작제를 투여받는 환자는 이것을 투여받지 않는 동일 환자보다 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체가 보다 낮은 용량으로 필요할 것이다. 따라서, 특정 실시양태에서, 결정질 인슐린-접합체는 인슐린 감작제도 처치받고 있는 환자에게 투여될 수 있다. 다양한 실시양태에서, 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체는 인슐린 감작제가 없는 경우에 필요한 일반적인 용량의 최대 75%로 투여될 수 있다. 다양한 실시양태에서, 일반적인 용량의 최대 50%, 40%, 30% 또는 20%가 투여될 수 있다.

[0382] 인슐린 내성은 정상적인 양의 인슐린이 정상적인 인슐린 반응을 유발하는데 적절치 않은 장애이다. 예를 들어, 인슐린-내성 환자에게는 이러한 내성을 극복하고 충분한 글루코스-저하 효과가 제공되도록 고용량의 인슐린이 필요할 수 있다. 이러한 경우, 내성이 덜한 환자에서는 일반적으로 저혈당증을 유도하는 인슐린 용량이 고도로 내성인 환자에서는 글루코스-저하 효과를 발휘하지 못한다. 유사하게, 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체는

적합한 기간 내에 높은 수준의 생물활성 인슐린을 제공하는 경우에만 이러한 하위부류의 환자에게 효과적이다. 특정 실시양태에서, 이러한 하위부류의 환자의 치료는 2가지 접근법을 조합하여 용이해질 수 있다. 따라서, 특정 실시양태에서, 통상의 인슐린-기재의 요법을 이용하여 기저 수준의 인슐린을 제공하고, 환자에게 필요한 경우에는 본 발명의 결정질 인슐린-접합체를 투여하여 생물활성 인슐린을 제어하며 보충한다. 따라서, 특정 실시양태에서, 결정질 인슐린-접합체는 인슐린 처치도 받고 있는 환자에게 투여될 수 있다. 다양한 실시양태에서, 인슐린은 본 개시내용의 접합체 부재하에 필요한 일반적인 용량의 최대 75%로 투여될 수 있다. 다양한 실시양태에서, 일반적인 용량의 최대 50%, 40%, 30% 또는 20%가 투여될 수 있다. 이러한 조합 접근법은 또한 인슐린 분비촉진제 (예를 들어, 술포닐우레아, GLP-1, 엑센딘-4 등) 및/또는 인슐린 감작제 (예를 들어, 비구아니드, 예컨대 메트포르민, 글리타존)를 투여받고 있는 인슐린 내성 환자에게도 사용될 수 있음을 알 것이다.

[0383] **외인성 촉발**

[0384] 앞서 언급된 바와 같이, 본원에 기재된 방법, 접합체 및 조성물은 글루코스 반응성-접합체로 제한되지 않는다. 실시예에서 입증되는 바와 같이, 여러가지 예시적 글루코스-반응성 접합체는 또한 외인성 사카라이드, 예컨대 알파-메틸 만노스 및 L-푸코스에도 반응성이었다. 따라서, 특정 실시양태에서는 접합체가 글루코스 이외의 사카라이드, 예컨대 알파-메틸 만노스 및 L-푸코스, 또는 접합체의 PK 또는 PD 특성을 변경시킬 수 있는 임의의 다른 사카라이드의 외인성 투여에 의해 촉발될 수 있다는 것을 알 것이다.

[0385] 상기 기재된 바와 같이 접합체가 일단 투여되면 (예를 들어, 지속 방출 제제로서 투여되면), 이것은 적합한 외인성 사카라이드의 투여에 의해 촉발될 수 있다. 특정 실시양태에서, 촉발량의 외인성 사카라이드가 투여된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 외인성 사카라이드의 "촉발량"은 접합체의 적어도 하나의 PK 및/또는 PD 특성 (예를 들어, 앞서 논의된 바와 같은 $C_{max}$, AUC, 반감기 등)에 변화를 야기하기에 충분한 양이다. 접합체에 관한 임의의 상기 언급된 투여 방법이 외인성 사카라이드에도 동등하게 적용된다는 것을 이해해야 한다. 또한, 접합체 및 외인성 사카라이드의 투여 방법은 동일할 수도 있고 상이할 수도 있다는 것을 이해해야 한다. 다양한 실시양태에서, 투여 방법은 상이하다 (예를 들어, 예시의 목적으로 언급하자면, 결정질 인슐린-접합체는 1주 단위로 피하 주사 투여될 수 있고, 외인성 사카라이드는 1일 단위로 경구 투여됨). 외인성 사카라이드의 경구 투여는 이것이 환자 순응도를 용이하게 하기 때문에 특히 유용하다. 일반적으로, 결정질 인슐린-접합체의 PK 및 PD 특성이 외인성 사카라이드의 PK 프로파일과 관련이 있을 것임을 알 것이다. 따라서, 접합체의 PK 및 PD 특성은 외인성 사카라이드의 PK 프로파일을 제어함으로써 조절될 수 있다. 당업계에 공지된 바와 같이, 외인성 사카라이드의 PK 프로파일은 사용되는 용량, 경로, 빈도 및 제제를 기초로 조절될 수 있다. 예를 들어, 접합체의 단기간의 강력한 활성화를 원하는 경우에는 경구용의 즉시 방출 제제가 사용될 수 있다. 반대로, 접합체의 보다 장기간의 덜 강력한 활성화를 원하는 경우에는 대신에 경구용의 연장 방출 제제가 사용될 수 있다. 즉시 및 연장 방출 제제의 제제화 및 제조시의 일반적인 고려사항은 예를 들어 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995]에서 찾을 수 있다.

[0386] 또한, 본 개시내용의 결정질 인슐린-접합체 및 외인성 사카라이드의 상대적인 투여 빈도는 동일할 수도 있고 상이할 수도 있음을 알 것이다. 특정 실시양태에서, 외인성 사카라이드는 접합체보다 더 빈번하게 투여된다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 외인성 사카라이드는 1일 1회 초과로 투여되는 반면에 접합체는 매일 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 외인성 사카라이드는 매일 투여되는 반면에 접합체는 매주 2회, 매주 1회, 격주 또는 매월 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 접합체는 매월 투여되고 외인성 사카라이드는 매주 2회, 매주 1회 또는 격주로 투여된다. 당업자는 이러한 방식에 있어서의 다른 변동을 인식할 것이고, 이러한 변동은 사용되는 접합체 및 제제의 성질에 따라 달라질 것이다.

[0387] **실시예**

[0388] 실시예에서 설명되고 사용되는 예시적인 접합체 I-5 내지 I-11 및 I-17의 구조를 도 2에 나타낸다.

[0389] 이러한 방법은 본 발명의 범주에 포함되는 다른 접합체를 생성하기 위해 변형될 수 있음을 이해한다.

[0390] **실시예 1 - 아지도에틸글루코스 (AzEG)의 합성**

[0391] ***a. 브로모에틸글루코스의 합성***

[0392] 도웩스(DOWEX) 50Wx4 수지 (알파-아에사르(Alfa-Aesar), 메사추세츠주 워드 힐 소재)를 탈이온수로 세척하여 탈색시켰다. 225 g D-글루코스 (1.25 mol; 1 equiv., 알파-아에사르) 및 140 g 도웩스 50Wx4의 혼합물을 2.2 L의 2-브로모에탄올 (30.5 mol, 25 equiv.; 124.97 g/mol; 1.762 g/mL; BP = 150℃; 알파-아에사르)로

처리하고, 교반한 혼합물을 4 시간 동안 80℃로 가열하였다. 반응은 TLC (20% 메탄올/디클로로메탄 (DCM))로 모니터링하였다. 반응은 약 4 시간 후에 완료되었고, 이것이 실온으로 냉각되게 하였다. 용액을 여과하여 수지를 제거하고, 이 수지는 에틸 아세테이트 및 DCM으로 세척하였다. 생성된 여과물을 회전 증발기에서 호박색 오일로 스트리핑하였다. 스트리핑 후 총 400 g.

[0393] 호박색 오일을 다음과 같은 방식으로 실리카 겔 (DCM 내에 패키징된 4 kg 실리카) 상에서 정제하였다. 조물질을 DCM에 용해시키고, 칼럼에 로딩한 다음, 2 x 4 L 10% 메탄올/DCM; 2 x 4 L 15% 메탄올/DCM; 및 3 x 4 L 20% 메탄올/DCM으로 용리시켰다. 분획 (TLC를 기초로 함)을 함유하는 생성물을 풀링하고, 건고상태로 스트리핑하여 152 g의 1-α-브로모에틸-글루코스 (42%)를 수득하였다.

[0394] *b. 브로모에틸글루코스의 아지도에틸글루코스 (AzEM)로의 전환*

[0395] 가열 맨틀, 오버헤드 교반기, 및 온도계가 구비된 5 L 둥근 바닥 3구 플라스크에 150 g 브로모에틸글루코스 (525 mmol)를 채웠다. 오일을 2 L의 물에 용해시키고, 68.3 g 나트륨 아지드 (1.05 mol, 2 equiv.; 65 g/mol; 알파-아에사르)에 이어 7.9 g 요오드화 나트륨 (52.5 mmol, 0.08 equiv.; 149.89 g/mol; 알파-아에사르)으로 처리하고, 용액을 50℃로 가온하고 밤새 교반하였다. 용액을 실온으로 냉각시키고, 회전증발기 상에서 건고상태로 농축시켰다. 고체 잔류물을 5:1 vol. $CHCl_3$:MeOH (3 x 500 mL)로 40℃에서 소화시켰다. 합한 유기 부분을 여과하고, 건고상태로 증발시켜 아지도에틸글루코스 (86 g)를 회백색 고체로서 수득하였다. TLC (20% MeOH/DCM; $H_2SO_4$로 채워짐): 출발 물질과 구별되지 않는 단일 스폿.

[0396] *c. 아지도에틸글루코스의 재정제*

[0397] 32 g의 아지도에틸글루코스를 100 mL 물에 녹였다. 혼탁한 용액을 유리 마이크로섬유 필터 (왓맨(Whatman) GF/B)를 통해 여과하였다. 금색 여과물을 회전증발기 상에서 고체로 증발시켰다. 고체를 메탄올 (100 mL)에 녹이고, 혼탁한 용액을 다시 유리 마이크로섬유 필터를 통해 여과하였다. 생성된 연황색 여과물을 진공하에 고체로 스트리핑하였다.

[0398] 고체를 최소한의 메탄올 (50 mL)에 녹이고, 에틸 아세테이트 (150 mL)를 천천히 교반하면서 첨가하였다. 대량의 슬러리를 냉각시키고 여과하였다. 고체를 공기건조시키고 (흡습성), 밤새 60℃ 오븐에 넣어두었다. TLC에 원래의 물질이 아주 조금 남았다. 수율 15.4 g. 모액을 진공하에 황색 검으로 증발시켰다. 이 시점에서는 이 물질에 대해 어떤 추가의 정제도 하지 않았다.

[0399] **실시예 2 - 아지도에틸만노스 (AzEM)의 합성**

[0400] *a. 브로모에틸만노스의 합성*

[0401] 도웩스 50Wx4 수지 (알파-아에사르, 메사추세츠주 워드 힐 소재)를 탈이온수로 세척하여 탈색시켰다. 225 g D-글루코스 (1.25 mol; 1 equiv., 알파-아에사르) 및 140 g 도웩스 50Wx4의 혼합물을 2.2 L의 2-브로모에탄올 (30.5 mol, 25 equiv.; 124.97 g/mol; 1.762 g/mL; BP = 150℃; 알파-아에사르)로 처리하고, 교반한 혼합물을 4 시간 동안 80℃로 가열하였다. 반응은 TLC (20% 메탄올/디클로로메탄 (DCM))로 모니터링하였다. 반응은 약 4 시간 후에 완료되었고, 이것이 실온으로 냉각되게 하였다. 용액을 여과하여 수지를 제거하고, 이 수지는 에틸 아세테이트 및 DCM으로 세척하였다. 생성된 여과물을 회전 증발기에서 호박색 오일로 스트리핑하였다.

[0402] 호박색 오일을 다음과 같은 방식으로 실리카 겔 (DCM 내에 패키징된 4 kg 실리카) 상에서 정제하였다. 조물질을 DCM에 용해시키고, 칼럼에 로딩한 다음, 2 x 4 L 10% 메탄올/DCM; 2 x 4 L 15% 메탄올/DCM; 및 3 x 4 L 20% 메탄올/DCM으로 용리시켰다. 분획 (TLC를 기초로 함)을 함유하는 생성물을 풀링하고, 건고상태로 스트리핑하여 152 g의 1-α-브로모에틸-글루코스 (42%)를 수득하였다.

[0403] *b. 브로모에틸만노스의 아지도에틸만노스 (AzEM)로의 전환*

[0404] 가열 맨틀, 오버헤드 교반기, 및 온도계가 구비된 5 L 둥근 바닥 3구 플라스크에 150 g 브로모에틸만노스 (525 mmol)를 채웠다. 오일을 2 L의 물에 용해시키고, 68.3 g 나트륨 아지드 (1.05 mol, 2 equiv.; 65 g/mol; 알파-아에사르)에 이어 7.9 g 요오드화 나트륨 (52.5 mmol, 0.08 equiv.; 149.89 g/mol; 알파-아에사르)으로 처리하고, 용액을 50℃로 가온하고 밤새 교반하였다. 용액을 실온으로 냉각시키고, 회전증발기 상에서 건고상태로 농축시켰다. 고체 잔류물을 5:1 vol. $CHCl_3$:MeOH (3 x 500 mL)로 40℃에서 소화시켰다. 합한 유기 부분을 여과하고, 건고상태로 증발시켜 아지도에틸만노스를 회백색 고체로서 수득하였다.

[0405] *c. 아지도에틸만노스의 재정제*

[0406] 32 g의 아지도에틸만노스를 100 mL 물에 녹였다. 혼탁한 용액을 유리 마이크로섬유 필터 (왓맨 GF/B)를 통해 여과하였다. 여과물을 회전증발기 상에서 고체로 증발시켰다. 고체를 메탄올 (100 mL)에 녹이고, 혼탁한 용액을 다시 유리 마이크로섬유 필터를 통해 여과하였다. 생성된 연황색 여과물을 진공하에 고체로 스트리핑하였다.

[0407] 고체를 최소한의 메탄올 (50 mL)에 녹이고, 에틸 아세테이트 (150 mL)를 천천히 교반하면서 첨가하였다. 대량의 슬러리를 냉각시키고 여과하였다. 고체를 공기건조시키고 (흡습성), 밤새 60℃ 오븐에 넣어두었다. 모액을 진공하에 황색 검으로 증발시켰다.

[0408] **실시예 3 - 아지도에틸만노비오스 (AzEBM)의 합성**

[0409] 벤젠 디메틸 에테르를 이용하여 실시예 2의 AzEM 화합물을 선택적으로 보호하고, 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제한 후, 벤질 브로마이드와 반응시켜 1-α-(2-아지도에틸)-4,6-벤즈알데히드 디아세탈-3-벤질-만노피라노시드를 수득하였다. 후속하여 엄격한 무수 조건하에서 은 트리플레이트 화학을 이용하여 생성물을 1-α-브로모-2,3,4,6-테트라벤조일만노피라노시드로 글리코실화하여, 보호된-아지도에틸만노비오스 생성물을 수득하였다. 이어서 벤조일 기 제거를 위해 중간체 생성물을 탈보호하여 AzEBM을 수득하였다.

[0410] **실시예 4 - 아지도에틸만노트리오스 (AzETM)의 합성**

[0411] *a. 1-α-브로모-2,3,4,6-테트라벤조일-만노스*

[0412] 교반 막대 및 질소 유입구를 함유하는 500 mL 3구 플라스크에 40 g (60.9 mmol)의 펜타벤조일만노스 및 80 mL의 메틸렌 클로라이드를 첨가하였다. 생성된 용액을 빙조 내에서 5℃ 미만으로 냉각시키고, 80 mL의 33% HBr-아세트산 용액을 첨가 깔대기를 통해 반응 온도가 10℃ 미만으로 유지되게 하는 속도로 첨가하였다. 첨가가 완료되면 (약 30 분), 빙조를 제거하고 3 시간 동안 교반을 계속하였다.

[0413] 반응 용액을 동 부피 (160 mL)의 DCM으로 희석시키고, 물 (2 x 500 mL), 포화 비카르보네이트 (2 x 50 mL) 및 염수 (1 x 50 mL)로 연속 추출하고, 황산 마그네슘 상에서 건조시키고, 용매를 증발시켜 고체 발포체를 41 g 수득하였고 (이론상 수율 40.1 g), 이를 동결기 내에서 $N_2$ 하에 저장하였다. 이 물질을 추가의 정제없이 사용하였다. 반응을 TLC에 의해 모니터링하였다: 실리카 겔 (헥산/에틸 아세테이트, 7/3) 출발 물질 $R_f$ 0.65, 생성물 $R_f$ 0.8 UV 시각화.

[0414] $^1$H NMR ($CDCl_3$) δ
8.11(d, 2H),8.01(m, 4H), 7.84(d, 2H), 7.58(m, 4H), 7.41(m, 6H), 7.28(t, 2H), 6.58(s, 1H),
6.28(m, 2H), 5.8(m, 1H), 4.75(dd, 1H) 4.68 (dd, 1H) 4.5(dd, 1H).

[0415] *b. 1-아지도에틸-2,4-디벤조일만노스*

[0416] 교반 막대, 질소 유입구 및 300 mL의 무수 아세토니트릴을 함유하는 1.0 L의 3구 플라스크에 25 g 1-아지도에틸만노스 (100.4 mmol) 및 50 mL 트리에틸 오르토벤조에이트 (220 mmol, 2.2 equiv.)를 첨가하였다. 생성된 슬러리를 실온에서 교반하고, 0.8 mL (10 mmol) 트리플루오로아세트산 (TFA)을 깔끔하게 첨가하였다. 용액은 10 분 이내에 맑아졌고, 추가로 2 시간 동안 교반을 계속한 다음, 25 mL의 10% 수성 TFA를 첨가하고, 추가로 2 시간 동안 교반을 계속하여 중간체를 에스테르 이성질체로 가수분해하였다. 용매를 진공하에 점성 오일로 증발시키고, 이것을 50 mL DCM으로 연화처리하고 다시 점성 오일로 증발시켰다. 잔류물에 톨루엔 (70 mL)을 첨가하고, 점성 용액에 2,4-디벤조일아지도에틸만노스를 시딩하였다. 미세한 침전물이 15 분 이내에 형성되었고, 실온에서 밤새 교반을 계속하였다. 생성된 다량의 현탁액을 동결기 내에 2-4 시간 둔 다음, 여과하고, 고체를 빙냉 톨루엔 (2 x 10 mL)으로 세척하였다. 고체를 일정한 중량으로 공기 건조시켜 21 g을 약 95% 이성질체 순도로 수득하였다 (TY 22.85 g @ 50% 이성질체 순도). 생성물을 40 mL 톨루엔에 녹이고, 1 시간 동안 교반한 다음, 동결기 내에 추가로 2 시간 동안 두었다. 고체를 여과하고, 빙냉 톨루엔으로 세척하고 (2 x 10 mL), 일정한 중량으로 공기 건조시켜 18.5 g의 단일 이성질체 생성물 2,4-디벤조일아지도에틸만노스를 83% 수율로 수득하였다. 모액은 목적하지 않는 이성질체 및 소량의 목적하는 이성질체를 함유하였다. 반응은 TLC로 모니터링하였다: SG (헥산/에틸 아세테이트 7/3) 출발 물질 $R_f$ 0.0, 오르토에스테르 중간체 $R_f$ 0.9. (헥산/에틸 아세테이트: 8/2) SM Rf 0.8, 목적하는 이성질체 $R_f$ 0.4, 목적하지 않는 이성질체 $R_f$ 0.2.

[0417] $^1$H NMR 300MHz ($CDCl_3$) δ 8.12(t, 4H), 7.66(t, 2H), 7.5(m, 4H), 5.56(t, 1H), 5.48(m, 1H), 5.14(m, 1H), 4.5(dd, 1H), 4.0(m, 2H), 3.8(m, 3H), 3.56(m, 1H), 3.44(m, 1H).

[0418] *c. 퍼벤조일화-man(α-1,3)-man(α-1.6)-α-1-아지도에틸만노피라노시드*

[0419] 교반 막대, 질소 유입구가 구비된 1.0 L 3구 플라스크에 185 mL DCM 중의 41 g의 조질의 1-브로모-테트라벤조일 만노스 (60.9 mmol, 약 2.5 equiv.)를 첨가하였다. 여기에 11.2 g 2,4-디벤조일아지도에틸만노스 (24.5 mmol)에 이어 11.2 g 4A 체를 첨가하였다. 슬러리를 실온에서 10 분 동안 교반하고, 메탄올/빙조에서 -15℃로 냉각시켰다.

[0420] 별개의 흑색 용기에서 190 mL 톨루엔에 이어 15.1 g 은-트리플루오로메탄술포네이트 (AgOTf) (58.8 mmol, 2.4 equiv.)를 첨가하고, 용액을 암소에서 교반하였다. 이 용액을 대형 첨가 깔대기로 옮기고, 반응물을 빛으로부터 보호하면서 교반 현탁액에 적가하였다. AgOTf 첨가 속도를 조정하여 반응 온도를 -10℃ 미만으로 유지시켰다. 첨가가 완료되면 (약 30 분), 빙조를 제거하고, TLC에 의해 단일 생성물이 남을 때까지 반응물을 추가로 2 시간 동안 교반하였다 (SG, 헥산/에틸 아세테이트: 7/3, 브로모 $R_f$ 0.9, 아지도 $R_f$ 0.4, 트리오스 생성물 $R_f$ 0.5, uv 시각화).

[0421] 트리에틸아민 (7 mL, 5.0 equiv.)을 첨가하고 이어서 200 mL DCM을 첨가하였다. 생성된 슬러리를 실리카 겔 패드 및 셀라이트를 통해 여과하고, 2 x 75 mL DCM으로 세척하였다. 진공하에 용매를 증발시키고, 잔류물을 에틸 아세테이트에 녹이고, 물 (2 x 100 mL), 비카르보네이트 (2 x 50 mL), 염수 (1 x 75 mL)로 순차적으로 세척하고, 황산 마그네슘 상에서 건조시켰다. 용매를 진공하에 증발시켜 39 g의 고체 발포체를 수득하였다 (TY 39.5 g).

[0422] $^1$H NMR 300MHz ($CDCl_3$) δ 8.3(d, 2H), 8.2(m, 8H), 7.85(d, 4H), 7.75(dd, 4H), 7.3-7.65(m, 30H), 7.2(t, 2H), 6.05(m, 4H), 5.9(t, 2H), 5.63(m, 2H), 5.38(s, 2H), 5.18(d, 1H), 4.65(m, 4H), 4.5(m, 2H), 4.35(m, 4H), 3,8(m, 2H), 3.54(m, 2H).

[0423] *d. man(α-1,3)-man(α-1.6)-α-1-아지도에틸만노피라노시드*

[0424] 40 mL 메탄올 중의 3.0 g 퍼벤조일화-man(α-1,3)-man(α-1.6)-α-1-아지도에틸만노피라노시드 (1.86 mmol)의 교반 현탁액에 메탄올 중의 4.28 M 나트륨 메톡시드 0.2 mL를 첨가하였다. 생성된 현탁액을 실온에서 20 시간 동안 교반하여 맑은 용액을 수득하였다. 반응의 완료는 TLC (SG, 헥산/에틸 아세테이트: 8/2 SM $R_f$ 0.4, 생성물 $R_f$ 0.0)로 모니터링하였다.

[0425] 진공하에 메탄올을 증발시켜 유성 반고체를 수득하였다. 잔류물을 에틸 아세테이트 (50 mL)에 녹이고, 3 시간 동안 교반하였다. 고체를 여과하고, 새로운 에틸 아세테이트로 세척하고 (2 x 20 mL), 일정한 중량으로 공기 건조시켜 생성물을 1.09 g (TY 1.07 g) 수득하였다. 모액은 탈보호된 부산물로서 잔여 메틸 벤조에이트를 함유하였다.

[0426] **실시예 5 - 아지도에틸-사카라이드 (AzEG, AzEM, AzEBM, AzETM)로부터 아미**노에틸-사카라이드 (AEG, AEM, AEBM, AETM)의 합성

[0427] 실시예 1-4로부터의 아지도 말단 화합물은 팔라듐/탄소 촉매, 소량의 아세트산, 및 용매로서 에탄올을 사용하는 것에 의해 실온에서 쉽게 수소화되어 상응하는 아민 말단 화합물로 된다. 도 1은 AEG, AEM, AEBM, AETM의 화학 구조를 보여준다. 과정은 이하에서 AETM에 대해 기술하는 것과 동일하지만, 다만 당업자는 시약, 용매 등의 양이 수소화하고자 하는 사카라이드-리간드의 몰 수에 따라 조정되어야 한다는 것을 이해할 것이다.

[0428] *a. man(α-1,3)-man(α-1.6)-α-1-아미노에틸만노피라노시드 ("아미노에틸*트리만노스", AETM)

[0429] 100 mL 물 및 50 mL 에탄올 중의 5.3 g (9.25 mmol) man(α-1,3)-man(α-1.6)-α-1-아지도에틸만노피라노시드 용액에 0.8 g 5% Pd/C를 첨가하였다. 강하게 교반한 현탁액을 30-40 psi에서 48 시간 동안 또는 출발 물질이 TLC (SG, 메탄올, SM $R_f$ 0.75, Pdt $R_f$ 0.0, PMA vis.)에 의해 보여지지 않을 때까지 수소화하였다. 현탁액을 셀라이트 상에서 여과하고, 이것을 에탄올로 세정하고 (2 x 50 mL), 여과물을 진공하에 농축시켰다.

[0430] 이 물질의 HPLC (C18, 3% 아세토니트릴/97% 0.1% $H_3PO_4$, 220 nm, 2 ml/분) 결과 주입 칼럼 공간 물질의 uv 흡착이 Rt 2.5 분으로 나타나, 벤조에이트 에스테르를 나타내었다.

[0431] 여과물을 70 mL 물 및 12 mL의 1 N NaOH로 희석하고, 용액을 실온에서 밤새 교반하였다 (HPLC: 칼럼 공간 Rt 2.5 분에 uv 물질 부존재, Rt 10.5 분에 uv 물질이 벤조산과 함께 공용리됨). 2 g의 탈색된 차콜을 첨가하고, 교반 현탁액을 80℃로 가열하고, 실온으로 냉각시키고, 셀라이트 상에서 여과하였다. 여과물 pH를 2 N HCl로 8.0으로 조정하고, 무색 용액을 진공하에 약 50% 부피로 농축시켰다.

[0432] 용액을 수지 칼럼 (도웩스 50W, 50 g) 상에 로딩하고, 임의의 잔여 산 부산물이 제거되어 용리된 분획의 pH가 중성이 될 때까지 물로 세척하였다 (6 x 75 mL). 0.25 N 수산화암모늄 (6 x 75 mL)으로 아민 생성물을 칼럼에서 세척해내고, 아민 생성물-닌히드린 검출물을 함유하는 분획을 합하고, 진공하에 25-30 mL로 농축시켰다. 이러한 농축된 용액을 300 mL의 교반 에탄올에 적가하고, 추가로 2 시간 동안 교반을 계속하였다. 생성물을 여과하고, 새로운 에탄올로 세척하고 (2 x 50 mL), 일정한 중량으로 공기 건조시켰다. 생성된 백색 무정형 고체를 진공 오븐 내에서 80℃에서 5 시간 동안 추가로 건조시켜, 4.1 g의 백색 과립상 고체를 수득하였다 (TY 5.1 g). NMR은 어떤 방향족 양성자도 나타내지 않았다.

[0433] $^1$H NMR 300 MHz ($D_2O$) δ 5.08(s, 1H), 4.87(s, 1H), 4.81(s, 1H), 4.8-3.6(m, 18H), 2.9(m, 2H).

[0434] **실시예 6 - $NH_2$-B29-BOC2(A1,B1)-인슐린의 합성**

[0435] ***a. Fmoc1-(B29)-인슐린***

[0436] 전형적인 합성법으로, 4 g의 분말형 인슐린 (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 미주리주 세인트 루이스 소재)을 실온에서 100 ml의 무수 DMSO에 용해시킨 후, 트리에틸아민 (TEA)을 4 ml 첨가하였다. 용액을 30 분 동안 실온에서 교반하였다. 다음으로, 1.2 당량의 9-플루오레닐메틸 N-숙신이미딜 카르보네이트 (Fmoc-NHS) (시그마-알드리치, 미주리주 세인트 루이스 소재)를 THF 중의 Fmoc-NHS의 1.0 M 용액으로서 인슐린-TEA 용액에 천천히 첨가하였다. 반응물을 대략 1 시간 동안 혼합하였다. DMSO 5 ml 중에 에탄올아민 250 ㎕를 함유하는 원액 4 ml를 첨가한 후 5 분 동안 혼합하는 것을 통해 반응을 켄칭시켰다. 켄칭 이후, 전체 용액을 아세톤 1600 ml에 붓고, 스파츌라로 간단히 혼합하였다. 다음으로, 혼합물의 표면에 8 x 400 ㎕ 분취량의 18.9% HCl:물 용액을 적가하여 반응된 인슐린을 침전시켰다. 이어서 침전된 물질을 원심분리하고, 침전 케이크가 한쪽에 쌓이도록 하면서 상청액을 제2 비커에 따라내었다. 상청액 용액에, 또 다른 8 x 400 ㎕ 분취량의 18.9% HCl:물 용액을 혼합물의 표면 상에 적가하여 반응된 인슐린의 제2 침전물을 수득하였다. 이 제2 침전물을 원심분리하고, 상청액을 따라내었다. 2번의 침전 단계로부터 합한 원심분리 케이크를 아세톤으로 한번 세척한 후 진공하에 실온에서 건조시켜 조 분말을 수득하였고, 이것은 전형적으로 Fmoc1 생성물을 20%, Fmoc2 생성물을 65%, 및 미반응 인슐린을 15% 함유하였다.

[0437] 정제용 역상 HPLC 방법을 사용하여 조 분말로부터 목적하는 순수한 Fmoc1-인슐린을 단리하였다. 완충제 A는 0.1% TFA를 함유하는 탈이온수이며, 완충제 B는 0.1% TFA를 함유하는 아세토니트릴이다. 조 분말을 70%A/30%B 혼합물 중에 25 mg/ml로 용해시키고, 시린지 여과한 후 칼럼에 주입하였다. 정제하기 전에, 칼럼 (워터스 시메트리프레프(Waters SymmetryPrep) C18, 7 ㎛, 19 x 150 mm)을 워터스 델트라프레프(Waters DeltraPrep) 600 시스템을 이용하여 70%A/30%B 이동상으로 15 ml/분으로 평형화하였다. 대략 5 ml의 조 분말 용액을 5 분 동안 15 ml/분의 유속으로 칼럼에 주입하고, 이후 다음 3.5 분 동안 70%A/30%B → 62%A/38%B의 선형 구배를 이용하고, 이 상태로 추가로 2.5 분간 두었다. 이러한 방법을 이용하여, 목적하는 Fmoc1 피크를 미반응 RHI 피크 후 대략 3 분째에 용리시켰고, Fmoc2-인슐린 피크가 바로 이어졌다. 일단 수집되면, 용액을 회전증발시켜 아세토니트릴을 제거하고, 동결건조시켜 순수한 Fmoc1-인슐린 분말을 수득하였다. 정체는 LC-MS (HT 래보러토리즈(HT Laboratories), 캘리포니아주 샌 디에고 소재)로 확인하고, 접합 부위는 N-말단 서열분석 (웨스턴 애널리티컬(Western Analytical), 미주리주 세인트 루이스 소재)으로 결정하였다.

[0438] ***b. BOC2(A1,B1)-Fmoc-(B29)-인슐린***

[0439] 전형적인 합성법으로, 1 g의 Fmoc1 -(B29)-인슐린을 실온에서 25 ml의 무수 DMSO에 용해시킨 후, 트리에틸아민 (TEA)을 1 ml 첨가하였다. 용액을 30 분 동안 실온에서 교반하였다. 다음으로, 0.379 ml (2.2 당량)의 디-tert-부틸-디카르보네이트/THF 용액 (시그마-알드리치, 미주리주 세인트 루이스 소재)을 인슐린-TEA 용액에 천천히 첨가하고, 대략 1 시간 동안 혼합하였다. DMSO 5 ml 중에 에탄올아민 250 ㎕를 함유하는 원액 1 ml를 첨가한 후 5 분 동안 혼합하는 것을 통해 반응을 켄칭시켰다. 켄칭 이후, 전체 용액을 아세톤 400 ml에 붓고, 스파츌라로 간단히 혼합하였다. 다음으로, 혼합물의 표면에 8 x 100 ㎕ 분취량의 18.9% HCl:물 용액을 적가하여 반응된 인슐린을 침전시켰다. 이어서 침전된 물질을 원심분리하고, 침전 케이크가 한쪽에 쌓이도록 하면서 상청액을 제2 비커에 따라내었다. 상청액 용액에, 또 다른 8 x 100 ㎕ 분취량의 18.9% HCl:물 용액을 혼합물의

표면 상에 적가하여 반응된 인슐린의 제2 침전물을 수득하였다. 이 제2 침전물을 원심분리하고, 상청액을 따라 내었다. 2번의 침전 단계로부터 합한 원심분리 케이크를 아세톤으로 한번 세척한 후 진공하에 실온에서 건조시켜 조 분말을 수득하였고, 이것은 전형적으로 목적하는 BOC2-Fmoc1 생성물을 90%를 초과하여 함유하였다.

[0440] 정제용 역상 HPLC 방법을 사용하여 조 분말로부터 순수한 BOC2-Fmoc1-인슐린을 단리하였다. 완충제 A는 0.1% TFA를 함유하는 탈이온수이며, 완충제 B는 0.1% TFA를 함유하는 아세토니트릴이다. 조 분말을 70%A/30%B 혼합물 중에 25 mg/ml로 용해시키고, 시린지 여과한 후 칼럼에 주입하였다. 정제하기 전에, 칼럼 (워터스 시메트리프레프 C18, 7 ㎛, 19 x 150 mm)을 워터스 델트라프레프 600 시스템을 이용하여 70%A/30%B 이동상으로 15 ml/분으로 평형화하였다. 대략 5 ml의 조 분말 용액을 5 분 동안 15 ml/분의 유속으로 칼럼에 주입하고, 이후 다음 3.5 분 동안 70%A/30%B → 62%A/38%B의 선형 구배를 이용하고, 이 상태로 추가로 2.5 분간 두었다. 이러한 방법을 이용하여, 목적하는 BOC2-Fmoc1 피크를 Fmoc1-인슐린 출발 물질 이후 대략 5 분째에 용리시켰다. 일단 수집되면, 용액을 회전증발시켜 아세토니트릴을 제거하고, 동결건조시켜 순수한 BOC2(A1,B1)-Fmoc(B29)-인슐린 분말을 수득하였다. 정체는 LC-MS (HT 래보러토리즈, 캘리포니아주 샌 디에고 소재)로 확인하고, 접합 부위는 N-말단 서열분석 (웨스턴 애널리티컬, 미주리주 세인트 루이스 소재)으로 결정하였다.

[0441] *c. $NH_2$-(B29)-BOC2(A1,B1)-인슐린*

[0442] 상기 단계에 따라 수득한 동결건조된 분말을 디메틸포름아미드 (DMF) 중의 20% 피페리딘에 4℃에서 30 분 동안 용해시켜 BOC2(A1,B1)-Fmoc(B29)의 Fmoc 보호기를 제거한 후, 0.150 M NaCl을 함유하는 25 mM HEPES pH 8.2 완충제 중에 10배 초희석시켰다. pH는 NaOH 용액을 이용하여 7.0 내지 8.0으로 조정하고, 이후 물질을 바이오겔 (Biogel) P2 칼럼을 통해 통과시켜 Fmoc, DMF, 및 임의의 다른 오염 염을 제거하였다. 필요에 따라 $NH_2$-(B29)-BOC2(A1,B1)-인슐린을 분말로 동결건조시키거나, 또는 목적하는 바에 따라 직접 수성 용액으로 사용하였다.

[0443] **실시예 7 - 유기 용매 중에서의 다가 활성화된 에스테르와의 인슐린 접합**

[0444] N-말단 활성화된 에스테르를 함유하는 프레임워크를 1 ml의 무수 DMSO 중에 60 mM로 용해시킨 후, 400 ㎕ (과량)의 트리에틸아민 (TEA)을 첨가하였다. 용액을 10 분 동안 실온에서 신속하게 교반하였다. 병행해서, 적절한 부피의 무수 DMSO 중에서 리간드의 122 mM 용액을 제조하였다. 일단 용해되면, 프레임워크 상의 활성화된 에스테르 기의 수, N, - 1과 정확하게 동일한 다수의 반응 당량이 생성되도록 충분한 리간드 용액을 10 분 동안 적가하였다. 예를 들어, 프레임워크 상에 N=3 활성화된 에스테르 기가 존재하는 경우, (1x(3-1)x60 mM/122 mM)=0.98 ml의 리간드 용액을 첨가한다. 프레임워크 상에 N=4 활성화된 에스테르 기가 존재하는 경우, (1x(4-1)x60 mM/122 mM)=1.5 ml의 리간드 용액을 첨가하는 등이다. 리간드 용액을 첨가한 후, 용액을 2 시간 동안 실온에서 교반하였다.

[0445] 이어서 별도로 인슐린을 7.5 ml의 무수 DMSO에 8.1 mM의 농도로 용해시켰다. 일단 용해되면, 전체 인슐린 용액을 프레임워크/DMSO/리간드/TEA 용액에 1 분 동안 첨가한 후, 추가로 2 시간 동안 실온에서 혼합하여 완벽하게 반응시켰다.

[0446] 이어서 생성된 용액을 0.150 M NaCl을 함유하는 20 mM pH 5.0 HEPES 완충 염수 용액으로 10배 초희석한 후 pH를 연한 HCl로 최종 pH 8.0으로 조정하였다. 수용액을 먼저 목적하는 접합 및 비접합 물질의 분리를 위해 적절한 고체상을 이용한 크기 배제에 의해 정제하였다. 이어서 칼럼 공간 부피를 통과한 용액을 적절한 크기의 한외여과 막을 이용하여 대략 10 ml로 농축시켰다. 이 용액을 추가로 정제용 역상 HPLC를 이용하여 워터스 시메트리프레프 C18, 7 ㎛ 칼럼, 19 x 150 mm 상에서 정제하여 목적하는 생성물을 수득하였다. 완충제 A는 0.1% TFA를 함유하는 탈이온수이고, 완충제 B는 0.1% TFA를 함유하는 아세토니트릴이다. 정제하기 전에, 칼럼을 워터스 델트라프레프 600 시스템을 이용하여 80%A/20%B 이동상으로 15 ml/분으로 평형화하였다. 대략 5 ml의 조 용액을 2 분 동안 15 ml/분의 유속으로 칼럼에 주입하고, 이후 다음 5 분 동안 80%A/20%B → 75%A/25%B의 선형 구배를 이용한 후, 다음 22 분 동안은 75%A/25%B → 62%A/38%B의 더 느린 선형 구배를 이용하였다. 목적하는 피크의 체류 시간은 사용한 인슐린 분자, 프레임워크 및 리간드에 따라 달라질 것이다. 일단 수집되면, 용액을 회전증발시켜 아세토니트릴을 제거하고, 동결건조시켜 순수한 접합체를 수득하였고, 그 정체는 LC-MS (HT 래보러토리즈, 캘리포니아주 샌 디에고 소재)로 확인할 수 있다.

[0447] **실시예 8 - 유기 용매 중에서 비보호된 인슐린으로부터 생성된 다가 사카라**이드와의 B29-인슐린 접합체

[0448] 본 실시예는 비보호된 인슐린에서, Lys-B29 엡실론-아미노 모이어티가 가장 반응성인 아민이고, 그 다음은 A1, 그 다음은 B1이라는 사실을 이용한 것이다. 따라서 비보호된 인슐린이 사용된 경우, 생성된 접합체는 대부분

Lys-B29 위치에서 치환될 것이다. 실시예 7에서 기재한 방법 및 재조합 인간 인슐린 (MW=5808 Da, 시그마-알드리치, 미주리주 세인트 루이스 소재)을 사용하여, 몰레큘라 바이오사이언시스(Molecular Biosciences) (콜로라도주 볼더 소재)에서 구입한 TSAT-C6 활성화된 에스테르 프레임워크를 이용하여 다음과 같은 인슐린 접합체를 제조하였다. AEM 및 AETM은 상기에서 기재한 바와 같이 합성하였다. 적절한 크기의 크기 배제 매질은 바이오겔 P2 (바이오-래드(Bio-Rad) 래보러토리즈, 캘리포티아주 헤라클레스 소재)이었고, 대략적인 크기의 한외여과막 분자량 차단은 3 kDa이었다.

[0449]

| 접합체 | 프레임워크 | 프레임워크 MW | 리간드 | AE-당 MW | 순도 (HPLC) | MW (LC-MS) | 당/인슐린 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **I-7: TSAT-C6-AEM-2 (B29)** | TSAT-C6 | 822 | AEM | 223 | 93% | 6729 | 2.0 |
| **I-6: TSAT-C6-AETM-2 (B29)** | TSAT-C6 | 822 | AETM | 547 | 95% | 7378 | 2.0 |

[0450] N-말단 서열분석에 따르면, AEM 함유 프레임워크의 대략 85%가 Lys-B29를 통해 인슐린에 접합되었고, AETM 함유 프레임워크의 대략 87%가 Lys-B29를 통해 인슐린에 접합되었다.

[0451] **실시예 9 - 수성 용매 중에서 다가 활성화된 에스테르와의 인슐린 접합**

[0452] 본 실시예는 실시예 7에서 기재한 방법의 대안으로, 유기 용매 대신 수성 용매에서 반응을 수행하였다.

[0453] N-말단 활성화된 에스테르를 함유하는 프레임워크를 6.25 ml의 수성 DMSO 중에 60 mM로 용해시킨 후, 2 ml (과량)의 트리에틸아민 (TEA)을 첨가하였다. 용액을 실온에서 10 분 동안 신속하게 교반하였다. 병행해서, 적절한 부피의 무수 DMSO 중에서 리간드의 448 mM 용액을 제조하였다. 일단 용해되면, 프레임워크 상의 활성화된 에스테르 기의 수, N, - 1의 1.5배와 동일한 다수의 반응 당량이 생성되도록 충분한 리간드 용액을 10 분 동안 적가하였다. 예를 들어, 프레임워크 상에 N=3 활성화된 에스테르 기가 존재하는 경우, (1.5x(3-1)x60 mM/448 mM)x6.25 ml = 2.5 ml의 리간드 용액을 첨가한다. 프레임워크 상에 N=4 활성화된 에스테르 기가 존재하는 경우, (1.5x(4-1)x60 mM/448 mM)x6.25 ml = 3.8 ml의 리간드 용액을 첨가하는 등이다. 리간드 용액을 첨가한 후, 용액을 1 시간 동안 실온에서 교반하였다.

[0454] 이어서 별도로 인슐린 분자를 2.67 ml의 0.1 M, pH 11 탄산나트륨 완충제 중에 17.2 mM로 용해시키고, 후속하여 1.0 N 수산화나트륨으로 pH를 10.8로 조정하였다. 일단 용해되면, 전체 프레임워크/DMSO/리간드/TEA 용액을 인슐린/카르보네이트 완충제 용액에 75 분 동안 적가하였다. 첨가하는 동안, 필요에 따라 연한 HCl 또는 NaOH를 사용하여 생성된 혼합물의 pH를 매 5 분마다 10.8로 조정하였다. 적가한 후 용액을 추가로 15 분 동안 교반하여 완벽하게 반응시켰다.

[0455] 이어서, 생성된 용액을 0.150 M NaCl을 함유하는 20 mM pH 5.0 HEPES 완충 염수 용액으로 10배 초희석한 후, pH를 연한 HCl로 최종 pH 8.0으로 조정하였다. 수용액을 먼저 목적하는 접합 및 비접합 물질의 분리를 위해 적절한 고체상을 이용한 크기 배제에 의해 정제하였다. 이어서 칼럼 공간 부피를 통과한 용액을 적절한 크기의 한외여과 막을 이용하여 대략 40 ml로 농축시켰다. 이 용액을 추가로 정제용 역상 HPLC를 이용하여 워터스 시메트리프레프 C18, 7 ㎛, 19 x 150 mm 칼럼 상에서 정제하여 목적하는 생성물을 수득하였다. 완충제 A는 0.1% TFA를 함유하는 탈이온수이고, 완충제 B는 0.1% TFA를 함유하는 아세토니트릴이다. 정제하기 전에, 칼럼을 워터스 델트라프레프 600 시스템을 이용하여 80%A/20%B 이동상으로 15 ml/분으로 평형화하였다. 대략 5 ml의 조 용액을 2 분 동안 15 ml/분의 유속으로 칼럼에 주입하고, 이후 다음 5 분 동안 80%A/20%B → 75%A/25%B의 선형 구배를 이용한 후, 다음 22 분 동안은 75%A/25%B → 62%A/38%B의 더 느린 선형 구배를 이용하였다. 목적하는 피크의 체류 시간은 사용한 인슐린 분자, 프레임워크 및 리간드에 따라 달라질 것이다. 일단 수집되면, 용액을 회전증발시켜 아세토니트릴을 제거하고, 동결건조시켜 순수한 접합체를 수득하였고, 그 정체는 LC-MS (HT 래보러토리즈, 캘리포니아주 샌 디에고 소재)로 확인할 수 있다.

[0456] **실시예 10 - 수성 용매 중에서 비보호된 인슐린으로부터 합성된 B29-AEM-2-인슐린 접합체 I-7**

[0457] 본 실시예는 비보호된 인슐린에서, Lys-B29 엡실론-아미노 모이어티가 가장 반응성인 아민이고, 그 다음은 A1, 그 다음은 B1이라는 사실을 이용한 것이다. 따라서 비보호된 인슐린이 사용된 경우, 생성된 접합체는 대부분 Lys-B29 위치에서 치환될 것이다. 실시예 9에서 기재한 방법 및 재조합 인간 인슐린 (MW=5808, 시그마-알드리치, 미주리주 세인트 루이스 소재)을 사용하여, 몰레큘라 바이오사이언시스 (콜로라도주 볼더 소재)에서 구입한

TSAT-C6 활성화된 에스테르 프레임워크를 이용하여 AEM-2 인슐린 접합체를 제조하였다. 인슐린 유사체로서 사용된 AEM은 상기에서 기재한 바와 같이 합성하였다. 적절한 크기의 크기 배제 매질은 바이오겔 P2 (바이오-래드 래보러토리즈, 캘리포니아주 헤라클레스 소재)이었고, 대략적인 크기의 한외여과 막 분자량 차단은 3 kDa이었다. 최종 생성물 (HPLC에 의하면 95% 순수)은 6729 g/mol의 목적하는 MW를 갖는 것으로 확인되었는데 (LC-MS), 이는 인슐린 당 총 2.0 AEM 분자가 접합되었음을 나타내고, 85%를 초과한 접합체 분자가 Lys-B29 위치에서 접합된 것으로 나타났다 (N-말단 서열분석).

[0458] **실시예 11 - 소 및 돼지와 같은 다른 종으로부터의 천연 인슐린을 이용하여** 제조한 접합체

[0459] 적어도 하나의 반응성 아민 관능기를 함유하는 다른 종으로부터의 인슐린 (예를 들어, 소 및 돼지 인슐린)을 재조합 인간 인슐린을 접합시키는데 사용되는 임의의 방법을 이용하여 커플링시킬 수 있다. 당업자는 소 또는 돼지 인슐린으로부터 제조되는 결과적인 접합체의 분자량이 재조합 인간 인슐린으로부터 제조되는 것과 하기 표에서 열거한 양만큼 다를 것임을 인식할 것이다.

[0460]

| 인슐린 유형 | 분자량 (g/mol) | 인간 인슐린과의 MW 차이(g/mol) |
|---|---|---|
| 인간 인슐린 | 5808 | - |
| 돼지 인슐린 | 5778 | -30 |
| 소 인슐린 | 5733 | -75 |

[0461] 당업자는 또한 소 또는 돼지 인슐린으로부터 제조되는 결과적인 접합체가 인슐린 사이의 구조상 작은 차이로 인해 인간 인슐린으로부터 제조되는 접합체의 그것과 약간 다른 크로마토그래피 피크 체류 시간을 가질 수 있음을 인식할 것이다.

[0462] **실시예 12 - 리스프로, 아스파르트, 글루리신, 글라진 및 데테미르와 같은** 인슐린 유사체와 함께 제조된 접합체

[0463] 적어도 하나의 반응성 아민 관능기를 함유하는 것으로 공지된 모든 인슐린 유사체 (예를 들어, 리스프로, 아스파르트, 글루리신, 글라진, 및 데테미르)를 재조합 인간 인슐린을 접합시키는데 사용되는 임의의 방법을 이용하여 커플링시킬 수 있다. 당업자는 인슐린 유사체로부터 제조되는 결과적인 접합체의 분자량이 재조합 인간 인슐린으로부터 제조되는 것과 하기 표에서 열거하는 양만큼 다를 것임을 인식할 것이다.

[0464]

| 인슐린 유형 | 분자량 (g/mol) | 인간 인슐린과의 MW 차이 (g/mol) |
|---|---|---|
| 인간 인슐린 | 5808 | - |
| 인슐린 리스프로 | 5808 | - |
| 인슐린 아스파르트 | 5832 | +24 |
| 인슐린 글루리신 | 5823 | +15 |
| 인슐린 글라진 | 6063 | +255 |
| 인슐린 데테미르 | 5913 | +105 |

[0465] 당업자는 또한 인슐린 유사체로부터 제조되는 결과적인 접합체가 인슐린 사이의 구조상 작은 차이로 인해 인간 인슐린으로부터 제조되는 접합체의 그것과 약간 다른 크로마토그래피 피크 체류 시간을 가질 수 있음을 인식할 것이다.

[0466] **실시예 13 - AEM-2-TSAT-C6-인슐린 접합체의 B29-치환된 버전의 PK 및 생물**활성

[0467] 본 실시예는 피하로 투여한 예시적 접합체에 대해 수득한 혈청 인슐린 및 혈당 저하 프로파일을 기재한다. 도 2의 예시적 접합체, I-7은 B29-치환된 접합체를 생성하기 위해 프레임워크로서 TSAT-C6, 리간드로서 AEM, 및 재조합 인간 인슐린을 이용하여 합성한 것이다. 이 사례에서, 접합체를 공복상태인 정상 비-당뇨병 래트 (수컷 스프라그-돌리, 400-500 g, n = 3)의 목 뒷쪽에 5 U/kg으로 주사하였다. 혈액 샘플은 0 분 및 주사 후 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 및 300 분에 꼬리 정맥을 통해 출혈시켜 수집하였다. 혈당값은 시판하는 시험띠 (프리시젼 엑스트라(Precision Xtra), 애보트 래보러토리즈, 일리노이주 애보트 파크 소재)를 이용하여 측정하였다. 또한, 각 시점으로부터의 혈액을 4℃에서 원심분리하여 혈청을 수집하였다. 이어서 시판하는 ELISA 키트 (휴먼 인슐린 ELISA, 메르코디아(Mercodia), 스웨덴 웁살라 소재)를 이용하여 혈청 인슐린 농도를 측정하였다. 도 3에서 볼 수 있는 바와 같이, 피하 주사 이후에 B29-치환된 접합체가 혈청으로 신속하게 흡수되어 제거되었다.

[0468] **실시예 14 - 리간드 친화성의 함수로서 PK 및 생물활성에 대한 a-MM의 효과**

[0469] 본 실시예에서는 TSAT-C6 프레임워크를 사용하였고, 실시예 9에서 기재한 방법에 따라 하기 접합체를 합성하였다 (주: 글루코스아민-HCl 또는 GA-HCl은 시그마-알드리치 (미주리주 세인트 루이스 소재) 사에서 구입하였고, 추가의 정제없이 사용하였다):

[0470]

| 접합체 | 프레임워크 | 프레임워크 MW | 리간드 | AE-당 MW | 순도 (HPLC) | MW (LC-MS) | 당/인슐린 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **I-7: TSAT-C6-AEM-2 (B29)** | TSAT-C6 | 822 | AEM | 223 | 95% | 6729 | 2.0 |
| **I-5: TSAT-C6-GA-2 (B29)** | TSAT-C6 | 822 | GA-HCl | 216 | 95% | 6641 | 2.0 |

[0471] N-말단 서열분석에 따르면, 각각의 사카라이드-함유 프레임워크의 대략 90%가 Lys-B29를 통해 인슐린에 접합되었다. TSAT-C6-AEM-2 (B29) 및 TSAT-C6-GA-2 (B29)를 각각 접합체 I-7 및 I-5로서 도 2에 나타내었다.

[0472] 접합체 (5 U/kg)를 공복상태인 정상 비-당뇨병 래트 (수컷 스프라그-돌리, 400-500 g, n = 3)의 목 뒷쪽에 주사하였다. 15 분 지체한 후, 4 g/kg 용량의 a-MM을 IP 주사하였다. 혈액 샘플은 0 분 및 처음 접합체를 주사한 후 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 및 300 분에 꼬리 정맥을 통해 출혈시켜 수집하였다. 혈당값은 시판하는 시험띠 (프리시젼 엑스트라, 애보트 래보러토리즈, 일리노이주 애보트 파크 소재)를 이용하여 측정하였다. 또한, 각 시점으로부터의 혈액을 4℃에서 원심분리하여 혈청을 수집하였다. 이어서 시판하는 ELISA 키트 (ISO 인슐린 ELISA, 메르코디아, 스웨덴 웁살라 소재)를 이용하여 혈청 인슐린 농도를 측정하였다. 15 분 후에 a-MM 대신 염수를 주사하여 대조군을 생성하였다.

[0473] 도 4 및 5는 I-7 및 I-5를 각각 피하 주사하고 15 분 후에 a-MM을 IP 주사에 의해 투여한 경우의 결과를 나타낸다. 나타낸 바와 같이, a-MM 주사로 인한 PK/PD 프로파일의 증가는 염수를 주사한 대조군 그룹과 비교했을때 접합체 I-7의 경우 매우 현저하였다 ($p<0.05$). I-5 접합체 프로파일은 a-MM 주사에 의한 영향을 받지 않았다.

[0474] **실시예 15 - 리간드 원자가의 함수로서 PK 및 생물활성에 대한 a-MM의 효과**

[0475] 본 실시예에서, 본 발명자들은 예시적인 사카라이드 리간드가 증가되는 개수로 공유적으로 부착된 접합체의 약동학 및 약력학 거동을 결정하는 것에 착수하였다. 모든 접합체는 하기에서 상술하는 프레임워크 및 사카라이드 리간드를 사용하여 실시예 9에서 기재한 방법에 따라 합성하였다:

[0476]

| 접합체 | 프레임워크 | 프레임워크 MW | 리간드 | AE-당 MW | 순도 (HPLC) | MW (LC-MS) | 당/인슐린 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **I-8: DSS-AEM-1 (B29)** | DSS | 368 | AEM | 223 | >95% | 6168 | 1.0 |
| **I-9: TSPE-AEM-3 (B29)** | TSPE | 813 | AEM | 223 | >95% | 6829 | 3.0 |
| **I-10: DSS-AETM-1 (B29)** | DSS | 368 | AETM | 547 | >95% | 6491 | 1.0 |
| **I-11: TSPE-AETM-3 (B29)** | TSPE | 813 | AETM | 547 | >95% | 7800 | 3.0 |

[0477] N-말단 서열분석에 따르면, 각각의 사카라이드-함유 프레임워크의 대략 90%가 Lys-B29를 통해 인슐린에 접합되었다. 접합체를 도 2에 I-8, I-9, I-10, 및 I-11로서 나타내었다.

[0478] 상기 표에서 기재한 접합체에 대해 실시예 14에서 기재한 것과 동일한 유형의 실험을 반복하였다. 각 사례에서, 동일한 용량의 접합체 (5 U/kg)를 공복상태인 정상 비-당뇨병 래트 (수컷 스프라그-돌리, 400-500 g, n = 3)의 목 뒷쪽에 주사하였다. 15 분 지체한 후, 4 g/kg 용량의 a-MM을 IP 주사하였다. 혈액 샘플은 0 분 및 처음 접합체를 주사한 후 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 및 300 분에 꼬리 정맥을 통해 출혈시켜 수집하였다. 혈당값은 시판하는 시험띠 (프리시젼 엑스트라, 애보트 래보러토리즈, 일리노이주 애보트 파크 소재)를 이용하여 측정하였다. 또한, 각 시점으로부터의 혈액을 4℃에서 원심분리하여 혈청을 수집하였다. 이어서 시판하는 ELISA 키트 (ISO 인슐린 ELISA, 메르코디아, 스웨덴 웁살라 소재)를 이용하여 혈청 인슐린 농도를 측정하였다. 15 분 후에 a-MM 대신 염수를 주사하여 대조군을 생성하였다.

[0479] 도 6 및 7은 I-8 및 I-9를 각각 피하 주사하고 15 분 후에 a-MM을 IP 주사에 의해 투여한 경우의 결과를 나타낸

다. 나타낸 바와 같이, a-MM 주사로 인한 PK/PD 프로파일의 증가는 염수를 주사한 대조군 그룹과 비교했을때 I-9의 경우는 매우 현저하였고 ($p<0.05$), I-8의 경우에는 덜 현저하였다.

[0480] 도 8 및 9는 I-10 및 I-11을 각각 피하 주사하고 15 분 후에 a-MM을 IP 주사에 의해 투여한 경우의 결과를 나타낸다. 나타낸 바와 같이, a-MM 주사로 인한 PK/PD 프로파일의 증가는 염수를 주사한 대조군 그룹과 비교했을때 I-11의 경우는 매우 현저하였고 ($p<0.05$), I-10의 경우에는 약간 덜 현저하였다.

[0481] **실시예 16 - 생체내 반감기/제거 속도 비교**

[0482] 비접합된 인슐린과 비교하여 생체내에서 혈청으로부터 소실되는 속도를 결정하기 위해 예시적인 접합체를 이용하여 다음과 같은 실험을 행하였다. 본 연구에 사용된 모든 접합체는 실시예 9에서 기재한 일반적인 방법에 따라 합성하였다.

[0483] 각 사례에서 가용성 접합체를 이중으로 경정맥 삽관한 수컷 스프라그-돌리 래트 (타코닉(Taconic), JV/JV, 350-400 g, n=3)에 0.4 mg 접합체/체중 kg으로 투약하였다. 멸균 접합체 용액 또는 대조군 인슐린을 하나의 JV 캐뉼라를 통해 정맥내 주사하고, 그 직후에 헤파린-염수의 추적 용액을 주사하여 모든 접합체 용량이 확실하게 동물에 투여되도록 하였다. 제2 캐뉼라는 t = 0 (투여 전), 및 투여 후 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90, 120, 및 180 분에 혈액 샘플을 수집하는데 사용하였다.

[0484] 혈당값은 시판하는 시험띠 (프리시젼 엑스트라, 애보트 래보러토리즈, 일리노이주 애보트 파크 소재)를 이용하여 측정하였다. 또한, 각 시점으로부터의 혈액을 4℃에서 원심분리하여 혈청을 수집하였다. 이어서 시판하는 ELISA 키트 (Iso-인슐린 ELISA, 메르코디아, 스웨덴 웁살라 소재)를 이용하여 혈청 인슐린 또는 혈청 접합체 농도를 측정하였다.

[0485] 도 10은 정맥내 주사 이후 시간의 함수로서, RHI 또는 도 2에 I-6으로 나타낸 TSAT-C6-AETM-2 접합체의 혈청 농도를 나타낸다. 분명하게, I-6은 RHI보다 혈청으로부터 훨씬 더 빨리 제거되었다. 데이터를 하기 일반식을 이용하는 2구획 이중지수 모델을 이용하여 최적으로 적합시켰다: $C(t) = A_0EXP(-at) + B_0EXP(-bt)$, 여기서 t는 시간이고, C(t)는 시간의 함수로서 혈청내 농도이고, $A_0$는 제1 구획 농도 상수이고, a는 제1 구획 지수 시간 상수이고, $B_0$는 제2 구획 농도 상수이고, b는 제2 구획 지수 시간 상수이다. 각 구획과 관련하여 제거 반감기 (분 단위)는 $t1/2(a) = 0.693/a$ 및 $t1/2(b) = 0.693/b$이었다. 도 10에서, RHI의 경우 $t1/2(a) = 0.76$ 및 $t1/2(b) = 11.46$이었고, I-6의 경우 $t1/2(a) = 0.47$ 및 $t1/2(b) = 2.87$이었다. 즉, I-6의 t1/2(b)는 RHI의 t1/2(b)에 비해 약 4 배 더 짧았다.

[0486] 아래 표에서는 상기에서 기재한 것과 완전히 동일한 절차를 이용하여 시험한 다수의 접합체에 대한 t1/2 파라미터를 요약하였다 (구조는 도 2에 나타내었음):

| 제제 | t1/2 (a) | t1/2 (b) | RHI t1/2 (a)에 대한 비 | RHI t1/2 (b)에 대한 비 |
|---|---|---|---|---|
| RHI | 0.76 | 11.46 | 1.00 | 1.00 |
| **I-5:** TSAT-C6-GA-2 | 0.81 | 12.02 | 1.07 | 1.05 |
| **I-8:** DSS-AEM-1 | 0.90 | 9.61 | 1.18 | 0.84 |
| **I-7:** TSAT-C6-AEM-2 | 0.45 | 2.77 | 0.60 | 0.24 |
| **I-9:** TSPE-AEM-3 | 0.66 | 2.62 | 0.87 | 0.23 |
| **I-10:** DSS-AETM-1 | 0.82 | 4.48 | 1.08 | 0.39 |
| **I-6:** TSAT-C6-AETM-2 | 0.47 | 2.87 | 0.62 | 0.25 |
| **I-11:** TSPE-AETM-3 | 0.22 | 1.33 | 0.29 | 0.12 |

[0487]

[0488] 이러한 데이터는 예시적인 접합체가 비접합된 인슐린에 비해 혈청으로부터 보다 신속하게 제거되며, 그 정도는 내인성 렉틴에 대한 특정 접합체의 친화성 및 접합체 당 치환된 리간드의 수에 의해 지배된다는 가설과 일치하였다.

[0489] **실시예 17 - 글루코스 주입 하에서의 생체내 반감기/제거 속도**

[0490] 본 실시예에서는, 예시적인 접합체의 소실 속도가 생리학적 농도의 글루코스의 존재에 의해 억제될 수 있다는 추가의 가설을 세웠다. 고혈당 조건 하에 접합체가 생체내에서 혈청으로부터 소실되는 속도를 결정하기 위해, 다음과 같은 실험을 수행하였다. 각 사례에서, 이중으로 경정맥 삽관한 수컷 스프라그-돌리 래트 (타코닉, JV/JV, 350-400 g, n=3)에 I-7을 0.4 mg 접합체/체중 kg으로 투약하였다.

[0491] 실험을 시작하기 1 시간 전에, 하나의 래트 캐뉼라를 멸균 50% w/v 글루코스 용액을 함유하는 주사기 주입 펌프에 연결하였다. 펌프 주입 속도는 동물의 혈당 수준이 실험 동안 모든 시점에서 300 mg/dL을 초과하여 유지되도록 실험자가 조정하였다. 혈당은 시판하는 시험띠 (프리시젼 엑스트라, 애보트 래보러토리즈, 일리노이주 애보트 파크 소재)를 이용하여 측정하였다. 전형적인 실험법으로, 동물에서 300 mg/dL을 초과하여 유지시키는데 요구되는 주입 펌프 속도가 전형적으로 85 ㎕/분을 초과하는 것으로 확인되었다. 혈액 샘플을 t = 0 분에 채취하고, 그 후에 멸균 접합체 용액 또는 대조군 인슐린을 제2 래트 캐뉼라를 통해 정맥내 주사하고, 그 직후에 헤파린-염수의 추적 용액을 주사하여 모든 접합체 용량이 확실하게 동물에 투여되도록 하였다. 헤파린-염수로 캐뉼라 라인을 추가로 플러싱한 후에, 제2 캐뉼라를 사용하여 투약 후 t = 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90, 120, 및 180 분에 혈액 샘플을 수집하였다.

[0492] 각 시점으로부터의 혈액을 4℃에서 원심분리하여 혈청을 수집하고, 이어서 시판하는 ELISA 키트 (Iso-인슐린 ELISA, 메르코디아, 스웨덴 웁살라 소재)를 이용하여 혈청 인슐린 또는 혈청 접합체 농도를 측정하였다. 인슐린 또는 접합체 혈청 농도 대 시간 데이터를 2구획 모델에 따라 2개의 독립적인 소멸 지수의 합 ($C(t) = a \exp(-k_a t) + b \exp(-k_b t)$)으로 최적으로 적합시켰고, 여기서 $t1/2(a) = (\ln 2)/k_a$이고 $t1/2(b) = (\ln 2)/k_b$이다. 하기 표에서는 글루코스를 주입한 경우 및 주입하지 않은 경우의 I-7에 대한 t1/2 파라미터를 실시예 16으로부터 RHI에 대해 수득한 것과 함께 요약하였다:

[0493]

| 주입 | 제제 | t1/2 (a) | t1/2 (b) | RHI t1/2 (a)에 대한 비 | RHI t1/2 (b)에 대한 비 |
|---|---|---|---|---|---|
| 주입안함 | RHI | 0.76 | 11.46 | 1.00 | 1.00 |
| 염수 | TSAT-C6-AEM-2 (I-7) | 0.45 | 2.77 | 0.60 | 0.24 |
| 글루코스 (400 mg/dl) | TSAT-C6-AEM-2 (I-7) | 0.64 | 5.11 | 0.84 | 0.45 |

[0494] 본 발명자들은 이들 데이터로부터 글루코스가 접합체에 대한 가속화된 혈청 제거를 억제하여 상 b의 제거 반감기를 2.77 분으로부터 5.11 분으로 배가시킬 수 있다고 결론내릴 수 있었다.

[0495] **실시예 18 - a-MM 주입 하에서의 생체내 반감기/제거 속도**

[0496] 본 실시예에서는, 인슐린 접합체의 소실 속도가 임의의 고 농도의 글루코스 이외의 억제 사카라이드, 예컨대 α-메틸-만노스 (a-MM)의 존재에 의해 억제될 수 있다는 추가의 가설을 세웠다. a-MM의 존재하에 예시적인 접합체가 생체내에서 혈청으로부터 소실되는 속도를 결정하기 위해, 다음과 같은 실험을 수행하였다. 각 사례에서, 이중으로 경정맥 삽관한 수컷 스프라그-돌리 래트 (타코닉, JV/JV, 350-400 g, n=3)에 가용성 접합체를 0.4 mg 접합체/체중 kg으로 투약하였다.

[0497] 실험을 시작하기 1 시간 전에, 하나의 래트 캐뉼라를 멸균 25% w/v a-MM 용액을 함유하는 주사기 주입 펌프에 연결하였다. 펌프 주입 속도는 실험자가 조정하였지만, 전형적으로 85 ㎕/분으로 설정하였다. 혈액 샘플을 t = 0 분에 채취하고, 그 후에 멸균 접합체 용액 또는 대조군 인슐린을 제2 래트 캐뉼라를 통해 정맥내 주사하고, 그 직후에 헤파린-염수의 추적 용액을 주사하여 모든 접합체 용량이 확실하게 동물에 투여되도록 하였다. 헤파린-염수로 캐뉼라 라인을 추가로 플러싱한 후에, 제2 캐뉼라를 사용하여 투약 후 t = 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90, 120, 및 180 분에 혈액 샘플을 수집하였다.

[0498] 또한, 혈당은 시판하는 시험띠 (프리시젼 엑스트라, 애보트 래보러토리즈, 일리노이주 애보트 파크 소재)를 이용하여 측정하였다. 각 시점으로부터의 혈액을 4℃에서 원심분리하여 혈청을 수집하고, 이어서 시판하는 ELISA 키트 (Iso-인슐린 ELISA, 메르코디아, 스웨덴 웁살라 소재)를 이용하여 혈청 인슐린 또는 혈청 접합체 농도를 측정하였다. 인슐린 또는 접합체 혈청 농도 대 시간 데이터를 2구획 모델에 따라 2개의 독립적인 소멸 지수의 합 ($C(t) = a \exp(-k_a t) + b \exp(-k_b t)$)으로 최적으로 적합시켰고, 여기서 $t1/2(a) = (\ln 2)/k_a$이고 $t1/2(b) = (\ln 2)/k_b$이다. 하기 표에서는 a-MM을 주입한 경우 및 주입하지 않은 경우의 TSAT-C6-AEM-2 접합체에 대한 t1/2 파라미터를, 실시예 17로부터 글루코스를 주입하여 수득한 것 및 실시예 16으로부터 사카라이드의 주입없이 RHI에 대해 수득한 것과 함께 요약하였다:

| 주입 | 제제 | t1/2 (a) | t1/2 (b) | RHI t1/2 (a)에 대한 비 | RHI t1/2 (b)에 대한 비 |
|---|---|---|---|---|---|
| 주입안함 | RHI | 0.76 | 11.46 | 1.00 | 1.00 |
| 염수 | TSAT-C6-AEM-2 (**I-7**) | 0.45 | 2.77 | 0.60 | 0.24 |
| a-MM | TSAT-C6-AEM-2 (**I-7**) | 0.92 | 10.09 | 1.21 | 0.88 |
| 글루코스 (400 mg/dl) | TSAT-C6-AEM-2 (**I-7**) | 0.64 | 5.11 | 0.84 | 0.45 |

[0499]

[0500] 본 발명자들은 이들 데이터로부터 a-MM이 접합체에 대한 가속화된 혈청 제거를 억제할 뿐만 아니라, 글루코스보다 더 큰 정도로 억제한다고 결론내릴 수 있었다. 본 사례에서, 상 b 제거 반감기는 2.77 분으로부터 10.09 분으로 거의 4배가 되었다.

[0501] **실시예 19 - 프로타민, 아연, 및 기타 부형제를 이용한 장시간 작용 인슐린** 접합체

[0502] 장시간 작용 접합체를 생성하기 위해, 본 발명자들은 실시예 9의 방법에 기초하여 제조한 B29-치환된 접합체로부터 PZI (프로타민 아연 인슐린) 제제를 제조하였다. 이러한 제제에 사용된 부형제에는 프로타민, 아연, m-크레졸, 및 염 (모두 시그마-알드리치 (미주리주 세인트 루이스 소재) 사로부터 상업적으로 수득한 것)이 포함된다. 이들 성분의 농도는 최적으로 편평하고 지속적인 흡수 속도를 수득하기 위해 변경될 수 있다. 또한, 일부 사례에서는 소량의 비변형된 인슐린을 첨가하는 것이 제제를 안정화하는데 도움이 되는 것으로 밝혀졌다. 이들 사례에서, 샘플에 함유되는 비변형된 인슐린의 농도는 최적으로 고르고 지속적인 흡수 속도를 수득하기 위해 변경하였다. 시험한 모든 제제에서, 다음과 같은 레시피를 이용하였다:

| 성분 | 변수 | 부피 (ml) |
|---|---|---|
| 접합체 용액 2.7 mg/ml | 비변형된 인슐린 함량 % (M/M) | 1.000 |
| 250 mM HEPES 완충 염수 | NaCl 농도 (M) | 0.111 |
| 아연 아세테이트 용액 | 아연 농도 (mg/ml) | 0.124 |
| 수중 크레졸 용액 | v/v % | 0.159 |
| 25 mM HEPES 완충 염수 중의 pH 7.2 프로타민 용액 | 프로타민 농도 (mg/ml) | 4x0.194 분취량 |

[0503]

[0504] 달리 명시하지 않는 한, 상기 표에서 기재한 순서로 성분을 첨가한 후에 제제가 제조되면, 이를 생체내에서 시험하기 이전에 30 분 동안 부드럽게 혼합하였다.

[0505] 해당 제제에 대해 지속 방출 프로파일 뿐만 아니라 글루코스-반응성 PK 프로파일을 시험하기 위해, 다음과 같은 실험을 수행하였다. 제제를 공복상태인 정상 비-당뇨병 래트 (수컷 스프라그-돌리, 400-500 g, n = 3)의 목 뒷쪽에 예정된 용량 (달리 명시되지 않는 한 대부분의 사례에서 약 15 U/kg)으로 주사하였다. 240 분 지체한 후, 글루코스 용량 (4 g/kg)을 IP 주사하였다. 혈액 샘플은 0 분 및 처음 접합체를 주사한 후 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 및 300 분에 꼬리 정맥을 통해 출혈시켜 수집하였다. 혈당값은 시판하는 시험띠 (프리시젼 엑스트라, 애보트 래보러토리즈, 일리노이주 애보트 파크 소재)를 이용하여 측정하였다. 또한, 각 시점으로부터의 혈액을 4℃에서 원심분리하여 혈청을 수집하였다. 이어서 시판하는 ELISA 키트 (Iso-인슐린 ELISA, 메르코디아, 스웨덴 웁살라 소재)를 이용하여 혈청 인슐린 농도를 측정하였다. 제조사의 검정 상세설명에 따르면, Iso-인슐린 ELISA는 래트 인슐린과 71% 교차 반응성을 갖는다. 각각의 샘플에서 검출되는 내인성 래트 인슐린의 양을 최소화하되 래트 인슐린 검출 가능성이 완전히 배제될 수는 없도록 혈청 샘플을 10배 희석시켰다. 따라서, 결과는 일반적으로 실험별로 접합체 또는 RHI에 더하여 약간의 내인성 래트 인슐린으로 이루어질 수 있는 "측정된 인슐린"으로서 보고한다. 그럼에도 불구하고, 하기 각각의 실시예에서 수집된 모든 샘플은 동일하게 처리하였고, 성능상 차이를 직접 비교할 수 있었다.

[0506] **실시예 20 - 장시간 작용 인슐린 접합체 성능에 대한 프로타민 농도의 효과**

[0507] 본 실시예의 목적은 예시적인 접합체의 시간 작용 및 글루코스-반응성 PK 프로파일에 대한 프로타민 농도의 효과를 입증하기 위한 것이다. 본 실시예에서는, 실시예 9에 기재된 방법에 따라 합성한 I-6을 이용하여 일반화된 제제 및 실시예 19에 기재되어 있는 생체내 프로토콜로 시험하였다:

| 성분 | 변수 | 부피 (ml) |
|---|---|---|
| TSAT-C6-AETM-2 (I-6) 용액 2.7 mg/ml | 비변형된 인슐린 = 16.7% | 1.000 |
| 250 mM HEPES 완충 염수 | NaCl 농도 = 1.5 M | 0.111 |
| 아연 아세테이트 용액 | 아연 농도 (mg/ml) = 하기 참조 | 0.124 |
| 수중 크레졸 용액 | 3 % v/v | 0.159 |
| 25 mM HEPES 완충 염수 중의 pH 7.2 프로타민 용액 | 프로타민 농도 (mg/ml) = 하기 참조 | 4x0.194 분취량 |

| 제제 | 아연 농도 (mg/ml) | 프로타민 농도 (mg/ml) |
|---|---|---|
| 1xP-1xZ | 1.15 | 1.25 |
| 4xP-4xZ | 4.60 | 5.00 |
| 10xP-4xZ | 4.60 | 12.50 |

[0508]

[0509] 상기에서 기재한 3 가지의 제제를 각각 15 U/kg (체중 (그램)/1.87 = 주사 부피 (마이크로리터)) 투약하여 4 시간 IP 글루코스 주사 (4 g/kg) 실험을 수행하였다. 도 11a-c에서 관찰되는 결과는 제제 내의 프로타민 농도가 증가됨에 따라 생성된 제제가 더 지속적이고, 4 시간 글루코스 주사후에 혈청 인슐린 프로파일에서 측정되는 증가가 더 확연한 것으로 나타났다. 1xP-1xZ 제제는 주사 직후에 짧은 시간에 걸쳐 현저한 분량의 인슐린 접합체 페이로드를 방출하여, IP 글루코스 투여 이후에 매우 작은 신호가 검출되었다. 한편, 10xP-4xZ 제제는 처음 4 시간에 걸쳐 저혈당증없이 낮은 기저량의 인슐린을 방출하였고, 후속하여 IP 글루코스를 주사한 직후에 측정한 인슐린 농도는 4x를 초과하여 증가하였다.

[0510] **실시예 21 - 장시간 작용 인슐린 접합체 성능에 대한 아연 농도의 효과**

[0511] 본 실시예의 목적은 예시적인 접합체의 제제 안정성, 시간 작용 및 글루코스-반응성 PK 프로파일에 대한 아연 농도의 효과를 입증하기 위한 것이다. 본 실시예에서는, 실시예 9에 기재된 방법에 따라 합성한 I-6을 이용하여 일반화된 제제 및 실시예 19에 기재되어 있는 생체내 프로토콜로 시험하였다:

| 성분 | 변수 | 부피 (ml) |
|---|---|---|
| TSAT-C6-AETM-2 (I-6) 용액 2.7 mg/ml | 비변형된 인슐린 = 0% | 1.000 |
| 250 mM HEPES 완충 염수 | NaCl 농도 = 1.5 M | 0.111 |
| 아연 아세테이트 용액 | 아연 농도 (mg/ml) = 하기 참조 | 0.124 |
| 수중 크레졸 용액 | 3 % v/v | 0.159 |
| 25 mM HEPES 완충 염수 중의 pH 7.2 프로타민 용액 | 프로타민 농도 (mg/ml) = 하기 참조 | 4x0.194 분취량 |

| 제제 | 아연 농도 (mg/ml) | 프로타민 농도 (mg/ml) |
|---|---|---|
| 4xP-1xZ | 1.15 | 5.00 |
| 4xP-2xZ | 2.30 | 5.00 |
| 10xP-1xZ | 1.15 | 12.5 |
| 10xP-2xZ | 2.30 | 12.5 |

[0512]

[0513] 상기에서 기재한 4 가지의 제제를 각각 15 U/kg (체중 (그램)/1.87 = 주사 부피 (마이크로리터)) 투약하여 4 시간 IP 글루코스 주사 (4 g/kg) 실험을 수행하였다. 도 12a-b 및 13a-b에서 관찰되는 결과는 실험 오차 내에서, 아연의 농도가 제제의 전체적인 지속 방출 성질 또는 글루코스-반응성 프로파일에 현저한 영향을 갖지 않는 것으로 나타났다. 모든 사례에서, 측정된 인슐린 농도에서 통계적으로 현저한 증가는 IP 글루코스를 주사한 이후에 관찰되었다. 실시예 20에서 증명된 바와 같이, 프로타민이 보다 높은 (10xP) 제제는 아연 농도와 관계없이 프로타민이 보다 낮은 (4xP) 제제 보다 시간에 걸쳐 접합체를 덜 방출하였다. 그러나, 24 시간을 초과하여 제제를 실온에 방치한 경우, 10xP 제제는 둘 모두 쉽게 분산되는 미립자 용액에서 끈끈하고 덩어리진 2상 용액으로 변형되었다. 이는 상응하는 10xP-4xZ 제제에서는 일어나지 않았다. 유사하게, 4xP-1xZ 제제는 10xP-1xZ 제

제와 같은 방식으로 변형되는 것으로 확인된 반면, 4xP-2xZ는 수주 동안 실온에서 비교적 안정하였다. 따라서, 주어진 프로타민 농도에 대한 아연 농도는 장기간에 걸쳐 안정한, 쉽게 분산되는 제제를 제조하기 위해 조정할 수 있다.

[0514] **실시예 22 - 장시간 작용 인슐린 접합체 성능에 대한 m-크레졸 농도의 효과**

[0515] 본 실시예의 목적은 예시적인 접합체의 시간 작용 및 글루코스-반응성 PK 프로파일에 대한 m-크레졸 농도의 효과를 입증하기 위한 것이다. 본 실시예에서는, 실시예 9에 기재된 방법에 따라 합성한 I-6을 이용하여 일반화된 제제 및 실시예 19에 기재되어 있는 생체내 프로토콜로 시험하였다:

| 성분 | 변수 | 부피 (ml) |
|---|---|---|
| TSAT-C6-AETM-2 (I-6) 용액 2.7 mg/ml | 비변형된 인슐린 = 0% | 1.000 |
| 250 mM HEPES 완충 염수 | NaCl 농도 = 1.5 M | 0.111 |
| 아연 아세테이트 용액 | 아연 농도 = 4.6 mg/ml | 0.124 |
| 수중 크레졸 용액 | v/v % = 하기 참조 | 0.159 |
| 25 mM HEPES 완충 염수 중의 pH 7.2 프로타민 용액 | 프로타민 농도 = 12.5 mg/ml | 4x0.194 분취량 |

| 제제 | 크레졸 농도 |
|---|---|
| 크레졸 무함유 | 0 |
| 4x 크레졸 | 12% v/v |

[0516]

[0517] 상기에서 기재한 2 가지의 제제를 15 U/kg (체중 (그램)/1.87 = 주사 부피 (마이크로리터)) 투약하여 4 시간 IP 글루코스 주사 (4 g/kg) 실험을 수행하였다. 도 14a-b에서 관찰되는 결과는 m-크레졸의 존재가 제제를 보다 지속적으로 유지시키는 것으로 나타났다. 크레졸 무함유 제제는 주사 직후에 짧은 시간에 걸쳐 현저한 분량의 인슐린 접합체 페이로드를 방출하여, IP 글루코스를 투여한 경우 측정한 인슐린 농도에서 매우 작은 증가가 관찰되었다. 한편, 4x 크레졸 제제는 처음 4 시간에 걸쳐 저혈당증없이 낮은 기저량의 인슐린을 방출하였고, 후속하여 IP 글루코스를 주사한 직후에 측정한 인슐린 농도는 3-4x 증가하였다.

[0518] **실시예 23 - 장시간 작용 인슐린 접합체 성능에 대한 염/등장화제 농도의 효과**

[0519] 본 실시예의 목적은 예시적인 접합체의 시간 작용 및 글루코스-반응성 PK 프로파일에 대한 염 농도 및 등장화제 선택의 효과를 입증하기 위한 것이다. 본 실시예에서는, 실시예 9에 기재된 방법에 따라 합성한 I-6을 이용하여 일반화된 제제 및 실시예 19에 기재되어 있는 생체내 프로토콜로 시험하였다:

| 성분 | 변수 | 부피 (ml) |
|---|---|---|
| TSAT-C6-AETM-2 (I-6) 용액 2.7 mg/ml | 비변형된 인슐린 = 16.7% | 1.000 |
| 250 mM HEPES 완충 염수 | NaCl 또는 글리세롤 농도 (M) = 하기 참조 | 0.111 |
| 아연 아세테이트 용액 | 아연 농도 = 4.6 mg/ml | 0.124 |
| 수중 크레졸 용액 | 3% v/v | 0.159 |
| 25 mM HEPES 완충 염수 중의 pH 7.2 프로타민 용액 | 프로타민 농도 = 12.5 mg/ml | 4x0.194 분취량 |

| 제제 | NaCl 농도 |
|---|---|
| 염 무함유 | 0.0 M |
| 3.3x 염 | 5.0 M |
| 글리세롤 | 완충 염수 대신 순수한 글리세롤 용액 |

[0520]

[0521] 상기에서 기재한 3 가지의 제제를 각각 15 U/kg (체중 (그램)/1.87 = 주사 부피 (마이크로리터)) 투약하여 4 시간 IP 글루코스 주사 (4 g/kg) 실험을 수행하였다. 도 15a-c에서 관찰되는 결과는 제제내의 염의 존재가 제제를 보다 지속적으로 유지시키는 것으로 나타났다. 염 무함유 제제는 실험의 초기 4 시간에 걸쳐 현저한 분량의 인슐린 접합체 페이로드를 방출하여, IP 글루코스를 투여한 경우 측정한 인슐린 농도에서 매우 작은 증가가 관찰되었다. 한편, 3.3x 염 제제는 처음 4 시간에 걸쳐 저혈당증없이 낮은 기저량의 접합체를 방출하였고, 후속

하여 IP 글루코스를 주사한 직후에 측정한 인슐린 농도는 약 4x 증가하였다. 이러한 성능은 3.3x 염 제제와 정확하게 동일하지만 대략 1/3 염 농도 (5.0 M와 비교하여 1.5 M)를 함유하는 실시예 20의 10xP-4xZ 제제로 수득한 것과 유사하였다. 마지막으로, 등장화제로서 NaCl을 글리세롤로 치환한 것은 제제의 지속성에 악영향을 미치는 것으로 보이지 않았다.

[0522] **실시예 24 - 장시간 작용 인슐린 접합체 성능에 대한 비변형된 인슐린 농도**의 효과

[0523] 본 실시예의 목적은 예시적인 접합체의 시간 작용 및 글루코스-반응성 PK 프로파일에 대한 상이한 농도의 비변형된 인슐린을 포함하는 효과를 입증하기 위한 것이다. 본 실시예에서는, 실시예 9에 기재된 방법에 따라 합성한 I-6을 이용하여 일반화된 제제 및 실시예 19에 기재되어 있는 생체내 프로토콜로 시험하였다:

| 성분 | 변수 | 부피 (ml) |
|---|---|---|
| TSAT-C6-AETM-2 (I-6) 용액 2.7 mg/ml | 비변형된 인슐린 % = 하기 참조 | 1.000 |
| 250 mM HEPES 완충 염수 | NaCl 농도 = 1.5 M | 0.111 |
| 아연 아세테이트 용액 | 아연 농도 = 4.6 mg/ml | 0.124 |
| 수중 크레졸 용액 | 3% v/v | 0.159 |
| 25 mM HEPES 완충 염수 중의 pH 7.2 프로타민 용액 | 프로타민 농도 = 12.5 mg/ml | 4x0.194 분취량 |

| 제제 | 비변형된 인슐린 % |
|---|---|
| 1/24 | 4.17 |
| 1/12 | 8.33 |
| 1/6 | 16.7 |

[0524]

[0525] 상기에서 기재한 3 가지의 제제를 각각 15 U/kg (체중 (그램)/1.87 = 주사 부피 (마이크로리터)) 투약하여 4 시간 IP 글루코스 주사 (4 g/kg) 실험을 수행하였다. 도 16a-c에서 관찰되는 결과는 제제내에 비변형된 인슐린이 존재하는 것이 IP 글루코스를 주사한 이후에 측정한 인슐린 농도가 실질적으로 증가되는, 보다 지속적인 제제를 유익하게 생성시키는 것으로 나타났다. 또한, 비변형된 인슐린의 존재는 수주간의 실온 인큐베이션 이후에도 제제의 성능을 보존시키는데 도움이 된다 (하기 실시예 26 참조).

[0526] **실시예 25 - 장시간 작용 인슐린 접합체 - 용량 반응 효과**

[0527] 본 실시예에서, 본 발명자들은 장시간 작용 예시적 접합체의 특정 제제의 용량 반응 효과를 평가하였다. 실시예 9에 기재된 방법에 따라 합성한 접합체 I-6을 이용하여 일반화된 제제 및 실시예 19에 기재되어 있는 생체내 프로토콜로 시험하였다:

| 성분 | 변수 | 부피 (ml) |
|---|---|---|
| TSAT-C6-AETM-2 (I-6) 용액 2.7 mg/ml | 비변형된 인슐린 = 16.7% | 1.000 |
| 250 mM HEPES 완충 염수 | NaCl 농도 = 1.5 M | 0.111 |
| 아연 아세테이트 용액 | 아연 농도 = 4.6 mg/ml | 0.124 |
| 수중 크레졸 용액 | 3% v/v | 0.159 |
| 25 mM HEPES 완충 염수 중의 pH 7.2 프로타민 용액 | 프로타민 농도 = 12.5 mg/ml | 4x0.194 분취량 |

[0528]

[0529] 상기에서 기재한 제제를 5 또는 15 U/kg (체중 (그램)/1.87 = 주사 부피 (마이크로리터)) 투약하여 4 시간 IP 글루코스 주사 (4 g/kg) 실험을 수행하였다.

[0530] 도 17에서 관찰되는 바와 같이, 접합체는 글루코스를 주사할 때까지 편평한 PK 프로파일을 나타내었다. IP 글루코스를 투여한 후에 측정한 인슐린 농도의 증가는 극적이었고 용량 의존적이었다 (접합체 5 U/kg (좌측) 및 15 U/kg (우측) 용량으로 수득한 데이터 비교).

[0531] **실시예 26 - 예시적인 장시간 작용, 글루코스-반응성 접합체의 안정성**

[0532] 본 실시예에서, 본 발명자들은 실시예 25로부터의 장시간 작용 제제와 정확하게 동일한 제제를 2x 규모로 합성하였다. 물질의 반은 2-8℃에서 보관하고, 나머지 반은 실온에서 1 주 또는 2 주 동안 보관하였다. 규정된 보

관 기간이 지난 후, 물질을 재분산시키고, 실시예 25에 기재된 것과 동일한 4 시간 IP 글루코스 주사 프로토콜을 이용하여 15 U/kg 용량 (체중 (그램)/1.87 = 주사 부피 (마이크로리터))으로 시험하였다. 도 18-19에서 관찰되는 바와 같이, 이러한 제제는 적어도 2 주 동안 냉장 (도 18) 또는 실온 (도 19)에서 보관한 이후에도 유사한 성능을 나타내었다.

[0533] **실시예 27 - 다양한 리간드 친화성 및 다원자가를 갖는 접합체로부터 제조된** 장시간 작용 접합체의 성능

[0534] 본 실시예에서, 본 발명자들은 상이한 리간드 유형 및 수로 구축된 접합체의 장시간 작용 제제의 시간 작용 및 글루코스-반응성 PK 프로파일을 결정하는 것에 착수하였다. 본 실시예를 위한 모든 접합체는 이하에서 상술하는 프레임워크 및 사카라이드 리간드를 사용하여 실시예 9에 기재한 방법에 따라 합성하였다:

[0535]

| 접합체 | 프레임워크 | 프레임워크 MW | 리간드 | AE-당 MW | 순도 (HPLC) | MW (LC-MS) | 당/인슐린 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **I-8: DSS-AEM-1 (B29)** | DSS | 368 | AEM | 223 | >95% | 6168 | 1.0 |
| **I-7: TSAT-C6-AEM-2 (B29)** | TSAT-C6 | 822 | AEM | 223 | 95% | 6729 | 2.0 |
| **I-9: TSPE-AEM-3 (B29)** | TSPE | 813 | AEM | 223 | >95% | 6829 | 3.0 |
| **I-10: DSS-AETM-1 (B29)** | DSS | 368 | AETM | 547 | >95% | 6491 | 1.0 |
| **I-11: TSPE-AETM-3 (B29)** | TSPE | 813 | AETM | 547 | >95% | 7800 | 3.0 |
| **I-17: C6-아미드-AEM-2 (B29)** | C6-아미드 | 838 | AEM | 223 | 95% | 6745 | 2.0 |

[0536] 각각의 접합체에 대해 다음과 같은 장시간 작용 제제를 사용하였다:

[0537]

| 성분 | 변수 | 부피 (ml) |
|---|---|---|
| 접합체 용액 2.7 mg/ml | 비변형된 인슐린 = 16.7% | 1.000 |
| 250 mM HEPES 완충 염수 | NaCl 농도 = 1.5 M | 0.111 |
| 아연 아세테이트 용액 | 아연 농도 = 4.6 mg/ml | 0.124 |
| 수중 크레졸 용액 | 3% v/v | 0.159 |
| 25 mM HEPES 완충 염수 중의 pH 7.2 프로타민 용액 | 프로타민 농도 = 12.5 mg/ml | 4x0.194 분취량 |

[0538] 상기에서 기재한 접합체를 각각 15 U/kg (체중 (그램)/1.87 = 주사 부피 (마이크로리터)) 투약하여 4 시간 IP 글루코스 주사 (4 g/kg) 실험을 수행하였다. 도 20에서 관찰되는 바와 같이, 모든 접합체는 지속적인 흡수 프로파일을 나타내었고, 4 시간 글루코스 주사 이후에 측정한 혈청 인슐린 농도에서 일부 성분이 증가한 것으로 나타났다. 장시간 작용 TSPE-AETM-3 접합체 I-11을 주사하고 처음 4 시간 이내에 일부 현저한 접합체 흡수가 존재하는 것으로 보인다. 그러나, 다른 모든 접합체는 TSAT-C6-AETM-2 접합체에서 관찰된 것과 유사한 편평한 흡수 프로파일을 나타내었다. 이러한 결과는 이들 접합체의 반감기가 실시예 16-17에 기재되어 있는 바와 같이 비변형된 인슐린에 비해 모두 낮고, 이들 각각이 실시예 14-15에 기재되어 있는 바와 같이 PK/PD 프로파일에서 a-MM-유도된 증가를 보인다는 사실과 상당한 관련이 있다.

[0539] **실시예 28 - IP a-MM 시험 조건하에서의 장시간 작용 접합체의 성능**

[0540] 본 실시예에서, 본 발명자들은 TSAT-C6-AETM-2 (I-6) 및 TSAT-C6-GA-2 (I-5) 접합체로부터 구축된 접합체의 장시간 작용 제제의 a-MM-반응성 프로파일을 시험하였다. 접합체는 둘 모두 실시예 9에서 기재한 일반적인 방법에 따라 제조하였다. 또한, 각각의 접합체에 대해 다음과 같은 장시간 작용 제제를 사용하였다:

| 성분 | 변수 | 부피 (ml) |
|---|---|---|
| 접합체 용액 2.7 mg/ml | 비변형된 인슐린 = 16.7% | 1.000 |
| 250 mM HEPES 완충 염수 | NaCl 농도 = 1.5 M | 0.111 |
| 아연 아세테이트 용액 | 아연 농도 = 4.6 mg/ml | 0.124 |
| 수중 크레졸 용액 | 3% v/v | 0.159 |
| 25 mM HEPES 완충 염수 중의 pH 7.2 프로타민 용액 | 프로타민 농도 = 12.5 mg/ml | 4x0.194 분취량 |

[0541]

[0542] 제제의 지속 방출 성질 뿐만 아니라 a-MM-반응성 PK 프로파일을 시험하기 위해, 다음과 같은 실험을 수행하였다. 제제를 공복상태인 정상 비-당뇨병 래트 (수컷 스프라그-돌리, 400-500 g, n = 3)의 목 뒷쪽에 15 U/kg (체중 (그램)/1.87 = 주사 부피 (마이크로리터))으로 주사하였다. 240 분 지체한 후, a-MM 용량 (4 g/kg)을 IP 주사하였다. 혈액 샘플은 0 분 및 처음 접합체를 주사한 후 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 및 300 분에 꼬리 정맥을 통해 출혈시켜 수집하였다. 혈당값은 시판하는 시험띠 (프리시젼 엑스트라, 애보트 래보러토리즈, 일리노이주 애보트 파크 소재)를 이용하여 측정하였다. 또한, 각 시점으로부터의 혈액을 4 ℃에서 원심분리하여 혈청을 수집하였다. 이어서 시판하는 ELISA 키트 (Iso-인슐린 ELISA, 메르코디아, 스웨덴 웁살라 소재)를 이용하여 혈청 인슐린 농도를 측정하였다.

[0543] 도 21a에서 관찰되는 바와 같이, 장시간 작용 TSAT-C6-AETM-2 (I-6) 제제의 경우 IP a-MM 주사 이후 피크:기준선 혈청 농도 비율은 a-MM을 글루코스로 치환한 동일한 제제에서 관찰되는 것보다 훨씬 높았다. 또한, TSAT-C6-GA-2 (I-5) 제제 (도 21b)는 a-MM 투여 이후에 혈청 접합체 농도에 있어서 어떤 증가도 나타내지 않았다. 이러한 결과는 TSAT-C6-GA-2 (I-5) 접합체의 제거 반감기가 비변형된 인슐린과 거의 동일하며 (실시예 16), PK에서 어떤 a-MM-유도된 변화도 나타내지 않는다는 사실 (실시예 14)과 상당한 관련이 있다.

[0544] **실시예 29 - 당뇨병 및 비당뇨병에서의 장시간 작용 접합체**

[0545] 장시간 작용 TSAT-C6-AETM-2 (I-6) 제제의 생체내 유용성을 확인하기 위해, 본 발명자들은 이를 (5, 10 및 20 U/kg) 정상 및 STZ-유도된 당뇨병 래트 (수컷 스프라그-돌리, 400-500 g, n = 6)에 투여하였다. 제제는 다음과 같은 절차를 이용하여 제조하였다:

| 성분 | 변수 | 부피 (ml) |
|---|---|---|
| TSAT-C6-AETM-2 (I-6) 용액 2.7 mg/ml | 비변형된 인슐린 = 0% | 1.000 |
| 250 mM HEPES 완충 염수 | NaCl 농도 = 1.5 M | 0.111 |
| 아연 아세테이트 용액 | 아연 농도 = 4.6 mg/ml | 0.124 |
| 수중 크레졸 용액 | 3% v/v | 0.159 |
| 25 mM HEPES 완충 염수 중의 pH 7.2 프로타민 용액 | 프로타민 농도 = 12.5 mg/ml | 4x0.194 분취량 |

[0546]

[0547] 접합체의 생물활성을 촉발하는데 어떤 외부적 IP 글루코스 주사는 이용하지 않았다. 그 대신 본 발명자들은 래트 내의 내인성 글루코스 수준에 의존하여 접합체 제제의 PK 및 PD 프로파일을 제어하였다. 혈액 샘플은 처음 접합체를 주사한 후의 다양한 시점에 꼬리 정맥으로부터 출혈시켜 수집하였다. 혈당값은 시판하는 시험띠 (프리시젼 엑스트라, 애보트 래보러토리즈, 일리노이주 애보트 파크 소재)를 이용하여 측정하였다. 도 22에서 관찰되는 바와 같이, 정상 또는 당뇨병 래트에서 초기 또는 후기 시점에 저혈당증은 관찰되지 않았다. 당뇨병 래트에서 관찰된 글루코스 프로파일은 극적이었고, 접합체가 보다 높은 글루코스 농도에 의해 활성화되며, 장기간에 걸쳐 (최고 용량에서 8 시간에 걸쳐) 용량 비례적인 방식으로 글루코스 저하 효과를 발휘하는 것으로 나타났다.

[0548] 상이한 용량 (7, 14 및 28 U/kg)을 이용하고 보다 긴 시간 (24 시간) 동안 실험을 반복하였다. 이러한 실험으로부터의 결과를 도 23에 나타낸다.

[0549] **실시예 30 - 생체내 반감기/제거 속도 비교**

[0550] I-6 접합체가 글루코스 또는 a-MM과 같은 억제성 당의 존재 또는 부재하에서 생체내에서 혈청으로부터 소실되는 속도를 결정하기 위해, 다음과 같은 실험을 수행하였다. 각각의 사례에서, 가용성 접합체 (또는 대조군으로서

RHI)를 이중으로 경정맥 삽관한 수컷 스프라그-돌리 래트 (타코닉, JV/JV, 350-400 g, n=3)에 0.4 mg 접합체/체중 kg으로 투약하였다.

[0551] 상승된 글루코스 수준의 존재하에서의 제거 속도를 결정하기 위해, 실험을 시작하기 1 시간 전에 하나의 래트 캐뉼라를 멸균 50% w/v 글루코스 용액을 함유하는 주사기 주입 펌프에 연결하였다. 펌프 주입 속도는 동물의 혈당 수준이 실험 동안 모든 시점에서 300 mg/dL을 초과하여 유지되도록 실험자가 조정하였다. 혈당은 시판하는 시험띠 (프리시젼 엑스트라, 애보트 래보러토리즈, 일리노이주 애보트 파크 소재)를 이용하여 측정하였다. 전형적인 실험법으로, 동물에서 300 mg/dL을 초과하여 유지시키는데 요구되는 주입 펌프 속도가 전형적으로 85 ㎕/분을 초과하는 것으로 확인되었다. 혈액 샘플을 t = 0 분에 채취하고, 그 후에 멸균 접합체 용액 또는 대조군 인슐린을 제2 래트 캐뉼라를 통해 정맥내 주사하고, 그 직후에 헤파린-염수의 추적 용액을 주사하여 모든 접합체 용량이 확실하게 동물에 투여되도록 하였다. 헤파린-염수로 캐뉼라 라인을 추가로 플러싱한 후에, 제2 캐뉼라를 사용하여 투약 후 t = 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90, 120, 및 180 분에 혈액 샘플을 수집하였다.

[0552] a-MM의 존재하에서의 제거 속도를 결정하기 위해, 실험을 시작하기 1 시간 전에 하나의 래트 캐뉼라를 멸균 25 % w/v a-MM 용액을 함유하는 주사기 주입 펌프에 연결하였다. 펌프 주입 속도는 실험자가 조정하였지만, 전형적으로 85 ㎕/분으로 설정하였다. 혈액 샘플을 t = 0 분에 채취하고, 그 후에 멸균 접합체 용액 또는 대조군 인슐린을 제2 래트 캐뉼라를 통해 정맥내 주사하고, 그 직후에 헤파린-염수의 추적 용액을 주사하여 모든 접합체 용량이 확실하게 동물에 투여되도록 하였다. 헤파린-염수로 캐뉼라 라인을 추가로 플러싱한 후에, 제2 캐뉼라를 사용하여 투약 후 t = 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90, 120, 및 180 분에 혈액 샘플을 수집하였다.

[0553] 실험 전반에 걸쳐, 시판하는 시험띠 (프리시젼 엑스트라, 애보트 래보러토리즈, 일리노이주 애보트 파크 소재)를 이용하여 혈당을 측정하였다. 각 시점으로부터의 혈액을 4℃에서 원심분리하여 혈청을 수집하고, 이어서 시판하는 ELISA 키트 (Iso-인슐린 ELISA, 메르코디아, 스웨덴 웁살라 소재)를 이용하여 혈청 인슐린 또는 혈청 접합체 농도를 측정하였다. 인슐린 또는 접합체 혈청 농도 대 시간 데이터를 2구획 모델에 따라 2개의 독립적인 소멸 지수의 합 ($C(t) = a \exp(-k_a t) + b \exp(-k_b t)$)으로 최적으로 적합시켰고, 여기서 $t1/2(a) = (\ln 2)/k_a$이고 $t1/2(b) = (\ln 2)/k_b$이다. 결과를 도 24에 나타내었다. 좌측 패널은 a-MM 또는 글루코스의 부재하에서 I-6 접합체 대 RHI의 제거 속도가 현저하게 높음 (> 5x)을 보여준다. 우측 패널은 글루코스의 존재하에서 (G400 주입) 제거 속도가 다소 감소하며 (약 50%), a-MM의 존재하에서 (a-MM 주입) 매우 실질적으로 감소함 (약 400 %)을 보여준다.

[0554] **실시예 31 - I-6 i.v. 주입의 경우 글루코스-반응성 PK**

[0555] 본 실시예에서는, 실시예 30에서 기재한 i.v. 제거 속도 실험을 0.4 mg 접합체/체중 kg의 단일 i.v. 볼루스에서 연속 i.v. 주입으로 변형하였다. 본 실험의 목표는 6 시간 동안 접합체 (또는 대조군으로서 RHI)의 주입 속도를 일정하게 유지시켜 (글루코스의 i.p. 주사는 4 시간 시점에 투여함) 혈청 접합체 (또는 RHI) 농도에 대한 효과를 결정하는 것이었다. 각 실험에서 이중으로 경정맥 삽관한 수컷 스프라그-돌리 래트 (타코닉, JV/JV, 350-400 g, n=3)를 사용하여, 하나의 경정맥 라인은 접합체 또는 RHI 주입 용으로, 다른 것은 혈액 수집용으로 사용하였다.

[0556] RHI의 경우, 0.2 ㎛ 여과 막을 통해 50 mU/ml 용액을 멸균 여과하고, 0.07 ml/분으로 주입하여 전체 6 시간의 실험 동안 3.5 mU/분의 일정한 주입 속도를 제공하였다. 혈액 샘플을 t = 0 분에 채취하고, 그 후에 일정한 i.v. 주입을 개시하였다. 제2 캐뉼라를 사용하여 t = 30, 60, 120, 180 및 240 분에 혈액 샘플을 수집하였다. t = 240 분에, i.p. 주사를 통해 4 g/kg 용량의 글루코스를 투여한 후, t = 255, 270, 300, 330 및 360 분에 혈액을 수집하였다.

[0557] I-6 접합체의 경우, 0.2 ㎛ 여과 막을 통해 150 mU/ml 용액을 멸균 여과하고, 0.10 ml/분으로 주입하여 전체 6 시간 실험 동안 15 mU/분의 일정한 주입 속도를 제공하였다. 혈액 샘플을 t = 0 분에 채취하고, 그 후에 일정한 i.v. 주입을 개시하였다. 제2 캐뉼라를 사용하여 t = 30, 60, 120, 180 및 240 분에 혈액 샘플을 수집하였다. t = 240 분에, i.p. 주사를 통해 1, 2, 또는 4 g/kg 용량의 글루코스를 투여한 후, t = 255, 270, 300, 330 및 360 분에 혈액을 수집하였다.

[0558] 실험 전반에 걸쳐, 시판하는 시험띠 (프리시젼 엑스트라, 애보트 래보러토리즈, 일리노이주 애보트 파크 소재)를 이용하여 혈당을 측정하였다. 각 시점으로부터의 혈액을 4℃에서 원심분리하여 혈청을 수집하고, 이어서 시판하는 ELISA 키트 (Iso-인슐린 ELISA, 메르코디아, 스웨덴 웁살라 소재)를 이용하여 혈청 인슐린 또는 혈청 접합체 농도를 측정하였다.

[0559] 도 25의 첫번째 2개의 패널은 4 g/kg i.p. 글루코스 주사 전후에 RHI를 3.5 mU/분 주입한 경우 및 I-6을 15 mU/분 주입한 경우의 혈당 및 혈청 인슐린/접합체 농도 프로파일을 비교한 것이다. RHI 주입은 I-6 주입과 비교하여 글루코스 주사 이전에 상당한 저혈당증을 야기하였다. i.p. 글루코스 주사 이후에, I-6의 측정된 혈청 인슐린 농도는 혈당 농도가 증가함에 따라 즉시 300%를 초과하여 증가되었고, 이후 글루코스 농도가 감소됨에 따라 신속하게 기준선 수준으로 되돌아갔다. 한편, 동일한 실험 조건하에서 RHI의 경우에는, i.p. 글루코스 주사 이후에 측정된 혈청 인슐린 농도에서 어떤 현저한 변화도 없었다. 도 25의 다음 3개의 패널은 i.p. 글루코스 주사 동안 측정된 인슐린 농도의 증가 정도가 투여한 글루코스 용량 및 결과적인 혈당 수준과 직접적인 관련이 있음을 보여준다. 예를 들어, 혈청 인슐린 농도에서 기준선 변화 대비 단지 50% 피크가 1 g/kg 글루코스를 주사한 경우에 관찰된 반면, 기준선 변화 대비 300% 피크가 4 g/kg 용량의 경우에 관찰되었다.

[0560] **실시예 32 - 당 존재 및 부존재하에서의 인슐린 접합체의 생체내 제거 속도**

[0561] I-9 접합체가 글루코스 또는 a-MM과 같은 억제성 당의 존재 또는 부재하에서 생체내에서 혈청으로부터 소실되는 속도를 결정하기 위해, 다음과 같은 실험을 수행하였다. 각각의 사례에서, 가용성 접합체 (또는 대조군으로서 RHI)를 이중으로 경정맥 삽관한 수컷 스프라그-돌리 래트 (타코닉, JV/JV, 350-400 g, n=3)에 0.4 mg 접합체/체중 kg으로 투약하였다.

[0562] 상승된 글루코스 수준의 존재하에서의 제거 속도를 결정하기 위해, 실험을 시작하기 1 시간 전에 하나의 래트 캐뉼라를 멸균 50% w/v 글루코스 용액을 함유하는 주사기 주입 펌프에 연결하였다. 펌프 주입 속도는 동물의 혈당 수준이 실험 동안 모든 시점에서 300 mg/dL을 초과하여 유지되도록 실험자가 조정하였다. 혈당은 시판하는 시험띠 (프리시젼 엑스트라, 애보트 래보러토리즈, 일리노이주 애보트 파크 소재)를 이용하여 측정하였다. 전형적인 실험법으로, 동물에서 300 mg/dL을 초과하여 유지시키는데 요구되는 주입 펌프 속도가 전형적으로 85 ㎕/분을 초과하는 것으로 확인되었다. 혈액 샘플을 t = 0 분에 채취하고, 그 후에 멸균 접합체 용액 또는 대조군 인슐린을 제2 래트 캐뉼라를 통해 정맥내 주사하고, 그 직후에 헤파린-염수의 추적 용액을 주사하여 모든 접합체 용량이 확실하게 동물에 투여되도록 하였다. 헤파린-염수로 캐뉼라 라인을 추가로 플러싱한 후에, 제2 캐뉼라를 사용하여 투약 후 t = 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90, 120, 및 180 분에 혈액 샘플을 수집하였다.

[0563] a-MM의 존재하에서의 제거 속도를 결정하기 위해, 실험을 시작하기 1 시간 전에 하나의 래트 캐뉼라를 멸균 25 % w/v a-MM 용액을 함유하는 주사기 주입 펌프에 연결하였다. 펌프 주입 속도는 실험자가 조정하였지만, 전형적으로 85 ㎕/분으로 설정하였다. 혈액 샘플을 t = 0 분에 채취하고, 그 후에 멸균 접합체 용액 또는 대조군 인슐린을 제2 래트 캐뉼라를 통해 정맥내 주사하고, 그 직후에 헤파린-염수의 추적 용액을 주사하여 모든 접합체 용량이 확실하게 동물에 투여되도록 하였다. 헤파린-염수로 캐뉼라 라인을 추가로 플러싱한 후에, 제2 캐뉼라를 사용하여 투약 후 t = 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90, 120, 및 180 분에 혈액 샘플을 수집하였다.

[0564] 실험 전반에 걸쳐, 시판하는 시험띠 (프리시젼 엑스트라, 애보트 래보러토리즈, 일리노이주 애보트 파크 소재)를 이용하여 혈당을 측정하였다. 각 시점으로부터의 혈액을 4℃에서 원심분리하여 혈청을 수집하고, 이어서 시판하는 ELISA 키트 (Iso-인슐린 ELISA, 메르코디아, 스웨덴 웁살라 소재)를 이용하여 혈청 인슐린 또는 혈청 접합체 농도를 측정하였다. 인슐린 또는 접합체 혈청 농도 대 시간 데이터를 2구획 모델에 따라 2개의 독립적인 소멸 지수의 합 ($C(t) = a \exp(-k_a t) + b \exp(-k_b t)$)으로 최적으로 적합시켰고, 여기서 $t1/2(a) = (\ln 2)/k_a$이고 $t1/2(b) = (\ln 2)/k_b$이다. 도 26의 첫번째 패널은 비변형된 인슐린의 제거 속도가 당 (글루코스 G400 또는 a-MM)의 존재에 영향을 받지 않음을 보여준다. 비교를 위해, 접합체 I-6을 당과 함께 주입한 것을 나타내는 도 26의 마지막 패널을 실시예 31의 결과로부터 재플롯팅하였다. 접합체 I-9를 당과 함께 주입한 것을 나타내는 도 26의 가운데 패널은 글루코스 (G400 주입)의 존재하에서 제거 속도가 I-6 접합체에 비해 훨씬 더 확연하게 감소됨을 보여준다 (약 350% 대 약 50%). 접합체 I-9는 또한 a-MM (a-MM 주입)의 존재하에서 제거 속도가 I-6 접합체에 비해 보다 현저하게 감소됨을 보여준다 (약 700% 대 약 400%).

[0565] **실시예 33 - 수성 완충제 내에서 접합체 용액의 결정화**

[0566] 실시예 25-27에 따라 합성한 장시간 작용 접합체의 분산액은 광 및 전자 주사 현미경에 의해 무정형 (비결정질)인 것으로 확인되었다. 한편 유사한 조건하에서 제제화된 종래의 비접합된 인슐린 분산액은 통상적으로 결정질이다. 인슐린 접합체의 결정질 제제는 배치간 재현성을 개선시키고, 제제 안정성을 증가시키고, 장기간 보관하는 동안 입자 응집을 감소시키는데 유익할 수 있다. 따라서, 본 발명자들은 우리의 접합체를 결정화할 수 있는 적절한 세트의 수성 조건이 존재하는지 여부를 결정하는 것에 착수하였다.

[0567] 한 세트의 48 개의 결정화 스크리닝 용액 (HR2-144)을 특별히 설계된 현적 증기 확산 플레이트(Hanging Drop

Vapor Diffusion plate)와 함께 햄톤 리서치, 인크.(Hampton Research, Inc.) (캘리포니아주 알타 비스타 소재) 사에서 구입하였다. 간략하게, 얇은 비드의 커버 슬라이드 밀봉제를 각각의 2 개의 플레이트 상의 24 개의 저장소 각각의 상단에 도포하였다. 1 ml의 인덱스 시약 1을 저장소 A1로 피펫팅하고, 1 ml의 인덱스 시약 2를 저장소 A2로 피펫팅하는 등 하였다. 탈이온수 중의 2 마이크로리터의 2.5 mg/ml 접합체 용액을 깨끗한, 실리콘 처리된 22 mm 직경의 원형 커버 슬라이드의 중앙에 첨가하고, 저장소 1로부터의 2 마이크로리터의 인덱스 시약 1과 혼합하였다. 커버 슬라이드를 뒤집고, A1 저장소를 덮어 밀봉하여, 액적이 저장소 용액 상에 맺히도록 하였다. 이러한 전체 과정을 시험하는 모든 48 개의 인덱스 용액에 대해 반복하고, 플레이트를 실온에서 밤새 정치시킨 후 광학 현미경을 통해 관찰하였다.

[0568] 스크리닝 실험 결과를 도 27에 요약하였다. 48 개의 인덱스 용액 중 대부분은 결정질 입자 또는 임의의 침전을 그 점에 대해서는 전혀 생성하지 않았다. 인덱스 완충제 19 (pH 8.2, 1.344 M 인산칼륨 2염기성을 함유하는 0.056 M 인산나트륨 1염기성 1수화물)는 윤곽이 뚜렷한 결정을 대량으로 분명히 생성하였다. 인덱스 완충제 19를 이용하여 추가로 시험한 결과 TSAT-$C_6$-AEM-2 (B29) 및 TSPE-AEM-3 (B29) 접합체 I-6 및 I-9와 실질적인 결정을 형성하는 것으로 밝혀졌다. 이들 화합물의 구조를 도 2에 나타낸다. 도 28은 TSAT-$C_6$-AETM-2 (B29) 및 TSAT-$C_6$-AEM-2 (B29) 접합체 I-6 및 I-7과 함께 완충제 19를 이용하여 형성한 대표적인 결정의 전자 주사 현미경사진 (SEM) 영상을 보여준다.

[0569] **실시예 34 - 미리결정화한 접합체로부터의 장시간 작용 중성 프로타민 제제**

[0570] 50/50 v/v 혼합물 (2.5 mg/ml TSAT-$C_6$-AETM-2 (B29) 접합체 I-6 0.5 ml 및 인덱스 완충제 19 0.5 ml)을 이용하여 합성한 결정의 확장 배치를 제조하고, 24 시간 동안 실온에서 정치시켜 완벽하고 완전한 결정화가 이루어지게 하였다. 생성된 분산액 0.5 ml에, 0.0795 ml의 3% m-크레졸 용액을 첨가한 후 0.097 ml의 50 mg/ml 프로타민 용액을 첨가하였다 (pH는 7.0으로 조정함). 생성된 분산액을 대략 2 시간 동안 부드럽게 혼합한 후 래트에 투약하였다.

[0571] 결정질 분산액 (프로타민 또는 m-크레졸이 첨가되지 않은 것) 뿐만 아니라 상기의 프로타민/크레졸 함유 분산액의 지속 방출 및 글루코스-반응성 PK 프로파일을 시험하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다. 공복상태인 비-당뇨병 래트 (수컷 스프라그-돌리, 400-500 g, n = 2 각각)의 목 뒷쪽에, 비-프로타민 결정 분산액은 동물의 체중 (그램)을 2.19로 나눈 것과 동일한 부피 (마이크로리터)로 주사하고, 프로타민/크레졸-함유 결정 분산액은 동물의 체중 (그램)을 1.62로 나눈 것과 동일한 부피 (마이크로리터)로 주사하였다. 240 분 지체한 후, 글루코스 용량 (4 g/kg)을 IP 주사하였다. 혈액 샘플은 0 분 및 처음 접합체를 주사한 후 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 및 300 분에 꼬리 정맥을 통해 출혈시켜 수집하였다. 혈당값은 시판하는 시험띠 (프리시젼 엑스트라, 애보트 래보러토리즈, 일리노이주 애보트 파크 소재)를 이용하여 측정하였다. 또한, 각 시점으로부터의 혈액을 4℃에서 원심분리하여 혈청을 수집하였다. 이어서 시판하는 ELISA 키트 (Iso-인슐린 ELISA, 메르코디아, 스웨덴 웁살라 소재)를 이용하여 혈청 인슐린 농도를 측정하였다.

[0572] 도 30에서 관찰되는 바와 같이, 프로타민/m-크레졸 함유 결정은 혈청 농도에서 매우 편평하고 지속적인 흡수 프로파일과 함께, 4 시간 글루코스 주사 이후에 현저한 글루코스 반응성 증가를 나타내었다. 그러나 프로타민 및 m-크레졸을 함유하지 않는 결정질 분산액은 4 시간 글루코스 주사 이후에 주사 직후 접합체의 대량의 볼루스 방출에 이어 혈청 농도에서 약간의 글루코스 반응성 증가를 나타내었다 (도 29). 이들 결과는 목적하는 장시간 작용 약동학 프로파일을 유지하기 위해 결정을 프로타민 및 m-크레졸과 조합하는 것이 유익함을 나타낸다.

[0573] 이와 동일한 실험을 TSAT-$C_6$-AEM-2 (B29) 접합체 I-7을 이용하여 반복하였다. 50/50 v/v 혼합물 (2.5 mg/ml 접합체 1.0 ml + 인덱스 완충제 19 1.0 ml)을 이용하여 합성한 결정의 확장 배치를 제조하고, 24 시간 동안 실온에서 정치시켜 완벽하고 완전한 결정화가 이루어지게 하였다. 각각의 접합체로부터 생성된 분산액 1.0 ml에, 0.159 ml의 3% m-크레졸 용액을 첨가한 후 0.194 ml의 50 mg/ml 프로타민 용액을 첨가하였다 (pH는 7.0으로 조정함). 생성된 분산액을 대략 2 시간 동안 부드럽게 혼합한 후 래트에 투약하였다.

[0574] 공복상태인 비-당뇨병 래트 (수컷 스프라그-돌리, 400-500 g, n = 3 각각)의 목 뒷쪽에, 프로타민/크레졸 함유 결정 분산액을 동물의 체중 (그램)을 1.62로 나눈 것과 동일한 부피 (마이크로리터)로 주사하였다. 240 분 지체한 후, 글루코스 용량 (4 g/kg)을 IP 주사하였다. 혈액 샘플은 0 분 및 처음 접합체를 주사한 후 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 및 300 분에 꼬리 정맥을 통해 출혈시켜 수집하였다. 혈당값은 시판하는 시험띠 (프리시젼 엑스트라, 애보트 래보러토리즈, 일리노이주 애보트 파크 소재)를 이용하여 측정하였다. 또한, 각 시점으로부터의 혈액을 4℃에서 원심분리하여 혈청을 수집하였다. 이어서 시판하는 ELISA 키트 (Iso-인슐린

ELISA, 메르코디아, 스웨덴 웁살라 소재)를 이용하여 혈청 인슐린 농도를 측정하였다. 제조사의 검정 상세설명에 따르면, Iso-인슐린 ELISA는 래트 인슐린과 71% 교차 반응성을 갖는다. 각각의 샘플에서 검출되는 내인성 래트 인슐린의 양을 최소화하되 래트 인슐린 검출 가능성이 완전히 배제될 수는 없도록 혈청 샘플을 10배 희석시켰다. 따라서, 결과는 일반적으로 접합체에 더하여 약간의 내인성 래트 인슐린으로 이루어질 수 있는 "측정된 인슐린"으로서 보고한다.

[0575] 도 31에서 관찰되는 바와 같이, 프로타민/크레졸 함유 결정은 측정된 혈청 인슐린 농도에서 매우 편평하고 지속적인 흡수 프로파일과 함께, 4 시간 글루코스 주사 이후에 현저한 증가를 나타내었다.

[0576] 상기의 프로타민/크레졸 결정 분산액은 시간의 경과에 따라 안정성을 유지하고 성능을 개선시키는데 비접합된 유리 인슐린의 첨가를 필요로 하지 않았다. 본 발명자들은 수 주간 냉장 보관한 이후에도, 각각의 결정질 분산액은 새롭게 제조한 물질과 동일한 성능을 나타냄을 확인하였다.

[0577] **실시예 35 - 생리학적 완충 세기에서 미리결정화한 접합체로부터의 장시간** 작용 중성 프로타민 제제

[0578] 상기의 프로타민/크레졸 함유 결정질 분산액은 반복적인 투약 이후에 잠재적으로 원치않는 주사 부위 염증을 야기할 수 있는 칼륨 및 포스페이트를 여전히 생리학적 농도보다 훨씬 많이 함유하였다. 결정이 일단 형성되면 프로타민 및 크레졸을 함유하는 생리 염수에서 안정한지 여부를 결정하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다. TSPE-AEM-3 (B29) 접합체 I-9 (2.5 mg/ml) 3.0 ml를 완충제 19 3.0 ml와 혼합하고, 실온에서 밤새 정치시켜 완벽하고 완전한 결정화가 이루어지게 하였다. 다음날, 생성된 분산액에 0.956 ml의 3% m-크레졸 용액 및 1.164 ml의 50 mg/ml 프로타민 용액 (pH 7.0)을 첨가하고, 4℃에서 밤새 정치시켰다. 다음날, 분산액을 1,000 g에서 3 분 동안 원심분리한 후 상청액 7.5 ml를 제거한 다음, 5.6 ml의 1x 인산염 완충 염수 (PBS)에 재분산시켰다. 생성된 분산액 2.8 ml에, 0.447 ml의 3% m-크레졸 용액, 0.204 ml의 1x PBS, 및 0.338 ml의 50 mg/ml 프로타민 용액 (pH 7.0)을 첨가하였다. 생성된 분산액을 4℃에서 1 주 보관한 후 래트에서 시험하였다.

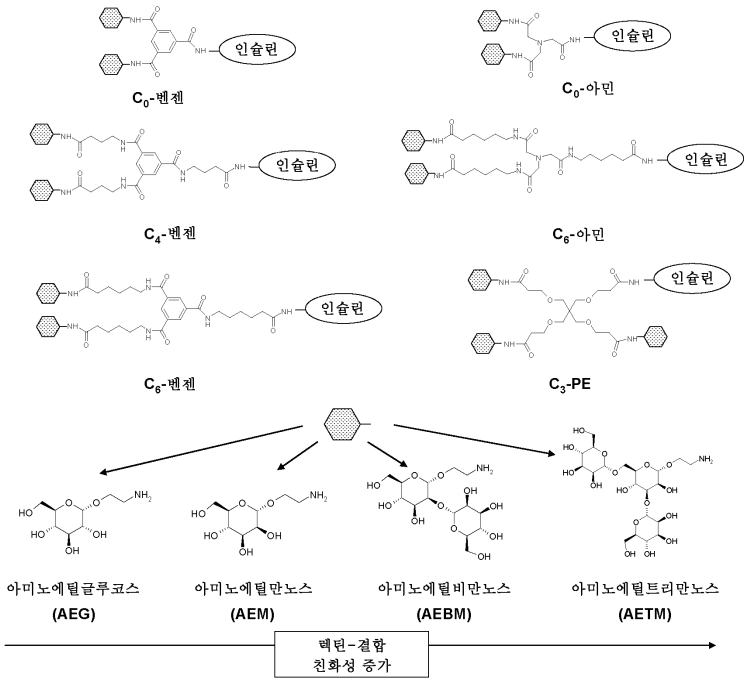
[0579] 숙성된 결정질 분산액을 공복상태인 비-당뇨병 래트 (수컷 스프라그-돌리, 400-500 g, n = 3)의 목 뒷쪽에 동물의 체중 (그램)을 1.62로 나눈 것과 동일한 부피 (마이크로리터)로 주사하였다. 240 분 지체한 후, 글루코스 용량 (4 g/kg)을 IP 주사하였다. 혈액 샘플은 0 분 및 처음 접합체를 주사한 후 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 및 300 분에 꼬리 정맥을 통해 출혈시켜 수집하였다. 혈당값은 시판하는 시험띠 (프리시젼 엑스트라, 애보트 래보러토리즈, 일리노이주 애보트 파크 소재)를 이용하여 측정하였다. 또한, 각 시점으로부터의 혈액을 4℃에서 원심분리하여 혈청을 수집하였다. 이어서 시판하는 ELISA 키트 (Iso-인슐린 ELISA, 메르코디아, 스웨덴 웁살라 소재)를 이용하여 혈청 인슐린 농도를 측정하였다. 도 32에서 관찰되는 바와 같이, 크레졸 및 프로타민을 함유하는 1x PBS 중에서 분산되고 숙성된 결정은 혈청 농도에서 극도로 편평하고 지속적인 흡수 프로파일과 함께, 4 시간 글루코스 주사 이후에 현저한 글루코스 반응성 증가를 나타내었다.

[0580] **다른 실시양태**

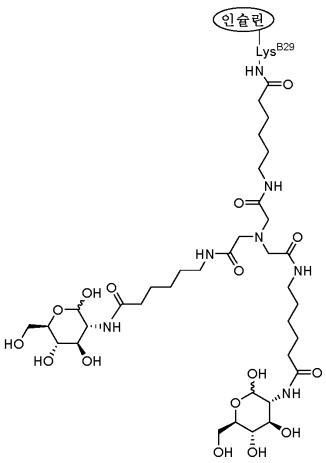
[0581] 본 발명의 다른 실시양태는 본원에서 개시하는 본 발명의 상세한 설명 및 실시를 고려할때 당업자에게 분명할 것이다. 상세한 설명 및 실시예는 단지 예시적인 것으로 간주되어야 하며, 본 발명의 실질적인 범주 및 취지는 하기하는 특허청구범위에 의해 나타내어지는 것으로 의도된다.

## 도면

### 도면1

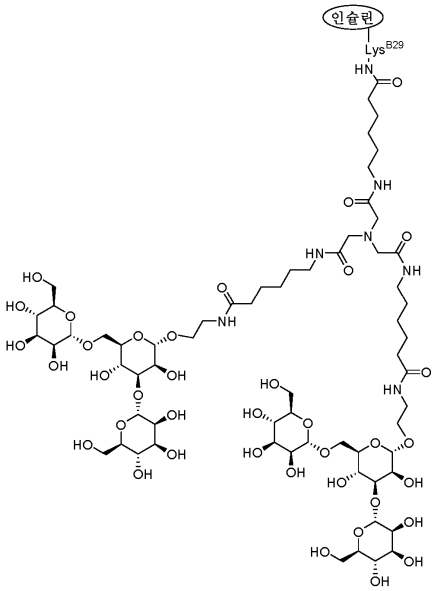



### 도면2a



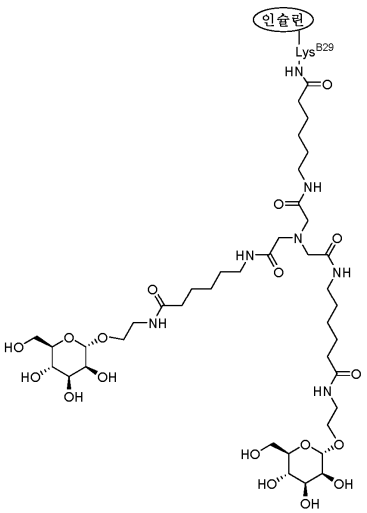

접합체 I-5
TSAT-C6-GA-2 (B29)

도면2b



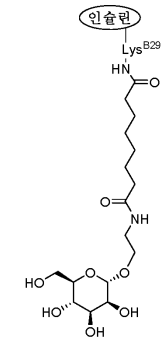

접합체 I-6
TSAT-C6-AETM-2 (B29)

도면2c



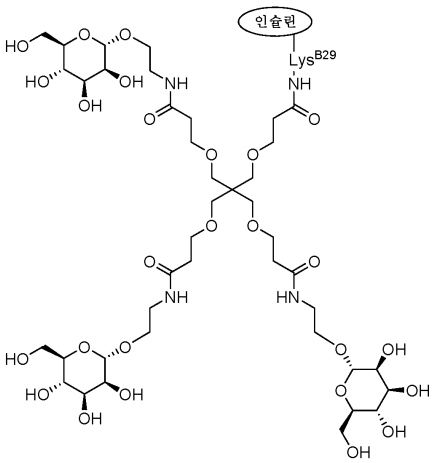

접합체 I-7
TSAT-C6-AEM-2 (B29)

도면2d



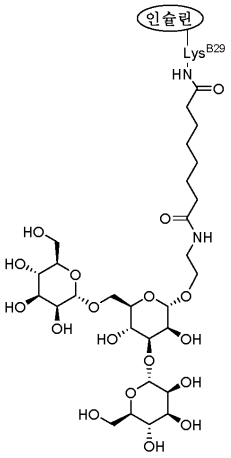

접합체 I-8
DSS-AEM-1 (B29)

도면2e



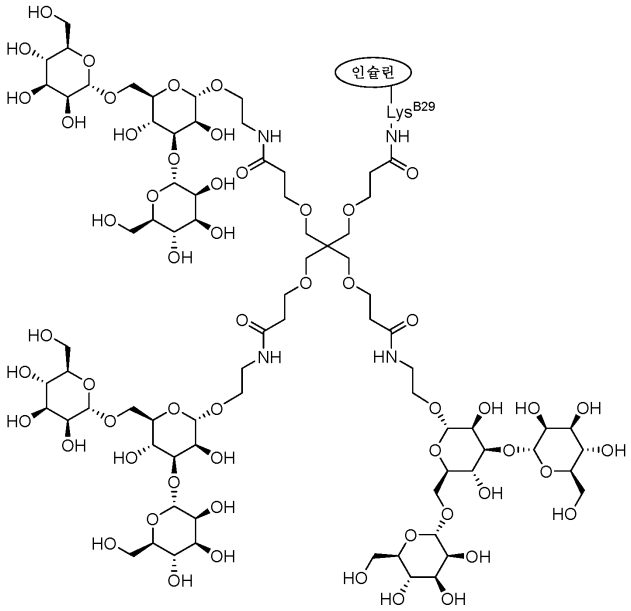

접합체 I-9
TSPE-AEM-3 (B29)

도면2f



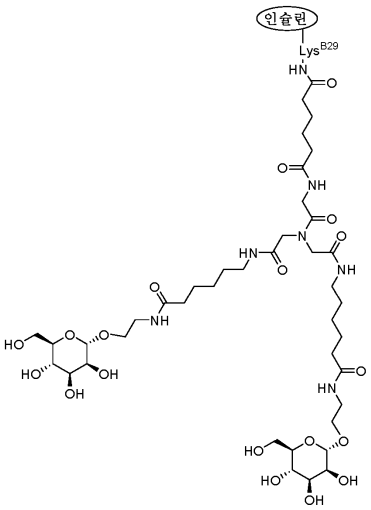

접합체 I-10
DSS-AETM-1 (B29)

도면2g



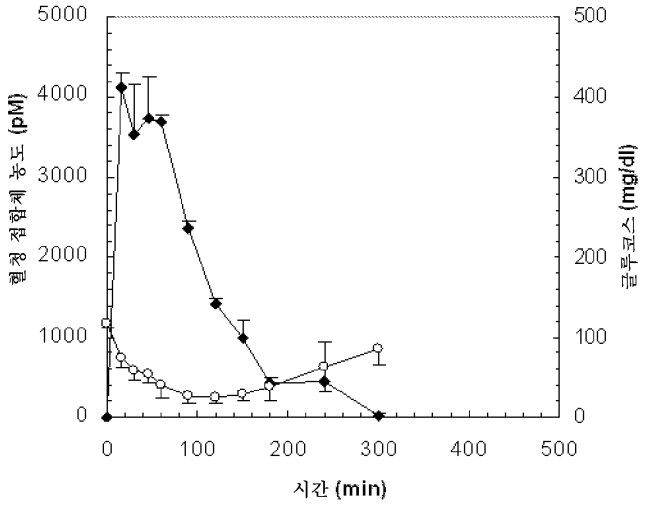

접합체 I-11
TSPE-AETM-3 (B29)

도면2h

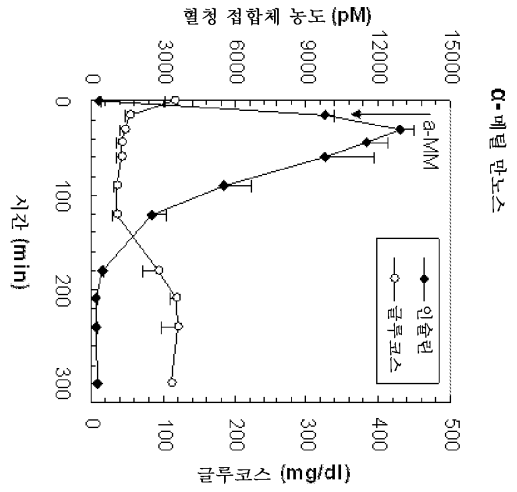


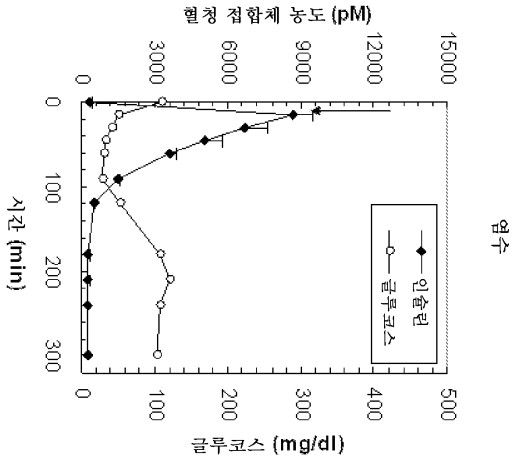

접합체 I-17
C6-아미드-AEM-2 (B29)

도면3

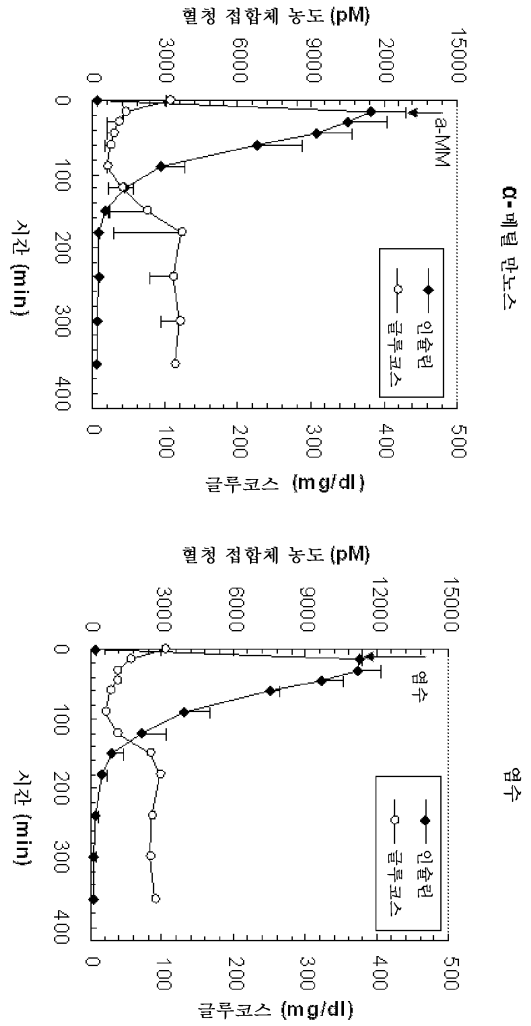

혈청 접합체 농도 (pM)
글루코스 (mg/dl)
시간 (min)

도면4

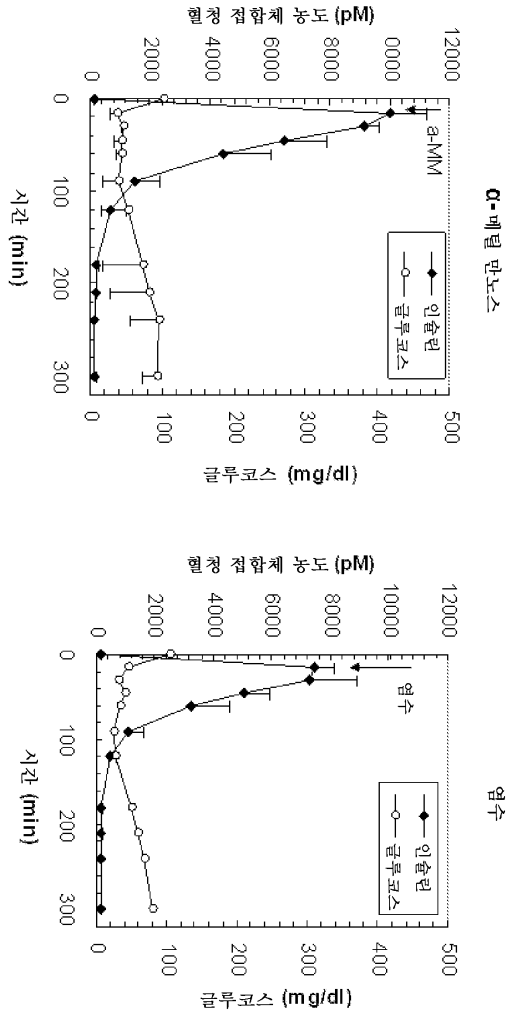

혈청 접합체 농도 (pM)
α-메틸 만노스
a-MM
인슐린
글루코스
시간 (min)
글루코스 (mg/dl)


혈청 접합체 농도 (pM)
염수
인슐린
글루코스
시간 (min)
글루코스 (mg/dl)

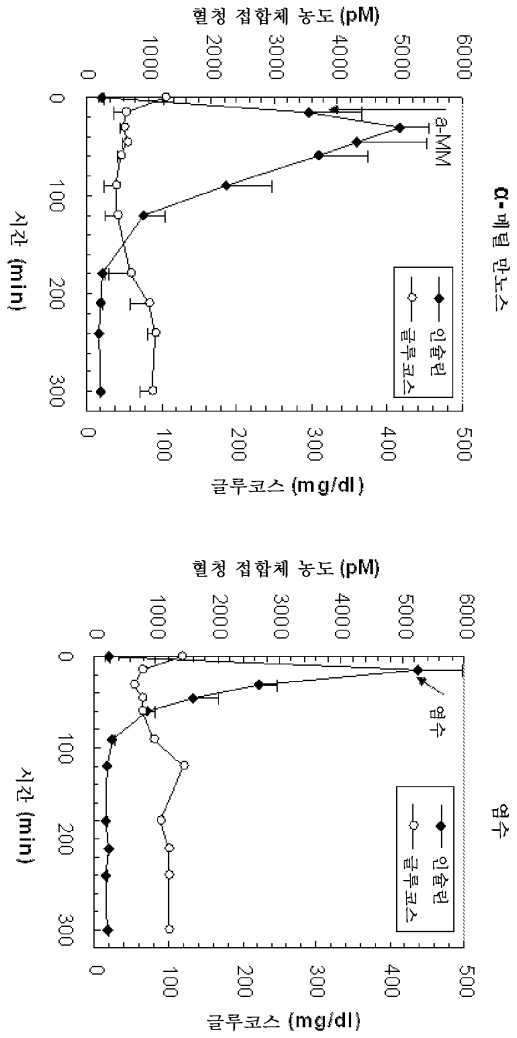
도면5


혈청 접합체 농도 (pM)
0
3000
6000
9000
12000
15000
시간 (min)
0
100
200
300
400
글루코스 (mg/dl)
0
100
200
300
400
500
α-메틸 만노스
a-MM
인슐린
글루코스
혈청 접합체 농도 (pM)
0
3000
6000
9000
12000
15000
시간 (min)
0
100
200
300
400
글루코스 (mg/dl)
0
100
200
300
400
500
염수
염수
인슐린
글루코스

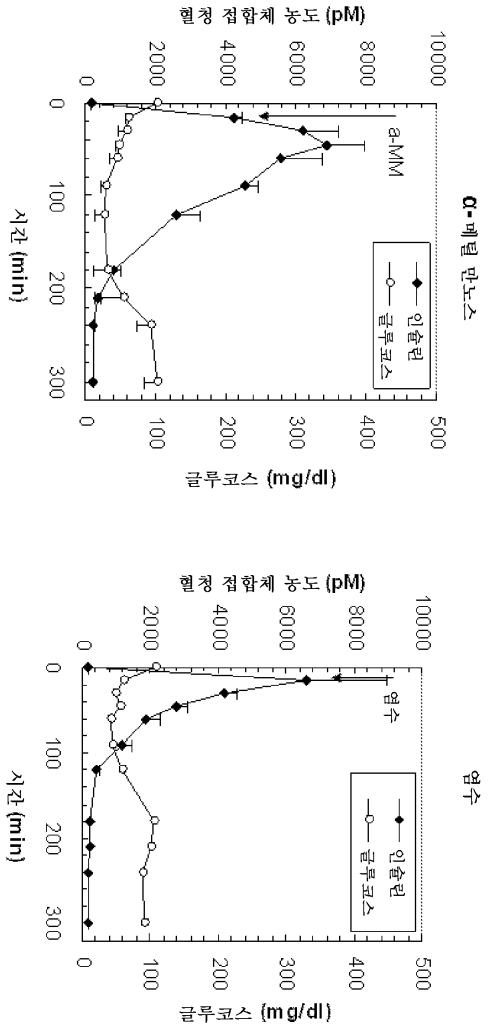
도면6


혈청 접합체 농도 (pM)
0
2000
4000
6000
8000
0000
12000
0
100
200
300
시간 (min)
a-MM
인슐린
글루코스
0
100
200
300
400
500
글루코스 (mg/dl)
α-메틸 만노스
혈청 접합체 농도 (pM)
0
2000
4000
6000
8000
10000
12000
0
100
200
300
시간 (min)
염수
인슐린
글루코스
0
100
200
300
400
500
글루코스 (mg/dl)
염수

도면7

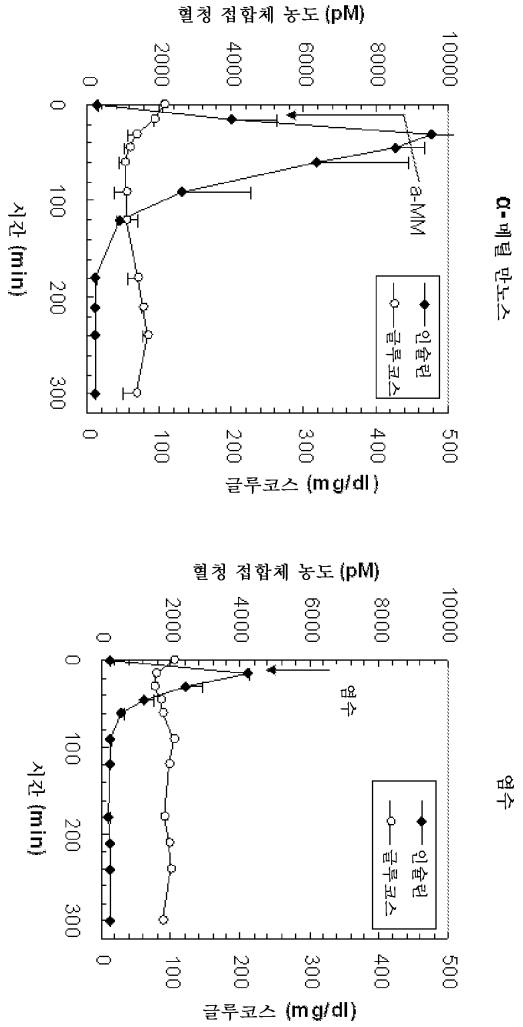

혈청 접합체 농도 (pM)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
시간 (min)
0
100
200
300
a-MM
인슐린
글루코스
글루코스 (mg/dl)
0
100
200
300
400
500
α-메틸 만노스
혈청 접합체 농도 (pM)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
시간 (min)
0
100
200
300
염수
인슐린
글루코스
글루코스 (mg/dl)
0
100
200
300
400
500
염수

도면8

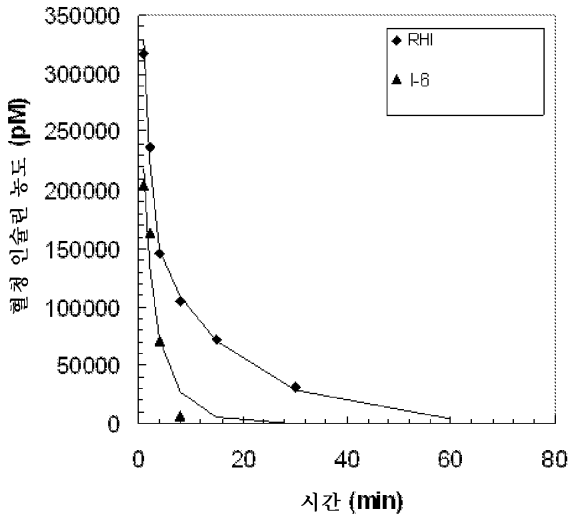

혈청 접합체 농도 (pM)
0
2000
4000
6000
8000
10000
0
100
200
300
시간 (min)
a-MM
인슐린
글루코스
0
100
200
300
400
500
글루코스 (mg/dl)
α-메틸 만노스


혈청 접합체 농도 (pM)
0
2000
4000
6000
8000
10000
0
100
200
300
시간 (min)
염수
인슐린
글루코스
0
100
200
300
400
500
글루코스 (mg/dl)
염수

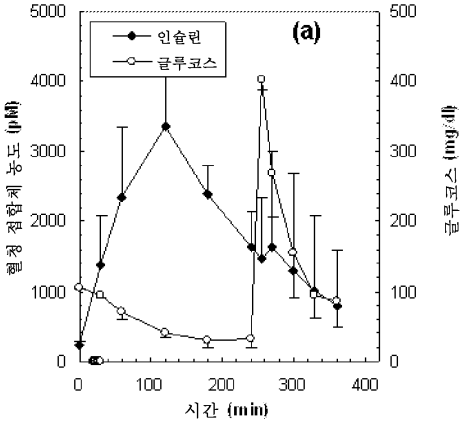
도면9

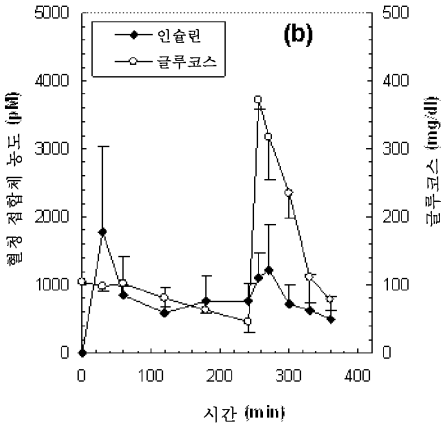

혈청 접합체 농도 (pM)
0
2000
4000
6000
8000
10000
시간 (min)
0
100
200
300
a-MM
인슐린
글루코스
글루코스 (mg/dl)
0
100
200
300
400
500
α-메틸 만노스
혈청 접합체 농도 (pM)
염수
시간 (min)
인슐린
글루코스
글루코스 (mg/dl)
염수

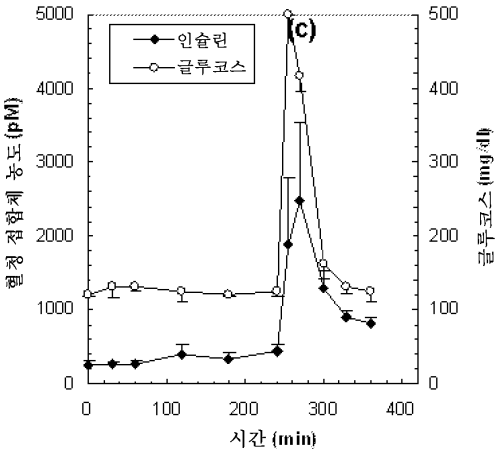
도면10


RH
I-6
혈청 인슐린 농도 (pM)
0
50000
100000
150000
200000
250000
300000
350000
시간 (min)
0
20
40
60
80

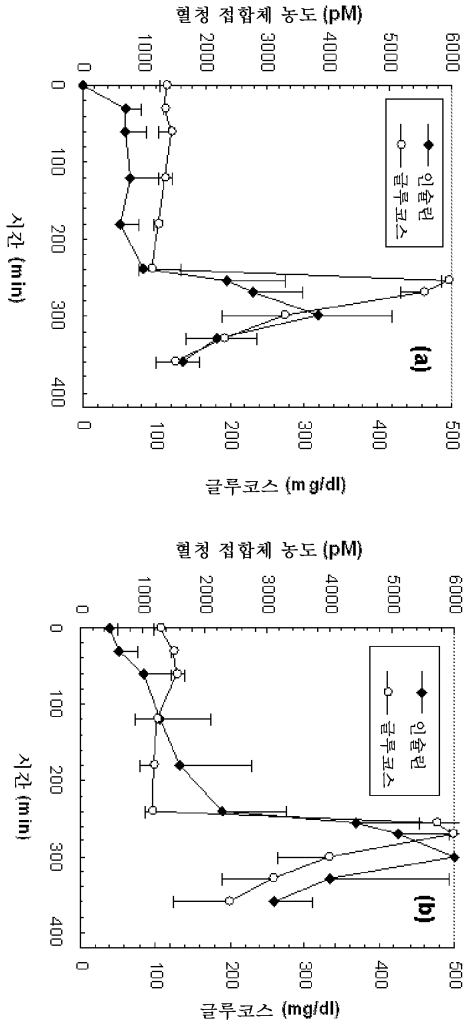
도면11


(a)
인슐린
글루코스
혈청 접합체 농도 (pM)
글루코스 (mg/dl)
시간 (min)

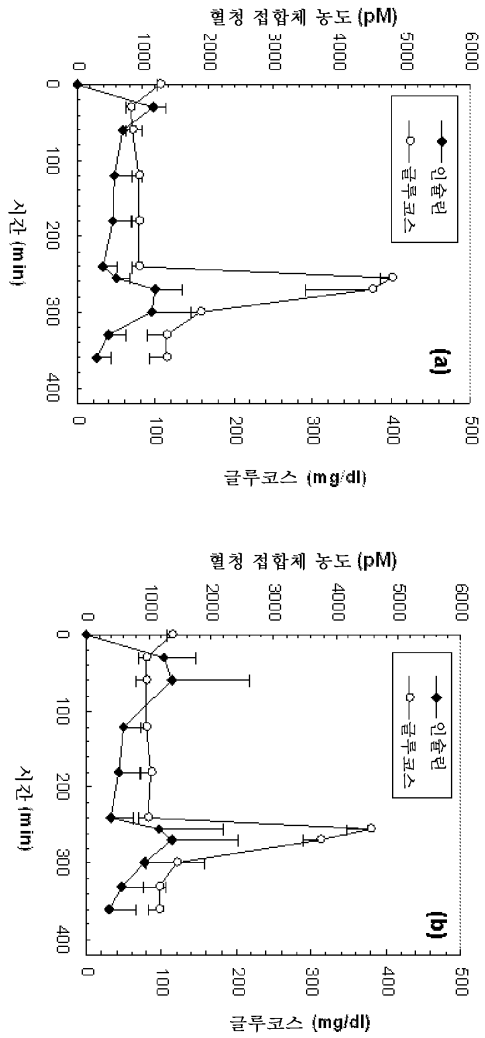

(b)
인슐린
글루코스
혈청 접합체 농도 (pM)
글루코스 (mg/dl)
시간 (min)


(c)
인슐린
글루코스
혈청 접합체 농도 (pM)
글루코스 (mg/dl)
시간 (min)

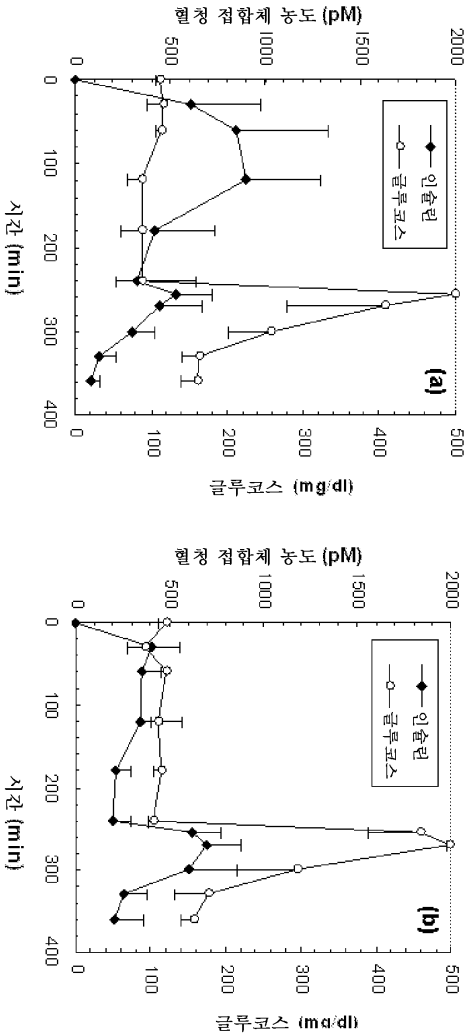
도면12


혈청 접합체 농도 (pM)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
시간 (min)
0
100
200
300
400
인슐린
글루코스
(a)
0
100
200
300
400
500
글루코스 (mg/dl)
혈청 접합체 농도 (pM)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
시간 (min)
0
100
200
300
400
인슐린
글루코스
(b)
0
100
200
300
400
500
글루코스 (mg/dl)

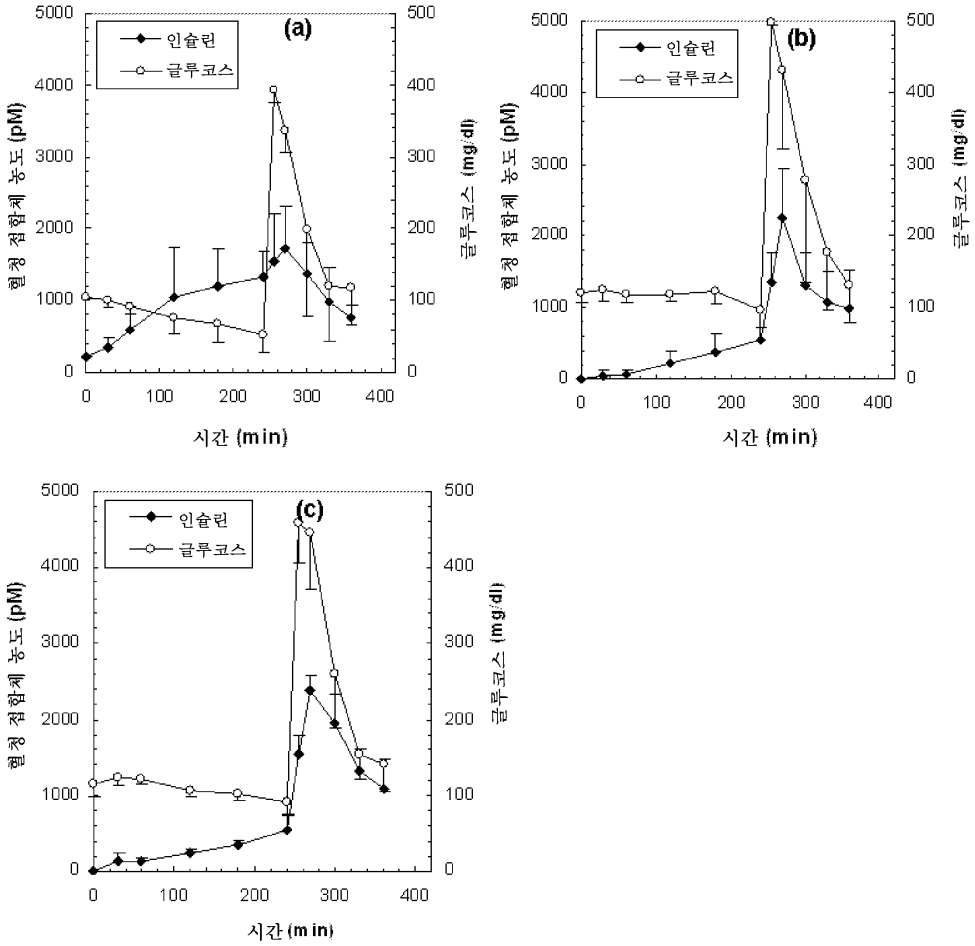
도면13


혈청 접합체 농도 (pM)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
시간 (min)
0
100
200
300
400
인슐린
글루코스
(a)
0
100
200
300
400
500
글루코스 (mg/dl)
혈청 접합체 농도 (pM)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
시간 (min)
0
100
200
300
400
인슐린
글루코스
(b)
0
100
200
300
400
500
글루코스 (mg/dl)

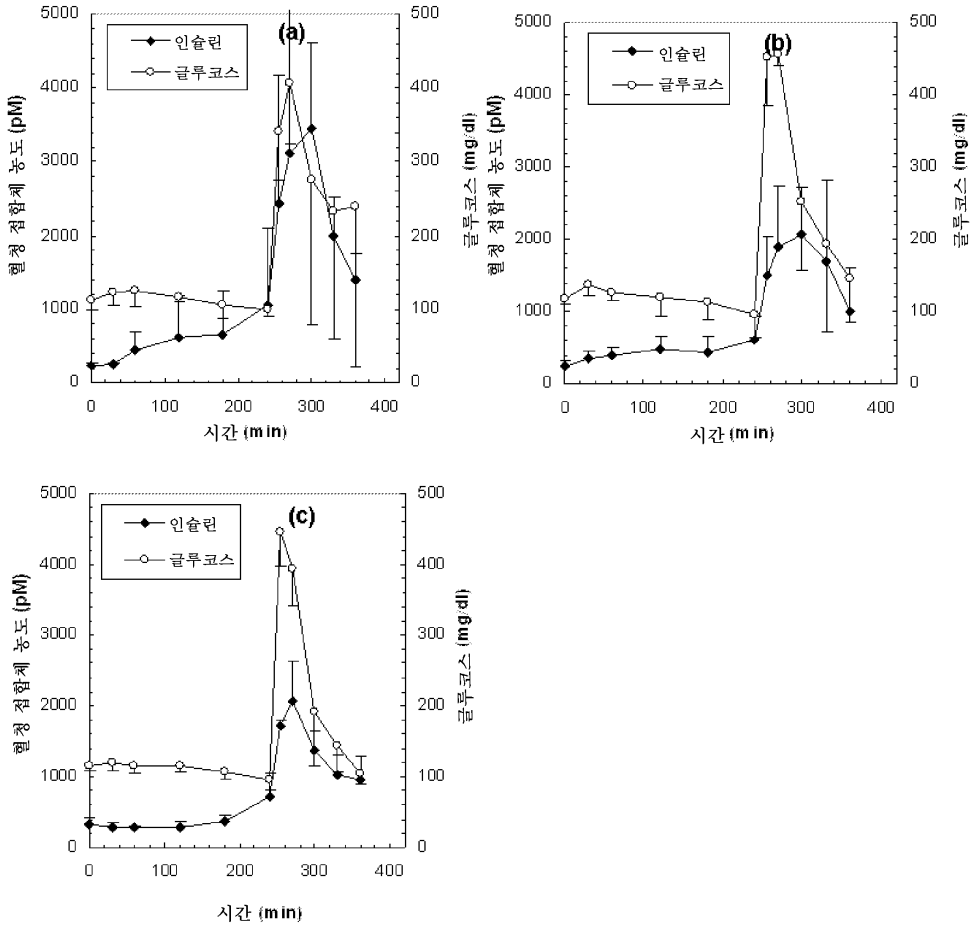
도면14


혈청 접합체 농도 (pM)
0
500
1000
1500
2000
시간 (min)
0
100
200
300
400
글루코스 (mg/dl)
0
100
200
300
400
500
인슐린
글루코스
(a)
혈청 접합체 농도 (pM)
시간 (min)
글루코스 (mg/dl)
인슐린
글루코스
(b)

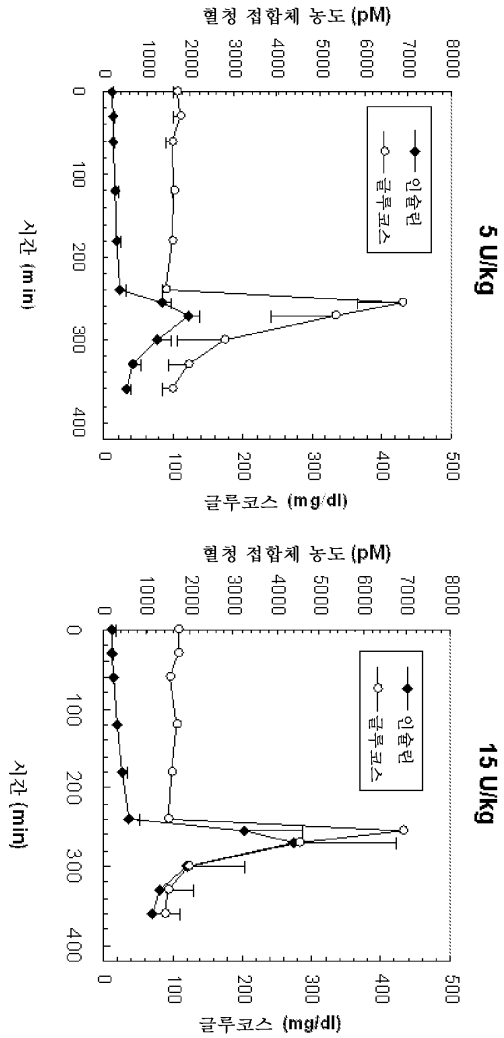
도면15


(a)
(b)
(c)
인슐린
글루코스
혈청 접합체 농도 (pM)
글루코스 (mg/dl)
시간 (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
100
200
300
400
500

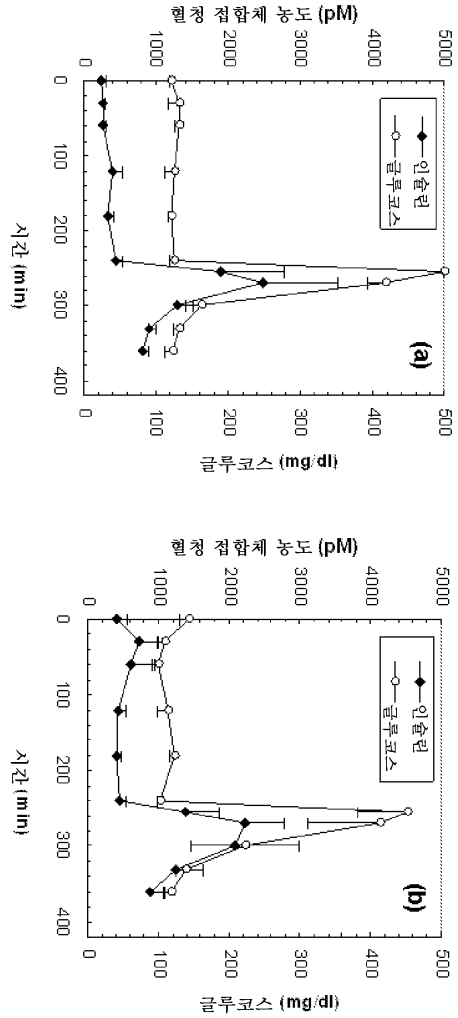
도면16


(a)
(b)
(c)
인슐린
글루코스
혈청 결합체 농도 (pM)
글루코스 (mg/dl)
시간 (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
100
200
300
400
500

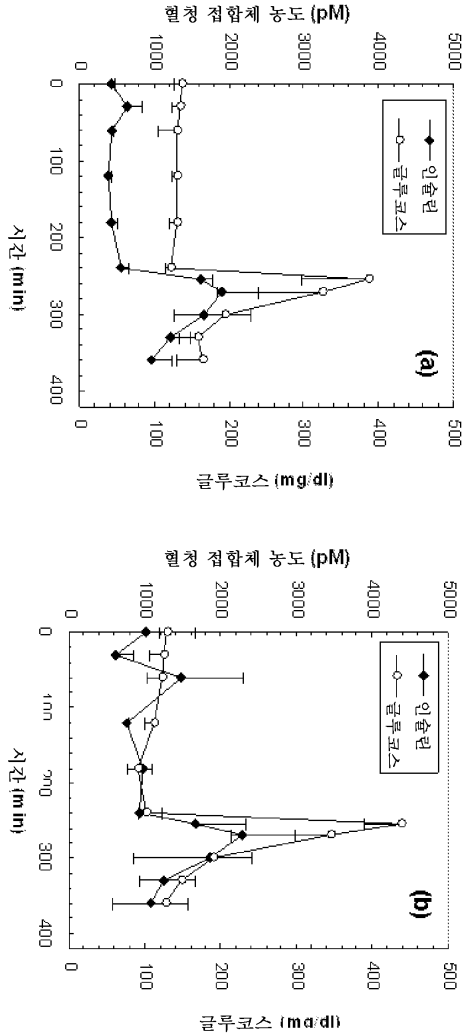
도면17


혈청 접합체 농도 (pM)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
인슐린
글루코스
5 U/kg
시간 (min)
0
100
200
300
400
글루코스 (mg/dl)
0
100
200
300
400
500
혈청 접합체 농도 (pM)
15 U/kg
시간 (min)
글루코스 (mg/dl)

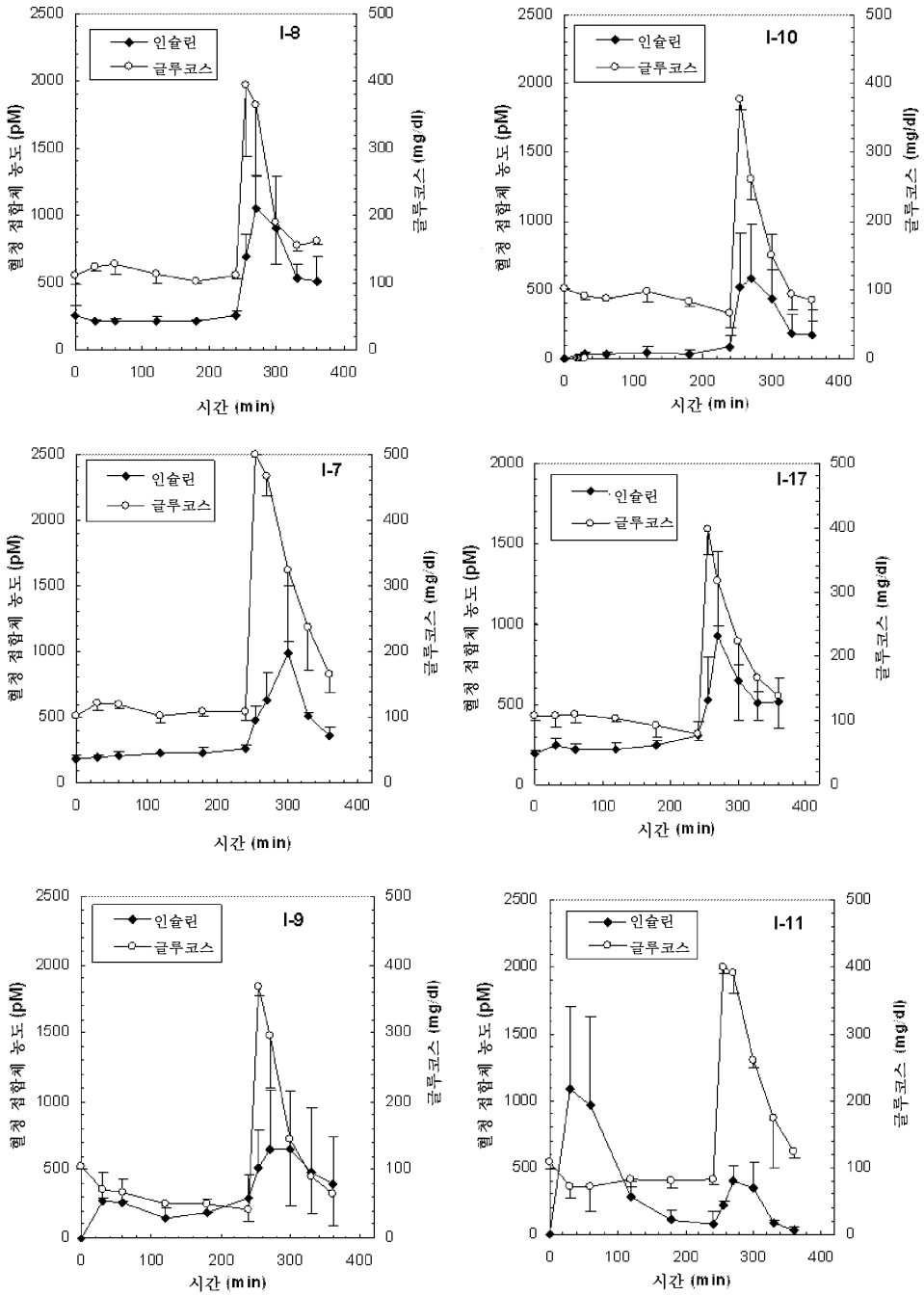
도면18


혈청 접합체 농도 (pM)
0
1000
2000
3000
4000
5000
시간 (min)
0
100
200
300
400
인슐린
글루코스
(a)
0
100
200
300
400
500
글루코스 (mg/dl)
혈청 접합체 농도 (pM)
0
1000
2000
3000
4000
5000
시간 (min)
0
100
200
300
400
인슐린
글루코스
(b)
0
100
200
300
400
500
글루코스 (mg/dl)

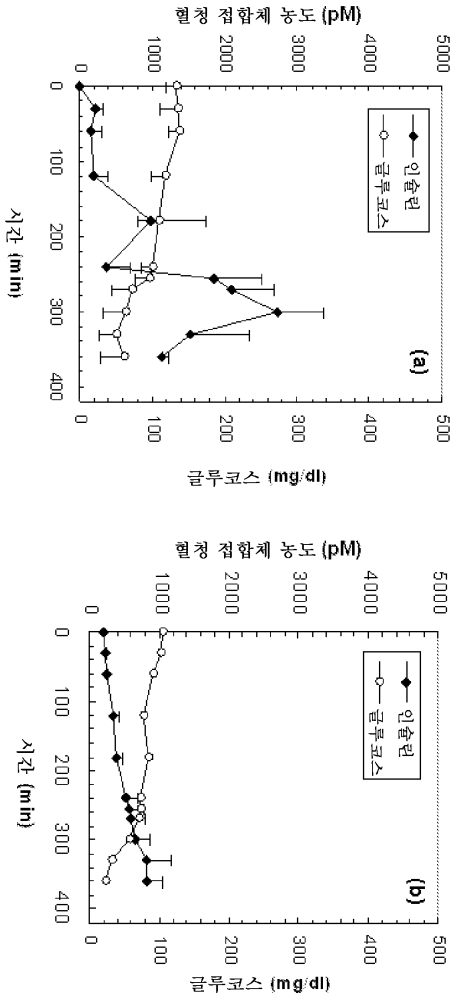
도면19


혈청 접합체 농도 (pM)
0
1000
2000
3000
4000
5000
시간 (min)
0
100
200
300
400
인슐린
글루코스
(a)
글루코스 (mg/dl)
0
100
200
300
400
500
혈청 접합체 농도 (pM)
시간 (min)
인슐린
글루코스
(b)
글루코스 (mg/dl)

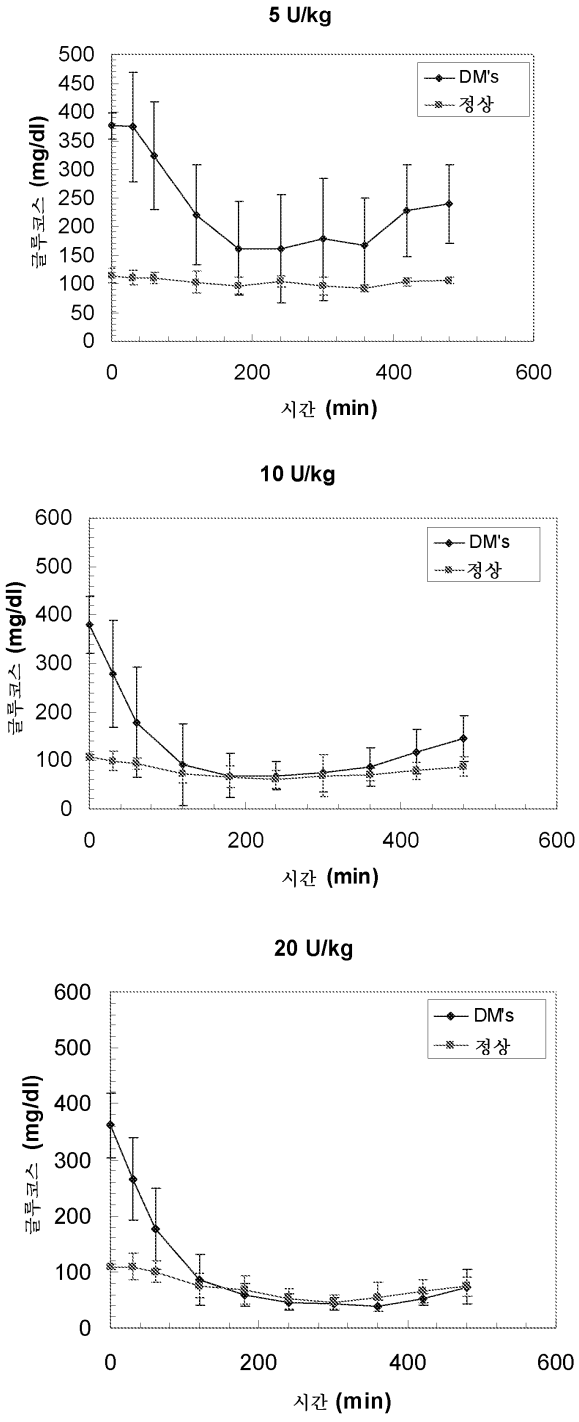
도면20



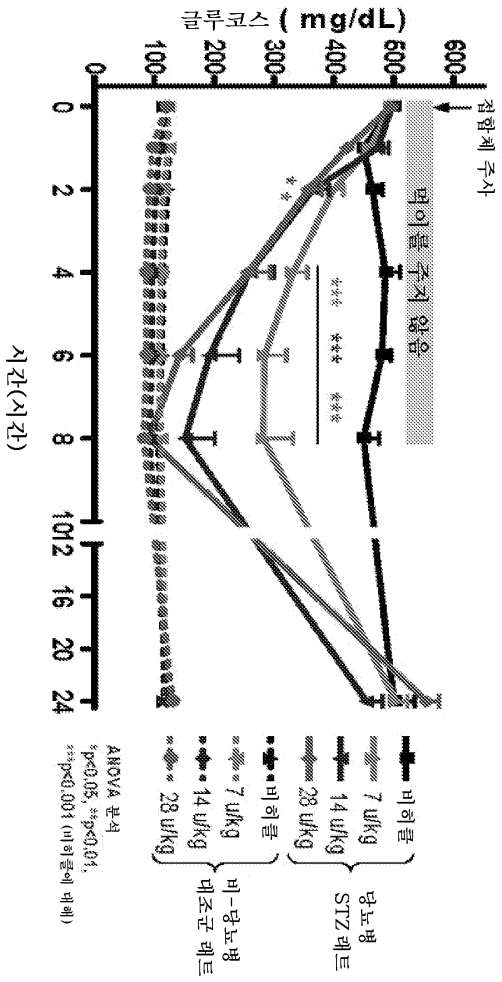
도면21


혈청 접합체 농도 (pM)
0
1000
2000
3000
4000
5000
시간 (min)
0
100
200
300
400
글루코스 (mg/dl)
0
100
200
300
400
500
인슐린
글루코스
(a)
혈청 접합체 농도 (pM)
시간 (min)
글루코스 (mg/dl)
인슐린
글루코스
(b)

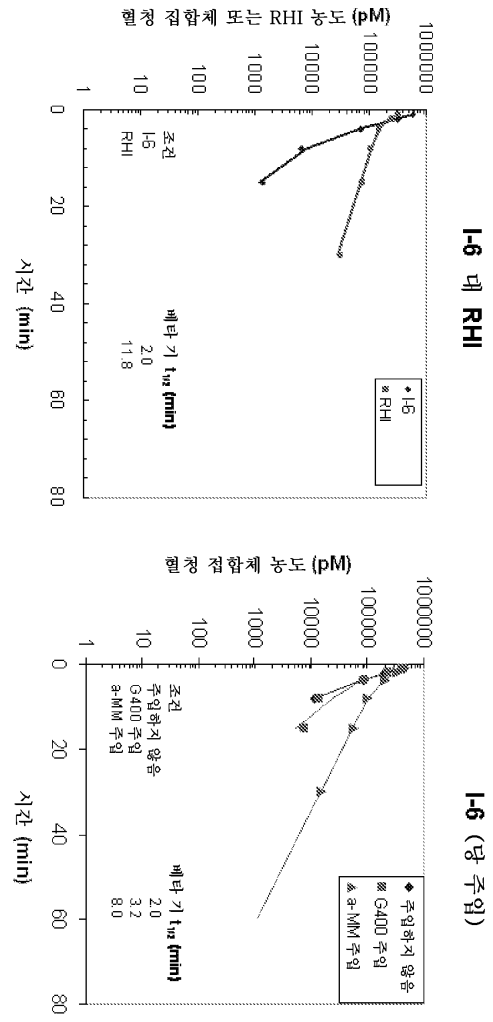
도면22


5 U/kg
DM's
정상
글루코스 (mg/dl)
시간 (min)
10 U/kg
DM's
정상
글루코스 (mg/dl)
시간 (min)
20 U/kg
DM's
정상
글루코스 (mg/dl)
시간 (min)

도면23


글루코스 ( mg/dL)
0
100
200
300
400
500
600
접합체 주사
먹이를 주지 않음
시간(시간)
0
2
4
6
8
10
12
16
20
24
비히클
7 u/kg
14 u/kg
28 u/kg
당뇨병 STZ 레트
비히클
7 u/kg
14 u/kg
28 u/kg
비-당뇨병 대조군 레트
ANOVA 분석
*p<0.05, **p<0.01,
***p<0.001 (비히클에 대해)

도면24

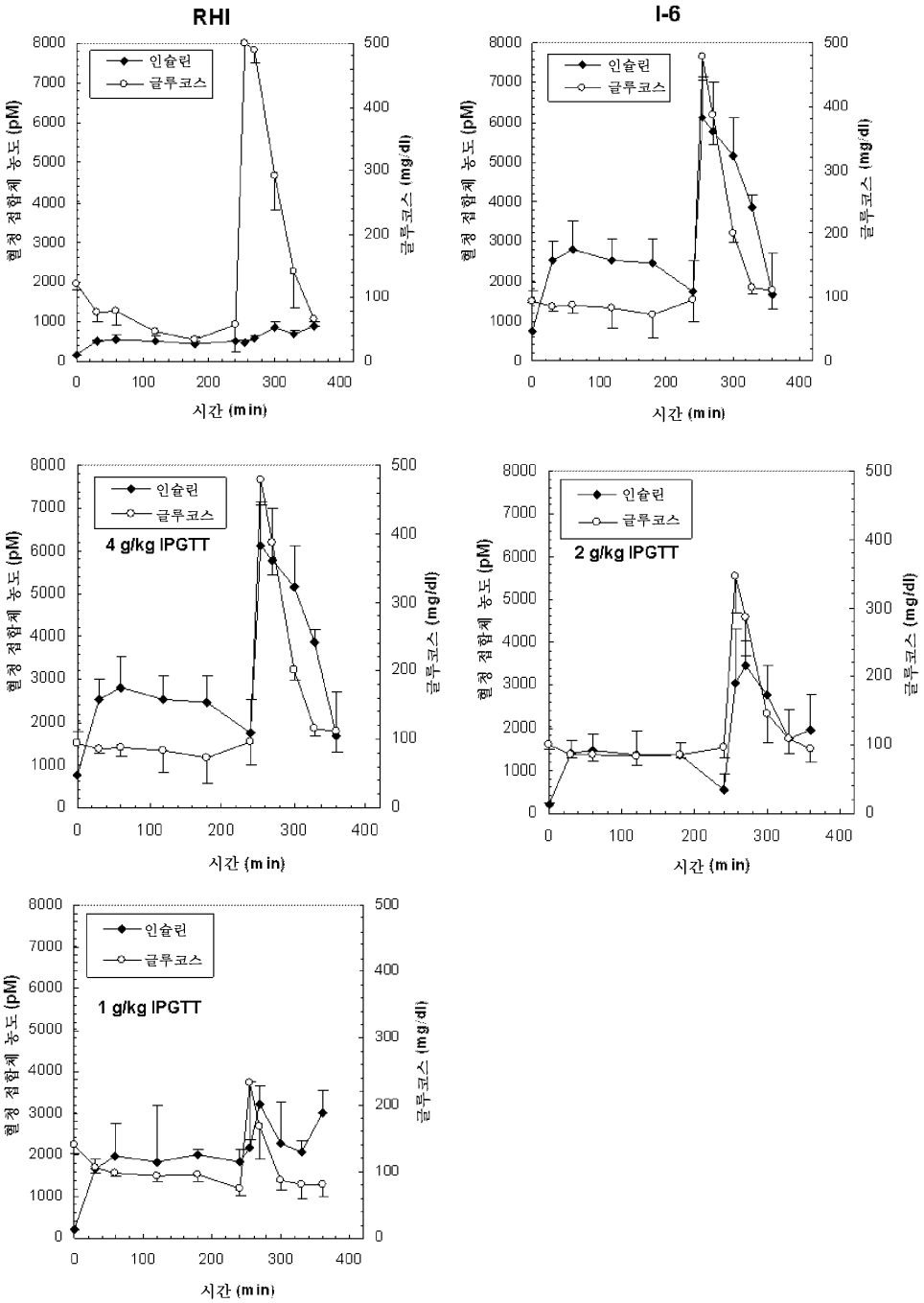



I-6 대 RHI

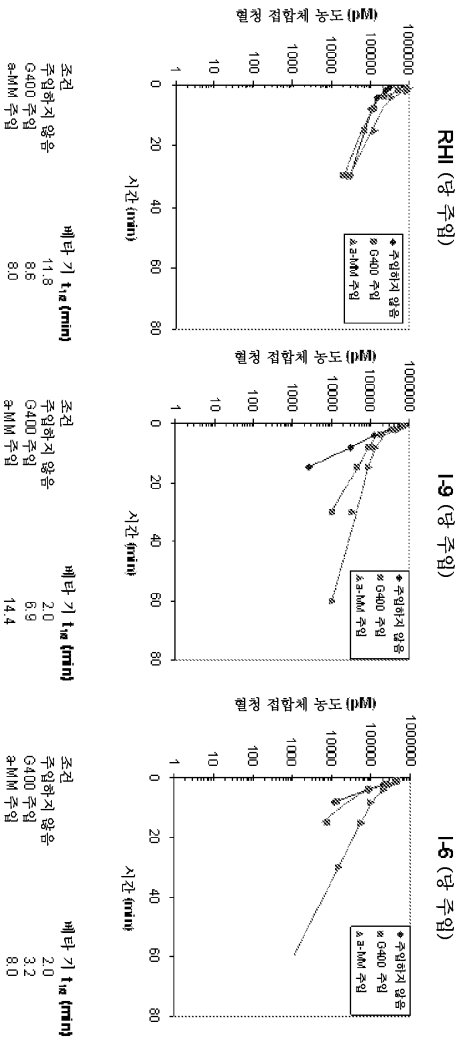



I-6 (당 주입)

도면25


RHI
I-6
4 g/kg IPGTT
2 g/kg IPGTT
1 g/kg IPGTT
인슐린
글루코스
혈청 접합체 농도 (pM)
글루코스 (mg/dl)
시간 (min)

도면26


RHI (당 주입)
혈청 접합체 농도 (pM)
시간 (min)
◆ 주입하지 않음
■ G400 주입
▲ α-MM 주입
조건
베타 기 $t_{1/2}$ (min)
주입하지 않음 11.8
G400 주입 8.6
α-MM 주입 8.0
I-9 (당 주입)
혈청 접합체 농도 (pM)
시간 (min)
◆ 주입하지 않음
■ G400 주입
▲ α-MM 주입
조건
베타 기 $t_{1/2}$ (min)
주입하지 않음 2.0
G400 주입 6.9
α-MM 주입 14.4
I-6 (당 주입)
혈청 접합체 농도 (pM)
시간 (min)
◆ 주입하지 않음
■ G400 주입
▲ α-MM 주입
조건
베타 기 $t_{1/2}$ (min)
주입하지 않음 2.0
G400 주입 3.2
α-MM 주입 8.0

도면27a

| 완충제 | 스코어 |
|---|---|
| 1. 0.1 M 시트르산 pH 3.5, 2.0 M 황산암모늄 | 3 |
| 2. 0.1 M 나트륨 아세테이트 삼수화물 pH 4.5, 2.0 M 황산암모늄 | 4 |
| 3. 0.1 M 비스-트리스 pH 5.5, 2.0 M 황산암모늄 | 1 |
| 4. 0.1 M 비스-트리스 pH 6.5, 2.0 M 황산암모늄 | 3 |
| 5. 0.1 M HEPES pH 7.5, 2.0 M 황산암모늄 | 3 |
| 6. 0.1 M 트리스 pH 8.5, 2.0 M 황산암모늄 | 3 |
| 7. 0.1 M 시트르산 pH 3.5, 3.0 M 염화나트륨 | 1 |
| 8. 0.1 M 나트륨 아세테이트 삼수화물 pH 4.5, 3.0 M 염화나트륨 | 1 |
| 9. 0.1 M 비스-트리스 pH 5.5, 3.0 M 염화나트륨 | 1 |
| 10. 0.1 M 비스-트리스 pH 6.5, 3.0 M 염화나트륨 | 1 |
| 11. 0.1 M HEPES pH 7.5, 3.0 M 염화나트륨 | 8 |
| 12. 0.1 M 트리스 pH 8.5, 3.0 M 염화나트륨 | 1 |
| 13. 0.1 M 비스-트리스 pH 5.5, 0.3 M 마그네슘 포르메이트 이수화물 | 1 |
| 14. 0.1 M 비스-트리스 pH 6.5, 0.5 M 마그네슘 포르메이트 이수화물 | 1 |
| 15. 0.1 M HEPES pH 7.5, 0.5 M 마그네슘 포르메이트 이수화물 | 8 |
| 16. 0.1 M 트리스 pH 8.5, 0.3 M 마그네슘 포르메이트 이수화물 | 1 |
| 17. 1.26 M 일염기성 인산나트륨 일수화물, 0.14 M 이염기성 인산칼륨, pH 5.6 | 1 |
| 18. 0.49 M 일염기성 인산나트륨 일수화물, 0.91 M 이염기성 인산칼륨, pH 6.9 | 1 |
| 19. 0.056 M 일염기성 인산나트륨 일수화물,1.344 M 이염기성 인산칼륨, pH 8.2 | 8 |
| 20. 0.1 M HEPES pH 7.5, 1.4 M 삼염기성 나트륨 시트레이트 이수화물 | 3 |
| 21. 1.8 M 삼염기성 암모늄 시트레이트 pH 7.0 | 3 |
| 22. 0.8 M 숙신산 pH 7.0 | 1 |
| 23. 2.1 M DL-말산 pH 7.0 | 3 |
| 24. 2.8 M 나트륨 아세테이트 삼수화물 pH 7.0 | 1 |
| 25. 3.5 M 나트륨 포르메이트 pH 7.0 | 1 |
| 26. 1.1 M 이염기성 암모늄 타르트레이트 pH 7.0 | 3 |
| 27. 2.4 M 나트륨 말로네이트 pH 7.0 | 1 |
| 28. 35% v/v 탁시메이트(Tacsimate) pH 7.0 | 3 |
| 29. 60% v/v 탁시메이트 pH 7.0 | 1 |

범례:

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1 | 투명 액적 | 5 | 로제트 또는 구결정 |
| 2 | 상 분리 | 6 | 침상 (1D 성장 ) |
| 3 | 일정한 과립 침전물 | 7 | 판상 (2D 성장 ) |
| 4 | 복굴절 침전물 또는 미세결정 | 8 | 단일 결정 (3D 성장 < 0.2 mm) |
| | | 9 | 단일 결정 (3D 성장 > 0.2 mm) |

## 도면27b

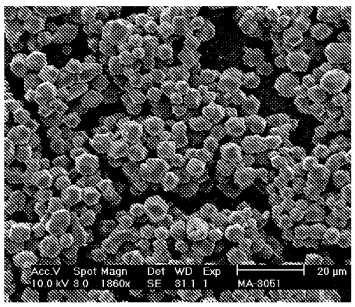
| 완충제 | 스코어 |
|---|---|
| 30. 0.1 M 염화나트륨,0.1 M 비스-트리스 pH 6.5, 1.5 M 황산암모늄 | 1 |
| 31. 0.8 M 칼륨 나트륨 타르트레이트 사수화물, 0.1 M 트리스 pH 8.5, 0.5% w/v 폴리에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르 5,000 | 1→3 |
| 32. 1.0 M 황산암모늄, 0.1 M 비스-트리스 pH 5.5, 1% w/v 폴리에틸렌 글리콜 3,350 | 4 |
| 33. 1.1 M 나트륨 말로네이트 pH 7.0, 0.1 M HEPES pH 7.0, 0.5% v/v 제파민(Jeffamine) ED-2001® pH 7.0 | 1 |
| 34. 1.0 M 숙신산 pH 7.0, 0.1 M HEPES pH 7.0, 1% w/v 폴리에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르 2,000 | 1 |
| 35. 1.0 M 황산암모늄, 0.1 M HEPES pH 7.0, 0.5% w/v 폴리에틸렌 글리콜 8,000 | 1 |
| 36. 15% v/v 탁시메이트 pH 7.0, 0.1 M HEPES pH 7.0, 2% w/v 폴리에틸렌 글리콜 3,350 | 1 |
| 37. 25% w/v 폴리에틸렌 글리콜 1,500 | 3 |
| 38. 0.1 M HEPES pH 7.0, 30% v/v 제파민 M-600® pH 7.0 | 7 |
| 39. 0.1 M HEPES pH 7.0, 30% v/v 제파민 ED-2001 ® pH 7.0 | 1 |
| 40. 0.1 M 시트르산 pH 3.5, 25% w/v 폴리에틸렌 글리콜 3,350 | 6 |
| 41. 0.1 M 나트륨 아세테이트 삼수화물 pH 4.5, 25% w/v 폴리에틸렌 글리콜 3,350 | 3 |
| 42. 0.1 M 비스-트리스 pH 5.5, 25% w/v 폴리에틸렌 글리콜 3,350 | 3/5 |
| 43. 0.1 M 비스-트리스 pH 6.5, 25% w/v 폴리에틸렌 글리콜 3,350 | 1 |
| 44. 0.1 M HEPES pH 7.5, 25% w/v 폴리에틸렌 글리콜 3,350 | 1 |
| 45. 0.1 M 트리스 pH 8.5, 25% w/v 폴리에틸렌 글리콜 3,350 | 1 |
| 46. 0.1 M 비스-트리스 pH 6.5, 20% w/v 폴리에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르 5,000 | 1 |
| 47. 0.1 M 비스-트리스 pH 6.5, 28% w/v 폴리에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르 2,000 | 1 |
| 48. 0.2 M 염화칼슘 이수화물, 0.1 M 비스-트리스 pH 5.5, 45% v/v (+/-)-2-메틸-2,4-펜탄디올 | 1 |

범례:

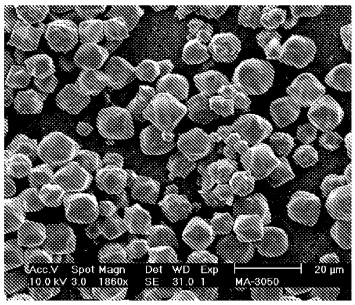
| | | | |
|---|---|---|---|
| 1 | 투명 액적 | 5 | 로제트 또는 구결정 |
| 2 | 상 분리 | 6 | 침상 (1D 성장) |
| 3 | 일정한 과립 침전물 | 7 | 판상 (2D 성장) |
| 4 | 복굴절 침전물 또는 미세결정 | 8 | 단일 결정 (3D 성장 < 0.2 mm) |
| | | 9 | 단일 결정 (3D 성장 > 0.2 mm) |

## 도면28

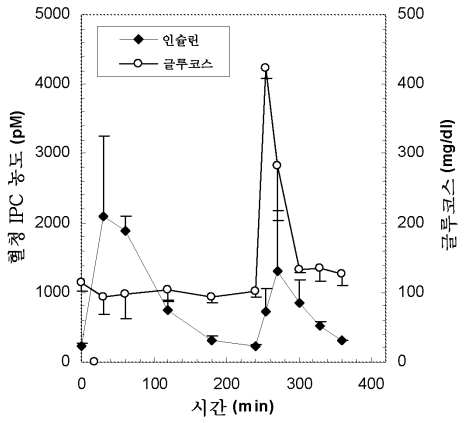
**TSAT-$C_6$-AETM-2 (B29)**



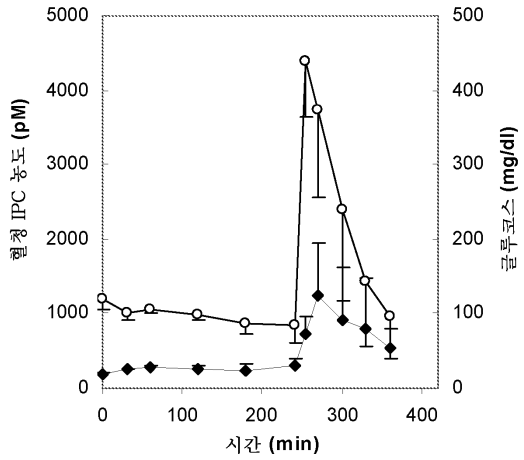

**TSAT-$C_6$-AEM-2 (B29)**



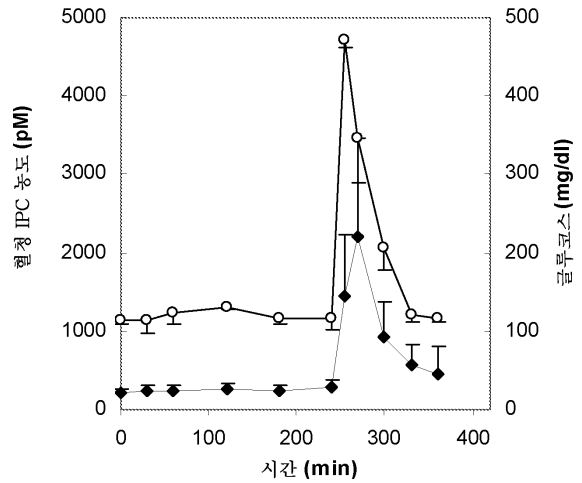
도면29



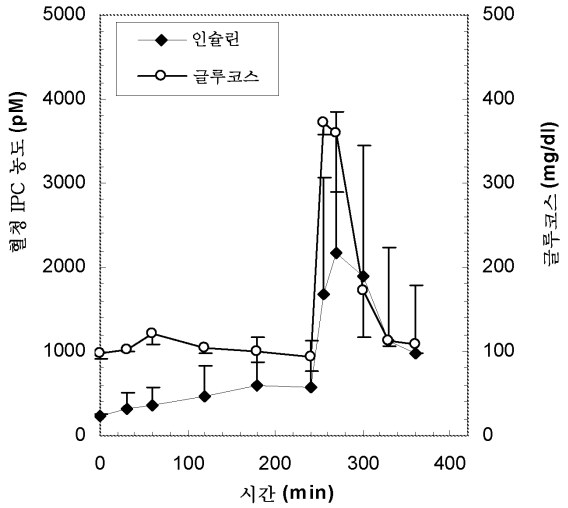

도면30



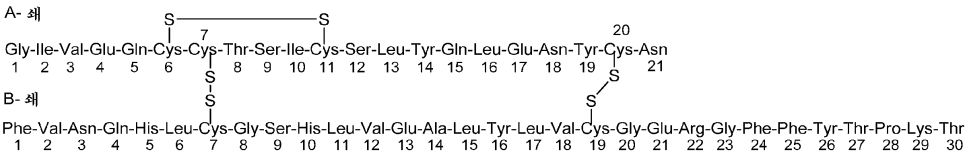

도면31



도면32




도면33




## 서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Lancaster, Thomas M.

Zion, Todd C.

<120> Crystalline Insulin-Conjugates

<130> 2005700-0032

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn

20

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
20 25 30