



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0115086  
(43) 공개일자 2013년10월21일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 14/575 (2006.01) C07K 17/08 (2006.01)  
A61K 38/22 (2006.01) A61K 47/30 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2012-7031723
- (22) 출원일자(국제) 2011년05월17일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2012년12월04일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2011/036858
- (87) 국제공개번호 WO 2011/146518  
국제공개일자 2011년11월24일
- (30) 우선권주장  
61/345,293 2010년05월17일 미국(US)  
61/448,402 2011년03월02일 미국(US)
- (71) 출원인  
세빅스 인코포레이티드  
미국 92037 캘리포니아주 라졸라 프로스펙트 스트리트 1298 스위트 2에이
- (72) 발명자  
배력 세리  
미국 92037 캘리포니아주 라졸라 프로스펙트 스트리트 1298 스위트 2에이  
캘러웨이 제임스  
미국 92037 캘리포니아주 라졸라 프로스펙트 스트리트 1298 스위트 2에이  
마조니 미첼  
미국 92037 캘리포니아주 라졸라 프로스펙트 스트리트 1298 스위트 2에이
- (74) 대리인  
특허법인코리어나

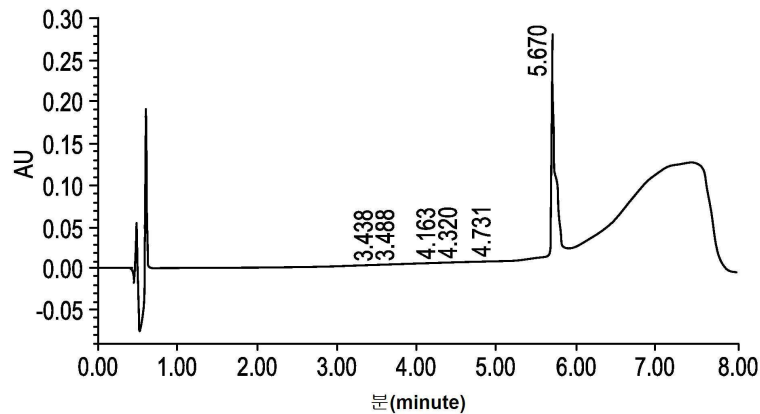
전체 청구항 수 : 총 68 항

(54) 발명의 명칭 폐길화된 C-펩티드

(57) 요약

본 발명은 C-펩티드의 변형된 형태, 그리고 이들의 이용 방법에 관계한다. 한 양태에서, C-펩티드의 변형된 형태는 N-말단에 부착된 적어도 하나의 PEG 기를 포함하는 폐길화된 C-펩티드 유도체를 포함하고, 이들 유도체는 생체내에서 우수한 약물동력학적 및 생물학적 활성을 나타낸다.

대표도 - 도1



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

C-펩티드의 N-말단에 공유 부착된 PEG 모이어티를 포함하는 폐길화된 C-펩티드.

### 청구항 2

청구항 1에 있어서, PEG 모이어티는 약 10 kDa 내지 약 80 kDa의 분자량을 갖는 것을 특징으로 하는 폐길화된 C-펩티드.

### 청구항 3

청구항 1에 있어서, PEG 모이어티는 약 20 kDa 내지 약 60 kDa의 분자량을 갖는 것을 특징으로 하는 폐길화된 C-펩티드.

### 청구항 4

청구항 1에 있어서, PEG 모이어티는 약 30 kDa 내지 약 50 kDa의 분자량을 갖는 것을 특징으로 하는 폐길화된 C-펩티드.

### 청구항 5

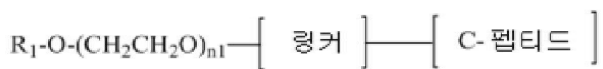
청구항 1 내지 4중 어느 한 항에 있어서, PEG 모이어티는 선형 중합체인 것을 특징으로 하는 폐길화된 C-펩티드.

### 청구항 6

청구항 1 내지 4중 어느 한 항에 있어서, PEG 모이어티는 가지형 중합체인 것을 특징으로 하는 폐길화된 C-펩티드.

### 청구항 7

청구항 5에 있어서, 폐길화된 C-펩티드는 하기 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 폐길화된 C-펩티드:



여기서  $R_1$  = 알킬;

$n_1$ 은 20 내지 800이고;

링커는 하기에서 선택되고;  $-X-$ ,  $-CO-$ ,  $-(CH_2)_{m_2}-$ ,

$-(CH_2)_{m_1}-CO-$ ,  $-CO-(CH_2)_{m_1}-$ ,

$-CO-X-CO-$ ,  $-(CH_2)_{m_1}-X-(CH_2)_{m_1}-$ ,

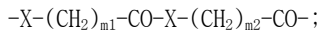
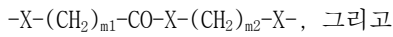
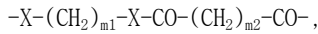
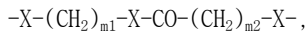
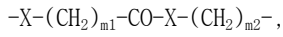
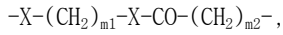
$-(CH_2)_{m_1}-CO-(CH_2)_{m_1}-$ ,  $-X-CO-X-$ ,

$-X-(CH_2)_{m_1}-X-$ ,  $-CO-(CH_2)_{m_1}-CO-$ ,

$-X-CO-(CH_2)_{m_1}-$ ,  $-(CH_2)_{m_1}-CO-X-$ ,

$-X-(CH_2)_{m_1}-CO-X-$ ,  $-X-CO-(CH_2)_{m_1}X-$ ,

$-X-CO-(CH_2)_{m_1}-CO-X-(CH_2)_{m_1}-X-CO-$ ,



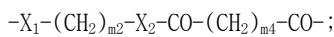
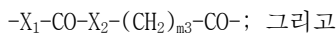
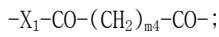
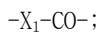
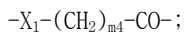
여기서 각 X는 -O-, -S-, 또는 -NH-에서 독립적으로 선택되거나, 또는 없고;

각  $m_1$ 은 독립적으로 0 내지 5이고;

각  $m_2$ 는 독립적으로 1 내지 5이고; 이때 링커는 C-펩티드의 N-말단 아미노기에 부착된다.

### 청구항 8

청구항 5에 있어서, 페길화된 C-펩티드는 하기에서 선택되는 링커를 포함하는 것을 특징으로 하는 페길화된 C-펩티드;



여기서  $X_1$ 은 -O-이거나, 또는 없고;

$X_2$ 는 -NH-이고;

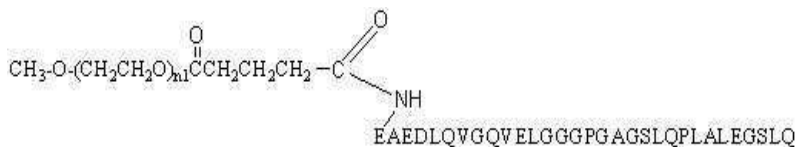
$m_2$ 는 1 내지 5이고;

$m_3$ 은 2이고; 그리고

$m_4$ 는 2 내지 5이다.

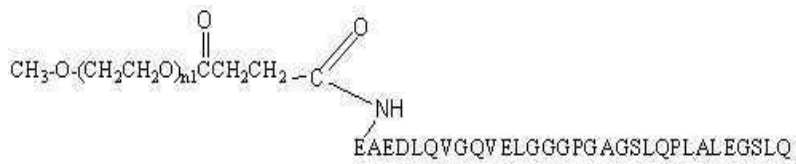
### 청구항 9

청구항 5에 있어서, 페길화된 C-펩티드는 하기 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 페길화된 C-펩티드:



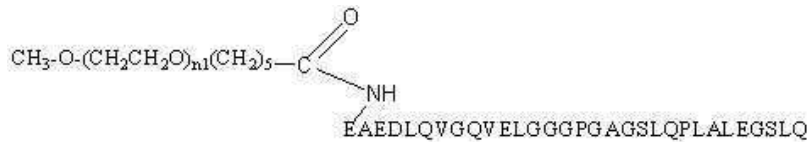
## 청구항 10

청구항 5에 있어서, 폐길화된 C-펩티드는 하기 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 폐길화된 C-펩티드:



## 청구항 11

청구항 5에 있어서, 폐길화된 C-펩티드는 하기 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 폐길화된 C-펩티드:



여기서  $n_1$ 은 20 내지 800이다.

## 청구항 12

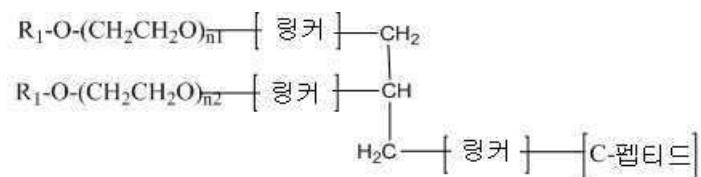
청구항 5에 있어서, 폐길화된 C-펩티드는 하기 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 폐길화된 C-펩티드:



여기서  $n$ 은 20 내지 800이다.

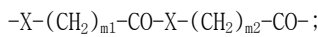
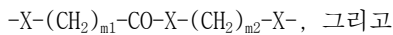
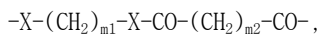
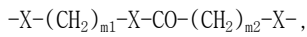
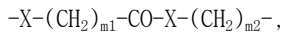
## 청구항 13

청구항 6에 있어서, 폐길화된 C-펩티드는 하기 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 폐길화된 C-펩티드:



여기서 각 링커는 하기에 독립적으로 선택되고;

$$-X-, -CO-, -(CH_2)_{m2}-,$$
$$-(\text{CH}_2)_{m1}-\text{CO}-, \quad -\text{CO}-(\text{CH}_2)_{m1}-,$$
$$-\text{CO}-\text{X}-\text{CO}-, \quad -(\text{CH}_2)_{m1}-\text{X}-(\text{CH}_2)_{m1}-,$$
$$-(\text{CH}_2)_{m1}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{m1}-, -\text{X}-\text{CO}-\text{X}-, -\text{X}-(\text{CH}_2)_{m1}-\text{X}-,$$
$$-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{m_1}-\text{CO}-, \quad -\text{X}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{m_1}-, \quad -(\text{CH}_2)_{m_1}-\text{CO}-\text{X}-,$$
$$-X-(CH_2)_{m1}-CO-X-, \quad -X-CO-(CH_2)_{m1}X-,$$
$$-X-CO-(CH_2)_{m1}-CO-X-(CH_2)_{m1}-X-CO-$$
$$-X-(CH_2)_{m1}-X-CO-(CH_2)_{m2}-,$$



여기서;

각 X는 -O-, -S-, 또는 -NH-에서 독립적으로 선택되거나, 또는 없고;

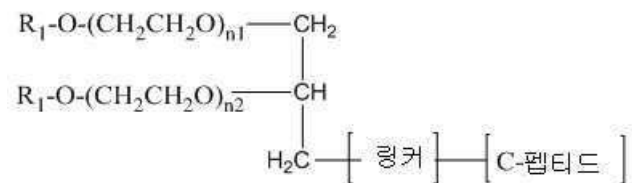
각  $m_1$ 은 독립적으로 0 내지 5이고;

각  $m_2$ 는 독립적으로 1 내지 5이고; 이때 링커는 C-펩티드의 N-말단 아미노기에 부착되고; 그리고

$R_1$ 은 알킬 또는 저급 알킬이고;  $n_1$ 은 20 내지 800이고; 그리고  $n_2$ 은 20 내지 800이다.

#### 청구항 14

청구항 6에 있어서, 페길화된 C-펩티드는 하기 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 페길화된 C-펩티드:

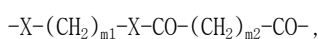
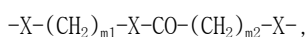
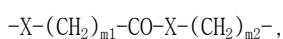
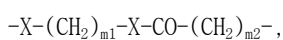
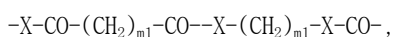
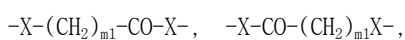
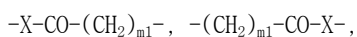
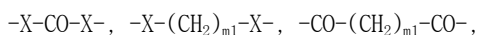
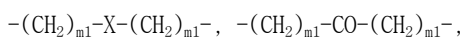
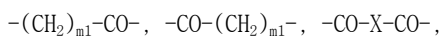
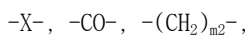


여기서  $R_1$  = 알킬 또는 저급 알킬;

$n_1$ 은 20 내지 800이고;

$n_2$ 는 20 내지 800이고;

링커는 하기에서 선택되고;



$-X-(CH_2)_{m1}-CO-X-(CH_2)_{m2}-X-$ , 그리고

$-X-(CH_2)_{m1}-CO-X-(CH_2)_{m2}-CO-$ ;

여기서 각 X는 -O-, -S-, 또는 -NH-에서 독립적으로 선택되거나, 또는 없고;

각  $m_1$ 은 독립적으로 0 내지 5이고;

각  $m_2$ 는 독립적으로 1 내지 5이고; 이때 링커는 C-펩티드의 N-말단 아미노기에 부착된다.

#### 청구항 15

청구항 14에 있어서, 폐길화된 C-펩티드는 하기에서 선택되는 링커를 포함하는 것을 특징으로 하는 폐길화된 C-펩티드;

$-X_1-(CH_2)_{m4}-CO-$

$-X_1-CO-$ ;

$-X_1-CO-(CH_2)_{m4}-CO-$

$-X_1-CO-X_2-(CH_2)_{m3}-CO-$ ; 그리고

$-X_1-(CH_2)_{m2}-X_2-CO-(CH_2)_{m4}-CO-$ ;

여기서  $X_1$ 은 -O-이거나, 또는 없고;

$X_2$ 는 -NH-이고;

$m_2$ 는 1 내지 5이고;

$m_3$ 은 2이고; 그리고

$m_4$ 는 1 내지 5이다.

#### 청구항 16

청구항 14에 있어서, 폐길화된 C-펩티드는 하기에서 선택되는 링커를 포함하는 것을 특징으로 하는 폐길화된 C-펩티드;

$-X_1-CO-X_2-(CH_2)_{m5}-X_1-(CH_2-CH_2-O)_{n3}-X-$ ,

$-X_1-CO-X_2-(CH_2)_{m5}-X_1-(CH_2-CH_2-O)_{n3}-(CH_2)_{m5}-CO-$ ,

$-X_1-CO-X_2-(CH_2)_{m5}-X_1-(CH_2-CH_2-O)_{n3}-CO-$ , 그리고

$-X_1-CO-X_2-(CH_2)_{m5}-X_1-(CH_2-CH_2-O)_{n3}-CO-(CH_2)_{m5}-CO-$ ;

여기서;

X는 -O-, -S-, 또는 -NH-에서 독립적으로 선택되거나, 또는 없고;

$X_1$ 은 -O-이거나, 또는 없고;

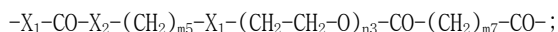
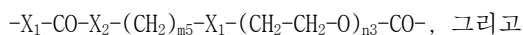
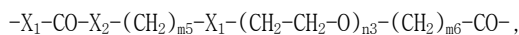
$X_2$ 는 -NH-이고;

각  $m_5$ 는 1 내지 5에서 독립적으로 선택되고; 그리고

각  $n_3$ 은 1 내지 400에서 독립적으로 선택된다.

### 청구항 17

청구항 14에 있어서, 폐길화된 C-펩티드는 하기에서 선택되는 링커를 포함하는 것을 특징으로 하는 폐길화된 C-펩티드;



여기서  $X_1$ 은 -O-이거나, 또는 없고;

$X_2$ 는 -NH-이고;

$m_5$ 는 3이고;

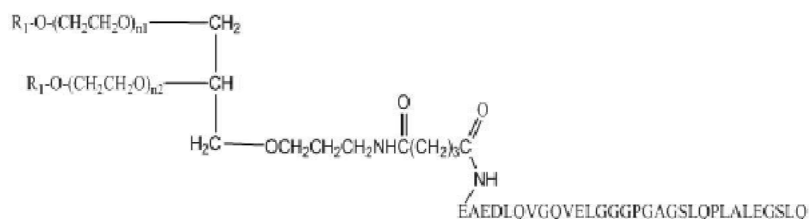
$m_6$ 은 독립적으로 2 또는 5이고;

$m_7$ 은 3이고; 그리고

$n_3$ 은 1 내지 400이다.

### 청구항 18

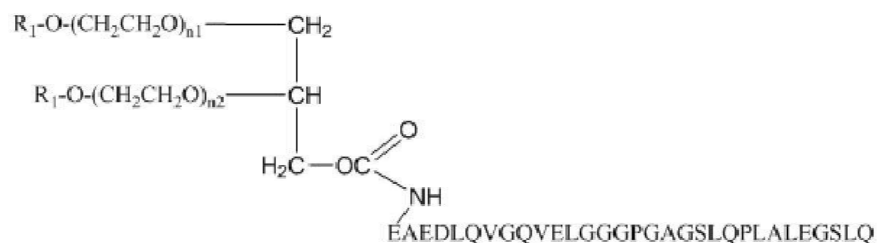
하기 구조를 갖는 폐길화된 C-펩티드:



여기서  $R_1$ 은 메틸이고, 그리고  $n_1$ 과  $n_2$ 는 약 400 내지 500의 범위 내에 있고, 그리고 PEG 모이어티는 약 40 kDa의 분자량을 갖는다.

### 청구항 19

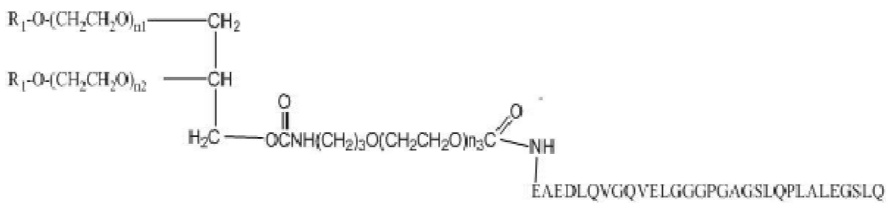
청구항 15에 있어서, 폐길화된 C-펩티드는 하기 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 폐길화된 C-펩티드:



여기서  $R_1$ 은 메틸이고, 그리고  $n_1$ 과  $n_2$ 는 약 400 내지 500의 범위 내에 있고, 그리고 PEG 모이어티는 약 40 kDa의 분자량을 갖는다.

## 청구항 20

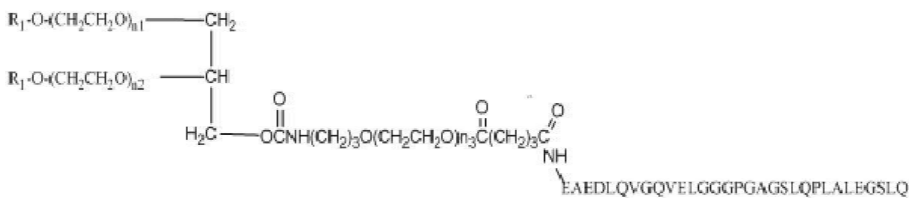
청구항 16에 있어서, 폐길화된 C-펩티드는 하기 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 폐길화된 C-펩티드:



여기서  $R_1$ 은 메틸이고, 그리고  $n_1$ 과  $n_2$ 는 약 400 내지 500의 범위 내에 있고, 그리고 PEG 모이어티는 약 40 kDa의 분자량을 갖는다.

## 청구항 21

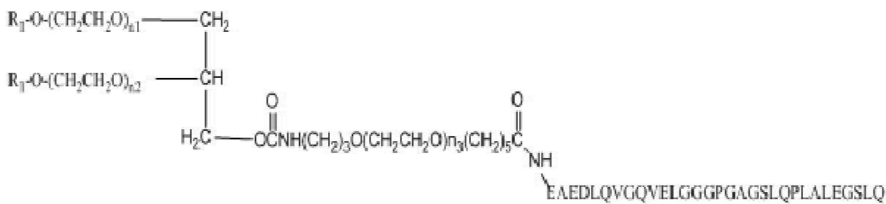
청구항 17에 있어서, 폐길화된 C-펩티드는 하기 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 폐길화된 C-펩티드:



여기서  $R_1$ 은 메틸이고, 그리고  $n_1$ 과  $n_2$ 는 약 400 내지 500의 범위 내에 있고, 그리고 PEG 모이어티는 약 40 kDa의 분자량을 갖는다.

## 청구항 22

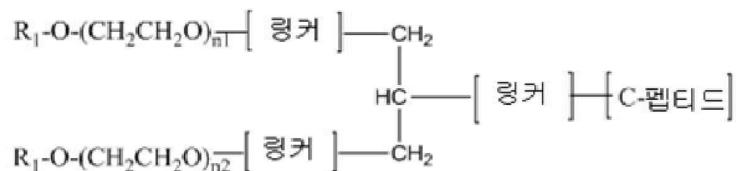
청구항 18에 있어서, 폐길화된 C-펩티드는 하기 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 폐길화된 C-펩티드:



여기서  $R_1$ 은 메틸이고, 그리고  $n_1$ 과  $n_2$ 는 약 400 내지 500의 범위 내에 있고, 그리고 PEG 모이어티는 약 40 kDa의 분자량을 갖는다.

## 청구항 23

청구항 6에 있어서, 폐길화된 C-펩티드는 하기 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 폐길화된 C-펩티드:



여기서 각 링커는 하기에서 독립적으로 선택되고;

$-X-$ ,  $-CO-$ ,  $-(CH_2)_{m2}-$ ,

$-(CH_2)_{m1}-CO-$ ,  $-CO-(CH_2)_{m1}-$ ,  $-CO-X-CO-$ ,



$-(CH_2)_{m1}-X-(CH_2)_{m1}-$ ,  $-(CH_2)_{m1}-CO-(CH_2)_{m1}-$ ,  
 $-X-CO-X-$ ,  $-X-(CH_2)_{m1}-X-$ ,  $-CO-(CH_2)_{m1}-CO-$ ,  
 $-X-CO-(CH_2)_{m1}-$ ,  $-(CH_2)_{m1}-CO-X-$ ,  
 $-X-(CH_2)_{m1}-CO-X-$ ,  $-X-CO-(CH_2)_{m1}X-$ ,  
 $-X-CO-(CH_2)_{m1}-CO--X-(CH_2)_{m1}-X-CO-$ ,  
 $-X-(CH_2)_{m1}-X-CO-(CH_2)_{m2}-$ ,  
 $-X-(CH_2)_{m1}-CO-X-(CH_2)_{m2}-$ ,  
 $-X-(CH_2)_{m1}-X-CO-(CH_2)_{m2}-X-$ ,  
 $-X-(CH_2)_{m1}-X-CO-(CH_2)_{m2}-CO-$ ,  
 $-X-(CH_2)_{m1}-CO-X-(CH_2)_{m2}-X-$ , 그리고  
 $-X-(CH_2)_{m1}-CO-X-(CH_2)_{m2}-CO-$ ;

여기서 각 X는 -O-, -S-, 또는 -NH-에서 독립적으로 선택되거나, 또는 없고;

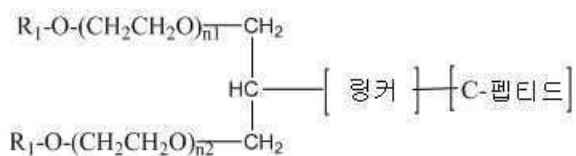
각  $m_1$ 은 독립적으로 0 내지 5이고;

각  $m_2$ 는 독립적으로 1 내지 5이고; 이때 링커는 C-펩티드의 N-말단 아미노기에 부착되고, 그리고;

여기서  $R_1$ 은 알킬 또는 저급 알킬이고,  $n_1$ 은 20 내지 800이고, 그리고  $n_2$ 은 20 내지 800이다.

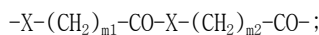
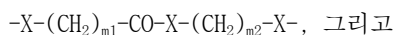
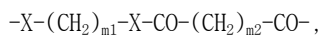
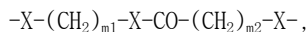
#### 청구항 24

청구항 6에 있어서, 페길화된 C-펩티드는 하기 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 페길화된 C-펩티드:



여기서 링커는 하기에서 선택되고;

$-X-$ ,  $-CO-$ ,  $-(CH_2)_{m2}-$ ,  
 $-(CH_2)_{m1}-CO-$ ,  $-CO-(CH_2)_{m1}-$ ,  $-CO-X-CO-$ ,  
 $-(CH_2)_{m1}-X-(CH_2)_{m1}-$ ,  $-(CH_2)_{m1}-CO-(CH_2)_{m1}-$ ,  
 $-X-CO-X-$ ,  $-X-(CH_2)_{m1}-X-$ ,  $-CO-(CH_2)_{m1}-CO-$ ,  
 $-X-CO-(CH_2)_{m1}-$ ,  $-(CH_2)_{m1}-CO-X-$ ,  
 $-X-(CH_2)_{m1}-CO-X-$ ,  $-X-CO-(CH_2)_{m1}X-$ ,  
 $-X-CO-(CH_2)_{m1}-CO--X-(CH_2)_{m1}-X-CO-$ ,  
 $-X-(CH_2)_{m1}-X-CO-(CH_2)_{m2}-$ ,  
 $-X-(CH_2)_{m1}-CO-X-(CH_2)_{m2}-$ ,



여기서 각 X는 -O-, -S-, 또는 -NH-에서 독립적으로 선택되거나, 또는 없고;

각  $m_1$ 은 독립적으로 0 내지 5이고;

각  $m_2$ 는 독립적으로 1 내지 5이고; 이때 링커는 C-펩티드의 N-말단 아미노기에 부착되고, 그리고;

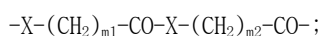
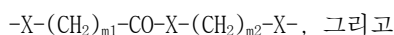
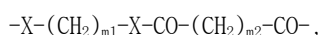
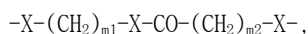
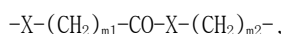
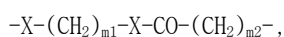
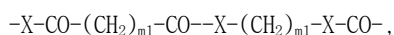
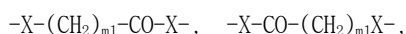
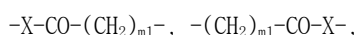
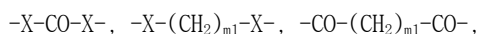
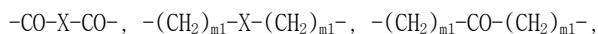
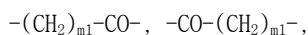
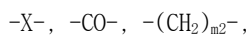
여기서  $R_1$ 은 알킬 또는 저급 알킬이고,  $n_1$ 은 20 내지 800이고, 그리고  $n_2$ 은 20 내지 800이다.

## 청구항 25

청구항 6에 있어서, 폐길화된 C-펩티드는 하기 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 폐길화된 C-펩티드:



여기서 각 링커는 하기에서 독립적으로 선택되고;



여기서;

각 X는 -O-, -S-, 또는 -NH-에서 독립적으로 선택되거나, 또는 없고;

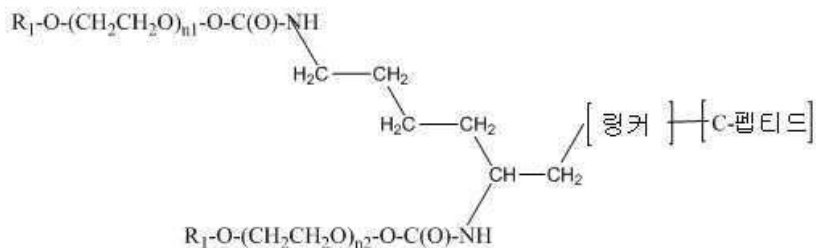
각  $m_1$ 은 독립적으로 0 내지 5이고;

각  $m_2$ 는 독립적으로 1 내지 5이고; 이때 링커는 C-펩티드의 N-말단 아미노기에 부착되고, 그리고;

여기서  $R_1$ 은 알킬 또는 저급 알킬이고,  $n_1$ 은 20 내지 800이고, 그리고  $n_2$ 는 20 내지 800이다.

## 청구항 26

청구항 6에 있어서, 폐길화된 C-펩티드는 하기 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 폐길화된 C-펩티드:



여기서 링커는 하기에서 선택되고:

$-X-$ ,  $-CO-$ ,  $-(CH_2)_{m_2}-$ ,

$-(CH_2)_{m_1}-CO-$ ,  $-CO-(CH_2)_{m_1}-$ ,

$-CO-X-CO-$ ,  $-(CH_2)_{m_1}-X-(CH_2)_{m_1}-$ ,

$-(CH_2)_{m_1}-CO-(CH_2)_{m_1}-$ ,

$-X-CO-X-$ ,  $-X-(CH_2)_{m_1}-X-$ ,

$-CO-(CH_2)_{m_1}-CO-$ ,  $-X-CO-(CH_2)_{m_1}-$ ,

$-(CH_2)_{m_1}-CO-X-$ ,  $-X-(CH_2)_{m_1}-CO-X-$ ,

$-X-CO-(CH_2)_{m_1}X-$ ,

$-X-CO-(CH_2)_{m_1}-CO--X-(CH_2)_{m_1}-X-CO-$ ,

$-X-(CH_2)_{m_1}-X-CO-(CH_2)_{m_2}-$ ,  $-X-(CH_2)_{m_1}-CO-X-(CH_2)_{m_2}-$ ,

$-X-(CH_2)_{m_1}-X-CO-(CH_2)_{m_2}-X-$ ,

$-X-(CH_2)_{m_1}-X-CO-(CH_2)_{m_2}-CO-$ ,

$-X-(CH_2)_{m_1}-CO-X-(CH_2)_{m_2}-X-$ , 그리고

$-X-(CH_2)_{m_1}-CO-X-(CH_2)_{m_2}-CO-$ ;

여기서;

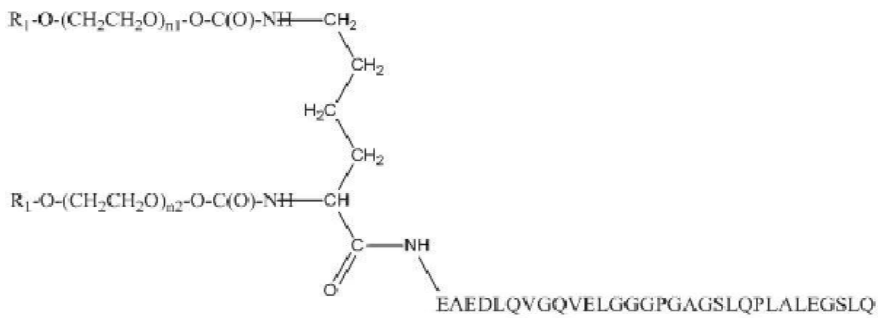
각  $X$ 는  $-O-$ ,  $-S-$ , 또는  $-NH-$ 에서 독립적으로 선택되거나, 또는 없고;

각  $m_1$ 은 독립적으로 0 내지 5이고;

각  $m_2$ 는 독립적으로 1 내지 5이고; 이때 링커는 C-펩티드의 N-말단 아미노기에 부착된다.

## 청구항 27

청구항 26에 있어서, 폐길화된 C-펩티드는 하기 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 폐길화된 C-펩티드:



여기서  $R_1$ 은 메틸이고, 그리고  $n_1$ 과  $n_2$ 는 약 400 내지 500의 범위 내에 있고, 그리고 PEG 모이어티는 약 40 kDa의 분자량을 갖는다.

## 청구항 28

청구항 1 내지 27중 어느 한 항에 있어서, 폐길화된 C-펩티드는 UV 원편광 이색성 분석을 통한 결정에서, 변형되지 않은 C-펩티드와 실질적으로 동일한 이차 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 폐길화된 C-펩티드.

## 청구항 29

청구항 1 내지 28중 어느 한 항에 있어서, 폐길화된 C-펩티드는 개에 피하 투여될 때 변형되지 않은 C-펩티드보다 적어도 10배 큰 혈장 또는 혈청 약물동력학적 AUC 프로필을 갖는 것을 특징으로 하는 폐길화된 C-펩티드.

## 청구항 30

청구항 1 내지 29중 어느 한 항에 있어서, 폐길화된 C-펩티드는 변형되지 않은 C-펩티드의 생물학적 활성의 적어도 약 50%를 유지하는 것을 특징으로 하는 폐길화된 C-펩티드.

## 청구항 31

청구항 1 내지 29중 어느 한 항에 있어서, 폐길화된 C-펩티드는 변형되지 않은 C-펩티드의 생물학적 활성의 적어도 약 75%를 유지하는 것을 특징으로 하는 폐길화된 C-펩티드.

## 청구항 32

3일 또는 그 이상의 투약 간격을 이용할 때 환자의 혈장 내에서 약 0.2 nM 내지 약 6 nM의 폐길화된 C-펩티드의 평균 정지-상태 농도를 지속하는 투약 섭생에 있어서, 청구항 1 내지 31중 어느 한 항의 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량을 환자에 투여하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 투약 섭생.

## 청구항 33

필요 환자에서 C-펩티드 수준을 최소 효과적 치료 수준 이상으로 지속하는 방법에 있어서, 청구항 1 내지 31중 어느 한 항의 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량을 환자에 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 34

필요 환자에서 당뇨병의 하나 또는 그 이상의 장기 합병증을 치료하는 방법에 있어서, 청구항 1 내지 31중 어느 한 항의 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량을 환자에 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 35

청구항 34에 있어서, 당뇨병의 장기 합병증은 망막증, 말초 신경병증, 자율성 신경병증, 그리고 신증으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 36

청구항 35에 있어서, 당뇨병의 장기 합병증은 말초 신경병증인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 37

청구항 36에 있어서, 말초 신경병증은 확립된 말초 신경병증인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 38

청구항 36 또는 37에 있어서, 치료는 폐길화된 C-펩티드 요법을 시작하기 이전에 신경 전도 속도와 비교하여 신경 전도 속도에서 적어도 10 %의 향상을 유발하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 39

당뇨병을 앓는 환자를 치료하는 방법에 있어서, 인슐린과 공동으로 청구항 1 내지 31중 어느 한 항의 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량을 환자에 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 40

인슐린-의존성 인간 환자를 치료하는 방법에 있어서, 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법;

- a) 인슐린을 환자에 투여하는 단계, 여기서 환자는 신경병증을 앓고;
- b) 환자의 인슐린 투여에 이용된 부위와 상이한 부위에서 청구항 1 내지 31중 어느 한 항의 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량을 환자에 피하 투여하는 단계;
- c) 치료 용량의 폐길화된 C-펩티드에 기인하는 환자의 변화된 인슐린 요구의 모니터링에 기초하여 투여되는 인슐린의 복용량, 유형, 또는 빈도를 조정하는 단계, 여기서 인슐린의 조정된 용량은 저혈당증의 위험, 발생률, 또는 심각도를 감소시키고, 여기서 인슐린의 조정된 용량은 폐길화된 C-펩티드 치료를 시작하기 이전에 환자의 인슐린 용량보다 적어도 10% 적다.

#### 청구항 41

청구항 39 또는 40중 어느 한 항에 있어서, 인슐린은 폐길화된 C-펩티드에 가장 최근에 이용된 저장소 부위와 상이한 저장소 부위에서 피하 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 42

청구항 33 내지 41중 어느 한 항에 있어서, 폐길화된 C-펩티드는 약 3일 또는 그 이상의 투약 간격으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 43

청구항 33 내지 41중 어느 한 항에 있어서, 폐길화된 C-펩티드는 약 5일 또는 그 이상의 투약 간격으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 44

청구항 33 내지 41중 어느 한 항에 있어서, 폐길화된 C-펩티드는 약 7일 또는 그 이상의 투약 간격으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 45

청구항 32 내지 44중 어느 한 항에 있어서, 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량은 약 1 mg 내지 약 4.0 mg인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 46

청구항 32 내지 45중 어느 한 항에 있어서, 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량은 약 1 mg인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 47

청구항 32 내지 45중 어느 한 항에 있어서, 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량은 약 3.5 mg인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 48

청구항 33 내지 47중 어느 한 항에 있어서, 폐길화된 C-펩티드의 혈장 농도는 약 0.2 nM 이상으로 지속되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 49

청구항 32 내지 47중 어느 한 항에 있어서, 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량은 피하 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 50

청구항 1 내지 31중 어느 한 항에 있어서, 필요 환자에서 C-펩티드 대체 요법으로서 이용되는 것을 특징으로 하는 폐길화된 C-펩티드.

#### 청구항 51

인슐린의 투여를 추가적으로 포함하는 섭생에서 인슐린 의존성 당뇨병을 앓는 인간 환자에서 저혈당증의 위험을 감소시키기 위한 청구항 1 내지 31중 어느 한 항의 폐길화된 C-펩티드의 용도에 있어서, 상기 섭생은 하기를 포함하는 것을 특징으로 하는 용도;

- a) 인슐린을 환자에 투여;
- b) 환자의 인슐린 투여에 이용된 부위와 상이한 부위에서 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량을 투여;
- c) 치료 용량의 폐길화된 C-펩티드에 기인하는 환자의 변화된 인슐린 요구에 기초하여 투여되는 인슐린의 복용량, 유형, 또는 빈도를 조정.

#### 청구항 52

청구항 51에 있어서, 환자는 당뇨병의 적어도 하나의 장기 합병증을 앓는 것을 특징으로 하는 용도.

#### 청구항 53

필요 환자에서 당뇨병의 하나 또는 그 이상의 장기 합병증을 치료하기 위한 청구항 1 내지 31중 어느 한 항에 따른 폐길화된 C-펩티드의 용도.

#### 청구항 54

청구항 52 또는 53에 있어서, 당뇨병의 장기 합병증은 망막증, 말초 신경병증, 자율성 신경병증, 그리고 신증으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 용도.

#### 청구항 55

청구항 54에 있어서, 당뇨병의 장기 합병증은 말초 신경병증인 것을 특징으로 하는 용도.

#### 청구항 56

청구항 55에 있어서, 말초 신경병증은 확립된 말초 신경병증인 것을 특징으로 하는 용도.

#### 청구항 57

청구항 55 또는 56에 있어서, 치료는 폐길화된 C-펩티드 요법을 시작하기 이전에 신경 전도 속도와 비교하여 신경 전도 속도에서 적어도 10 %의 향상을 유발하는 것을 특징으로 하는 용도.

#### 청구항 58

청구항 1 내지 31중 어느 한 항의 폐길화된 C-펩티드 및 제약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 제약학적 조성물.

#### 청구항 59

청구항 58에 있어서, 제약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제는 소르비톨인 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

#### 청구항 60

청구항 59에 있어서, 소르비톨은 약 2 % 내지 약 8 % wt / wt의 농도로 존재하는 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

#### 청구항 61

청구항 60에 있어서, 소르비톨은 약 4.7 %의 농도로 존재하는 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

#### 청구항 62

청구항 58 내지 61중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 약 pH 5.5 내지 약 pH 6.5의 범위 내에 pH로 완충되는 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

#### 청구항 63

청구항 62에 있어서, 조성물은 약 6.0의 pH로 완충되는 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

#### 청구항 64

청구항 58 내지 63중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 약 5 mM 내지 약 25 mM의 농도에서 인산염 완충액으로 완충되는 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

#### 청구항 65

청구항 64에 있어서, 조성물은 약 10 mM의 농도에서 인산염 완충액으로 완충되는 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

#### 청구항 66

청구항 58 내지 65중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 pH 7.0에서 0.9% 염수에서 보관된 동일한 폐길화된 C-펩티드를 포함하는 제약학적 조성물과 비교하여 청구항 1 내지 31중 어느 한 항에 따른 폐길화된 C-펩티드의 향상된 안정성으로 특징되고, 여기서 안정성은 40℃에서 미리 결정된 시간 동안 항온처리후 결정되는 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

#### 청구항 67

청구항 1 내지 31중 어느 한 항의 폐길화된 C-펩티드 및 인슐린을 포함하는 제약학적 조성물.

#### 청구항 68

인슐린-의존성 인간 환자에서 인슐린 사용량을 감소시키는 방법에 있어서, 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법;

- a) 인슐린을 환자에 투여하는 단계;
- b) 환자의 인슐린 투여에 이용된 부위와 상이한 부위에서 청구항 1 내지 31중 어느 한 항의 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량을 환자에 피하 투여하는 단계;
- c) 치료 용량의 폐길화된 C-펩티드에 기인하는 환자의 변화된 인슐린 요구의 모니터링에 기초하여 투여되는 인슐린의 복용량, 유형, 또는 빈도를 조정하는 단계, 여기서 인슐린의 조정된 용량은 저혈당증을 유도하지 않고, 여기서 인슐린의 조정된 용량은 폐길화된 C-펩티드 치료를 시작하기 이전에 환자의 인슐린 용량보다 적어도 10% 적다.

## 명세서

### 기술분야

- [0001] 관련된 출원에 대한 교차 참조
- [0002] 본 출원은 2010년 5월 17일자 제출된 United States 특허가출원 No. 61/345,293 및 2011년 3월 2일자 제출된 United States 특허가출원 61/448,402에 우선권을 주장하고, 이들의 내용은 본 발명에 전체로서 참고문헌으로 편입된다.
- [0003] 본 발명의 배경
- [0004] 본 발명의 기술 분야
- [0005] 본 발명은 C-펩티드의 변형된 형태, 그리고 이들의 이용 방법에 관계한다. 한 양태에서, C-펩티드의 변형된 형태는 N-말단에 부착된 적어도 하나의 PEG 기를 포함하는 폐길화된 C-펩티드 유도체를 포함하고, 이들 유도체는 생체내에서 우수한 약물동력학적 및 생물학적 활성을 나타낸다.

### 배경 기술

- [0006] C-펩티드는 프로인슐린 (proinsuline) 분자에서 A-와 B-사슬 사이에 연결 펩티드이다. 췌장 섬  $\beta$ -세포의 소포체에서 개열과 가공후, 인슐린과 C-펩티드가 산출된다. C-펩티드는 췌장 섬  $\beta$ -세포로부터 문맥 순화 (portal circulation) 내로 등몰량 (equimolar amount)으로 인슐린과 공동-분비된다. 2-사슬 인슐린 구조의 접힘 (folding)에 대한 기여 이외에, C-펩티드의 추가적인 생물학적 활성이 이의 발견후 수년 동안 탐구되었다.
- [0007] 1형 당뇨병, 또는 인슐린-의존성 진성 당뇨병은 일반적으로, 췌장 섬  $\beta$ -세포의 자가면역 파괴 (autoimmune destruction)로 인하여 인슐린과 C-펩티드 결핍으로 특징된다. 이런 이유로, 이들 환자는 생명을 유지하기 위해 외인성 인슐린에 의존한다. 질환의 병인에 여러 인자, 예를 들면, 유전적 배경 (genetic background), 환경 인자 (environmental factor), 그리고 일시적 감염 이후에 공격적 자가면역 반응 (aggressive autoimmune response)이 중요할 수 있다 (Akerblom HK et al.: *Annual Medicine* 29(5): 383-385, (1997)). 현재, 인슐린-의존성 당뇨병은 C-펩티드로부터 분리된 외인성 인슐린이 제공되고, 따라서 외인성 C-펩티드 요법을 받지 않는다. 대조적으로, 대부분의 2형 당뇨병은 초기에, 인슐린과 C-펩티드 둘 모두를 내생적으로 여전히 생산하지만, 일반적으로 골격근 (skeletal muscle)과 지방 조직 (adipose tissue)에서 인슐린 내성 (insulin resistance)으로 특징된다.
- [0008] 1형 당뇨병은 많은 경우에, 2형 당뇨병에서보다 심각하고 만연하는 당뇨병의 일단의 장기 합병증을 앓는다. 구체적으로, 예로써 망막, 신장, 그리고 신경을 침범하는 미세혈관 합병증은 1형 당뇨병을 앓는 환자에서 이환율 (morbidity)과 사망률(mortality)의 주요 원인이다. C-펩티드 결핍이 인슐린-의존성 당뇨병의 장기 합병증의 발생에서 일정한 역할을 할 수 있다는 개념에 대한 증거가 증가하고 있다. 부가적으로, 당뇨병 동물 모델 및 1형 당뇨병을 앓는 환자에서 생체내와 시험관내 연구는 C-펩티드가 호르몬 활성을 갖는다는 것을 증명한다 (Wahren J et al.: *American Journal of Physiology* 278: E759-E768, (2000); Wahren J et al.: In *International textbook of diabetes mellitus* Ferranninni E, Zimmet P, De Fronzo RA, Keen H, Eds. Chichester, John Wiley & Sons, (2004), p. 165-182). 따라서 정규 인슐린 요법에 대한 보완제로서 이용되는 C-펩티드는 1형 당뇨병 장기 합병증의 관리에 효과적 접근법을 제공할 수 있다.
- [0009] 현재까지의 연구는 C-펩티드의 치료 활성이 G-단백질-결합된 막 수용체에 C-펩티드의 결합,  $Ca^{2+}$ -의존성 세포내 신호전달 경로의 활성화, 그리고 MAP-키나아제 시스템의 인산화, 나트륨 / 칼륨 ATPase 및 내피 산화질소 합성 효소 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS)의 증가된 활성의 유도를 수반한다는 것을 암시한다. 인슐린-의존성 당뇨병의 장기 합병증을 치료하고 예방하기 위해 C-펩티드를 이용하는 장래성에도 불구하고, 짧은 생물학적 반감기 및 피하 주사, 또는 정맥내 (I.V.) 투여를 통해 하루 수회 C-펩티드를 투약해야 하는 요구는 상업적 개발을 방해해왔다.
- [0010] 본 발명은 고유 C-펩티드의 생물학적 활성을 유지하고, 그리고 우수한 약물동력학적 성질을 나타내는 C-펩티드의 폐길화된 이형의 개발에 집중된다. C-펩티드의 이들 향상된 치료 형태는 당뇨병의 장기 합병증의 치료를 위



한 더욱 효과적 치료 섭생의 개발을 가능하게 하고, 그리고 훨씬 낮은 빈도의 투여를 요구한다.

[0011] 한 양태에서, 이들 요법은 당뇨병 환자, 그리고 진전된 양태에서, 인슐린-의존성 환자에 표적화된다. 한 양태에서, 인슐린-의존성 환자는 당뇨병의 하나 또는 그 이상의 장기 합병증을 앓는다.

[0012] 이들 향상된 방법은 놀랍게도, C-펩티드 분자의 N-말단에서 C-펩티드의 변형이 매우 우수한 약물동력학적 특징을 나타내면서 고유 분자의 생물학적 활성을 유지하는 C-펩티드의 폐길화된 이형을 유발한다는 것을 증명하는 동물 연구에 기초된다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

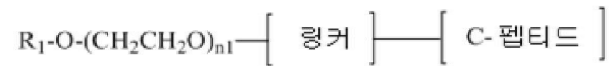
[0013] 본 발명의 요약

[0014] 한 구체예에서, 본 발명은 C-펩티드의 N-말단에 공유 부착된 PEG 모이어티를 포함하는 폐길화된 C-펩티드를 포함한다. 한 양태에서, 본 발명의 폐길화된 C-펩티드는 선형 중합체 PEG 중합체를 포함한다. 다른 양태에서, 본 발명의 폐길화된 C-펩티드는 가지형 사슬 PEG 중합체를 포함한다.

[0015] 이들 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 다른 양태에서, PEG 모이어티는 약 10 kDa 내지 약 80 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 양태에서, PEG 모이어티는 약 20 kDa 내지 약 60 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 양태에서, PEG 모이어티는 약 30 kDa 내지 약 50 kDa의 분자량을 갖는다.

[0016] 이들 선형 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 하기 일반식(I)을 갖는다:

[일반식 I]



[0018] 여기서  $R_1$  = 알킬;

[0020]  $n_1$ 은 20 내지 800이고;

[0021] 링커는 하기에서 선택되고;  $-X-$ ,  $-CO-$ ,  $-(CH_2)_{m_2}-$ ,

[0022]  $-(CH_2)_{m_1}-CO-$ ,  $-CO-(CH_2)_{m_1}-$ ,

[0023]  $-CO-X-CO-$ ,  $-(CH_2)_{m_1}-X-(CH_2)_{m_1}-$ ,

[0024]  $-(CH_2)_{m_1}-CO-(CH_2)_{m_1}-$ ,  $-X-CO-X-$ ,

[0025]  $-X-(CH_2)_{m_1}-X-$ ,  $-CO-(CH_2)_{m_1}-CO-$ ,

[0026]  $-X-CO-(CH_2)_{m_1}-$ ,  $-(CH_2)_{m_1}-CO-X-$ ,

[0027]  $-X-(CH_2)_{m_1}-CO-X-$ ,  $-X-CO-(CH_2)_{m_1}X-$ ,

[0028]  $-X-CO-(CH_2)_{m_1}-CO-X-(CH_2)_{m_1}-X-CO-$ ,

[0029]  $-X-(CH_2)_{m_1}-X-CO-(CH_2)_{m_2}-$ ,

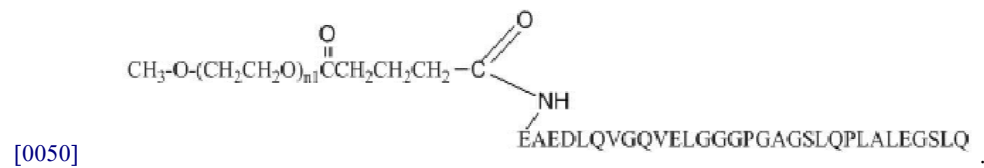
[0030]  $-X-(CH_2)_{m_1}-CO-X-(CH_2)_{m_2}-$ ,

[0031]  $-X-(CH_2)_{m_1}-X-CO-(CH_2)_{m_2}-X-$ ,

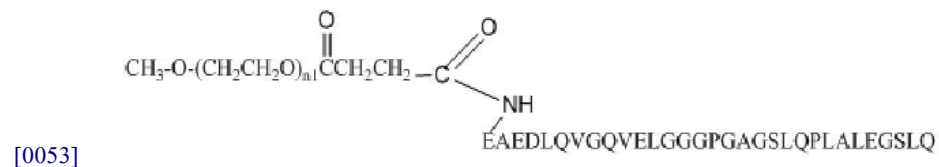
[0032]  $-X-(CH_2)_{m_1}-X-CO-(CH_2)_{m_2}-CO-$ ,

[0033]  $-X-(CH_2)_{m_1}-CO-X-(CH_2)_{m_2}-X-$ , 그리고

- [0034]  $-X-(CH_2)_{m1}-CO-X-(CH_2)_{m2}-CO-$ ;
- [0035] 여기서 각 X는 -O-, -S-, 또는 -NH-에서 독립적으로 선택되거나, 또는 없고;
- [0036] 각  $m_1$ 은 독립적으로 0 내지 5이고;
- [0037] 각  $m_2$ 는 독립적으로 1 내지 5이고; 이때 링커는 C-펩티드의 N-말단 아미노기에 부착된다.
- [0038] 이들 선형 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 하기에서 선택되는, PEG 모이어티를 C-펩티드에 연결하는 링커를 포함한다;
- [0039]  $-X_1-(CH_2)_{m4}-CO-$ ;
- [0040]  $-X_1-CO-$ ;
- [0041]  $-X_1-CO-(CH_2)_{m4}-CO-$ ;
- [0042]  $-X_1-CO-X_2-(CH_2)_{m3}-CO-$ ; 그리고
- [0043]  $-X_1-(CH_2)_{m2}-X_2-CO-(CH_2)_{m4}-CO-$ ;
- [0044] 여기서  $X_1$ 은 -O-이거나, 또는 없고;
- [0045]  $X_2$ 는 -NH-이고;
- [0046]  $m_2$ 는 1 내지 5이고;
- [0047]  $m_3$ 은 2이고; 그리고
- [0048]  $m_4$ 는 2 내지 5이다.
- [0049] 다른 구체예에서, 본 발명은 폐길화된 C-펩티드를 포함하고, 여기서 폐길화된 C-펩티드는 하기 구조를 갖는다:

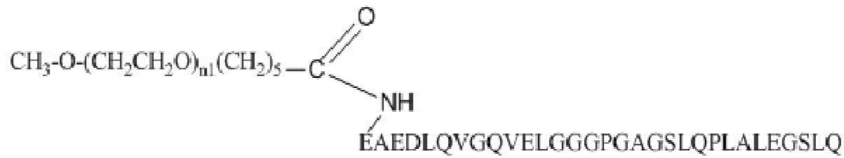


- [0051] 여기서  $n_1$ 은 약 400 내지 약 1000이다.
- [0052] 다른 구체예에서, 본 발명은 폐길화된 C-펩티드를 포함하고, 여기서 폐길화된 C-펩티드는 하기 구조를 갖는다:



- [0054] 여기서  $n_1$ 은 약 400 내지 약 1000이다.

[0055] 다른 구체예에서, 본 발명은 폐길화된 C-펩티드를 포함하고, 여기서 폐길화된 C-펩티드는 하기 구조를 갖는다:



[0056]

[0057] 다른 구체예에서, 본 발명은 폐길화된 C-펩티드를 포함하고, 여기서 폐길화된 C-펩티드는 하기 구조를 갖는다:

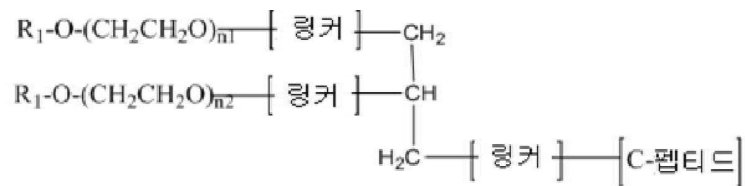


[0058]

[0059] 여기서 n은 약 400 내지 약 1000이다.

[0060] 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 일반식 (II)의 가지형 사슬 PEG를 포함한다:

[0061] [일반식 II]



[0062]

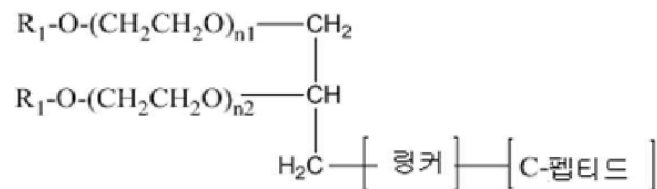
[0063] 여기서;

[0064] R<sub>1</sub> = 알킬;

[0065] n<sub>1</sub>은 20 내지 800이고;

[0066] n<sub>2</sub>는 20 내지 800이고; 이때 각 링커는 하기와 같이 독립적으로 정의되고, 그리고 여기서 C-펩티드에 연결하는 링커는 C-펩티드의 N-말단 아미노기에 부착된다.

[0067] 다른 구체예에서, 본 발명은 폐길화된 C-펩티드를 포함하고, 여기서 폐길화된 C-펩티드는 일반식 (IIA)의 구조를 갖는다:



[0068]

[0069] 여기서 R<sub>1</sub> = 알킬;

[0070] n<sub>1</sub>은 20 내지 800이고;

[0071] n<sub>2</sub>는 20 내지 800이고;

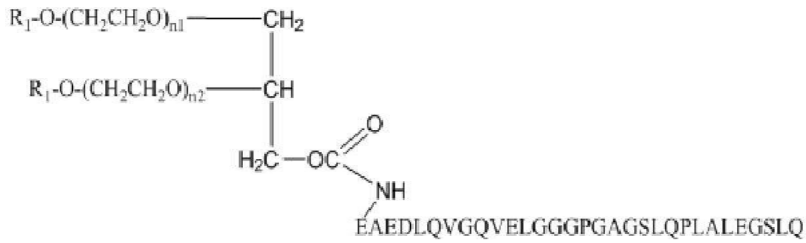
[0072] 링커는 하기에서 선택되고;

[0073] -X-, -CO-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m2</sub>-,

- [0074]  $-(\text{CH}_2)_{m1}-\text{CO}-$ ,  $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{m1}-$ ,  $-\text{CO}-\text{X}-\text{CO}-$ ,
- [0075]  $-(\text{CH}_2)_{m1}-\text{X}-(\text{CH}_2)_{m1}-$ ,  $-(\text{CH}_2)_{m1}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{m1}-$ ,
- [0076]  $-\text{X}-\text{CO}-\text{X}-$ ,  $-\text{X}-(\text{CH}_2)_{m1}-\text{X}-$ ,  $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{m1}-\text{CO}-$ ,
- [0077]  $-\text{X}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{m1}-$ ,  $-(\text{CH}_2)_{m1}-\text{CO}-\text{X}-$ ,
- [0078]  $-\text{X}-(\text{CH}_2)_{m1}-\text{CO}-\text{X}-$ ,  $-\text{X}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{m1}\text{X}-$ ,
- [0079]  $-\text{X}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{m1}-\text{CO}-\text{X}-(\text{CH}_2)_{m1}-\text{X}-\text{CO}-$ ,
- [0080]  $-\text{X}-(\text{CH}_2)_{m1}-\text{X}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{m2}-$ ,
- [0081]  $-\text{X}-(\text{CH}_2)_{m1}-\text{CO}-\text{X}-(\text{CH}_2)_{m2}-$ ,
- [0082]  $-\text{X}-(\text{CH}_2)_{m1}-\text{X}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{m2}-\text{X}-$ ,
- [0083]  $-\text{X}-(\text{CH}_2)_{m1}-\text{X}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{m2}-\text{CO}-$ ,
- [0084]  $-\text{X}-(\text{CH}_2)_{m1}-\text{CO}-\text{X}-(\text{CH}_2)_{m2}-\text{X}-$ , 그리고
- [0085]  $-\text{X}-(\text{CH}_2)_{m1}-\text{CO}-\text{X}-(\text{CH}_2)_{m2}-\text{CO}-$ ;
- [0086] 여기서 각 X는 -O-, -S-, 또는 -NH-에서 독립적으로 선택되거나, 또는 없고;
- [0087] 각  $m_1$ 은 독립적으로 0 내지 5이고;
- [0088] 각  $m_2$ 는 독립적으로 1 내지 5이고; 이때 링커는 C-펩티드의 N-말단 아미노기에 부착된다.
- [0089] 이들 가지형 사슬 폐결화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐결화된 C-펩티드는 하기에서 선택되는, PEG 모이어티를 C-펩티드에 연결하는 링커를 포함한다;
- [0090]  $-\text{X}_1-(\text{CH}_2)_{m4}-\text{CO}-$
- [0091]  $-\text{X}_1-\text{CO}-$ ;
- [0092]  $-\text{X}_1-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{m4}-\text{CO}-$
- [0093]  $-\text{X}_1-\text{CO}-\text{X}_2-(\text{CH}_2)_{m3}-\text{CO}-$ ; 그리고
- [0094]  $-\text{X}_1-(\text{CH}_2)_{m2}-\text{X}_2-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{m4}-\text{CO}-$ ;
- [0095] 여기서  $\text{X}_1$ 은 -O-이거나, 또는 없고;
- [0096]  $\text{X}_2$ 는 -NH-이고;
- [0097]  $m_2$ 는 1 내지 5이고;
- [0098]  $m_3$ 은 2이고; 그리고
- [0099]  $m_4$ 는 1 내지 5이다.
- [0100] 이들 가지형 사슬 폐결화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐결화된 C-펩티드는 하기에서 선택되는, PEG 모이어티를 C-펩티드에 연결하는 링커를 포함한다;



[0127] 다른 구체예에서, 본 발명은 폐길화된 C-펩티드를 포함하고, 여기서 폐길화된 C-펩티드는 하기 구조를 갖는다:



[0128]

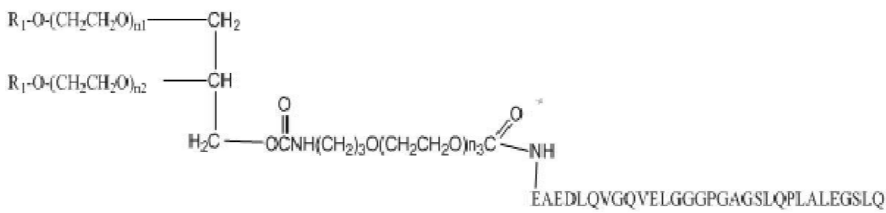
[0129] 여기서;

[0130]  $R_1$  = 알킬;

[0131]  $n_1$ 은 200 내지 800이고; 그리고

[0132]  $n_2$ 는 200 내지 800이다.

[0133] 다른 구체예에서, 본 발명은 폐길화된 C-펩티드를 포함하고, 여기서 폐길화된 C-펩티드는 하기 구조를 갖는다:



[0134]

[0135] 여기서;

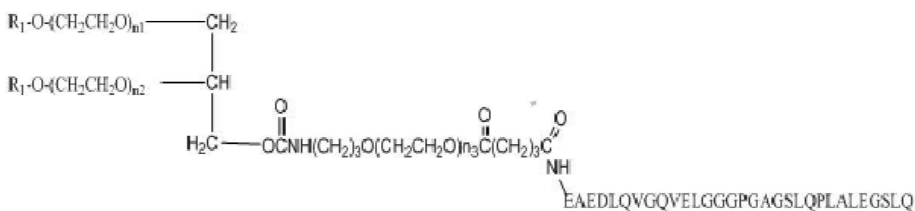
[0136]  $R_1$  = 알킬;

[0137]  $n_1$ 은 200 내지 800이고;

[0138]  $n_2$ 는 200 내지 800이고; 그리고

[0139]  $n_3$ 은 1 내지 400이다.

[0140] 다른 구체예에서, 본 발명은 폐길화된 C-펩티드를 포함하고, 여기서 폐길화된 C-펩티드는 하기 구조를 갖는다:



[0141]

[0142] 여기서;

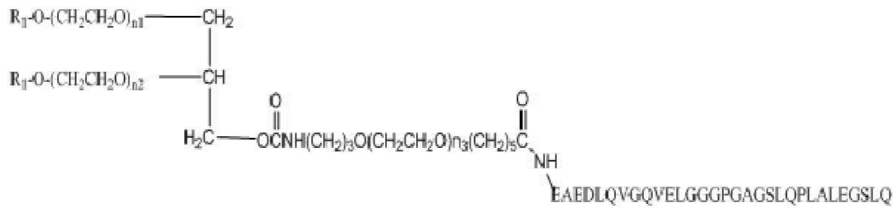
[0143]  $R_1$  = 알킬;

[0144]  $n_1$ 은 200 내지 800이고;

[0145]  $n_2$ 는 200 내지 800이고; 그리고

[0146]  $n_3$ 은 1 내지 400이다.

[0147] 다른 구체예에서, 본 발명은 폐길화된 C-펩티드를 포함하고, 여기서 폐길화된 C-펩티드는 하기 구조를 갖는다:



[0148]

[0149] 여기서;

[0150]  $R_1$  = 알킬;

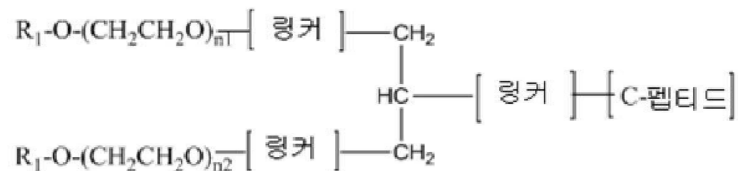
[0151]  $n_1$ 은 200 내지 800이고;

[0152]  $n_2$ 는 200 내지 800이고; 그리고

[0153]  $n_3$ 은 1 내지 400이다.

[0154] 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 일반식 (III)의 가지형 사슬 PEG를 포함한다:

[0155] [일반식 III]



[0156]

[0157] 여기서;

[0158]  $R_1$  = 알킬;

[0159]  $n_1$ 은 20 내지 800이고;

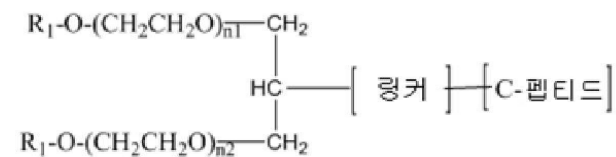
[0160]  $n_2$ 는 20 내지 800이고; 그리고

[0161] 여기서 각 링커는 하기와 같이 독립적으로 정의되고, 그리고

[0162] 여기서 C-펩티드에 연결하는 링커는 C-펩티드의 N-말단 아미노기에 부착된다.

[0163] 일반식 (III)의 폐길화된 C-펩티드의 한 구체예에서, 폐길화된 C-펩티드는 일반식 (III A)를 갖는다:

[0164] [일반식 IIIA]



[0165]

[0166] 여기서;

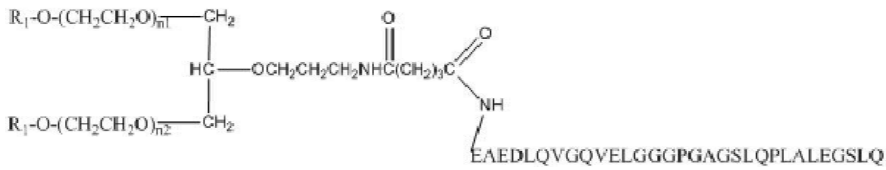
[0167]  $R_1$  = 알킬;

[0168]  $n_1$ 은 20 내지 800이고;

[0169]  $n_2$ 는 20 내지 800이고; 그리고

[0170] 여기서 링커는 하기와 같이 정의되고, 그리고 C-펩티드의 N-말단 아미노기에 부착된다.

[0171] 다른 구체예에서, 본 발명은 폐길화된 C-펩티드를 포함하고, 여기서 폐길화된 C-펩티드는 하기 구조를 갖는다:



[0172]

[0173] 여기서;

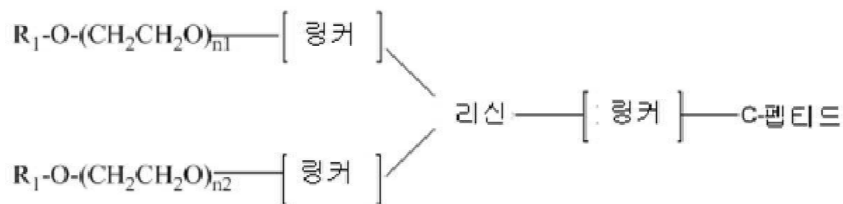
[0174]  $R_1$  = 알킬;

[0175]  $n_1$ 은 200 내지 800이고; 그리고

[0176]  $n_2$ 는 200 내지 800이다.

[0177] 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 일반식 (IV)의 가지형 사슬 PEG를 포함한다:

[0178] [일반식 IV]



[0179]

[0180] 여기서;

[0181]  $R_1$  = 알킬;

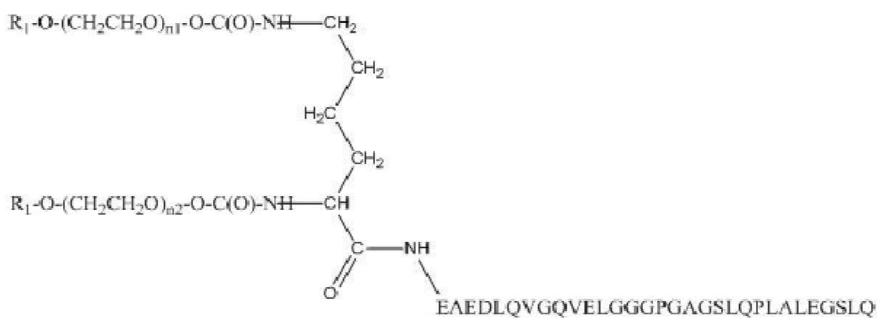
[0182]  $n_1$ 은 20 내지 800이고;

[0183]  $n_2$ 는 20 내지 800이고;

[0184] 여기서 각 링커는 하기와 같이 독립적으로 정의되고;

[0185] 여기서 리신 잔기를 C-펩티드에 연결하는 링커는 C-펩티드의 N-말단 아미노기 및 리신 잔기의 C-말단 카르복실레이트 기에 부착되고, 이때 리신 모이어터를 PEG 모이어터에 연결하는 링커는 리신 분자의 아미노기를 통해 연결된다.

[0186] 다른 구체예에서, 본 발명은 폐길화된 C-펩티드를 포함하고, 여기서 폐길화된 C-펩티드는 하기 구조를 갖는다:



[0187]

[0188] 여기서;

[0189]  $R_1$  = 알킬;



- [0190]  $n_1$ 은 200 내지 800이고; 그리고
- [0191]  $n_2$ 는 200 내지 800이다.
- [0192] 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 일정한 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 개에 피하 투여될 때 변형되지 않은 C-펩티드보다 적어도 약 5-배 큰 혈장 또는 혈청 약물동력학적 AUC 프로필을 갖는다.
- [0193] 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 일정한 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 개에 피하 투여될 때 변형되지 않은 C-펩티드보다 적어도 약 6-배 큰 혈장 또는 혈청 약물동력학적 AUC 프로필을 갖는다.
- [0194] 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 일정한 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 개에 피하 투여될 때 변형되지 않은 C-펩티드보다 적어도 약 7-배 큰 혈장 또는 혈청 약물동력학적 AUC 프로필을 갖는다.
- [0195] 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 일정한 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 개에 피하 투여될 때 변형되지 않은 C-펩티드보다 적어도 약 8-배 큰 혈장 또는 혈청 약물동력학적 AUC 프로필을 갖는다.
- [0196] 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 일정한 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 개에 피하 투여될 때 변형되지 않은 C-펩티드보다 적어도 약 10-배 큰 혈장 또는 혈청 약물동력학적 AUC 프로필을 갖는다.
- [0197] 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 일정한 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 개에 피하 투여될 때 변형되지 않은 C-펩티드보다 적어도 약 15-배 큰 혈장 또는 혈청 약물동력학적 AUC 프로필을 갖는다.
- [0198] 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 일정한 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 개에 피하 투여될 때 변형되지 않은 C-펩티드보다 적어도 약 20-배 큰 혈장 또는 혈청 약물동력학적 AUC 프로필을 갖는다.
- [0199] 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 일정한 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 개에 피하 투여될 때 변형되지 않은 C-펩티드보다 적어도 약 25-배 큰 혈장 또는 혈청 약물동력학적 AUC 프로필을 갖는다.
- [0200] 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 일정한 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 개에 피하 투여될 때 변형되지 않은 C-펩티드보다 적어도 약 50-배 큰 혈장 또는 혈청 약물동력학적 AUC 프로필을 갖는다.
- [0201] 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 일정한 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 개에 피하 투여될 때 변형되지 않은 C-펩티드보다 적어도 약 75-배 큰 혈장 또는 혈청 약물동력학적 AUC 프로필을 갖는다.
- [0202] 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 일정한 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 개에 피하 투여될 때 변형되지 않은 C-펩티드보다 적어도 약 100-배 큰 혈장 또는 혈청 약물동력학적 AUC 프로필을 갖는다.
- [0203] 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 일정한 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 변형되지 않은 C-펩티드와 동등성 생물학적 활성을 갖는다. 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 일정한 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 변형되지 않은 C-펩티드의 생물학적 활성의 적어도 약 95 %를 유지한다. 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 일정한 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 변형되지 않은 C-펩티드의 생물학적 활성의 적어도 약 90 %를 유지한다. 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 일정한 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 변형되지 않은 C-펩티드의 생물학적 활성의 적어도 약 80 %를 유지한다. 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 변형되지 않은 C-펩티드의 생물학적 활성의 적어도 약 70 %를 유지한다. 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 변형되지 않은 C-펩티드의 생물학적 활성의 적어도 약 60 %를 유지한다. 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 변형되지 않은 C-펩티드의 생물학적 활성의 적어도 약 50 %를 유지한다. 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 변형되지 않은 C-펩티드의 생물학적 활성의 적어도 약 40 %를 유지한다. 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 변형되지 않은 C-펩티드의 생물학적 활성의 적어도 약 30 %를 유지한다. 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 변형되지 않은 C-펩티드의 생물학적 활성의 적어도 약 20 %를 유지한다. 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 변형되지 않은 C-펩티드의 생물학적 활성의 적어도 약 10 %를 유지한다. 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 변형되지 않은 C-펩티드의 생물학적 활성의 적어도 약 5 %를 유지한다.
- [0204] 다른 구체예에서, 본 발명은 3일 또는 그 이상의 투약 간격을 이용할 때 환자의 혈장 내에서 약 0.2 nM 내지 약 6 nM의 폐길화된 C-펩티드의 평균 정지-상태 농도 (average steady-state concentration)를 지속하는 투약 섭

생 (dosing regime)을 포함하고, 상기 투약 섭생은 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량을 환자에 투여하는 것을 포함한다.

[0205] 다른 구체예에서, 본 발명은 3일 또는 그 이상의 투약 간격을 이용할 때 환자의 혈장 내에서 약 0.4 nM 내지 약 6 nM의 폐길화된 C-펩티드의 평균 정지-상태 농도 (average steady-state concentration)를 지속하는 투약 섭생 (dosing regime)을 포함하고, 상기 투약 섭생은 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량을 환자에 투여하는 것을 포함한다.

[0206] 다른 구체예에서, 본 발명은 3일 또는 그 이상의 투약 간격을 이용할 때 환자의 혈장 내에서 약 0.6 nM 내지 약 8 nM의 폐길화된 C-펩티드의 평균 정지-상태 농도 (average steady-state concentration)를 지속하는 투약 섭생 (dosing regime)을 포함하고, 상기 투약 섭생은 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량을 환자에 투여하는 것을 포함한다.

[0207] 다른 구체예에서, 본 발명은 3일 또는 그 이상의 투약 간격을 이용할 때 환자의 혈장 내에서 약 0.8 nM 내지 약 10 nM의 폐길화된 C-펩티드의 평균 정지-상태 농도 (average steady-state concentration)를 지속하는 투약 섭생 (dosing regime)을 포함하고, 상기 투약 섭생은 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량을 환자에 투여하는 것을 포함한다.

[0208] 다른 구체예에서, 본 발명은 필요 환자에서 C-펩티드 수준을 최소 효과적 치료 수준 이상으로 지속하는 방법을 포함하고, 상기 방법은 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 치료 용량을 환자에 투여하는 단계를 포함한다.

[0209] 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 효과적 치료 용량에서 포유동물에 피하 투여될 때 부작용 효과가 실질적으로 없다.

[0210] 다른 구체예에서, 본 발명은 필요 환자에서 당뇨병의 하나 또는 그 이상의 장기 합병증을 치료하는 방법을 포함하고, 상기 방법은 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 치료 용량을 환자에 투여하는 단계를 포함한다.

[0211] 다른 구체예에서, 본 발명은 당뇨병을 앓는 환자를 치료하는 방법을 포함하고, 상기 방법은 인슐린과 공동으로 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량을 환자에 투여하는 단계를 포함한다.

[0212] 이들 방법 중에서 한 가지의 한 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 약 3일 또는 그 이상의 투약 간격으로 투여된다. 이들 방법 중에서 한 가지의 한 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 약 4일 또는 그 이상의 투약 간격으로 투여된다. 이들 방법 중에서 한 가지의 한 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 약 5일 또는 그 이상의 투약 간격으로 투여된다. 이들 방법 중에서 한 가지의 한 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 약 6일 또는 그 이상의 투약 간격으로 투여된다. 이들 방법 중에서 한 가지의 한 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 약 7일 또는 그 이상의 투약 간격으로 투여된다.

[0213] 일정한 구체예에서, 치료는 폐길화된 C-펩티드 요법을 시작하기 이전에 신경 전도 속도와 비교하여 신경 전도 속도에서 적어도 10 %의 향상을 유발한다.

[0214] 이들 방법 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드의 혈장 농도는 약 0.1 nM 이상으로 지속된다. 이들 방법 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드의 혈장 농도는 약 0.2 nM 이상으로 지속된다. 이들 방법 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드의 혈장 농도는 약 0.3 nM 이상으로 지속된다. 이들 방법 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드의 혈장 농도는 약 0.4 nM 이상으로 지속된다.

[0215] 이들 방법 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량은 피하 투여된다. 이들 방법 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량은 경구 투여된다.

[0216] 다른 구체예에서, 본 발명은 필요 환자에서 C-펩티드 대체 요법으로서 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 용도를 포함한다.

[0217] 다른 구체예에서, 본 발명은 필요 환자에서 당뇨병의 하나 또는 그 이상의 장기 합병증을 치료하기 위한 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 용도를 포함한다. 일정한 구체예에서, 당뇨병의 장기 합병증은 망막증, 말초 신경병증, 자율성 신경병증, 그리고 신증으로 구성된 군에서 선택된다. 일정한 구체예에서, 당뇨병의 장기 합병증은 말초 신경병증이다. 일정한 구체예에서, 말초 신경병증은 확립된 말초 신경병증이다. 일정한 구체예에서, 치료는 폐길화된 C-펩티드 요법을 시작하기 이전에 신경 전도 속도와 비교하여 신경 전도 속도에서 적어도

10 %의 향상을 유발한다.

[0218] 다른 구체예에서, 본 발명은 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지 및 제약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 제약학적 조성물을 포함한다. 일정한 구체예에서, 제약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제는 소르비톨이다. 일정한 구체예에서, 소르비톨은 약 2 % 내지 약 8 % wt / wt의 농도로 존재한다. 일정한 구체예에서, 소르비톨은 약 4.7 %의 농도로 존재한다. 일정한 구체예에서, 제약학적 조성물은 약 pH 5.5 내지 약 pH 6.5의 범위 내에 pH로 완충된다. 일정한 구체예에서, 제약학적 조성물은 약 pH 6.0의 pH로 완충된다. 일정한 구체예에서, 제약학적 조성물은 약 5 mM 내지 약 25 mM의 농도에서 인산염 완충액으로 완충된다. 일정한 구체예에서, 제약학적 조성물은 약 10 mM의 농도에서 인산염 완충액으로 완충된다. 이들 구체예 중에서 한 가지의 한 양태에서, 제약학적 조성물은 pH 7.0에서 0.9% 염수 및 동일한 폐길화된 C-펩티드를 포함하는 제약학적 조성물과 비교하여 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 향상된 안정성으로 특징되고, 여기서 안정성은 40℃에서 미리 결정된 시간 동안 항온처리후 결정된다. 상이한 구체예에서, 미리 결정된 시간은 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 또는 약 5주, 또는 약 6주이다.

[0219] 다른 구체예에서, 본 발명은 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지 및 인슐린을 포함하는 제약학적 조성물을 포함한다.

[0220] 일정한 구체예는 인슐린의 투여를 추가적으로 포함하는 섭생에서 인슐린 의존성 당뇨병을 앓는 인간 환자에서 저혈당증의 위험을 감소시키기 위한 개시된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 용도를 포함하고, 상기 섭생은 하기를 포함한다; a) 인슐린을 환자에 투여; b) 환자의 인슐린 투여에 이용된 부위와 상이한 부위에서 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량을 투여; c) 치료 용량의 폐길화된 C-펩티드에 기인하는 환자의 변화된 인슐린 요구에 기초하여 투여되는 인슐린의 복용량, 유형, 또는 빈도를 조정.

[0221] 일부 구체예에서, 환자는 당뇨병의 적어도 하나의 장기 합병증을 앓는다.

[0222] 일정한 구체예는 인슐린-의존성 인간 환자를 치료하는 방법을 포함하고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다; a) 인슐린을 환자에 투여하는 단계, 여기서 환자는 신경병증을 앓고; b) 환자의 인슐린 투여에 이용된 부위와 상이한 부위에서 개시된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 치료 용량을 환자에 피하 투여하는 단계; c) 치료 용량의 폐길화된 C-펩티드에 기인하는 환자의 변화된 인슐린 요구의 모니터링에 기초하여 투여되는 인슐린의 복용량, 유형, 또는 빈도를 조정하는 단계, 여기서 인슐린의 조정된 용량은 저혈당증의 위험, 발생률, 또는 심각도를 감소시키고, 여기서 인슐린의 조정된 용량은 폐길화된 C-펩티드 치료를 시작하기 이전에 환자의 인슐린 용량보다 적어도 10% 적다.

[0223] 일정한 구체예는 인슐린-의존성 인간 환자에서 인슐린 사용량을 감소시키는 방법을 포함하고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다; a) 인슐린을 환자에 투여하는 단계; b) 환자의 인슐린 투여에 이용된 부위와 상이한 부위에서 개시된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 치료 용량을 환자에 피하 투여하는 단계; c) 치료 용량의 폐길화된 C-펩티드에 기인하는 환자의 변화된 인슐린 요구의 모니터링에 기초하여 투여되는 인슐린의 복용량, 유형, 또는 빈도를 조정하는 단계, 여기서 인슐린의 조정된 용량은 저혈당증을 유도하지 않고, 여기서 인슐린의 조정된 용량은 폐길화된 C-펩티드 치료를 시작하기 이전에 환자의 인슐린 용량보다 적어도 10% 적다.

## 파제의 해결 수단

[0224] 본 발명의 상세한 설명

[0225] 정의:

[0226] 특정 기능기와 함께 이용될 때 용어 "활성" 또는 "활성화된"은 다른 분자 상에서 친전자체 또는 구핵원자와 쉽게 반응하는 반응성 기능기를 지칭한다. 이것은 반응하기 위하여, 강한 촉매 또는 고도로 비현실적인 반응 조건을 필요로 하는 기 (즉, "비-반응성" 또는 "비활성" 기)와 대조적이다. 본 명세서에서, 용어 "기능기" 또는 이의 임의의 동의어는 이들의 보호된 형태뿐만 아니라 보호되지 않은 형태를 포함하는 것으로 의도된다.

[0227] 용어 "알콕시"는 -O-R 기를 지칭하고, 여기서 R은 알킬 또는 치환된 알킬, 바람직하게는 C1-6 알콕시 (가령, 메톡시, 에톡시, 프로필옥시 등)이다.

[0228] 용어 "알킬"은 전형적으로 약 1 내지 12개 범위의 원자 길이를 갖는 탄화수소를 지칭한다. 탄화수소는 가지형 또는 선형일 수 있고, 그리고 바람직하게는, 반드시 포화될 필요는 없다. 예시적인 알킬 기에는 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸, 2-메틸부틸, 2-에틸프로필 등이 포함된다. 본 명세서에서, "알킬"은 시클로알킬뿐만 아니라

시클로알킬렌 알킬을 포함한다. 용어 "저급 알킬"은 1개 내지 6개의 탄소 원자를 내포하는 알킬 기를 지칭하고, 그리고 직선 사슬 또는 가지형일 수 있다.

[0229] 본 명세서에서, 용어 " $C_{\max}$ "는 모니터링되는 방출의 기간 동안 발생하는 약물의 최대 혈청 또는 혈장 농도이다.

[0230] 본 명세서에서, 용어 " $C_{\min}$ "은 치료 기간 동안 방출의 기간 동안 발생하는 약물의 최소 혈청 또는 혈장 농도이다.

[0231] 본 명세서에서, 용어 " $C_{ave}$ "는 방출의 지속 기간으로 방출 프로파일의 곡선 아래 면적 (AUC)을 나눔으로써 도출된 약물의 평균 혈청 또는 혈장 농도이다.

[0232] 본 명세서에서, 용어 " $C_{ss-ave}$ "는 적어도 5 제거 반감기 동안, 투약후 복수 투약 섭생 동안 획득된 약물의 평균 정지-상태 농도이다. 약물 농도는 심지어 약물의 평균 정지-상태 농도가 획득된 이후에도 투약 간격 내에서 변동하는 것으로 인지될 것이다.

[0233] 본 명세서에서, 용어 " $t_{\max}$ "는  $C_{\max}$ 가 관찰되는 투약후 시점이다.

[0234] 본 명세서에서, 용어 "AUC"는 완전한 샘플 수집 간격에 걸쳐 사다리꼴 법칙 (trapezoidal rule)에 의해 계산되는, 혈청 또는 혈장 농도-시간 곡선에 대한 "곡선 아래 면적"을 의미한다.

[0235] 용어 "생체내 이용효율"은 투여된 약물의 퍼센트로 표시되는, 순환계에 도달하는 약물의 양을 지칭한다. 생체내 이용가능 물질의 양은 투여후 시작되고 미리 결정된 시점에서 종결되는 기간 동안 약물의 방출 프로파일에 대한 계산된 AUC로서 정의될 수 있다. 당분야에서 이해되는 바와 같이, 방출 프로파일은 미리 결정된 시점 (X-축)에서 개체에서 생물학적 활성제의 혈청 수준 (Y-축)을 도표로 나타냄으로써 산출된다. 생체내 이용효율은 종종, 생체내 이용효율 %의 관점에서 지칭되는데, 이것은 약물 (가령, C-펩티드)의 동일한 동등 용량의 정맥내 투여 이후에 상기 약물에 대해 달성되는 생체내 이용효율로 나뉘셈되고 100으로 곱셈된, 약물의 지속 방출 조성물의 투여 이후에 상기 약물에 대해 달성되는 생체내 이용효율이다.

[0236] 구(句) "보존성 아미노산 치환" 또는 "보존성 돌연변이"는 공통의 성질을 갖는 다른 아미노산에 의한 한 아미노산의 대체를 지칭한다. 개별 아미노산 사이에 공통 성질을 정의하는 기능적 방법은 상동성 생물체의 상응하는 단백질 사이에 아미노산 변화의 표준화된 빈도를 분석하는 것이다 (Schulz GE and RH Schirmer, *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag (1979)). 이런 분석에 따르면, 아미노산의 그룹이 정의될 수 있고, 여기서 한 그룹 내에 아미노산은 서로 우선적으로 교체되고, 그리고 이런 이유로, 전체 단백질 구조에 대한 그들의 영향에서 서로 매우 유사하다 (Schulz GE and RH Schirmer, *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag (1979)).

[0237] 이러한 방식으로 정의된 아미노산 기의 실례에는 하기가 포함된다: Glu, Asp, Asn, Gln, Lys, Arg, 그리고 His로 구성되는 하전된 / 극성 그룹; Pro, Phe, Tyr, 그리고 Trp로 구성되는 방향족 또는 환상 그룹; 그리고 Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Ser, Thr, 그리고 Cys로 구성되는 지방족 그룹.

[0238] 각 그룹 내에서, 하위그룹 역시 확인될 수 있다, 예를 들면, 하전된 / 극성 아미노산의 그룹은 Lys, Arg, 그리고 His로 구성되는 "양으로-하전된 하위그룹"; Glu와 Asp로 구성되는 "음으로-하전된 하위그룹", 그리고 Asn과 Gln으로 구성되는 "극성 하위그룹"으로 구성되는 하위그룹으로 세분될 수 있다. 방향족 또는 환상 그룹은 Pro, His, 그리고 Trp로 구성되는 "질소 고리 하위그룹"; 그리고 Phe와 Tyr로 구성되는 "페닐 하위그룹"으로 구성되는 하위그룹으로 세분될 수 있다. 지방족 그룹은 Val, Leu, 그리고 Ile로 구성되는 "큰 지방족 비-극성 하위그룹"; Met, Ser, Thr, 그리고 Cys로 구성되는 "지방족 약간-극성 하위그룹"; 그리고 Gly와 Ala로 구성되는 "작은-잔기 하위그룹"으로 구성되는 하위그룹으로 세분될 수 있다.

[0239] 보존성 돌연변이의 실례에는 상기 하위그룹 내에서 아미노산의 아미노산 치환, 예를 들면, 양성 전하가 지속될 수 있도록 Arg의 Lys으로의 치환 및 그 반대; 음성 전하가 지속될 수 있도록 Asp의 Glu로의 치환 및 그 반대; 유리 -OH가 지속될 수 있도록 Thr의 Ser으로의 치환; 그리고 유리 -NH<sub>2</sub>가 지속될 수 있도록 Asn의 Gln으로의 치환이 포함된다. "반-보존성 돌연변이"에는 동일한 하위그룹을 공유하지 않는, 앞서 열거된 동일한 그룹으로 아미노산의 아미노산 치환이 포함된다. 가령, Asn의 Asp로의 돌연변이, 또는 Lys의 Asn으로의 치환은 모두, 동일한 그룹, 하지만 상이한 하위그룹 내에 아미노산을 수반한다. "비-보존성 돌연변이"는 상이한 그룹 사이에 아미노산 치환, 예를 들면, Leu의 Lys으로의 치환, Ser의 Phe으로의 치환을 수반한다.



- [0240] 용어 "달톤", "Da", 또는 "D"는 질량의 임의의 단위 (arbitrary unit)를 지칭하고, 탄소-12의 핵종 (nuclide)의 질량의 1/12는  $1.657 \times 10^{-24}$  g에 상당한다. 용어 "kDa"는 킬로달톤 (즉, 1000 달톤)을 의미한다.
- [0241] 용어 "당뇨병", "진성 당뇨병", 또는 "당뇨성 상태"는 달리 특정되지 않으면, 모든 형태의 당뇨병을 포함한다. 용어 "1형 당뇨병" 또는 "1형 당뇨병"은 약 7.0 mmol/L 이상의 공복 혈장 글루코오스 농도 및 약 0.2 nmol/L 또는 그 이하의 공복 C-펩티드 수준을 갖는 환자를 지칭한다. 용어 "1.5형 당뇨병" 또는 "1.5형 당뇨병"은 약 7.0 mmol/L 이상의 공복 혈장 글루코오스 농도 및 약 0.4 nmol/L 또는 그 이하의 공복 C-펩티드 수준을 갖는 환자를 지칭한다. 용어 "2형 당뇨병" 또는 "2형 당뇨병"은 일반적으로, 약 7.0 mmol/L 이상의 공복 혈장 글루코오스 농도 및 C-펩티드 수준의 정상 생리학적 범위 (약 0.47 내지 2.5 nmol/L) 이내 또는 이보다 높은 공복 C-펩티드 수준을 갖는 환자를 지칭한다. 초기에 2형 당뇨병으로 진단된 환자는 비록 그들의 C-펩티드 수준이 1.5형 또는 1형 당뇨병 환자의 수준 (< 0.2 nmol/L)으로 하락하더라도, 차후에 인슐린-의존성 당뇨병이 발생하고, 그리고 2형 환자로서 여전히 진단될 수 있는 것으로 인지될 것이다.
- [0242] 용어 "인슐린-의존성 환자" 또는 "인슐린-의존성 당뇨병"은 달리 특정되지 않으면, 정상적인 글루코오스 수준을 적절하게 지속하기 위해 인슐린 투여를 필요로 하는 모든 형태의 당뇨병을 포함한다.
- [0243] 당뇨병은 빈번하게, 공복 혈당, 인슐린, 또는 당화된 헤모글로빈 수준 (이들은 전형적으로, 헤모글로빈 A1c, Hb<sub>1c</sub>, HbA<sub>1c</sub>, 또는 A1C로 지칭된다)을 측정함으로써 진단된다. 정상적인 성체 글루코오스 수준은 60-126 mg/dL이다. 정상적인 인슐린 수준은 30-60 pmol/L이다. 정상적인 HbA1c 수준은 일반적으로, 6 % 이하이다. World Health Organization에서는 공복 혈장 글루코오스 농도의 진단 값을 진성 당뇨병의 경우에 7.0 mmol/L (126 mg/dL) 및 그 이상 (전혈 6.1 mmol/L 또는 110 mg/dL), 또는 11.1 mmol/L 또는 이보다 높은 (200 mg/dL 또는 이보다 높은) 2-시간 글루코오스 수준으로 정의한다. 진성 당뇨병에 대한 높은 위험을 암시하거나 지시하는 다른 값에는 하기가 포함된다: 140/90 mm Hg 또는 이보다 높은 상승된 동맥압 (arterial pressure); 상승된 혈장 트리글리세리드 (1.7 mmol/L [150 mg/dL] 또는 이보다 높음) 및/또는 낮은 HDL-콜레스테롤 (남성의 경우에 0.9 mmol/L [35 mg/dL] 이하; 그리고 여성의 경우에 1.0 mmol/L [39 mg/dL] 이하); 내장 비만 (30 kg/m<sup>2</sup>를 초과하는 BMI); 미세단백뇨 (microalbuminuria), 여기서 소변 알부민 배출 속도는 20 µg/min 또는 이보다 크고, 또는 알부민 크레아티닌 비율은 30 mg/g 또는 이보다 크다.
- [0244] 용어 "전달 작용제"는 치료제의 경구 전달에 효과적인 담체 화합물 또는 담체 분자를 지칭하고, 그리고 "담체"와 교체하여 이용될 수 있다.
- [0245] 용어 "상동성"은 유사한 기능 또는 모티프를 갖는 유전자 또는 단백질을 확인하는데 이용되는 서열 유사성의 수학적으로-기초된 비교를 기술한다. 본 발명의 핵산과 단백질 서열은 예로써, 다른 패밀리 구성원, 관련된 서열, 또는 동족체를 확인하는 공개 데이터베이스에 대한 검색을 수행하기 위한 "쿼리 서열"로서 이용될 수 있다. 이런 검색은 Altschul et al.: *J. Mol. Biol.* 215: 403-410, (1990)의 NBLAST와 XBLAST 프로그램 (이형 2.0)을 이용하여 수행될 수 있다. BLAST 뉴클레오타이드 검색은 본 발명의 핵산 분자에 상동한 뉴클레오타이드 서열을 획득하기 위해 NBLAST 프로그램, 스코어=100, 단어길이=12로 수행될 수 있다. BLAST 단백질 검색은 본 발명의 단백질 분자에 상동한 아미노산 서열을 획득하기 위해 XBLAST 프로그램, 스코어=50, 단어길이=3으로 수행될 수 있다. 비교 목적으로 갭트 정렬 (gapped alignment)을 획득하기 위해, Altschul et al.: *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-3402, (1997)에서 기술된 바와 같은 갭트 BLAST가 이용될 수 있다. BLAST와 갭트 BLAST 프로그램을 이용할 때, 개별 프로그램 (가령, XBLAST와 BLAST)의 디폴트 파라미터가 이용될 수 있다 ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)를 참고한다).
- [0246] 용어 "상동성"은 동물의 동일한 종에서 슈퍼패밀리 (가령, 면역글로불린 슈퍼패밀리)로부터 단백질, 그리고 동물의 상이한 종으로부터 상동성 단백질 (가령, 미오신 경쇄 폴리펩티드)을 비롯하여, 공통의 진화적 기원 (common evolutionary origin)을 갖는 두 단백질 사이에 상관관계를 지칭한다 (Reeck et al.: *Cell* 50: 667, (1987)을 참고한다). 이런 단백질 (및 그들의 인코딩 핵산)은 동일성 퍼센트 (percent identity)의 관점에서 또는 특정한 잔기 또는 모티프 및 보존된 위치의 존재에 의해, 그들의 서열 유사성으로 반영되는 서열 상동성을 갖는다. 특정한 구체예에서, 2개의 핵산 서열은 BLAST, FASTA, DNA Strider, CLUSTAL 등과 같은 공지된 서열 비교 알고리즘에 의한 결정에서, 뉴클레오타이드 중에서 적어도 약 85 %, 그리고 더욱 바람직하게는 적어도 약 90 % 또는 적어도 약 95 %가 핵산 서열의 정의된 길이에 걸쳐 정합할 때, "실질적으로 상동성" 또는 "실질적으로 유사성"이다. 이런 서열의 실례는 본 발명의 특정한 유전자의 대립형질성 또는 종 변이체이다. 실질적으로 상동한 서열은 또한, 예로써 특정 시스템에 대해 정의된 바와 같은 엄격한 조건 하에, 예로써 서던 혼성화 실험에

서 혼성화에 의해 확인될 수도 있다.

- [0247] 유사하게, 본 발명의 특정 구체예에서, 2개의 아미노산 서열은 아미노산 잔기 중에서 80 % 이상이 동일할 때, 또는 아미노산 잔기 중에서 약 90 % 이상이 유사할 때 (즉, 기능적으로 동일할 때), "실질적으로 상동성" 또는 "실질적으로 유사성"이다. 바람직하게는, 유사성 또는 상동성 폴리펩티드 서열은 예로써, GCG (Genetics Computer Group, version 7, Madison, WI) 파일업 프로그램, 또는 앞서 기술된 임의의 프로그램과 알고리즘을 이용한 정렬에 의해 확인된다. 상기 프로그램은 디폴트 값: 갭 산출 페널티 (gap creation penalty) =  $-(1+1/3k)$ , k는 갭 연장 번호 (gap extension number), 평균 정합 (average match) = 1, 평균 부정합 (mismatch) = -0.333을 갖는 Smith와 Waterman의 국부 상동성 알고리즘을 이용할 수도 있다.
- [0248] 본 명세서에서, "동일성"은 서열이 서열 정합을 극대화하도록 정렬될 때, 다시 말하면, 갭과 삽입을 고려할 때, 2개 또는 그 이상의 서열 내에 상응하는 위치에서 동일한 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기의 백분율을 의미한다. 동일성은 *Computational Molecular Biology*, Lesk AM, Ed., Oxford University Press, New York, (1988); *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith DW, Ed., Academic Press, New York, (1993); *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, Griffin AM and Griffin HG, Eds., Humana Press, New Jersey, (1994); *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje G, Academic Press, (1987); and *Sequence Analysis Primer*, Gribskov M and Devereux J, Eds., M Stockton Press, New York, (1991); 그리고 Carillo H and Lipman D, *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988)에서 기술된 것들이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 공지된 방법에 의해 쉽게 계산될 수 있다. 동일성을 결정하는 방법은 조사된 서열 간에 최대 정합을 제공하도록 설계된다. 게다가, 동일성을 결정하는 방법은 공개적으로 가용한 컴퓨터 프로그램에서 성문화된다. 두 서열 간에 동일성을 결정하기 위한 컴퓨터 프로그램 방법에는 GCG 프로그램 패키지 (Devereux J et al.: *Nucleic Acids Res.* 12(1): 387, (1984)), BLASTP, BLASTN, 그리고 FASTA (Altschul SF et al.: *J. Molec. Biol.* 215: 403-410, (1990) 및 Altschul SF et al.: *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, (1997))가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. BLAST X 프로그램은 NCBI 및 다른 출처로부터 공개적으로 가용하다 (BLAST Manual, Altschul SF et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul SF et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410, (1990)). 널리 공지된 Smith Waterman 알고리즘 (Smith TF, Waterman MS: *J. Mol. Biol.* 147(1): 195-197, (1981)) 역시 서열 간에 유사성을 결정하는데 이용될 수 있다.
- [0249] 용어 "인슐린"은 제한 없이, 신속-작용 형태, 예를 들면, 인슐린 Lispro rDNA 기원: HUMALOG (1.5 mL, 10 mL, Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN), 소와 돼지로부터 인슐린 주사 (정규 인슐린) (정규 ILETIN I, Eli Lilly), 인간: rDNA: HUMULIN R (Eli Lilly), NOVOLIN R (Novo Nordisk, New York, NY), 반 합성: VELOSULIN 인간 (Novo Nordisk), rDNA 인간, 완충됨: VELOSULIN BR, 돼지: 정규 인슐린 (Novo Nordisk), 정제된 돼지: 돼지 정규 ILETIN II (Eli Lilly), 정규 정제된 돼지 인슐린 (Novo Nordisk), 그리고 정규 (농축된) ILETIN II U-500 (500 단위/mL, Eli Lilly); 중기-작용 형태, 예를 들면, 인슐린 아연 현탁액, 소와 돼지: LENTE ILETIN G I (Eli Lilly), 인간, rDNA: HUMULIN L (Eli Lilly), NOVOLIN L (Novo Nordisk), 정제된 돼지: LENTE ILETIN II (Eli Lilly), 아이소판 인슐린 현탁액 (NPH): 소와 돼지: NPH ILETIN I (Eli Lilly), 인간, rDNA: HUMULIN N (Eli Lilly), Novolin N (Novo Nordisk), 정제된 돼지: 돼지 NPH Eetin II (Eli Lilly), NPH-N (Novo Nordisk); 그리고 장기-작용 형태, 예를 들면, 인슐린 아연 현탁액, 확장됨 (ULTRALENTE, Eli Lilly), 인간, rDNA: HUMULIN U (Eli Lilly)를 비롯한 모든 형태의 인슐린을 포함한다.
- [0250] 용어 "측정하는" 또는 "측정"은 소정의 물질의 정성적 또는 정량적 농도 수준의 도출을 비롯하여, 임상적- 또는 환자-유래된 샘플내에 소정의 물질의 존재, 부재, 수량 또는 양 (이것은 효과량일 수 있다), 또는 환자의 임상적 파라미터의 값 또는 범주화 (categorization)를 평가하거나, 또는 달리 사정하는 것을 의미한다.
- [0251] 본 명세서에서, 용어 "식사"는 표준 및/또는 혼성 식사를 의미한다.
- [0252] 약물동력학적 값 (가령, 평균  $t_{max}$ )을 선행할 때, 용어 "평균"은 달리 특정되지 않으면, 약물동력학적 값의 산술적 평균 값을 나타낸다.
- [0253] 본 명세서에서, 용어 "평균 기준선 수준"은 통계학적으로 유의한 숫자의 개체에서, 예를 들면, 단일 임상 연구 또는 하나 이상의 임상 연구의 조합 전역에서 평균 값인, 비교를 위한 기초로서 이용되는 일정한 값의 치수, 계산, 또는 수준을 의미한다.
- [0254] 용어 "복수 용량"은 환자가 조성물에 대한 투약 간격에 따라서, 약물 조성물의 적어도 2회 용량이 제공된다는 것을 의미한다.

- [0255] "신경병증을 앓는 환자" 또는 "신경병증을 앓는" 환자의 맥락에서 용어 "신경병증"은 환자가 San Antonio Conference on diabetic neuropathy에 개설된 4가지 기준 중에서 적어도 한 가지 (report and recommendations of the San Antonio Conference on diabetic neuropathy, *Ann. Neurol.* 24 99-104 (1988))를 충족한다는 것을 의미하고, 이들은 간단히 말하면, 1) 다발성신경병증의 임상적 징후, 2) 신경 기능장애의 증상, 3) 적어도 2개의 신경에서 신경 전도 결함, 또는 4) 정량적 감각 결함을 포함한다. 용어 "확립된 신경병증"은 환자가 San Antonio Conference on diabetic neuropathy에서 개설된 4가지 기준 중에서 적어도 2가지를 충족한다는 것을 의미한다. 용어 "초발 신경병증"은 신경 전도 결함만을 나타내고, 그리고 신경병증의 다른 증상을 나타내지 않는 환자를 지칭한다.
- [0256] 용어 "정상적인 글루코오스 수준"은 용어 "정상혈당 (normoglycemic)" 및 "정상"과 교체가능하게 이용되고, 그리고 약 6.1 mmol/L (110 mg/dL) 이하의 공복 정맥 혈장 글루코오스 농도를 지칭한다. 정상혈당을 초과하는 지속된 글루코오스 수준은 전-당뇨성 질환으로 간주된다.
- [0257] 본 명세서에서, 본 발명의 맥락에서 용어 "환자"는 바람직하게는, 포유동물이다. 포유동물은 인간, 비-인간 영장류, 생쥐, 쥐, 개, 고양이, 말, 또는 소일 수 있지만 이들 실례에 한정되지 않는다. 인간 이외의 포유동물은 인슐린-의존성 진성 당뇨병, 또는 당뇨병 질환의 동물 모델을 대표하는 환자로서 유리하게 이용될 수 있다. 환자는 수컷 또는 암컷일 수 있다. 환자는 인슐린-의존성 당뇨병, 또는 당뇨병 질환을 앓는 것으로 이전에 진단되거나 확인되고, 그리고 선택적으로 당뇨병에 대한 치료적 개입 (therapeutic intervention)을 이미 받았거나 받고 있는 환자일 수 있다. 환자는 또한, 당뇨병의 장기 합병증을 앓고 있는 환자일 수 있다. 바람직하게는, 환자는 인간이다.
- [0258] 본 명세서에서, 용어 "PEG", "폴리에틸렌 글리콜", 또는 "폴리(에틸렌 글리콜)"은 임의의 물 용해성 폴리(에틸렌 산화물)를 지칭하고, 그리고 구조  $-(CH_2CH_2O)_n-$ 를 포함하는 분자를 포함하고, 여기서  $n$ 은 2 내지 약 800의 정수이다. 통상적으로 이용되는 PEG는 단부-캡핑(capping)된 PEG이고, 여기서 PEG의 한쪽 단부는 상대적으로 비활성 기, 예를 들면, 알콕시로 캡핑되고, 반면 다른 쪽은 더욱 변형될 수 있는 히드록실 기이다. 종종 이용되는 캡핑 기는 메톡시이고, 그리고 상응하는 단부-캡핑된 PEG는 종종, mPEG로 표시된다. 이러한 개념 PEG는 mPEG 대신에 종종 이용된다. 본 발명의 특정한 PEG 형태는 가지형, 선형, 갈래진 PEG 등이고, 그리고 이들 PEG 기는 전형적으로 다분산계 (polydisperse)이고, 약 1.05 이하의 낮은 다분산성 지수 (polydispersity index)를 지수를 갖는다. 본 발명의 PEG 모이어티는 소정의 분자량의 경우에, 전형적으로 일정한 범위의 에틸렌 글리콜 (또는 에틸렌산화물) 단위체로 구성될 것이다. 가령, 분자량 2000 Da의 PEG 모이어티는 전형적으로,  $43 \pm 10$ 개의 단위체로 구성되고, 평균적으로 약 43개 단위체이다. 용어 "폐길화된"은 다른 분자, 예를 들면, C-펩티드에 PEG의 공유 부착을 지칭한다.
- [0259] C-펩티드에 대한 대체 요법의 맥락에서 용어 "대체 용량"은 바람직한 범위 내에서, 특히 최소 효과적 치료 수준 이거나 이를 초과하는 수준에서 혈액 내에 C-펩티드 또는 폐길화된 C-펩티드 수준을 지속하는 C-펩티드 또는 폐길화된 C-펩티드의 용량을 지칭한다. 일정한 양태에서, 대체 용량은 투약 간격 사이에 약 0.1 nM의 최소 수준 이상으로 평균 정지-상태 농도 C-펩티드 또는 폐길화된 C-펩티드 수준을 지속한다. 일정한 양태에서, 대체 용량은 투약 간격 사이에 약 0.2 nM의 최소 수준 이상으로 평균 정지-상태 농도 C-펩티드 또는 폐길화된 C-펩티드 수준을 지속한다. 일정한 양태에서, 대체 용량은 투약 간격 사이에 약 0.4 nM의 최소 수준 이상으로 평균 정지-상태 농도 C-펩티드 또는 폐길화된 C-펩티드 수준을 지속한다.
- [0260] 인슐린 또는 폐길화된 C-펩티드의 투여 양식에 관하여 용어 "피하" 또는 "피하" 또는 "S.C."는 집합적으로 피부 (cutis)로 지칭되는 진피 (dermis)와 상피 (epidermis) 바로 아래의 피부 층인 피하 세포층 (subcutis) 내에 또는 아래의 구역 내로 일시주사로서, 또는 이식가능 장치를 거쳐 투여되는 약물을 지칭한다. 피하 투여 및/또는 이식을 위한 선호되는 부위에는 상완의 외부 구역, 배꼽 바로 인근의 지역 (2-인치 원)을 제외하고 허리 바로 위아래, 궁둥이의 위쪽 구역, 자골 바로 뒤에, 넓적다리의 정면, 외부면에 중간쯤, 넓적다리의 정상 아래 4 인치에서 무릎 위 4 인치가 포함된다.
- [0261] 용어 "단일 용량"은 환자가 약물 조성물의 단일 용량이 제공되거나, 또는 반복 단일 용량이 중간에 휴약기 (washout period)를 두고 투여된다는 것을 의미한다. "단일 용량"으로 또는 "정지-상태"로 특정되지 않으면, 본 명세서에서 개시되고 청구된 약물동력학적 파라미터는 단일-용량과 복수-용량 조건 둘 모두를 포함한다.
- [0262] 용어 "서열 유사성"은 공통의 진화적 기원을 공유하거나 공유하지 않는 핵산 또는 아미노산 서열 사이에 동일성 또는 일치의 정도를 지칭한다 (Reeck et al., supra를 참고한다). 하지만, 통상의 어법 및 본 출원에서, "고도

로"와 같은 부사로 수식될 때, 용어 "상동성"은 서열 유사성을 지칭할 수 있고, 그리고 공통의 진화적 기원에 관련되거나 관련되지 않을 수 있다.

[0263] "통계학적으로 유의한"은 결과가 우연히 발생할 가능성이 없다는 것을 의미한다. 통계학적 유의성 (statistical significance)은 당업자에게 공지된 임의의 방법에 의해 결정될 수 있다. 유의성의 통상적으로 이용되는 적도 (measure)에는 p-값이 포함되는데, 이것은 귀무 가설 (null hypothesis)이 참이면, 관찰된 사건이 일어날 빈도 또는 가능성이다. 획득된 p-값이 유의성 수준보다 작으면, 귀무 가설은 거부된다. 단순한 경우에, 유의성 수준은 0.05 또는 그 이하의 p-값으로 정의된다.

[0264] 본 명세서에서 정의된 바와 같이, 용어 "지속된 방출", "연장 방출", 또는 "저장소 제제"는 약물이 약물의 단일 용량의 직접 I.V. 또는 S.C. 투여 이후에 가용한 기간보다 더욱 긴 기간에 걸쳐 일어나는 지속 방출 조성물 또는 지속 방출 장치로부터 폐길화된 C-펩티드와 같은 약물의 방출을 지칭한다. 한 양태에서, 지속된 방출은 적어도 약 1 내지 2주, 약 2 내지 4주, 약 1 내지 2개월, 약 2 내지 3개월, 또는 약 3 내지 6개월의 기간에 걸쳐 일어나는 방출일 것이다. 일정한 양태에서, 지속된 방출은 약 6개월 내지 약 1년의 기간에 걸쳐 일어나는 방출일 것이다. 방출의 연속성 (continuity) 및 방출의 수준은 본 명세서에서 더욱 상세하게 기술된 바와 같이, 지속 방출 장치 (가령, 프로그램가능 펌프 또는 삼투-피동된 펌프) 또는 지속 방출 조성물의 유형, 그리고 이용된 폐길화된 C-펩티드의 유형 (가령, 단위체 비율, 분자량, 블록 조성, 그리고 중합체의 가변적 조합), 폴리펩티드 하중 (loading), 및/또는 원하는 효과를 산출하기 위한 부형제의 선택에 의해 영향을 받을 수 있다.

[0265] 본 발명의 임의의 방법에 따라서 다양한 지속 방출 프로필이 제공될 수 있다. "지속 방출 프로필"은 이식/삽입 또는 체내에 약물을 투여하는 다른 방법의 진전 동안 일어나는 약물의 총 방출 중에서 50 % 이하가 투여의 첫 24시간 이내에 일어나는 방출 프로필을 의미한다. 본 발명의 바람직한 구체예에서, 연장 방출 프로필은 a) 이식/삽입 또는 다른 투여 방법 이후, 48시간과 72시간 사이의 시점에서 일어나는 50 % 방출 포인트 (release point); b) 이식/삽입 또는 다른 투여 방법 이후, 72시간과 96시간 사이의 시점에서 발생하는 50 % 방출 포인트; c) 이식/삽입 또는 다른 투여 방법 이후, 96시간과 110시간 사이의 시점에서 발생하는 50 % 방출 포인트; d) 이식/삽입 또는 다른 투여 방법 이후, 1주와 2주 사이의 시점에서 발생하는 50 % 방출 포인트; e) 이식/삽입 또는 다른 투여 방법 이후, 2주와 4주 사이의 시점에서 발생하는 50 % 방출 포인트; f) 이식/삽입 또는 다른 투여 방법 이후, 4주와 8주 사이의 시점에서 발생하는 50 % 방출 포인트; g) 이식/삽입 또는 다른 투여 방법 이후, 8주와 16주 사이의 시점에서 발생하는 50 % 방출 포인트; h) 이식/삽입 또는 다른 투여 방법 이후, 16주와 52주 (1년) 사이의 시점에서 발생하는 50 % 방출 포인트; 그리고 i) 이식/삽입 또는 다른 투여 방법 이후, 52주와 104주 사이의 시점에서 발생하는 50 % 방출 포인트로 구성된 군에서 선택된다.

[0266] 부가적으로, 지속 방출 조성물의 이용은 약물 혈장 농도의 "변동도 (degree of fluctuation)" ("DFL")를 감소시킬 수 있다. DFL은 투약 간격의 진전 동안 약물의 혈장 수준이 얼마나 변하는 지의 치수 ( $C_{max}-C_{min}/C_{min}$ )이다. I.V. 투여와 같은 단순한 경우에, 변동은 소멸 반감기 ( $T_{1/2}$ ) 및 투약 간격 사이의 상관관계에 의해 결정된다. 투약 간격이 반감기에 동등하면, 트로프 농도 (trough concentration)는 피크 농도 (peak concentration)의 정확하게 절반이고, 그리고 변동도는 100%이다. 따라서 감소된 DFL을 갖는 지속 방출 조성물 (동일한 투약 간격의 경우에)은 피크와 트로프 혈장 수준에서 차이가 감소된다는 것을 의미한다. 바람직하게는, 폐길화된 C-펩티드의 지속 방출 조성물이 제공되는 환자는 동일한 투약 간격으로 비-연장 방출 조성물이 제공되는 환자에서 DFL의 대략 50 %, 40 %, 또는 30 % DFL을 갖는다.

[0267] 용어 "치료하는" 또는 "치료"는 환자에서 질환을 경감하거나, 완화하거나, 지연시키거나, 감소시키거나, 반전시키거나, 향상시키거나, 관리하거나, 또는 적어도 하나의 증상을 예방하는 것을 의미한다. 용어 "치료하는"은 또한, 질환을 중지시키고, 발병을 지연시키고 (즉, 질환의 임상적 양상 (clinical manifestation)에 앞선 기간), 및/또는 질환이 발생하거나 악화되는 위험을 감소시키는 것을 의미할 수 있다.

[0268] 본 명세서에서, 용어 "치료 효과량", "예방 효과량", 또는 "진단 효과량"은 투여 이후에, 원하는 생물학적 반응을 유도하는데 필요한, 약물, 예를 들면, 인슐린 또는 폐길화된 C-펩티드의 양이다.

[0269] 용어 "단위-용량 형태"는 당분야에 공지된 바와 같이, 인간과 동물 환자에 적합하고 개별적으로 포장되는 물리적으로 별개의 단위를 지칭한다. 본 발명을 위해, 치료 효과량의 약물을 포함하는 본 발명의 제형은 치료 효과를 달성하기 위해 하나 또는 그 이상의 단위 용량 (가령, 정제, 캡슐, 분말, 반고체 [가령, 젤캡 (gelcap) 또는 필름], 경구 투여용 액체, 주사용 앰플 또는 바이알, 충전된 주사기)을 포함할 수 있는 것으로 예기된다. 본 발명을 위해, 제형 (dosage form)의 바람직한 구체예는 피하 주사가능 제형인 것으로 더욱 예기된다.



- [0270] 용어 "약" 또는 "대략"은 당업자에 의해 결정된, 특정 값에 대한 허용 오차 범위 (acceptable error range) 이 내를 의미하는데, 이것은 부분적으로, 값이 어떻게 측정되거나 결정되는 지, 다시 말하면, 측정 시스템의 한정에 좌우될 것이다. 가령, "약"은 당분야에서 관례적으로, 1 또는 그 이상의 표준 편차를 의미할 수 있다. 대안으로, 조성물에 대하여 "약"은 20 %까지, 바람직하게는 10 %까지, 더욱 바람직하게는 5 %까지의 플러스 또는 마이너스 범위를 의미할 수 있다.
- [0271] 본 명세서에서, 그리고 첨부된 청구항에서, 단수 형태는 맥락에서 명백하게 달리 지시되지 않으면, 복수 지시대상을 포함한다. 따라서 예로써, "분자"에 대한 언급은 하나 또는 그 이상의 이와 같은 분자를 포함하고, "시약"에 대한 언급은 하나 또는 그 이상의 이와 같은 상이한 시약을 포함하고, "항체"에 대한 언급은 하나 또는 그 이상의 이와 같은 상이한 항체를 포함하고, 그리고 "방법"에 대한 언급은 본 명세서에서 기술된 방법과 제약학적 조성물에 대해 변형되거나 치환될 수 있는, 당업자에게 공지된 동등한 단계들과 방법들에 대한 언급을 포함한다.
- [0272] 달리 정의되지 않으면, 본 명세서에서 이용된 모든 기술 용어와 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 표 A에서 기재된 하기 약어는 본 명세서의 일정한 섹션에서 이용된다:

[0273] [표 A]

표 A 약어의 목록	
ADA	항-약물 항체
AUC	곡선 아래 면적
AUC <sub>(0-7)</sub>	0 에서부터 Day 7 까지 혈장 농도-시간 곡선 아래 면적
AUC <sub>(0-14)</sub>	0 에서부터 Day 14 까지 혈장 농도-시간 곡선 아래 면적
AUC <sub>(0-t)</sub> / AUC <sub>12h</sub>	0 에서부터 최종 정량가능 농도의 시점까지 혈장 농도-시간 곡선 아래 면적
AUC <sub>(0-inf)</sub> / AUC <sub>inf</sub>	0 에서부터 무한까지 혈장 농도-시간 곡선 아래 면적
Conc.	농도
C <sub>ss</sub>	정상 상태에서 농도
CL/F	생체내 이용효율 (F)에 대해 보정되지 않은 겉보기 청소율
CL <sub>ss</sub> /F	정상 상태에서 생체내 이용효율 (F)에 대해 보정되지 않은 겉보기 청소율
C <sub>max</sub>	최대 관찰 농도
ELISA	효소결합 면역흡착 측정법
F	생체내 이용효율 또는 알럿
F <sub>rel</sub>	상대적 생체내 이용효율
GLP	우수 실험실 관리기준
h	시간
i.v.	정맥내
kg	킬로그램
L	리터
M	수컷
mg	밀리그램
mL	밀리리터
min	분

[0274]

MTD	최대 내량
ND	결정되지 않음
ng	나노그램
NOEL	관찰된 효과 수준 없음.
nM / nmol/L	나노몰(Nanomolar)
nmol	나노몰(nanomole)
QC	품질 관리
PEG	폴리에틸렌 글리콜
RIA	방사 면역 측정법
s.c. / S.C.	피하
SD	표준 편차
T <sub>1/2</sub>	종말 소멸 반감기
T <sub>max</sub>	C <sub>max</sub> 에 도달하는 시간
Vd/F	피하 투여 이후에, 생체내 이용효율 (F)에 대해 보정되지 않은 겉보기 분포 용적
Vd <sub>ss</sub> /F	피하 투여 이후에, 정상 상태에서 생체내 이용효율 (F)에 대해 보정되지 않은 겉보기 분포 용적
wk	주

[0275]

[0276]

비록 본 명세서에서 기술된 임의의 방법, 조성물, 시약, 세포, 또는 이들에 유사하거나 동등한 것들이 본 발명의 실시 또는 검사에 이용될 수 있긴 하지만, 바람직한 방법과 물질이 본 명세서에서 기술된다.

[0277]

특허와 특허 출원이 포함되지만 이들에 국한되지 않는, 본 명세서에서 인용된 모든 간행물과 참고문헌은 각 개별 간행물 또는 참고문헌이 구체적으로 및 개별적으로, 본 발명에 전체로서 참고문헌으로 편입되는 것으로 지시된 것처럼 본 발명에 전체로서 참고문헌으로 편입된다. 본 출원이 우선권을 주장하는 임의의 특허 출원 역시 간행물과 참고문헌에 대해 앞서 기술된 방식으로 본 발명에 전체로서 참고문헌으로 편입된다.

[0278]

본 발명의 실시는 달리 지시되지 않으면, 당업자의 능력 범위 내에 있는, 화학, 분자 생물학, 미생물학, 재조합 DNA와 면역학의 전통적인 기술을 이용할 것이다. 이런 기술은 기존 문헌에서 설명된다. 예로써, J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (1995 and periodic supplements; Current Protocols in Molecular Biology, ch. 9, 13, and 16, John Wiley & Sons, New York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, and A. Kahn, 1996, DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques, John Wiley & Sons; J. M. Polak and James O'D. McGee, 1990, In Situ Hybridization: Principles and Practice; Oxford University Press; M. J. Gait (Editor), 1984, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, Irl Press; D. M. J. Lilley and J. E. Dahlberg, 1992, Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology, Academic Press; Handbook of Drug Screening, edited by Ramakrishna Seethala, Prabhavathi B. Fernandes (2001, New York, N.Y., Marcel Dekker, ISBN 0-8247-0562-9); Lab Ref: A Handbook of Recipes, Reagents, and Other Reference Tools for Use at the Bench, edited by Jane Roskams and Linda Rodgers, 2002, Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN 0-87969-630-3; Harris, JM, and Zalipsky, S, eds, Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications, ACS, Washington, 1997; Veronese, F., and J.M. Harris, Eds., Peptide and protein PEGylation, Advanced Drug Delivery Reviews, 54(4) 453-609 (2002); Zalipsky, S., et al., "Use of functionalized Poly(Ethylene Glycols) for modification of polypeptides" in Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications를 참고한다. 이들 일반적인 문서 각각은 본 발명에 참고문헌으로 편입된다.

[0279]

앞서 논의된 간행물은 본 출원의 출원일 이전에 그들의 개시 목적으로만 제공된다. 본 명세서에서 어느 것도 본

발명이 선행 발명에 의해서 이런 개시보다 선행할 권한이 없음을 인정하는 것으로 간주되지 않는다.

[0280] I. 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)

[0281] PEG는 많은 수성과 유기 용매에서 우수한 용해도를 갖는 널리-공지된 중합체이고, 이것은 낮은 독성을 나타내고, 면역원성이 없고, 투명하고, 무색이고, 무취이고, 그리고 안정하다. 이들 이유 등으로 인하여, PEG는 부착을 위한 선호되는 중합체로서 선택되고 있긴 하지만, 이것은 예시의 목적으로만 이용되고 본 발명을 한정하지 않는다. 유사한 산물은 제한 없이, 폴리비닐 알코올, 다른 폴리(알킬렌 산화물), 예를 들면, 폴리(프로필렌 글리콜) 등, 폴리(옥시에틸화된 폴리올), 예를 들면, 폴리(옥시에틸화된 글리세롤) 등, 카르복시메틸셀룰로오스, 텍스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물, 그리고 폴리아미노산을 비롯한 다른 물-용해성 중합체로 획득될 수 있다. 당업자는 원하는 용량, 순환 시간, 단백분해에 저항, 그리고 기타 고려 사항에 기초하여 원하는 중합체를 선택할 수 있을 것이다.

[0282] 이런 중합체를 활성 모이어티에 접합하기 위한 대표적인 중합성 시약과 방법은 Harris, J.M. and Zalipsky, S., Eds, Poly(에틸렌 glycol), Chemistry and Biological Applications, ACS, Washington, 1997; Veronese, F., and J.M. Harris, Eds., Peptide and Protein PEGylation, Advanced Drug Delivery Reviews, 54(4); 453-609 (2002); Zalipsky, S., et al., "Use of Functionalized Poly Ethylene Glycols) for Modification of Polypeptides" in Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J.M. Harris, ed., Plenus Press, New York (1992); Zalipsky (1995) Advanced Drug Reviews 16:157-182; 그리고 Roberts et al., Adv. Drug Delivery Reviews, 54, 459-476 (2002)에서 기술된다.

[0283] 매우 다양한 PEG 유도체는 상업적으로 구입가능할 뿐만 아니라 본 발명의 PEG-접합체의 제조에 이용하기 적합하다. 예로써, NOF Corp.의 SUNBRIGHT® Series ([www.peg-drug.com](http://www.peg-drug.com))는 다양한 방법으로 C-펩티드에 커플링을 위한, 메톡시폴리에틸렌 글리콜 및 활성화된 PEG 유도체, 예를 들면, 숙시니미딜 에스테르, 메톡시-PEG 아민, 말레이미드, 그리고 카르복실산을 비롯한 다수의 PEG 유도체를 제공하고, 그리고 Nektar Therapeutics' Advanced PEGylation 역시 치료제의 안정성과 효능을 향상시키기 위한 다양한 PEG-커플링 기술을 제공한다. 본 발명의 C-펩티드 접합체를 형성하는데 이용되는 추가의 PEG에는 Polypure (Norway), QuantaBioDesign LTD (Ohio) 및 Sunbio, Inc (South Korea)로부터 구입가능한 것들이 포함된다.

[0284] 본 발명의 접합체를 형성하는데 이용하기 적합한 추가의 PEG 시약, 그리고 접합의 방법은 Pasut, G., et al., *Expert Opin. Ther. Patents* (2004), 14(6) 859-893에서 기술된다.

[0285] 특허, 공개된 특허 출원, 그리고 관련된 간행물의 검색 역시 본 명세서를 읽는 당업자에게 유의미한 가능한 PEG-커플링 기술과 PEG-유도체를 제공할 것이다. 가령, US Pat. No. 7,026,440; 6,858,736; 6,828,401; 6,602,498; 6,495,659; 6,448,369, 6,436,386; 5,990,237; 5,932,462; 5,900,461; 5,824,784; 5,739,208; 5,672,662; 5,650,234; 5,629,384; 5,252,714; 그리고 4,904,584 (이들의 내용은 본 발명에 전체로서 참고문헌으로 편입된다)에서는 이런 기술과 유도체, 그리고 그들의 제조 방법을 기술한다.

[0286] 본 발명에 따른 폐길화된 C-펩티드는 약 4,000 Da 내지 80,000 Da의 범위 내에서 변하는 분자량의 PEG 모이어티를 갖는다. 분자량 범위는 전형적으로, 약 4000 Da 내지 약 10,000 Da, 약 10,000 Da 내지 약 20,000 Da, 약 20,000 Da 내지 약 30,000 Da, 약 30,000 Da 내지 약 40,000 Da, 약 40,000 Da 내지 약 50,000 Da, 약 50,000 Da 내지 약 60,000 Da, 약 60,000 Da 내지 약 70,000 Da, 그리고 약 70,000 Da 내지 약 80,000 Da일 것이다. PEG 모이어티의 평균 분자량의 무제한적 실례는 약 10,000 Da, 약 20,000 Da, 약 30,000 Da, 약 40,000 Da, 약 50,000 Da, 약 60,000 Da, 약 70,000 Da, 그리고 약 80,000 Da이다.

[0287] 실질적으로 모든 PEG 중합체가 다양한 고분자 질량의 혼합물로서 존재하기 때문에, PEG 분자량 (MW)은 전형적으로, 수평균 ( $M_n$ ), 중량 평균 ( $M_w$ ), 또는 z-평균 ( $M_z$ ) 분자량으로서 보고된다. 중량 평균은 아마도, 이들 3가지 중에서 가장 유용한데, 그 이유는 이것이 중합체의 전반적인 행태에 대한 상이한 크기 사슬의 기여를 충실하게 해명하고, 그리고 대부분의 목적되는 물리적 성질과 최고로 상관하기 때문이다.

$$\text{수평균 } MW(M_n) = \frac{\sum(M_i N_i)}{\sum N_i}$$

$$\text{중량 평균 } MW(M_w) = \frac{\sum(M_i^2 N_i)}{\sum(M_i N_i)}$$

$$Z \text{ 평균 } MW(M_z) = \frac{\sum(M_i^3 N_i)}{\sum(M_i^2 N_i)}$$

[0288]

[0289] 여기서 "Ni"는 중합체 혼합물 내에서 분자량 "Mi"를 갖는 분자의 몰분율 (mole-fraction) (또는 수분율 (number-fraction))이다. Mw 대(對) Mn의 비율은 다분산성 지수 (polydispersity index, PDI)로 알려져 있고, 그리고 분포의 폭의 대략적인 지수를 제공한다. PDI는 매우 좁은 MW 분포를 갖는 특수한 중합체의 경우에 1.0 (하한선)에 근접한다.

[0290] 본 발명의 PEG 기는 소정의 분자량을 위해, 전형적으로 일정한 범위의 에틸렌 글리콜 (또는 에틸렌산화물; OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) 단위체로 구성될 것이다. 가령, 분자량 2000 Da의 PEG 기는 전형적으로, 43 ± 10개 단위체로 구성되고, 평균적으로 대략 43-44개 단위체일 것이다.

[0291] 본 발명의 PEG 기는 전형적으로, 다수의 아단위를 포함할 것이다, 예를 들면, 임의의 청구된 화합물에서 각 n, n<sub>1</sub> 또는 n<sub>2</sub> 또는 n<sub>3</sub>은 각각 독립적으로, 약 1 내지 약 1000, 약 1 내지 약 800, 약 1 내지 약 600, 약 1 내지 약 400, 약 1 내지 약 300, 약 1 내지 약 200일 수 있다. 매우 적합한 PEG 기는 아단위 (즉, n<sub>1</sub>, n<sub>2</sub>, 그리고 n<sub>3</sub>)의 숫자가 약 800 내지 약 1000; 약 800 내지 약 950; 약 600 내지 약 850; 약 400 내지 약 650; 약 200 내지 약 450, 약 180 내지 약 350; 약 100 내지 약 150; 약 35 내지 약 55; 약 42 내지 약 62; 약 12 내지 약 25개 아단위, 약 1 내지 10개 아단위로 구성되는 군에서 독립적으로 선택되는 것이다. 일정한 구체예에서, 폐결화된 C-펩티드는 약 40 kDa의 분자량을 가질 것이고, 그리고 따라서 가지 사슬 PEG 내에서 각 PEG 사슬에 대한 n<sub>1</sub>과 n<sub>2</sub>는 약 440 내지 약 550, 또는 약 450 내지 약 520의 범위 내에 있을 것이다.

[0292] 전술한 것들 중에서 한 가지의 총 분자량을 갖는 PEG 중합체의 가지형 이형 (가령, 2개 또는 그 이상의 10,000 Da 내지 20,000 Da PEG 중합체 등으로 구성되는 가지형 40,000 Da PEG 중합체) 역시 이용될 수 있다.

[0293] 본 명세서에서 기술된 대표적인 가지형 중합체에는 하기 일반화된 구조: (PEG)<sub>y</sub>-[코어]-[링커]를 갖는 것들이 포함된다;

[0294] 여기서 "[코어]"는 2개 또는 그 이상의 PEG 팔을 뻗는 중심 또는 코어 분자이고, 변수 "y"는 PEG 팔의 숫자를 나타내고, 그리고 "[링커]"는 전형적으로 [코어]를 C-펩티드에 커플링하는 선택적 연결 모이어티 (하기에 더욱 상세하게 기술됨)를 나타낸다. 가지형 사슬 PEG의 한 가지 대안적 구체예에서, 적어도 하나의 중합체 팔은 C-펩티드와의 반응에 적합한 말단 기능기 (가령, NHS 모이어티)를 보유한다. 전형적으로, 본 발명의 가지형 사슬 중합체는 C-펩티드의 N-말단 아미노기에 커플링된다.

[0295] 또 다른 구체예에서, 링커 모이어티는 가수분해적으로 안정성, 또는 대안으로 분해성 링커를 나타낼 수 있고, 이것은 연쇄가 생리 조건 하에 가수분해될 수 있다는 것을 의미한다, 예를 들면, 연쇄는 에스테르, 가수분해성 카바메이트, 카보네이트, 또는 다른 이와 같은 기를 포함한다. 중합체 중추 내에서 분해성 연쇄로서뿐만 아니라 본 발명의 일정한 구체예의 경우에, C-펩티드에 물-용해성 중합체를 공유 부착하기 위한 유용한 가수분해적으로 분해성 연쇄에는 하기가 포함된다: 카보네이트; 예로써, 아민과 알데히드의 반응에 기인하는 이민 (예로써, Ouchi et al. (1997) Polymer Preprints 38(1):582-3을 참고한다); 예로써, 알코올을 인산염 기와 반응시킴으로써 형성되는 인산염 에스테르; 예로써, 히드라지드와 알데히드의 반응에 의해 형성된 히드라존; 예로써, 알데히드와 알코올의 반응에 의해 형성된 아세탈; 예로써, 포름산염과 알코올 사이의 반응에 의해 형성된 오르토에스테르; 그리고 에스테르, 그리고 일정한 우레탄 (카바메이트) 연쇄. 본 발명에 따라서 방출성 C-펩티드 접합체를 제조하는데 이용되는 예시적인 PEG 시약은 U.S. Patent No. 6,348,558, 5,612,460, 5,840,900, 5,880,131, 그리고 6,376,470에서 기술된다. 전형적으로 방출성 링커는 C-펩티드 내에 임의의 잔기에 부착될 수 있고, 그리고 N-말단 아미노산에 제한되지 않는다.

[0296] 가지형 PEG, 예를 들면, 상기 화학식, (PEG)<sub>y</sub>-[코어]-[링커]에 의해 일반적으로 표시되는 것들은 2개의 중합체 팔 내지 약 8개의 중합체 팔을 보유할 수 있다 (즉, "y"의 범위는 2 내지 약 8이다). 바람직하게는, 이런 가지

형 PEG는 전형적으로 2 내지 약 4개의 중합체 팔을 보유한다. 다중-팔 중합체에는 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 PEG 팔을 갖는 것들이 포함된다.

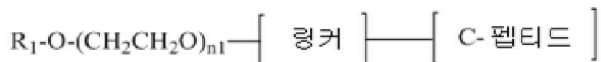
앞서 기술된 바와 같은 가지형 PEG 내에 코어 분자는 폴리올을 포함하고, 이들은 이후, 더욱 기능화된다. 이런 폴리올에는 에틸렌 글리콜, 알칸 디올, 알킬 글리콜, 알킬리덴 알킬 디올, 알킬 시클로알칸 디올, 1,5-테칼핀디올, 4,8-비스(히드록시메틸)트리시클로데칸, 시클로알킬리덴 디올, 디히드록시알칸, 트리히드록시알칸 등을 비롯하여, 1 내지 10개의 탄소 원자 및 1 내지 10개의 히드록실 기를 갖는 지방족 폴리올이 포함된다. 직선 사슬 또는 단환-고리 당과 당 알코올, 예를 들면, 만니톨, 소르비톨, 이노시톨, 자일리톨, 퀘브라치톨(quebrachitol), 트레이톨, 아라비톨, 에리트리톨, 아도니톨, 두시톨, 파코스, 리보오스, 아라비노오스, 자일로오스, 릭소오스, 람노오스, 갈락토오스, 글루코오스, 프럭토오스, 소르보오스, 만노오스, 피라노오스, 알트로오스, 탈로오스, 타기토오스(tagitose), 피라노시드, 수크로오스, 락토오스, 말토오스 등을 비롯한 시클로지방족 폴리올 역시 이용될 수 있다. 추가의 지방족 폴리올에는 글리세랄데히드, 글루코오스, 리보오스, 만노오스, 갈락토오스, 그리고 관련된 입체이성질체의 유도체가 포함된다. 이용될 수 있는 다른 코어 폴리올에는 크라운 에테르(crown ether), 시클로텍스트린, 텍스트린 및 다른 탄수화물, 예를 들면, 전분과 아밀로오스가 포함된다. 전형적인 폴리올에는 글리세롤, 펜타에리트리톨, 소르비톨, 그리고 트리메틸올프로판이 포함된다. 다른 적절한 코어에는 리신, 그리고 다른 폴리아민, 그리고 복수의 기능성 말단 종결 기를 포함하는 PEG 모이어티가 포함된다.

2개의 팔, 3개의 팔, 4개의 팔, 그리고 8개의 팔을 갖는 예시적인 다중-팔 PEG는 당분야에 공지되어 있고, 그리고 상업적으로 구입가능하고 및/또는 당업자에게 공지된 기술에 따라 제조될 수 있다 (Pasut et al., (2004) Protein, peptide and non-peptide drug PEGylation for therapeutic application Expert Opin. Ther. Patents 14(6) 859-894를 전반적으로 참고한다). 본 발명의 C-펩티드 접합체를 형성하는데 이용하기 위한 추가의 가지형-PEG에는 U.S. Patent Application Publication No. 20050009988, 20060194940, 20090234070, 20070031371, US Patent No, 6,664,331; 6,362,254; 6,437,025; 6,541,543; 6,664,331; 6,730,334; 6,774,180; 6,838,528; 7,030,278; 7,026,440; 7,053,150; 7,157,546; 7,223,803; 7,265,186; 7,419,600; 7,432,330; 7,432,331; 7,511,094; 7,528,202; 7,589,157; 그리고 PCT publication number WO2005000360, WO2005108463, WO2005107815, WO2005028539와 WO200605108463에서 기술된 것들이 포함된다.

본 발명에 이용을 위한 예시적인 선형 또는 다중-팔 PEG에는 하기에 더욱 기술된 바와 같은 일반식 (I) (II), (III) 또는 (IV)의 것들이 포함된다:

한 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 일반식 (I)의 선형 PEG를 포함한다:

[화학식 I]



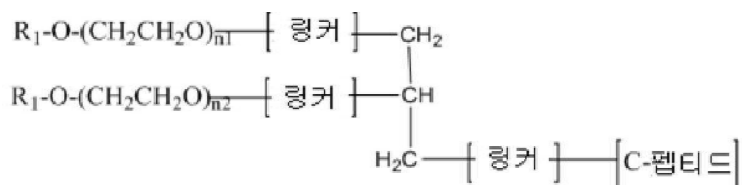
여기서;

$R_1 =$  알킬; 그리고

$n_1$ 은 20 내지 800이고; 이때 링커는 하기와 같이 정의되고, 그리고 C-펩티드의 N-말단 아미노기에 부착된다.

다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 일반식 (II)의 가지형 사슬 PEG를 포함한다:

[일반식 II]



여기서;



[0310]  $R_1$  = 알킬;

[0311]  $n_1$ 은 20 내지 800이고;

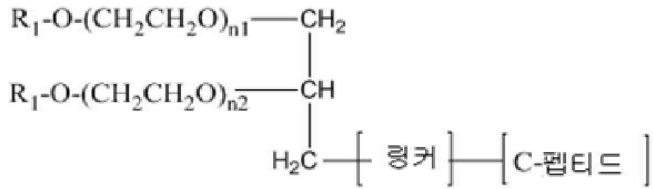
[0312]  $n_2$ 는 20 내지 800이고;

[0313] 여기서 각 링커는 하기와 같이 독립적으로 정의되고; 그리고

[0314] 여기서 C-펩티드에 연결하는 링커는 C-펩티드의 N-말단 아미노기에 부착된다.

[0315] 일반식 (II)의 폐길화된 C-펩티드의 한 구체예에서, 폐길화된 C-펩티드는 일반식 (II A)를 갖는다:

[0316] [일반식 II A]



[0317]

[0318] 여기서;

[0319]  $R_1$  = 알킬;

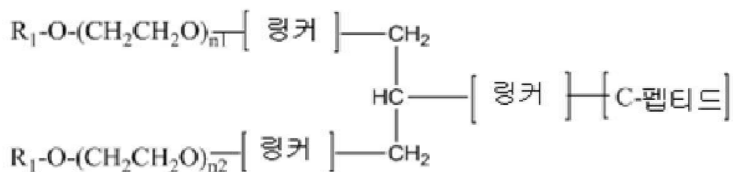
[0320]  $n_1$ 은 20 내지 800이고;

[0321]  $n_2$ 는 20 내지 800이고; 그리고

[0322] 여기서 링커는 하기와 같이 정의되고, 그리고 C-펩티드의 N-말단 아미노기에 부착된다.

[0323] 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 일반식 (III)의 가지형 사슬 PEG를 포함한다:

[0324] [일반식 III]



[0325]

[0326] 여기서;

[0327]  $R_1$  = 알킬;

[0328]  $n_1$ 은 20 내지 800이고;

[0329]  $n_2$ 는 20 내지 800이고;

[0330] 여기서 각 링커는 하기와 같이 독립적으로 정의되고, 그리고

[0331] 여기서 C-펩티드에 연결하는 링커는 C-펩티드의 N-말단 아미노기에 부착된다.

[0332] 일반식 (III)의 폐길화된 C-펩티드의 한 구체예에서, 폐길화된 C-펩티드는 일반식 III A를 갖는다:





- [0353]  $R_1$  = 알킬;
- [0354]  $n_1$ 은 20 내지 800이고;
- [0355]  $n_2$ 는 20 내지 800이고; 이때 링커는 하기와 같이 정의되고, 그리고 C-펩티드의 N-말단 아미노기에 부착된다.
- [0356] 당업자가 인지하는 바와 같이, C-펩티드 접합체를 형성하는데 이용하기 위한 선형과 가지형 사슬 PEG를 기술하는 상기 논의는 결코 전체가 아니고 단지 예시이며, 그리고 본 명세서에서 기술된 속성을 갖는 모든 중합성 물질 및 가지형 PEG 구조가 예기된다. 게다가, 본 발명에 기초하여, 당업자는 예로써, 본 명세서에서 기술된 바와 같이 접합체를 환자에 투여하고 주기적인 혈액 및/또는 소변 샘플을 채취하여 각 접합체에 대한 클리어런스 프로파일 (clearance profile)을 획득함으로써, 일과적 실험을 이용하여 대안적 폐기화된 C-펩티드의 적절한 크기와 최적 구조를 쉽게 결정할 수 있다. 일련의 클리어런스 프로파일이 각 조사된 접합체에 대해 획득되면, 원하는 클리어런스 프로파일(들)을 갖는 접합체 또는 접합체의 혼합물이 결정될 수 있다.
- [0357] II. 링커 모이어티
- [0358] C-펩티드와 물-용해성 중합체 사이에 특정한 연쇄는 연쇄의 원하는 안정성, 이의 소수성, 이용된 특정한 연쇄 화학, 그리고 폐기화된 C-펩티드의 수성 용해도와 집합 상태에 대한 영향을 비롯한 다수의 인자에 좌우된다. 예시적인 연쇄는 가수분해에 안정하고, 그리고 물 용해성의 대표적인 적절한 링커는 아미드, 우레탄 (일명, 카바메이트), 아민, 티오에테르 (일명, 설퍼드), 또는 요소 (일명, 카르바미드) 기의 임의의 조합을 포함할 수 있다.
- [0359] 적절한 물-용해성 링커 모이어티의 많은 상업적으로 구입가능한 실례가 있고 및/또는 이들은 당업자에게 공지된 기술에 따라 제조될 수 있다. 일정한 예시적인 링커 모이어티는 하기에 기술된다. 상응하는 활성화된 중간물질은 하기 표 D1과 D2에 제공된다.
- [0360] 일반식 (I), (II), (III), 또는 (IV)의 폐기화된 C-펩티드의 한 구체예에서, 폐기화된 C-펩티드는 하기에 독립적으로 선택되는 하나 또는 그 이상의 링커를 포함한다;
- [0361]  $-X-$ ,  $-CO-$ ,  $-(CH_2)_{m_2}-$ ,  $-(CH_2)_{m_1}-CO-$ ,  $-CO-(CH_2)_{m_1}-$ ,  $-CO-X-CO-$ ,
- [0362]  $-(CH_2)_{m_1}-X-(CH_2)_{m_1}-$ ,  $-(CH_2)_{m_1}-CO-(CH_2)_{m_1}-$ ,  $-X-CO-X-$ ,  $-X-(CH_2)_{m_1}-X-$ ,
- [0363]  $-CO-(CH_2)_{m_1}-CO-$ ,  $-X-CO-(CH_2)_{m_1}-$ ,  $-(CH_2)_{m_1}-CO-X-$ ,  $-X-(CH_2)_{m_1}-CO-X-$ ,
- [0364]  $-X-CO-(CH_2)_{m_1}-X-$ ,  $-X-CO-(CH_2)_{m_1}-CO-X-(CH_2)_{m_1}-X-CO-$ ,
- [0365]  $-X-(CH_2)_{m_1}-X-CO-(CH_2)_{m_2}-$ ,
- [0366]  $-X-(CH_2)_{m_1}-CO-X-(CH_2)_{m_2}-$ ,
- [0367]  $-X-(CH_2)_{m_1}-X-CO-(CH_2)_{m_2}-X-$ ,
- [0368]  $-X-(CH_2)_{m_1}-X-CO-(CH_2)_{m_2}-CO-$ ,
- [0369]  $-X-(CH_2)_{m_1}-CO-X-(CH_2)_{m_2}-X-$ , 그리고
- [0370]  $-X-(CH_2)_{m_1}-CO-X-(CH_2)_{m_2}-CO-$ ;
- [0371] 여기서;
- [0372] 각 X는  $-O-$ ,  $-S-$ , 또는  $-NH-$ 에서 독립적으로 선택되거나, 또는 없고;
- [0373] 각  $m_1$ 은 독립적으로 0 내지 5이고; 그리고

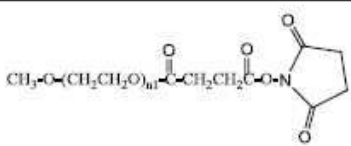
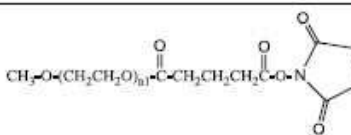
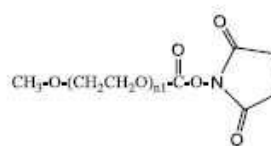
- [0374] 각  $m_2$ 는 독립적으로 1 내지 5이다.
- [0375] 일반식 (I), (II), (III), 또는 (IV)의 폐길화된 C-펩티드의 다른 구체예에서, 폐길화된 C-펩티드는 하기에서 독립적으로 선택되는 하나 또는 그 이상의 링커를 포함한다:
- [0376]  $-X_1-(CH_2)_{m4}-CO-$ ;
- [0377]  $-X_1-CO-$ ;
- [0378]  $-X_1-CO-(CH_2)_{m4}-CO-$ ;
- [0379]  $-X_1-CO-X_2-(CH_2)_{m3}-CO-$ ; 그리고
- [0380]  $-X_1-(CH_2)_{m2}-X_2-CO-(CH_2)_{m4}-CO-$ ;
- [0381] 여기서;
- [0382]  $X_1$ 은  $-O-$ 이거나, 또는 없고;
- [0383]  $X_2$ 는  $-NH-$ 이고;
- [0384]  $m_2$ 는 1 내지 5이고;
- [0385]  $m_3$ 은 2이고; 그리고
- [0386]  $m_4$ 는 1 내지 5이다.
- [0387] 일반식 (II), (III), 또는 (IV)의 폐길화된 C-펩티드의 다른 구체예에서, 폐길화된 C-펩티드는 하기에서 독립적으로 선택되는 하나 또는 그 이상의 링커를 포함한다:
- [0388]  $-X_1-CO-X_2-(CH_2)_{m5}-X_1-(CH_2-CH_2-O)_{n3}-X-$ ,
- [0389]  $-X_1-CO-X_2-(CH_2)_{m5}-X_1-(CH_2-CH_2-O)_{n3}-(CH_2)_{m5}-CO-$ ,
- [0390]  $-X_1-CO-X_2-(CH_2)_{m5}-X_1-(CH_2-CH_2-O)_{n3}-CO-$ , 그리고
- [0391]  $-X_1-CO-X_2-(CH_2)_{m5}-X_1-(CH_2-CH_2-O)_{n3}-CO-(CH_2)_{m5}-CO-$ ;
- [0392] 여기서;
- [0393]  $X$ 는  $-O-$ ,  $-S-$ , 또는  $-NH-$ 에서 독립적으로 선택되거나, 또는 없고;
- [0394]  $X_1$ 은  $-O-$ 이거나, 또는 없고;
- [0395]  $X_2$ 는  $-NH-$ 이고;
- [0396] 각  $m_5$ 는 1 내지 5에서 독립적으로 선택되고; 그리고
- [0397] 각  $n_3$ 은 1 내지 400에서 독립적으로 선택된다.
- [0398] 일반식 (II), (III), 또는 (IV)의 폐길화된 C-펩티드의 다른 구체예에서, 폐길화된 C-펩티드는 하기에서 독립적으로 선택되는 하나 또는 그 이상의 링커를 포함한다:
- [0399]  $-X_1-CO-X_2-(CH_2)_{m5}-X_1-(CH_2-CH_2-O)_{n3}-(CH_2)_{m6}-CO-$ ,
- [0400]  $-X_1-CO-X_2-(CH_2)_{m5}-X_1-(CH_2-CH_2-O)_{n3}-CO-$ , 그리고
- [0401]  $-X_1-CO-X_2-(CH_2)_{m5}-X_1-(CH_2-CH_2-O)_{n3}-CO-(CH_2)_{m7}-CO-$ ;

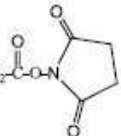
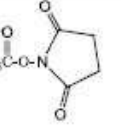
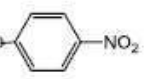
- [0402] 여기서;
- [0403]  $X_1$ 은 -O-이거나, 또는 없고;
- [0404]  $X_2$ 는 -NH-이고;
- [0405]  $m_5$ 는 3이고;
- [0406]  $m_6$ 은 독립적으로 2 또는 5이고;
- [0407]  $m_7$ 은 3이고; 그리고
- [0408]  $n_3$ 은 1 내지 400이다.
- [0409] 일반식 (IV)의 폐길화된 C-펩티드의 다른 구체예에서, 폐길화된 C-펩티드는 하기에 독립적으로 선택되는 링커를 포함한다:
- [0410] -X-, -CO-,  $-(CH_2)_{m_2}$ -, 그리고  $-X_1-C(O)-X_2-$ ;
- [0411] 여기서;
- [0412] X는 -O-, 또는 -S-, 또는 -NH-이거나, 또는 없고;
- [0413]  $X_1$ 과  $X_2$ 는 독립적으로 -NH- 또는 -O-에서 선택되거나, 또는 없고; 그리고
- [0414]  $m_2$ 는 독립적으로 1 내지 5이다.
- [0415] 당업자가 인지하는 바와 같이, C-펩티드 접합체를 형성하는데 이용하기 위한 링커 모이어티를 기술하는 상기 논의는 결코 전제가 아니고 단지 예시이며, 그리고 본 명세서에서 기술된 속성을 갖는 모든 링커가 예기된다.
- [0416] 게다가, 본 발명에 기술된 교시에 기초하여, 당업자는 예로써, 상이한 링커 모이어티를 갖는 다수의 상이한 상업적으로 구입가능한 PEG 유도체를 시험하고, 그리고 결과의 폐길화된 C-펩티드의 생물학적 활성, 용해도와 안정성을 특성화함으로써, 일과적 실험을 이용하여 링커의 적절한 크기와 최적 구조를 쉽게 결정할 수 있다.
- [0417] III. 활성화된 기능기와 반응 조건
- [0418] 인간 C-펩티드에서 유일한 자연 유리 아미노기는 N-말단 아미노기이고, 그리고 따라서, C-펩티드의 N-말단 아미노기에 중합성 PEG 기의 선별적 접합은 다양한 상업적으로 구입가능한 활성화된 PEG 및 표준 커플링 접근법을 이용하여 쉽게 달성될 수 있다.
- [0419] 한 접근법에서, C-펩티드는 활성화된 기능기, 예를 들면, 속신이미드 유도체 (가령, N-히드록시속신이미드 에스테르 (NHS))와 같은 활성 에스테르를 거쳐 PEG 시약에 접합된다. 이러한 접근법에서, 반응성 에스테르를 보유하는 PEG는 적절한 pH 조건 하에, 실온 또는 4℃에서, 수 시간 내지 하룻밤동안 수성 매체에서 C-펩티드와 반응된다. 전형적으로, 중합성 시약은 본 명세서에서 기술된 바와 같이 링커를 거쳐 활성화된 기능기에 커플링된다.
- [0420] N-히드록시속신이미드 에스테르 (NHS 기)를 보유하는 PEG 시약으로 N-말단 폐길화는 전형적으로, 약간 염기성 pH 조건, 예를 들면, 약 7.5 내지 약 8 범위의 pH 하에, 실온 또는 4℃에서, 극성 비양자성 용매, 예를 들면, 디메틸포름아미드 (DMF) 또는 아세토니트릴, 또는 이들의 조합 (펩티드를 용해시키기 위한 소량의 물과 함께)에서 수행된다. 반응 시간은 전형적으로, 반응의 pH와 온도에 따라, 1 내지 24시간의 범위 내에 있다.
- [0421] 알데히드 기를 보유하는 PEG 시약으로 N-말단 폐길화는 전형적으로, 온화한 조건 하에, 나트륨 시아노보롬하이드리드 (10 당량)의 존재에서, 4℃, 약 5 내지 10의 pH에서, 약 20 내지 36시간 동안 수행된다. N-말단 폐길화는 예로써, pH 5.0~6.0에서 100 mM 나트륨 아세테이트 또는 100 mM 나트륨 이인산염 완충액에서 수행될 수 있다. 완충액은 20 mM 나트륨 시아노보롬하이드리드를 추가적으로 내포할 수 있다. 화합물 대(對) mPEG-알데히드의 몰 비율은 1:5 ~ 1:10일 수 있다. 폐길화는 이후, 주위 온도 또는 냉장 온도에서 하룻밤동안 교반된다.
- [0422] p-니트로페닐옥시카르보닐 기를 보유하는 PEG 시약으로 N-말단 폐길화는 전형적으로, 약 8 내지 8.3의 pH에서

실온에서 하룻밤동안 붕산염 또는 인산염 완충액으로 수행된다.

[0423] 모든 커플링 반응의 경우에, 중합성 시약 대(對) C-펩티드의 다양한 비율, 예를 들면, 등몰 비율에서부터 중합체 시약의 10-배 몰 과잉까지 이용될 수 있다. 전형적으로, 2-배 몰 과잉까지의 중합체 시약이 충분할 것이다. 예시적인 활성화된 PEG에는 예로써, 표 D1과 표 D2에서 열거된 것들이 포함된다. 하기 목록에서, 선택된 폐길화 시약이 열거된다. 명백하게, 다른 활성 기와 링커가 이용될 수 있고, 그리고 이들은 당업자에게 공지되어 있다.

[표 D1]



표 D1 예시적인 활성화된 선형 PEG	
구조 / 기능성	약어 & 분자량 범위 (Da)
 N-히드록시숙신이미드 에스테르	SUNBRIGHT ME-020CS MW =2,000
	SUNBRIGHT ME-050CS MW =5,000
	SUNBRIGHT ME-100CS MW =10,000
	SUNBRIGHT ME-200CS MW =20,000
	SUNBRIGHT ME-300CS MW =30,000
	SUNBRIGHT ME-400CS MW =40,000
 N-히드록시숙신이미드 에스테르	SUNBRIGHT ME-050GS MW =5,000
	SUNBRIGHT ME-200GS MW =20,000
	SUNBRIGHT ME-300GS MW =30,000
	SUNBRIGHT ME-400GS MW =40,000
 N-히드록시숙신이미드 에스테르	SUNBRIGHT ME-050TS MW =5,000
	SUNBRIGHT ME-200TS MW =20,000
	SUNBRIGHT ME-300TS MW =30,000
	SUNBRIGHT ME-400TS MW =40,000

$\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n1}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N}$  <p>N-히드록시숙신이미드 에스테르</p>	<p>SUNBRIGHT ME-020AS MW =2,000</p> <p>SUNBRIGHT ME-050AS MW =5,000</p>
$\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n1}-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N}$  <p>N-히드록시숙신이미드 에스테르</p>	<p>SUNBRIGHT ME-050HS MW =5,000</p> <p>SUNBRIGHT ME-200HS MW =20,000</p> <p>SUNBRIGHT ME-300HS MW =30,000</p> <p>SUNBRIGHT ME-400HS MW =40,000</p>
$\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n1}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$  <p>p-니트로페닐</p>	<p>SUNBRIGHT MENP-020H MW =2,000</p> <p>SUNBRIGHT MENP-050H MW =5,000</p> <p>SUNBRIGHT MENP-10T MW =10,000</p> <p>SUNBRIGHT MENP-20T MW =20,000</p> <p>SUNBRIGHT MENP-30T MW =30,000</p> <p>SUNBRIGHT MENP-40T MW =40,000</p>
$\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n1}-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ <p>이소시아네이트</p>	
$\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n1}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CHO}$ <p>알데히드</p>	<p>SUNBRIGHT ME-050AL MW =5,000</p> <p>SUNBRIGHT ME-100AL MW =10,000</p> <p>SUNBRIGHT ME-200AL MW =20,000</p>

[0426]

	<p>SUNBRIGHT ME-300AL MW =30,000</p> <p>SUNBRIGHT ME-400AL MW =40,000</p>
$\text{CH}_3\text{-O-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}$ <p>알데히드</p>	<p>SUNBIO P1PAL-5 MW =5,000</p> <p>SUNBIO P1PAL-10 MW =10,000</p> <p>SUNBIO P1PAL-20 MW =20,000</p> <p>SUNBIO P1PAL-30 MW =30,000</p>
$\text{CH}_3\text{-O-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-CH}_2\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CNHCH}_2\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}_2\text{CH}$ <p>아미드 알데히드</p>	<p>SUNBIO P1APAL-5 MW =5,000</p> <p>SUNBIO P1APAL-10 MW =10,000</p> <p>SUNBIO P1APAL-20 MW =20,000</p> <p>SUNBIO P1APAL-30 MW =30,000</p>
$\text{CH}_3\text{-O-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-C(=O)NHCH}_2\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}_2\text{CH}$ <p>우레탄 알데히드</p>	<p>SUNBIO P1TPAL-5 MW =5,000</p>
$\text{CH}_3\text{-O-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}$ <p>알데히드</p>	<p>SUNBIO P1BAL-5 MW =5,000</p> <p>SUNBIO P1BAL-10 MW =10,000</p> <p>SUNBIO P1BAL-20 MW =20,000</p> <p>SUNBIO P1BAL-30 MW =30,000</p>
	<p>SUNBIO P1ABAL-5 MW</p>

[0427]

$\text{CH}_3\text{-O-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_{\text{m}}\text{-CH}_2\text{-C(=O)NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C(=O)H}$ <p>아미드 알데히드</p>	<p>=5,000 SUNBIO P1ABAL-10 MW =10,000 SUNBIO P1ABAL-20 MW =20,000 SUNBIO P1ABAL-30 MW =30,000</p>
$\text{CH}_3\text{-O-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_{\text{m}}\text{-C(=O)NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C(=O)H}$ <p>우레탄 알데히드</p>	<p>SUNBIO P1TBAL-5 MW =5,000</p>
$\text{R}_1\text{O(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_x\text{-C(=O)-(CH}_2\text{)}_y\text{-C(=O)-O-N}$  <p>N-히드록시숙신이미드 에스테르</p>	<p>X=0, y=1 SUNBRIGHT-AS X=0, y=5 SUNBRIGHT-HS X=1, y=2 SUNBRIGHT-CS X=1, y=3 SUNBRIGHT-GS</p>
$\text{R}_1\text{O(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_x\text{-(CH}_2\text{)}_y\text{NH-(CH}_2\text{)}_z\text{-N}$  <p>말레이미드</p>	<p>z=2 SUNBRIGHT-MA z=5 SUNBRIGHT-MA3</p>

[0428]

[0430]



$  \begin{array}{c}  R_1-O-(CH_2CH_2O)_{n1}-CH_2 \\    \\  R_1-O-(CH_2CH_2O)_{n2}-CH \\    \\  H_2C-OC(=O)NHCH_2CH_2C(=O)H \\  \text{알데히드}  \end{array}  $	<p>SUNBRIGHT GL2-200AL3 MW =20,000</p> <p>SUNBRIGHT GL2-400AL3 MW =40,000</p> <p>SUNBRIGHT GL2-600AL3 MW =60,000</p> <p>SUNBRIGHT GL2-800AL3 MW =80,000</p>
$  \begin{array}{c}  R_1-O-(CH_2CH_2O)_{n1}-CH_2 \\    \\  R_1-O-(CH_2CH_2O)_{n2}-CH \\    \\  H_2C-OC(=O)NH(CH_2)_3O(CH_2CH_2O)_{n3}-CH_2CH_2C(=O)H \\  \text{알데히드}  \end{array}  $	<p>SUNBRIGHT GL3-400AL100U MW =50,000</p>
$  \begin{array}{c}  R_1-O-(CH_2CH_2O)_{n1}-CH_2 \\    \\  R_1-O-(CH_2CH_2O)_{n2}-CH \\    \\  H_2C-OC(=O)NH(CH_2)_3O(CH_2CH_2O)_{n3}-C(=O)-C_6H_4-NO_2 \\  \text{p-니트로페닐}  \end{array}  $	<p>SUNBRIGHT GL3-400NP100U MW =50,000</p>
$  \begin{array}{c}  R_1-O-(CH_2CH_2O)_{n1}-CH_2 \\    \\  R_1-O-(CH_2CH_2O)_{n2}-CH \\    \\  H_2C-OC(=O)NH(CH_2)_3O(CH_2CH_2O)_{n3}-C(=O)-(CH_2)_2-C(=O)-N \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ O \end{array} \\  \text{N-히드록시숙신이미드 에스테르}  \end{array}  $	<p>SUNBRIGHT GL3-400GS100U MW =50,000</p>
$  \begin{array}{c}  R_1-O-(CH_2CH_2O)_{n1}-CH_2 \\    \\  R_1-O-(CH_2CH_2O)_{n2}-CH \\    \\  H_2C-OC(=O)NH(CH_2)_3O(CH_2CH_2O)_{n3}-C(=O)-(CH_2)_6-C(=O)-N \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ O \end{array} \\  \text{N-히드록시숙신이미드 에스테르}  \end{array}  $	<p>SUNBRIGHT GL3-400HS100U MW =50,000</p>
$  \begin{array}{c}  R_1-O-(CH_2CH_2O)_{n1}-O-C(=O)-NH \\    \\  H_2C-CH_2-CH_2-CH \\    \\  R_2-O-(CH_2CH_2O)_{n2}-O-C(=O)-NH \\  \text{N-히드록시숙신이미드 에스테르}  \end{array}  $	<p>SUNBRIGHT LY-400NS MW =40,000</p>

[0431]

$  \begin{array}{c}  \text{N-히드록시숙신이미드 에스테르} \\  R_1-O-(CH_2CH_2O)_{n1}-CH_2 \\    \\  HC-OCH_2CH_2CH_2NHC(=O)C(=O)-N \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ O \end{array} \\    \\  R_1-O-(CH_2CH_2O)_{n2}-CH_2  \end{array}  $	<p>MW = 40,000</p>
---	--------------------

[0432]

[0433] 페길화된 C-펩티드는 임의의 편의한 접근법에 의해, 예를 들면, 이소프로필-에테르로 침전, 그 이후에 역상 HPLC 또는 이온 교환 크로마토그래피에 의한 반응 완충액의 중화후 정제될 수 있다.

[0434] IV. C-펩티드의 치료 형태

[0435] 본 명세서에서, 용어 "C-펩티드" 또는 "프로인슐린 C-펩티드"는 C-펩티드 활성을 유지하는 C-펩티드의 모든 자연-발생 형태와 합성 형태를 포함한다. 이런 C-펩티드에는 인간 펩티드뿐만 아니라, 다른 동물 종과 속, 바람직

하계는 포유동물로부터 유래된 펩티드가 포함된다. 바람직하게는, "C-펩티드"는 아미노산 서열 EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ (표 D3에서 서열 번호 1)을 갖는 인간 C-펩티드를 지칭한다.

[0436] 다수의 상이한 종으로부터 C-펩티드는 염기서열분석되었고, 그리고 적어도 부분적으로 기능적으로 호환성인 것으로 당분야에 공지되어 있다. 따라서 인간 이외의 종 또는 속으로부터 C-펩티드인 변이체를 선별하는 것은 일과적인 문제일 것이다. C-펩티드의 여러 이와 같은 변이체 (즉, 다른 종으로부터 대표적인 C-펩티드)는 표 D3에 제시된다 (서열 번호 1-29를 참고한다).

[0437] [표 D3]

표 D3 C-펩티드 변이체		
인간 M- 프로인슐린	인간 EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ (서열 번호 1)	<a href="#">gb AAA7253</a> <a href="#">1.1 </a> <a href="#">dbj BAH5908</a> <a href="#">1.1 </a>
침팬지 (Pan troglodytes)	(서열 번호 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ 정렬 EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ (서열 번호 2) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ  동일성 = 31/31 (100%). 포지티브 = 31/31 (100%). 갭 = 0/31 (0%)	<a href="#">NP_0010089</a> <a href="#">96.1 </a> <a href="#">emb CAA434</a> <a href="#">03.1 </a> 유전자 ID: <a href="#">449570 INS</a>
고릴라 (Gorilla gorilla)	(서열 번호 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ 정렬 EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ (서열 번호 3) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ  동일성 = 31/31 (100%). 포지티브 = 31/31 (100%). 갭 = 0/31 (0%)	<a href="#">gb AAN0693</a> <a href="#">5.1 </a>
오랑우탄 (Pongo pygmaeus) (보르네오 오랑우탄)	(서열 번호 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ (서열 번호 4) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ 동일성 = 31/31 (100%). 포지티브 = 31/31 (100%). 갭 = 0/31 (0%)	<a href="#">gb AAN0693</a> <a href="#">7.1 </a>
그린벵 원숭이 (Chlorocebu s aethiops) (원숭이)	(서열 번호 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ EAED OVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ (서열 번호 5) EAEDPOVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ  동일성 = 30/31 (96%). 포지티브 = 30/31 (96%). 갭 = 0/31 (0%)	<a href="#">emb CAA434</a> <a href="#">05.1 </a>
개 (Canis lupus familiaris)	(서열 번호 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ E EDLQV VEL G PG G LOPLALEG+LQ (서열 번호 6) EVEDLQVRDVELAGAPGEGGLOPLALEGALQ  동일성 = 23/31 (74%). 포지티브 = 24/31 (77%). 갭 = 0/31 (0%)	<a href="#">ref NP_0011</a> <a href="#">23565.1 sp </a> <a href="#">P01321.1 IN</a> <a href="#">S-CANFAem</a> <a href="#">b CAA23475</a> <a href="#">1 </a> 유전자 ID: <a href="#">483665 INS</a>
굴토끼 (Oryctolagus cuniculus) (토끼)	(서열 번호 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ E E+LQVGQ ELGGPG AG LQP ALE +LQ (서열 번호 7) EVEELQVGQAEELGGGPDAGGLQPSALELALQ  동일성 = 23/31 (74%). 포지티브 = 25/31 (80%). 갭 = 0/31 (0%)	<a href="#">gb ACK4431</a> <a href="#">9.1 </a>

[0438]

시궁쥐 (Rattus norvegicus)	(서열 번호 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ E ED QV Q+ELGGGPGAG LQ LALE + Q. (서열 번호 8) EVEDPQVAQLELGGGPGAGDLQTLALEVARQ  동일성 = 22/31 (70%), 포지티브 = 24/31 (77%). 갭 = 0/31 (0%)	<a href="#">ref NP_062003.1 </a> <a href="#">sp P01323.1 INS2_RAT</a> <a href="#">emb CAA24560.1 </a> 유전자 ID: 24506 Ins2
대만 들쥐 (Apodemus semotus)	(서열 번호 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ E ED QV Q+ELGGGPGAG LQ LALE + Q. (서열 번호 9) EVEDPQVAQLELGGGPGAGDLQTLALEVARQ  동일성 = 22/31 (70%), 포지티브 = 24/31 (77%). 갭 = 0/31 (0%)	<a href="#">gb ABB8974.8.1 </a>
해면 (Geodia cydonium)	(서열 번호 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ E ED QVGQVELG GPGAGS Q LALE + Q (서열 번호 10) EVEDPQVGQVELGAGPGAGSEQLALEVARQ  동일성 = 23/31 (74%), 포지티브 = 24/31 (77%). 갭 = 0/31 (0%)	<a href="#">pir S09278</a>
생쥐 (Mus musculus)	(서열 번호 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALE E ED QV Q+ELGGGPGAG LQ LALE (서열 번호 11) EVEDPQVAQLELGGGPGAGDLQTLALE  동일성 = 21/27 (77%), 포지티브 = 22/27 (81%). 갭 = 0/27 (0%)	<a href="#">ref NP_032413.1 </a>  <a href="#">sp P01326.1 INS2_MOUS</a> <a href="#">Emb CAA28433.1 </a> 유전자 ID: 16334 Ins2
류큐 쥐 (Mus caroli)	(서열 번호 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALE E ED QV Q+ELGGGPGAG LQ LALE (서열 번호 12) EVEDPQVAQLELGGGPGAGDLQTLALE  동일성 = 21/27 (77%), 포지티브 = 22/27 (81%). 갭 = 0/27 (0%)	<a href="#">gb ABB8974.9.1 </a>
시궁쥐 (Rattus norvegicus)	(서열 번호 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ E ED QV Q+ELGGGPGAG LQ LALE + Q (서열 번호 13) EVEDPQVPQLELGGGPGAGDLQTLALEVARQ  동일성 = 22/31 (70%), 포지티브 = 24/31 (77%). 갭 = 0/31 (0%)	<a href="#">prf  7204608</a>
라투스 로세아 (Rattus losea)	(서열 번호 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ E ED QV Q ELGGGPGAG LQ LALE + Q (서열 번호 14) EVEDPQVAQLELGGGPGAGDLQTLALEVARQ  동일성 = 22/31 (70%), 포지티브 = 23/31 (74%). 갭 = 0/31 (0%)	<a href="#">gb ABB8974.7.1 </a>

[0439]

꼭싱씨 흰배쥐 (Coxing's white-bellied rat) (Niviventer coxingi)	(서열 번호 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLO E ED QV Q+ELGGGPG G LQ LALE + Q (서열 번호 15) EVEDPQVQLELGGGPGTGDLOTLALEVARQ  동일성 = 21/31 (67%), 포지티브 = 23/31 (74%), 갭 = 0/31 (0%)	<a href="#">gb ABB8975</a> <a href="#">0.1 </a>
대만 들쥐 (Microtus kikuchii)	(서열 번호 1) AEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALE ED QV Q+ELGGGPGAG LQ LALE (서열 번호 16) VEDPQVAQLELGGGPGAGDLOTLALE  동일성 = 20/26 (76%), 포지티브 = 21/26 (80%), 갭 = 0/26 (0%)	<a href="#">gb ABB8975</a> <a href="#">2.1 </a>
시궁쥐 (Rattus norvegicus)  인슐린 전구체 1	(서열 번호 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLO E ED QV Q+ELGGGP AG LQ LALE + Q (서열 번호 17) EVEDPQVQLELGGGPEAGDLOTLALEVARQ  동일성 = 21/31 (67%), 포지티브 = 23/31 (74%), 갭 = 0/31 (0%)	<a href="#">ref NP_0620</a> <a href="#">02.1 </a> <a href="#">gb AAA4143</a> <a href="#">9.1 </a> <a href="#">gb AAA4144</a> <a href="#">2.1 </a> <a href="#">emb CAA245</a> <a href="#">59.1 </a> <a href="#">gb EDL9440</a> <a href="#">7.1 </a> 유전자 ID: <a href="#">24505 Ins1</a>
고양이 (Felis catus) (집 고양이)	(서열 번호 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLO EAEDLQ ELG PGAG LQP ALE LQ (서열 번호 18) EAEDLQGKDAELGEAPGAGGLQPSALEAPLO  동일성 = 21/31 (67%), 포지티브 = 21/31 (67%), 갭 = 0/31 (0%)	<a href="#">ref NP_0010</a> <a href="#">09272.1 </a> <a href="#">sp P06306.2</a> <a href="#"> INS_FELCA</a> <a href="#">dbi BAB8411</a> <a href="#">0.1 </a>  유전자 ID: <a href="#">493804 INS</a>
명주쥐 (Golden hamster)	(서열 번호 1) AEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALE ED QV Q+ELGGGPGA LQ LALE (서열 번호 19) VEDPQVAQLELGGGPGADDLOTLALE  동일성 = 19/26 (73%), 포지티브 = 20/26 (76%), 갭 = 0/26 (0%)	<a href="#">sp P01313.2</a> <a href="#"> INS-CRILQ</a>  <a href="#">pir  I48166</a>  <a href="#">gb AAA3708</a> <a href="#">9.1 </a>
꼭싱씨 흰배쥐 (Coxing's white-bellied rat) (Niviventer coxingi)	(서열 번호 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLO E ED QV Q+ELG GP AG LQ LALE + Q (서열 번호 20) EVEDPQVAQLELGGGPEAGDLOTLALEVARQ  동일성 = 20/31 (64%), 포지티브 = 22/31 (70%), 갭 = 0/31 (0%)	<a href="#">gb ABB8974</a> <a href="#">6.1 </a>

[0440]



대만 들쥐 ( <i>Apodemus semotus</i> )	(서열 번호 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLO E ED QV Q+ELGG PG G L+ LALE + Q (서열 번호 21) EVEDPQVEQLELGGAPGTGDLTLELAVARQ  동일성 = 19/31 (61%), 포지티브 = 22/31 (70%), 갭 = 0/31 (0%)	gb ABB8974 4.1
라투스 로세아 ( <i>Rattus losea</i> )	(서열 번호 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLO E ED QV Q+ELGG P AG LQ LALE + Q (서열 번호 22) EVEDPQVPQLELGGSPAGDLQTLAVARQ  동일성 = 20/31 (64%), 포지티브 = 22/31 (70%), 갭 = 0/31 (0%)	gb ABB8974 3.1
모래 쥐 ( <i>Meriones unguiculatus</i> )	(서열 번호 1) AEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLO ED Q+ Q+ELGG PGAG LQ LALE + Q (서열 번호 23) VEDPQMPQLELGGSPGAGDLQALAVARQ  동일성 = 19/30 (63%), 포지티브 = 22/30 (73%), 갭 = 0/30 (0%)	gb ABB8975 1.1
사막 쥐 ( <i>Psammomys obesus</i> ) (사막 모래쥐)	(서열 번호 1) AEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLO +D Q+ Q+ELGG PGAG L+ LALE + Q (서열 번호 24) VDDPQMPQLELGGSPGAGDLRALAVARQ  동일성 = 17/30 (56%), 포지티브 = 22/30 (73%), 갭 = 0/30 (0%)	sp Q62587.1  INS_PSAOB emb CAA668 97.1
돼지 ( <i>Sus scrofa</i> )	(서열 번호 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEG EAE+ Q G VELGG G G LQ LALEG (서열 번호 25) EAENPQAGAVELGG--GLGGLQALALEG  동일성 = 19/28 (67%), 포지티브 = 20/28 (71%), 갭 = 2/28 (7%)	ref NP_0011 03242.1
관박쥐 ( <i>Rhinolophus ferrumequinum</i> )	(서열 번호 26) EVEDPQAGQVELGGGPGTGGGLQSLALEGPPQ	gb ACC6894 5.1
프제발스키 말 ( <i>Equus przewalskii</i> ) (말)	(서열 번호 27) EAEDPQVGEVELGGGPGGLGLOPLALAGPQQ	유전자 ID: 100060077 LOC1000600 77 gb AAB2581 8.1
소 ( <i>Bos Taurus</i> )	(서열 번호 28) EVEGPQVGALELAGGPGAGGLEGPPQ	gb AAI42035 .1
목부근 갈라고 ( <i>Otolis mur garnetti</i> )	(서열 번호 29) DTEDPQVGQVGLGGSPITGDLQSLALDVPPQ	gb ACH5310 3.1

[0441]

[0442] 따라서 인간뿐만 아니라 다른 종으로부터 C-펩티드의 모든 이와 같은 동족체, 오르토로그 (ortholog), 그리고 자연-발생 이소형 (서열 번호 1-29)은 그들이 검출가능한 C-펩티드 활성을 유지하기만 하면, 본 발명의 임의의 방법과 제약학적 조성물 내에 포함된다.

[0443] C-펩티드는 그들의 고유 형태, 다시 말하면, 그들이 상이한 종에서 자연적으로 나타나는 바와 같은 상이한 변이체로서 존재하고, 이들은 인간 C-펩티드의 기능적으로 동등한 변이체로 간주될 수 있고, 또는 이들은 기능적으로 동등한 자연 유도체이고, 이들은 예로써, 절두 (가령, N- 또는 C-말단 또는 둘 모두로부터) 또는 다른 아미노산 결실, 부가, 삽입, 치환, 또는 번역후 변형에 의해 그들의 아미노산 서열에서 상이할 수 있다. C-펩티드의 번역후 변형과 분해 산물, 예를 들면, C-펩티드의 피로글루타미드, 이소-아스파르틸, 단백분해, 인산화, 당화, 산화, 이성질화, 그리고 탈아미노화 변이체를 비롯한 자연-발생 화학적 유도체 역시 본 발명의 임의의 방법과 제약학적 조성물 내에 특이적으로 포함된다.

[0444] 유용한 활성을 유지하면서 단백질 또는 펩티드의 서열을 합성적으로 변형하는 것은 당분야에 알려져 있고, 그리고 이것은 당분야에서 표준이고 기존 문헌에서 폭넓게 보고되는 기술, 예를 들면, 무작위 또는 특정부위 돌연변이 유발, 개열 (cleavage), 그리고 핵산의 절찰을 이용하여, 또는 아미노산 또는 폴리펩티드 사슬의 화학적 합성 또는 변형을 거쳐 달성될 수 있다. 유사하게는, C-펩티드 변이체를 이용하면 발생하는 번역원성 우려

(immunogenicity concern)를 예로써, 잠재적 T 세포 에피토프를 확인하는 자동화된 컴퓨터 인식 프로그램, 그리고 번역원성이 덜한 형태를 확인하는 방향적 진화 접근법 (directed evolution approach)의 이용에 의해 해결하고 및/또는 완화하는 것은 당분야의 평균적 지식 내에 있다.

[0445] 임의의 이와 같은 변형, 또는 이들의 조합이 만들어지고, 그리고 활성이 유지되지만 하면, 본 발명의 임의의 방법과 제약학적 조성물에 이용될 수 있다. 분자의 C-말단 단부는 활성에 중요한 것으로 알려져 있다. 바람직하게는, 이런 이유로, C-펩티드의 C-말단 단부는 임의의 이와 같은 C-펩티드 변이체 또는 유도체 내에 보존되어야 하고, 더욱 바람직하게는 C-펩티드의 C-말단 펜타펩티드 (EGSLQ) (서열 번호 31)는 보존되거나 충분해야 한다 (참고: Henriksson M et al.: *Cell Mol. Life Sci.* 62: 1772-1778, (2005)). 앞서 언급된 바와 같이, 아미노산 서열의 변형은 아미노산 치환일 수 있다, 가령, 아미노산은 펩티드의 물리화학적 특징을 보존하는 다른 아미노산으로 대체될 수 있다 (가령, A는 G로 대체되거나 그 반대일 수 있고, V는 A 또는 L로 대체될 수 있고; E는 D로 대체되거나 그 반대일 수 있고; 그리고 Q는 N으로 대체될 수 있다). 일반적으로, 치환 아미노산은 치환되는 아미노산과 유사한 성질, 예를 들면, 소수성 (hydrophobicity), 친수성 (hydrophilicity), 전기음성도 (electronegativity), 부피가 큰 측쇄 (bulky side chain) 등을 갖는다.

[0446] C-펩티드 서열의 중간-부분 (가령, 인간 C-펩티드의 잔기 13 내지 25)에 변형은 C-펩티드의 기능적 유도체 또는 변이체의 생산을 가능하게 한다. 따라서 본 발명의 임의의 방법 또는 제약학적 조성물에 이용될 수 있는 C-펩티드는 고유 C-펩티드 아미노산 서열, 예를 들면, 서열 번호 1의 인간 C-펩티드 서열 또는 표 D3에 제시된 임의의 다른 고유 C-펩티드 서열에 실질적으로 상동한, 또는 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 가질 수 있다. 대안으로, C-펩티드는 표 D3에 제시된 서열 번호 1-29 중에서 한 가지의 아미노산 서열, 바람직하게는 서열 번호 1의 고유 인간 서열과 적어도 30 %, 바람직하게는 적어도 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 또는 99 % 동일성을 갖는 아미노산 서열을 가질 수 있다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 임의의 방법 또는 제약학적 조성물에서 이용을 위한 C-펩티드는 표 D3에서 선택되는 서열과 적어도 80 % 동일하다. 다른 양태에서, 본 발명의 임의의 방법 또는 제약학적 조성물에서 이용을 위한 C-펩티드는 인간 C-펩티드 (서열 번호 1)에 적어도 80 % 동일하다. 비록 C-펩티드의 임의의 아미노산이 앞서 기술된 바와 같이 변화될 수 있긴 하지만, 인간 C-펩티드 (서열 번호 1)의 위치 3, 11, 그리고 27, 또는 다른 종의 C-펩티드에서 상응하는 또는 동등한 위치에서 하나 또는 그 이상의 글루타민산 잔기가 보존되는 것이 바람직하다. 바람직하게는, 서열 번호 1의 위치 3, 11, 그리고 27에서 모든 글루타민산 잔기 (또는 상응하는 Glu 잔기)가 보존된다. 대안으로, 바람직하게는 인간 C-펩티드의 Glu27 (또는 비-인간 C-펩티드의 상응하는 Glu 잔기)이 보존된다. 본 발명의 임의의 방법 또는 제약학적 조성물에 이용될 수 있는 C-펩티드의 예시적인 기능적으로 동등한 형태는 하기 아미노산 서열을 포함한다:

[0447] EXEXXQXXXELXXXXXXXXXXALBXXXQ (서열 번호 30).

[0448] GXEXXQXXXELXXXXXXXXXXALBXXXQ (서열 번호 33).

[0449] 본 명세서에서, X는 임의의 아미노산이다. N-말단 잔기는 Glu 또는 Gly (각각, 서열 번호 30 또는 서열 번호 33)일 수 있다. 고유 C-펩티드 서열의 기능적으로 동등한 유도체 또는 변이체는 당분야에 공지된 기술에 따라 쉽게 제조될 수 있고, 그리고 고유 C-펩티드의 기능적, 예를 들면, 생물학적 활성을 갖는 펩티드 서열을 포함한다.

[0450] 고유 또는 합성 C-펩티드 서열의 단편은 또한, 그들이 유래된 펩티드의 바람직한 기능적 성질을 가질 수 있고, 그리고 본 발명의 임의의 방법 또는 제약학적 조성물에 이용될 수 있다. 따라서 본 명세서에서, 용어 "단편"은 C-펩티드의 단편을 포함하고, 단서로써 이들 단편은 전체 분자의 생물학적 또는 치료적으로 유익한 활성을 유지해야 한다. 단편은 또한, C-펩티드의 C-말단 단편을 포함할 수 있다. 바람직한 단편은 고유 C-펩티드의 잔기 15-31, 더욱 구체적으로 잔기 20-31을 포함한다. 펜타펩티드 EGSLQ (서열 번호 31) (고유 인간 C-펩티드의 잔기 27-31)를 포함하는 펩티드 역시 바람직하다. 따라서 단편은 예로써, 4개 내지 30개 아미노산 또는 5개 내지 20개 잔기의 크기에서 변한다. 적절한 단편은 WO 98/13384에서 개시되고, 이의 내용은 본 발명에 참고문헌으로 편입된다.

[0451] 단편은 또한, 전형적으로 서열 EAEDLQVGQVEL (서열 번호 32)을 갖는 C-펩티드의 N-말단 단편, 또는 2개의 산성 아미노산 잔기를 포함하고, 이들 2개의 산성 아미노산 잔기가 그들의 알파-탄소 사이에 9-14 Å의 거리에 의해

공간적으로 분리되는 입체형태 (conformation)를 채택할 수 있는 이의 단편을 포함한다. 또한, N- 및/또는 C-말단 확장 또는 측면 서열을 갖는 단편이 포함된다. 이런 연장된 펩티드의 길이는 변할 수 있지만, 전형적으로 50, 30, 25, 또는 20개 아미노산 이하의 길이를 갖는다. 대표적인 적절한 단편은 US Pat. No. 6,610,649에서 기술되고, 이것은 본 발명에 전체로서 참고문헌으로 편입된다.

[0452] 이런 경우에, 확장 또는 측면 서열은 자연-발생 또는 고유 C-펩티드, 그리고 특히 단편이 유래되는 C-펩티드에 고유하지 않은 아미노산의 서열인 것으로 인지될 것이다. 이런 N- 및/또는 C-말단 확장 또는 측면 서열은 예로써, 1 내지 10개, 1 내지 6개, 1 내지 5개, 1 내지 4개, 또는 1 내지 3개의 아미노산을 포함할 수 있다.

[0453] 따라서 본 명세서에서, 용어 "유도체"는 C-펩티드 서열 또는 이들의 단편을 지칭하고, 이들은 고유 서열과 비교하여 변형을 갖는다. 이런 변형은 하나 또는 그 이상의 아미노산 결실, 부가, 삽입, 및/또는 치환될 수 있다. 이들은 인접하거나 비-인접할 수 있다. 대표적인 변이체에는 서열 번호 1-33 중에서 한 가지와 비교하여 1 내지 6개, 또는 그 이상, 바람직하게는 1 내지 4개, 1 내지 3개, 또는 1 또는 2개의 아미노산 치환, 삽입, 및/또는 결실을 갖는 것들이 포함된다. 치환된 아미노산은 임의의 아미노산, 특히 널리 공지된 20개의 전통적인 아미노산 (Ala (A); Cys (C); Asp (D); Glu (E); Phe (F); Gly (G); His (H); Ile (I); Lys (K); Leu (L); Met (M); Asn (N); Pro (P); Gln (Q); Arg (R); Ser (S); Thr (T); Val (V); Trp (W); 그리고 Tyr (Y)) 중에서 한 가지일 수 있다. C-펩티드의 임의의 이와 같은 변이체 또는 유도체가 본 발명의 임의의 방법 또는 제약학적 조성물에 이용될 수 있다.

[0454] 고유 L-아미노산의 이성질체, 예를 들면, D-아미노산은 C-펩티드의 상기 형태 중에서 한 가지에 함입 (incorporation)되고, 그리고 본 발명의 임의의 방법 또는 제약학적 조성물에 이용될 수 있다. 추가의 변이체는 아미노 및/또는 카복실 말단 융합체, 그리고 단일 또는 복수 아미노산의 서열내 삽입을 포함할 수 있다. 더욱 긴 펩티드는 하나 또는 그 이상의 C-펩티드 서열, 예를 들면, 서열 번호 1-33 중에서 한 가지의 복수 사본을 포함할 수 있다. 삽입성 아미노산 서열 변이체는 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기가 단백질 내에 한 부위에 도입되는 것들이다. 결실성 변이체는 서열로부터 하나 또는 그 이상의 아미노산의 제거로 특징된다. 변이체에는 예로써, 그들이 자연적으로 나타나는 바와 상이한 대립 변이체 (allelic variant), 예를 들면, 다른 종에서 또는 지리적 변이 (geographical variation)에 기인한 대립 변이체가 포함된다. 이와 같은 변이체, 유도체, 융합 단백질, 또는 C-펩티드의 단편 모두 본 발명에 포함되고, 본 명세서에서 개시된 임의의 방법 또는 제약학적 조성물에 이용될 수 있고, 그리고 용어 "C-펩티드" 하에 포함된다.

[0455] C-펩티드의 폐길화된 형태, C-펩티드 변이체, 유도체, 그리고 이들의 단편은 그들이 검출가능 C-펩티드 활성을 갖는다는 점에서 기능적으로 동등하다. 더욱 구체적으로, 이들은 고유 프로인슐린 C-펩티드, 구체적으로 인간 C-펩티드의 활성의 적어도 약 1 %, 적어도 약 5 %, 적어도 약 10 %, 적어도 약 15 %, 적어도 약 20 %, 적어도 약 30 %, 적어도 약 40 %, 적어도 약 50 %, 적어도 약 60 %, 적어도 약 70 %, 적어도 약 80 %, 적어도 약 90 %, 적어도 약 100 %, 또는 100 % 이상을 나타낸다. 따라서 이들은 프로인슐린 C-펩티드로서 기능할 수 있다, 다시 말하면, C-펩티드 자체를 대체할 수 있다. 이런 활성은 생체내 또는 시험관내 검사 시스템에서 나타나는 생리학적 반응, 또는 예로써, 효소 측정법에서 또는 검사 조직, 막, 또는 금속 이온에 대한 결합에서 고유 C-펩티드에 의해 매개되는 임의의 생물학적 활성 또는 반응인 지에 상관없이, 고유 C-펩티드가 나타내는 임의의 활성을 의미한다. 따라서 C-펩티드는 칼슘의 유입을 유발하고, 그리고 ERK 1과 2, CREB, PKC, GSK3, PI3K, NF-kappaB 및 PPARGamma의 인산화를 비롯한 MAP-키나아제 경로의 인산화와 같은 일정한 범위의 세포내 신호전달 캐스케이드를 개시하여 eNOS, Na+K+ATPase 및 넓은 범위의 전사 인자 (transcription factor)의 증가된 발현을 결과하는 것으로 알려져 있다. 따라서 C-펩티드 활성화에 대한 분석평가는 내피, 신장, 섬유아세포 및 면역 세포를 비롯한 관련된 표적 조직으로부터 세포에 문제의 펩티드 (가령, 단편 또는 유도체)의 첨가 또는 투여 시에 이들 경로 중에서 한 가지의 활성화 또는 상향-조절을 시금함으로써 달성될 수 있다. 이런 분석평가는 예로써, Ohtomo Y et al. (*Diabetologia* 39: 199-205, (1996)), Kunt T et al. (*Diabetologia* 42(4): 465-471, (1999)), Shafqat J et al. (*Cell Mol. Life Sci.* 59: 1185-1189, (2002)), Kitamura T et al. (*Biochem. J.* 355: 123-129, (2001)), Hills and Brunskill (*Exp Diab Res* 2008), WO 98/13384 또는 Ohtomo Y et al. (supra) 또는 Ohtomo Y et al. (*Diabetologia* 41: 287-291, (1998))에서 기술된다. 내피 산화질소 합성효소 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 활성화에 기초된 C-펩티드 활성화에 대한 분석평가 역시 소 대동맥 세포 및 리포터 세포 측정법을 이용한 Kunt T et al. (supra)에서 기술된다. 특정 세포에 결합은 또한, 예로써 Rigler R et al. (*PNAS USA* 96: 13318-13323, (1999)), Henriksson M et al. (*Cell Mol. Life Sci.* 57: 337-342, (2000)) 및 Pramanik A et al. (*Biochem Biophys. Res. Commun.* 284: 94-98, (2001))에서 기술된 바와 같이, 형광 상관 분광법 (fluorescence correlation spectroscopy)을 이용하여 예로써, 인간 신관 세포 (renal

tubular cell), 피부 섬유아세포 (skin fibroblast), 그리고 복재 정맥 내피 세포 (saphenous vein endothelial cell)로부터 세포 막에 대한 C-펩티드 활성을 평가하거나 시금하는데 이용될 수 있다.

[0456] 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 포유동물에 피하 투여될 때 변형되지 않은 C-펩티드보다 적어도 약 5-배 큰 혈장 또는 혈청 약물동력학적 AUC 프로필을 갖는다.

[0457] 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 포유동물에 피하 투여될 때 변형되지 않은 C-펩티드보다 적어도 약 6-배 큰 혈장 또는 혈청 약물동력학적 AUC 프로필을 갖는다.

[0458] 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 포유동물에 피하 투여될 때 변형되지 않은 C-펩티드보다 적어도 약 7-배 큰 혈장 또는 혈청 약물동력학적 AUC 프로필을 갖는다.

[0459] 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 포유동물에 피하 투여될 때 변형되지 않은 C-펩티드보다 적어도 약 8-배 큰 혈장 또는 혈청 약물동력학적 AUC 프로필을 갖는다.

[0460] 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 포유동물에 피하 투여될 때 변형되지 않은 C-펩티드보다 적어도 약 10-배 큰 혈장 또는 혈청 약물동력학적 AUC 프로필을 갖는다.

[0461] 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 포유동물에 피하 투여될 때 변형되지 않은 C-펩티드보다 적어도 약 15-배 큰 혈장 또는 혈청 약물동력학적 AUC 프로필을 갖는다.

[0462] 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 포유동물에 피하 투여될 때 변형되지 않은 C-펩티드보다 적어도 약 20-배 큰 혈장 또는 혈청 약물동력학적 AUC 프로필을 갖는다.

[0463] 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 포유동물에 피하 투여될 때 변형되지 않은 C-펩티드보다 적어도 약 25-배 큰 혈장 또는 혈청 약물동력학적 AUC 프로필을 갖는다.

[0464] 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 포유동물에 피하 투여될 때 변형되지 않은 C-펩티드보다 적어도 약 50-배 큰 혈장 또는 혈청 약물동력학적 AUC 프로필을 갖는다.

[0465] 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 포유동물에 피하 투여될 때 변형되지 않은 C-펩티드보다 적어도 약 75-배 큰 혈장 또는 혈청 약물동력학적 AUC 프로필을 갖는다.

[0466] 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 포유동물에 피하 투여될 때 변형되지 않은 C-펩티드보다 적어도 약 100-배 큰 혈장 또는 혈청 약물동력학적 AUC 프로필을 갖는다.

[0467] 한 양태에서, 포유동물은 개이다. 한 양태에서, 포유동물은 쥐이다. 한 양태에서, 포유동물은 인간이다.

[0468] V. C-펩티드 및 폐길화된 C-펩티드 생산

[0469] C-펩티드는 표준 고품-상 펩티드 합성을 이용하여, 또는 재조합 기술에 의해, 예를 들면, 인간 프로인슐린으로부터 인간 인슐린의 생산에서 부산물로서, 또는 유전자 조작된 숙주를 이용하여 합성적으로 생산될 수 있다 (전반적으로, WO 1999007735; Jonasson P, et al., J Biotechnol. (2000) 76(2-3):215-26; Jonasson P, et al., Gene (1998):210(2):203-10; Li SX, Tian et al., Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai) (2003) 35(11):986-92; Nilsson J, et al., J Biotechnol. (1996) 48(3):241-50; Huang YB, et al., Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) (2006) 38(8):586-92를 참고한다).

[0470] N-말단에 직접 커플링에 대한 대안적 접근법에서, PEG 시약, 또는 리신 잔기가 펩티드 합성 동안 C-펩티드의 원하는 위치에서 함입될 수 있다. 이러한 방식으로, 하나 또는 그 이상의 PEG의 부위-선택적 도입이 달성될 수 있다. 예로써, International Patent Publication No. WO 95/00162를 참고하고, 이것은 접합된 펩티드의 부위 선택적 합성을 기술한다.

[0471] C-펩티드는 예로써, US Pat. No. 6,500,645에서 개시된 바와 같이 인슐린 생합성에 이용되는 널리 공지된 기술에 의해, 적절한 숙주 세포에서 문제의 C-펩티드를 인코딩하는 DNA 서열을 발현함으로써 생산될 수 있다. C-펩티드는 직접적으로, 또는 US Pat. No. 6,558,924에서 개시된 바와 같이 산물의 수율을 증가시키기 위해 다합체화된 구조체 (multimerized construct)로서 발현될 수 있다. 다합체화된 산물은 배양액 (culture broth)으로부터 분리후 시험관내에서 개열된다.

[0472] C-펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 확립된 표준 방법, 예를 들면, Beaucage et al. (1981)



*Tetrahedron Letters* 22:1859-1869에 의해 기술된 포스포라미디트 방법, 또는 Matthes et al. (1984) *EMBO Journal* 3:801-805에 의해 기술된 방법에 의해 합성적으로 제조될 수 있다. 포스포라미디트 방법에 따라, 올리고뉴클레오티드는 예로써, 자동 DNA 합성장치에서 합성되고, 정제되고, 이중으로 되고, 그리고 결합되어 합성 DNA 구조체가 형성된다. DNA 구조체를 제조하는 현재 선호되는 방법은 중합효소 연쇄 반응 (PCR)이다.

[0473] 폴리뉴클레오티드 서열은 또한, 혼성 게놈, cDNA, 그리고 합성 기원일 수 있다. 가령, 리더 펩티드를 인코딩하는 게놈 또는 cDNA 서열은 A와 B 사슬을 인코딩하는 게놈 또는 cDNA 서열에 연결될 수 있고, 그 이후에 상기 DNA 서열은 널리 공지된 절차에 따라 상동성 재조합 (homologous recombination)을 위한 원하는 아미노산 서열을 인코딩하는 합성 올리고뉴클레오티드를 삽입하거나, 또는 바람직하게는, 적절한 올리고뉴클레오티드를 이용한 PCR에 의해 원하는 서열을 산출함으로써 한 부위에서 변형될 수 있다.

[0474] 재조합 방법은 전형적으로, 선택된 미생물 또는 숙주 세포에서 복제할 수 있고, 그리고 본 발명의 부모 단일-사슬 인술린을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 운반하는 벡터를 이용할 것이다. 재조합 벡터는 자율적 복제 벡터, 다시 말하면, 염색체의 실체 (extra-chromosomal entity)로서 존재하는 벡터일 수 있고, 이의 복제는 염색체 복제, 예를 들면, 플라스미드 (plasmid), 염색체의 요소 (extra-chromosomal element), 미니-염색체 (mini-chromosome), 또는 인공 염색체 (artificial chromosome)와 독립적이다.

[0475] 벡터는 자가-복제 (self-replication)를 담보하기 위한 임의의 수단을 내포할 수 있다. 대안으로, 벡터는 숙주 세포 내로 도입될 때, 게놈 내로 통합되고, 그리고 자신이 통합된 염색체(들)과 함께 복제되는 것일 수 있다. 게다가, 단일 벡터 또는 플라스미드 또는 숙주 세포의 게놈 내로 도입되는 전체 DNA를 함께 내포하는 2개 또는 그 이상의 벡터 또는 플라스미드, 또는 트랜스포손 (transposon)이 이용될 수 있다. 벡터는 선형 또는 닫힌 원형 플라스미드일 수 있고, 그리고 바람직하게는, 숙주 세포의 게놈 내로 벡터의 안정된 통합 또는 게놈과 무관하게 세포 내에서 벡터의 자율 복제 (autonomous replication)를 가능하게 하는 요소(들)를 내포할 것이다.

[0476] 재조합 발현 벡터는 효모에서 복제할 수 있다. 벡터가 효모에서 복제할 수 있도록 하는 서열의 실례는 효모 플라스미드 2 pm 복제 유전자 REP 1-3 및 복제 기점 (origin of replication)이다. 벡터는 형질전환된 세포의 용이한 선별을 가능하게 하는 하나 또는 그 이상의 선별가능 마커 (selectable marker)를 내포할 수 있다. 선별가능 마커는 그 산물이 살생물제 또는 바이러스 내성, 중금속에 대한 내성, 영양요구체 (auxotroph)에 원영양체 (prototroph) 등을 제공하는 유전자이다. 박테리아 선별가능 마커의 실례는 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) 또는 바실러스 리체니포르미스 (*Bacillus licheniformis*)로부터 dal 유전자, 또는 항생제 내성, 예를 들면, 암피실린, 카나마이신, 클로람페니콜 또는 테트라사이클린 내성을 공여하는 마커이다. 섬유상 진균 숙주 세포에 이용을 위한 선별가능 마커에는 amdS (acetamidase), argB (ornithine carbamoyltransferase), pyrG (orotidine-5'-phosphate decarboxylase) 및 trpC (anthranilate synthase)가 포함된다. 효모 숙주 세포에 적절한 마커는 ADE2, H153, LEU2, LYS2, MET3, TRP1, 그리고 URA3이다. 효모에 매우 적합한 선별가능 마커는 쉬조사카로미세스 폼베 (*Schizosaccharomyces pombe*) TPI 유전자 (Russell (1985) *Gene* 40:125-130)이다.

[0477] 벡터 내에서, 폴리뉴클레오티드 서열은 적절한 프로모터 서열에 작동가능하게 연결된다. 프로모터는 돌연변이 프로모터, 절두된 프로모터, 그리고 하이브리드 프로모터를 비롯하여, 선택된 숙주 세포 내에서 전사 활성을 보이는 임의의 핵산 서열일 수 있고, 그리고 숙주 세포에 상동성 또는 이형성의 세포외 또는 세포내 폴리펩티드를 인코딩하는 유전자로부터 획득될 수 있다.

[0478] 박테리아 숙주 세포에서 전사를 지시하기 위한 적절한 프로모터의 실례는 대장균 (*E. coli*) lac 오페론, 스트렙토미세스 코엘리컬러 (*Streptomyces coelicolor*) 아가라제 (agarase) 유전자 (dagA), 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) 레반수크라제 (levansucrase) 유전자 (sacB), 바실러스 리체니포르미스 (*Bacillus licheniformis*) 알파-아밀라아제 유전자 (amyL), 바실러스 스테아로써머필러스 (*Bacillus stearothermophilus*) 말토제닉 아밀라아제 (maltogenic amylase) 유전자 (amyM), 바실러스 아밀로리키페시엔스 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 알파-아밀라아제 유전자 (amyQ), 그리고 바실러스 리체니포르미스 (*Bacillus licheniformis*) 페니실리나제 (penicillinase) 유전자 (penP)로부터 획득된 프로모터이다. 섬유상 진균 숙주 세포에서 전사를 지시하기 위한 적절한 프로모터의 실례는 아스페르길루스 오리재 (*Aspergillus oryzae*) TAKA 아밀라아제, 리조무코르 미에헤이 (*Rhizomucor miehei*) 아스파르트산 프로테이나아제, 아스페르길루스 니게르 (*Aspergillus niger*) 중성 알파-아밀라아제, 그리고 아스페르길루스 니게르 (*Aspergillus niger*) 산 안정성 알파-아밀라아제에 대한 유전자로부터 획득된 프로모터이다. 효모 숙주에서, 유용한 프로모터는 사카로미세스 세레비시에 (*Saccharomyces cerevisiae*) Mal, TPI, ADH, 또는 PGK 프로모터이다. 본 발명의 C-펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 또한, 전형적으로 적절한 종결자에 작동가능하게 연결될 것이다. 효모에서 적절한

종결자는 TPI 종결자이다 (Alber et al. (1982) *J. Mol. Appl. Genet.* 1:419-434).

[0479] 본 발명의 부모 단일-사슬 인슐린, 프로모터 및 종결자를 각각 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 결합하고, 그리고 선택된 숙주에서 복제에 필요한 정보를 내포하는 적절한 벡터 내로 이들을 삽입하는데 이용되는 절차는 당업자에게 공지되어 있다.

[0480] 벡터는 먼저, 본 발명의 단일-사슬 인슐린을 인코딩하는 전체 DNA 서열을 내포하는 DNA 구조체를 제조하고, 그리고 차후에, 이 단편을 적절한 발현 벡터 내로 삽입함으로써, 또는 이들 개별 요소에 대한 유전자 정보를 인코딩하는 DNA 단편을 순차적으로 삽입하고, 그 이후에 결합함으로써 작제될 수 있는 것으로 이해될 것이다.

[0481] 본 발명의 C-펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터는 숙주 세포 내로 도입되고, 따라서 벡터는 염색체 통합체 (chromosomal integrant)로서 또는 자가-복제 염색체외 벡터 (self-replicating extra-chromosomal vector)로서 지속된다. 용어 "숙주 세포"는 복제 동안 발생하는 돌연변이로 인하여, 부모 세포와 동일하지 않은 부모 세포의 임의의 자손을 포함한다. 숙주 세포는 단세포 미생물, 예를 들면, 원핵생물, 또는 비-단세포 미생물, 예를 들면, 진핵생물일 수 있다. 유용한 단세포 세포는 박테리아 세포, 예를 들면, 바실러스 (*Bacillus*) 세포, 스트렙토미세스 (*Streptomyces*) 세포 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 그람 양성 박테리아, 또는 그람 음성 박테리아, 예를 들면, 대장균 (*E. coli*)과 슈도모나스 (*Pseudomonas*) 종이다. 진핵생물 세포는 포유동물, 곤충, 식물, 또는 진균 세포일 수 있다. 한 구체예에서, 숙주 세포는 효모 세포이다. 효모 생물체는 배양 동안, 본 발명의 단일 사슬 인슐린을 다량 생산하는 임의의 적절한 효모 생물체일 수 있다. 적절한 효모 생물체의 실례는 효모 중 사카로미세스 세레비시에 (*Saccharomyces cerevisiae*), 사카로미세스 클루이베리 (*Saccharomyces kluyveri*), 쉬조사카로미세스 폼페 (*Schizosaccharomyces pompe*), 사카로미세스 우바룸 (*Sacchoromyces uvarum*), 클루이베로미세스 락티스 (*Kluyveromyces lactis*), 한세놀라 폴리모르파 (*Hansenula polymorpha*), 피치아 파스토리스 (*Pichia pastoris*), 피치아 메타놀리카 (*Pichia methanolica*), 피치아 클루이베리 (*Pichia kluyveri*), 야로위아 리폴리티카 (*Yarrowia ilpolytica*), 칸디다 (*Candida*) 종, 칸디다 우틸리스 (*Candida utilis*), 칸디다 카카오이 (*Candida cacaoi*), 지오텐리쿰 (*Geotrichum*) 종, 그리고 지오텐리쿰 퍼멘탄스 (*Geotrichum fermentans*)에서 선택되는 균주이다.

[0482] 효모 세포의 형질전환은 예로써, 원형질체 형성 (protoplast formation), 그 이후에 공지된 방식으로 형질전환 그 자체에 의해 달성될 수 있다. 세포를 배양하는데 이용되는 배지는 효모 생물체를 성장시키는데 적합한 임의의 전통적인 배지일 수 있다. 분비된 단일-사슬 인슐린 (이의 상당 부분은 배지 내에서 정확하게 가공된 형태로 존재할 것이다)은 원심분리, 여과 또는 이온 교환 매트릭스 또는 역상 흡수 매트릭스로 인슐린 전구체의 포획에 의한 배지로부터 효모 세포의 분리, 염, 예를 들면, 암모늄 황산염에 의한 상층액 또는 여과액의 단백질성 성분의 침전, 그 이후에 다양한 크로마토그래피 절차, 예를 들면, 이온 교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등에 의한 정제를 비롯한 전통적인 절차에 의해 배지로부터 회수될 수 있다.

## [0483] VI. 이용 방법

[0484] 한 양태에서, 본 발명은 필요 환자에서 C-펩티드 수준을 최소 효과적 치료 수준 이상으로 지속하는 방법을 포함하고, 상기 방법은 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 치료 용량을 환자에 투여하는 단계를 포함한다.

[0485] 다른 양태에서, 본 발명은 필요 환자에서 당뇨병의 하나 또는 그 이상의 장기 합병증을 치료하는 방법을 포함하고, 상기 방법은 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 치료 용량을 환자에 투여하는 단계를 포함한다.

[0486] 다른 양태에서, 본 발명은 당뇨병을 앓는 환자를 치료하는 방법을 포함하고, 상기 방법은 인슐린과 공동으로 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 치료 용량을 환자에 투여하는 단계를 포함한다.

[0487] 다른 양태에서, 본 발명은 필요 환자에서 C-펩티드 대체 요법 또는 용량으로서 이용을 위한 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지를 포함한다.

[0488] 넓은 의미에서, 당뇨병은 신체가 자체 인슐린에 적절하게 반응하지 못하거나, 충분한 인슐린을 생산하지 못하거나, 또는 둘 모두인 상황을 지칭한다. 손상된 인슐린 생산의 일차적인 결과는 혈액에서 글루코오스의 축적, 그리고 C-펩티드 결핍이고 다양한 단기-와 장기 합병증으로 이어진다. 당뇨병의 3가지 주요한 형태가 존재한다:

[0489] 1형: 인슐린과 C-펩티드를 생산하는 신체의 실패로부터 결과. 당뇨병으로 진단되는 미국인 중에서 5-10 %는 1형 당뇨병을 앓는 것으로 추정된다. 1형 당뇨병을 앓는 현재 거의 모든 환자는 인슐린 주사를 맞아야 한다. 용어 "1형 당뇨병"은 소아기-발병 당뇨병, 연소자형 당뇨병, 그리고 인슐린-의존성 진성 당뇨병 (IDDM)을 비롯한 이

전의 여러 용어를 대체하였다. 1형 당뇨병을 앓는 환자의 경우에, C-펩티드의 기저 수준은 전형적으로, 약 0.20 nM 이하이다 (Ludvigsson et al.: *New Engl. J. Med.* 359: 1909-1920, (2008)).

[0490] 2형: 세포가 인슐린에 적절하게 반응하지 못하고, 때때로 상대적 인슐린 결핍과 합동되는 상태인 조직 인슐린 내성으로부터 결과. 용어 "2형 당뇨병"은 성인-발병 당뇨병, 비만-관련된 당뇨병, 그리고 비-인슐린-의존성 진성 당뇨병 (NIDDM)을 비롯한 이전의 여러 용어를 대체하였다. 기저 상태에서 2형 환자의 경우에, 약 0.8 nM (0.64 내지 1.56 nM 범위)의 C-펩티드 수준, 그리고 약 5.7 nM (3.7 내지 7.7 nM 범위)의 자극된 글루코오스 수준이 보고되었다 (Retnakaran R et al.: *Diabetes Obes. Metab.* (2009) DOI 10.1111/j.1463-1326.2009.01129.x; Zander et al.: *Lancet* 359: 824-830, (2002)).

[0491] 1형과 2형 당뇨병 이외에, 성인에서 잠재성 자가면역 당뇨병 (LADA) 또는 성인기의 후기-발병 자가면역 당뇨병, 또는 "완서 발병 1형" 당뇨병, 그리고 때때로 "1.5형 당뇨병"으로 지칭되는 당뇨병의 하위부류에 관한 인식이 증가하고 있다. 이러한 질환에서, 당뇨병 발병은 일반적으로, 35세 이상에서 일어나고, 그리고 인슐린-생산 세포의 성분에 대한 항체는 항상 존재하는데, 이것은 자가면역 활성이 LADA에 대한 중요한 특징이라는 것을 증명한다. 글루타민산 디카르복실라아제 (GAD)에 대한 항체가 일차적으로 관찰된다. 일부 LADA 환자는 증가된 신체 용적 지수 (body mass index, BMI) 또는 비만, 인슐린 내성, 그리고 비정상적 혈중 지질로 2형 환자의 표현형과 유사한 표현형을 보인다. LADA의 유전적 특징은 1형과 2형 당뇨병 둘 모두에 대한 유전적 특징과 유사하다. 발병후 첫 6-12개월 동안, 환자는 인슐린 투여를 필요로 하지 않을 수도 있고, 그리고 이들은 식이 변화 및/또는 경구 항-당뇨성 약물을 통해 상대적 정상혈당을 지속할 수 있다. 하지만, 궁극적으로 모든 환자는 아마도, 췌장 섬 β-세포의 점진적인 파괴를 초래하는 진행성 자가면역 활성의 결과로서 인슐린 의존성이 된다. 이러한 단계에서, LADA 환자는 내인성 인슐린과 C-펩티드의 낮은 또는 부재 수준을 보이고, 그리고 이들은 1형 당뇨병 환자에서와 유사한 말초 신경, 신장, 또는 눈을 침범하는 당뇨병의 장기 합병증이 발생하기 쉽고, 따라서 C-펩티드 요법에 대한 후보가 된다 (Palmer et al.: *Diabetes* 54(suppl 2): S62-67, (2005); Desai et al.: *Diabetic Medicine* 25(suppl 2): 30-34, (2008); Fournanos et al.: *Diabetologia* 48: 2206-2212, (2005)).

[0492] 임신성 당뇨병: 이전에 당뇨병을 앓은 적이 없지만 임신 동안 높은 혈액 당 (글루코오스) 수준을 갖는 임신 여성은 임신성 당뇨병을 앓는 것으로 말해진다. 임신성 당뇨병은 모든 임신 여성 중에서 약 4 %에 영향을 준다. 이것은 2형 (또는 드물지만 1형) 당뇨병의 발달을 선행할 수도 있다.

[0493] 여러 다른 형태의 진성 당뇨병이 이들로부터 별개로 분류된다. 실례에는 인슐린 분비의 유전적 결함에 기인한 선천성 당뇨병, 낭포성 섬유증 (cystic fibrosis)-관련된 당뇨병, 높은 용량의 글루코코르티코이드에 의해 유도된 스테로이드 당뇨병, 그리고 여러 형태의 단일유전성 당뇨병이 포함된다.

[0494] 따라서 이들 방법 중에서 한 가지에서, 용어 "환자"는 임의의 당뇨병의 하나 또는 그 이상의 증상을 앓는 개체를 지칭한다. 이들 방법 중에서 한 가지의 한 양태에서, 용어 "환자"는 임의의 인슐린-의존성 당뇨병의 하나 또는 그 이상의 증상을 앓는 개체를 지칭한다. 이들 방법 중에서 한 가지의 한 양태에서, 용어 "환자"는 임의의 2형 당뇨병의 하나 또는 그 이상의 증상을 앓는 개체를 지칭한다. 이들 방법 중에서 한 가지의 한 양태에서, 용어 "환자"는 LADA의 하나 또는 그 이상의 증상을 앓는 개체를 지칭한다. 이들 방법 중에서 한 가지의 한 양태에서, 용어 "환자"는 임신성 당뇨병의 하나 또는 그 이상의 증상을 앓는 개체를 지칭한다. 따라서 이들 방법 중에서 한 가지의 한 양태에서, 용어 "환자"는 약 0.4 nM 이하의 공복 C-펩티드 수준을 갖는 개체를 지칭한다. 이들 방법 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 용어 "환자"는 약 0.2 nM 이하의 공복 C-펩티드 수준을 갖는 개체를 지칭한다.

[0495] 당뇨병의 급성 합병증에는 상기 질환이 적절하게 제어되지 않으면 발생할 수 있는 저혈당증, 당뇨병 케토에시도시스 (diabetic ketoacidosis), 또는 비케톤 고삼투압성 혼수 (nonketotic hyperosmolar coma)가 포함된다. 심각한 장기 합병증 또한 발생할 수 있고, 그리고 하기에 더욱 상세하게 논의된다.

[0496] 다른 양태에서, 본 발명은 필요 환자에서 당뇨병의 하나 또는 그 이상의 장기 합병증을 치료하는 방법을 포함하고, 상기 방법은 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 치료 용량을 환자에 투여하는 단계를 포함한다.

[0497] 다른 양태에서, 본 발명은 당뇨병을 앓는 환자를 치료하는 방법을 포함하고, 상기 방법은 인슐린과 공동으로 청구된 폐길화된 C-펩티드 중에서 한 가지의 치료 용량을 환자에 투여하는 단계를 포함한다.

[0498] 이러한 문맥에서, "공동으로"는 1) 동일한 단위 제형의 일부; 2) 반드시 그러한 것은 아니지만 전형적으로, 동일한 일자에서 별개로, 하지만 동일한 치료적 처치 프로그램 또는 섭생의 일부로서 투여를 의미한다. 한 양태에서, 임의의 청구된 폐길화된 C-펩티드는 고정된 일일 용량으로 투여될 수 있고, 그리고 인슐린은 필요에 기초하

여 복용될 수 있다.

- [0499] 다른 양태에서, 본 발명은 필요 환자에서 당뇨병의 하나 또는 그 이상의 장기 합병증을 치료하는데 이용을 위한 임의의 청구된 펩티드 C-펩티드를 포함한다.
- [0500] 이들 방법 중에서 한 가지에서, 용어 "1형 당뇨병의 장기 합병증", 또는 "당뇨병의 장기 합병증"은 손상된 혈당 제어의 장기 합병증, 그리고 인슐린-의존성 당뇨병과 연관된 C-펩티드 결핍을 지칭한다. 전형적으로 1형 당뇨병의 장기 합병증은 1형 당뇨병과 연관된다. 하지만 상기 용어는 또한, 췌장 섬  $\beta$ -세포를 상실한 결과로서 C-펩티드 결핍이 발생하고, 따라서 인슐린 의존성이 되는 1.5형과 2형 당뇨병 환자에서 발생하는 당뇨병의 장기 합병증을 지칭할 수 있다. 넓은 의미에서, 많은 이와 같은 합병증은 혈관의 일차 손상 (혈관병증 (angiopathy))으로부터 발생하고, "미세혈관 질환" (소혈관에 대한 손상에 기인) 및 "거대혈관 질환" (동맥에 대한 손상에 기인)으로 분류될 수 있는 차후 문제점을 유발할 수 있다.
- [0501] 용어 당뇨병의 장기 합병증 내에 포함되는 특정한 질환과 장애에는 제한 없이, 소동맥류 (microaneurysm)를 동반한 초기 단계 망막증, 증식성 망막증, 그리고 황반 부종 (macular edema)을 비롯한 망막증; 감각운동성 다발성신경병증을 비롯한 말초 신경병증, 통증 감각 신경병증, 급성 운동 신경병증, 두개 병소성과 다병소성 다발성신경병증, 등허리 근신경병증 (thoracolumbar radiculoneuropathy), 근위성 당뇨병성 신경병증, 그리고 포착성과 압박성 신경병증을 비롯한 병소성 손발 신경병증; 심혈관계, 위장관, 호흡기계, 비뇨생식기계, 땀분비 기능 및 유두 기능과 관련된 자율성 신경병증; 그리고 미세알부민뇨 (microalbuminuria), 진성 단백뇨 (overt proteinuria), 그리고 말기 신장 질환을 동반하는 질환을 비롯한 신증이 포함된다.
- [0502] 손상된 미세 관류 (microcirculatory perfusion)는 당뇨병에서 신경병증과 망막증 둘 모두의 발병 (pathogenesis)에 결정적인 것으로 보인다. 이것은 차례로, 단백질 키나아제 C의 과다-활성화, 산화질소 (NO)의 감소된 이용가능성, 초산화물 (superoxide)과 엔도텔린-1 (ET-1)의 증가된 생산, 손상된 인슐린 기능, 프로스타사이클린/PGE1의 감소된 합성, 그리고 백혈구의 증가된 활성화와 내피 부착 (endothelial adherence)을 유발하는 혈관 내피 기능 (vascular endothelial function)의 고혈당증-매개된 동요를 반영한다. 이것은 궁극적으로, 임상적 사건의 집단적 파국이다.
- [0503] 따라서 일부 구체예에서, 용어 "환자"는 당뇨병의 장기 합병증의 하나 또는 그 이상의 증상을 앓는 개체를 지칭한다.
- [0504] 당뇨병성 망막증은 미세혈관병증 (microangiopathy)으로 이어지는 소혈관에 대한 시스템적 손상의 안과적 양상 (ocular manifestation)이다. 망막증에서, 망막 내에서 연약하고 불량한 품질의 새로운 혈관의 성장뿐만 아니라 황반 부종 (황반의 수종)은 심각한 시력 상실 또는 실명을 유발할 수 있다. 새로운 혈관이 증식성 당뇨병성 망막증 (PDR)의 일부로서 눈의 뒷부분에서 형성될 때, 이들은 출혈하고 시력을 흐릴 수 있다. 이것은 10년 또는 그 이상 동안 당뇨병을 앓는 모든 환자 중에서 80 %까지 영향을 준다.
- [0505] 당뇨병성 망막증의 증상은 종종, 발달이 느려지고 미묘해지며, 흐려진 시력 및 시력의 점진적 상실을 포함한다. 더욱 급속하게 시력 상실을 유발할 수 있는 황반 부종은 때때로, 임의의 경고 징후 (warning sign)를 갖지 않을 수도 있다. 하지만, 일반적으로 황반 부종을 앓는 환자는 흐려진 시력을 가질 가능성이 높고, 독서 또는 운전과 같은 활동을 하는 것을 어렵게 만든다. 일부 경우에, 시력은 하루 동안 좋아지거나 나빠질 것이다.
- [0506] 따라서 일부 구체예에서, 용어 "환자"는 당뇨병성 망막증의 하나 또는 그 이상의 증상을 앓는 개체를 지칭한다.
- [0507] 당뇨병성 신경병증은 신경을 공급하는 소혈관 (신경 혈관 (vasa nervorum))과 관련된 당뇨병성 미세혈관 손상과 연관된 신경병증성 질환이다. 당뇨병성 신경병증과 연관될 수 있는 상대적으로 일반적인 장애에는 3차 신경 마비; 단발신경병증; 다발신경병증; 당뇨병성 근위축증; 통증성 다발성신경병증; 자율성 신경병증; 그리고 흉복부 신경병증이 포함된다.
- [0508] 당뇨병성 신경병증은 모든 말초 신경: 통증 섬유 (pain fiber), 운동 뉴런 (motor neuron), 자율 신경에 영향을 준다. 이런 이유로, 이것은 모든 장기와 시스템에 필연적으로 영향을 줄 수 있는데, 그 이유는 이들 모두에서 신경이 통하기 때문이다. 영향을 받는 장기 시스템과 구성원에 기초하여 여러 상이한 증후군이 있긴 하지만, 이들은 결코 배타적이지 않다. 환자는 감각운동성 및 자율성 신경병증 또는 임의의 다른 조합을 가질 수 있다. 증상은 영향을 받는 신경(들)에 따라 달라지고, 그리고 열거된 것들 이외의 증상을 포함할 수도 있다. 증상은 통상적으로, 수년에 걸쳐 점진적으로 발달한다.
- [0509] 당뇨병성 신경병증의 증상에는 하기가 포함된다: 사지의 저린감과 저림, 감각장애 (dysesthesia) (신체 부분에 대



한 감각의 감소 또는 상실), 설사, 발기 부전, 요실금 (방광 제어의 상실), 생식불능, 안면, 입과 눈꺼풀 처짐, 시력 변화, 현기증, 근육 약화, 삼킴의 어려움, 언어 장애, 총생 (fasciculation) (muscle contraction), 성 흥분 부전증 (anorgasmia), 그리고 따끔따끔한 통증 또는 전기성 통증.

- [0510] 부가적으로, 상이한 신경은 신경병증에 의해 상이한 방식으로 영향을 받는다. 감각운동성 다발성신경병증은 신경 전도 속도가 신경의 길이에 비례하여 느려지기 때문에, 더욱 긴 신경 섬유가 더욱 짧은 신경 섬유보다 더욱 크게 영향을 받는다. 이러한 증후군에서, 감소된 감각 및 반사의 상실이 각 발의 발가락 부분에서 먼저 발생하고, 이후 위쪽으로 확장한다. 이것은 통상적으로, 저린감, 감각 상실, 감각장애, 그리고 야간 통증 (night-time pain)의 장갑-양말 분포 (glove-stocking distribution)로서 기술된다. 통증은 따끔거림, 뜨끔뜨끔 쑤시는 느낌, 빠근함, 또는 무지근함과 같이 느껴질 수 있다. 저리는 느낌이 일반적이다. 다리가 공중에 떠있는 느낌인 고유감각 (proprioception)의 상실은 초기에 영향을 받는다. 이들 환자는 언제 그들이 파편과 같은 이물질을 밟았는지, 또는 언제 그들이 맞지 않는 신발로부터 굳은살이 생겼는지를 느낄 수 없다. 결과적으로, 이들은 발과 다리에 궤양과 감염이 발생할 위험에 처해있고, 이것은 절단 (amputation)을 유발할 수 있다. 유사하게, 이들 환자는 무릎, 발목, 또는 발의 복합 골절을 입고, 그리고 샤르코 관절 (Charcot joint)이 발생할 수 있다. 운동 기능의 상실은 뒤굽힘 (dorsiflexion), 발가락의 경축 (contracture), 골간근 (interosseous muscle) 기능의 상실을 유발하고, 그리고 추상족지증 (hammer toe)으로 불리는 발가락의 수축으로 이어진다. 이들 경축은 발에서만 뿐만 아니라 손에서도 발생하는데, 여기서 근육 조직의 상실은 손이 야위고 앙상하게 보이도록 만든다. 근육 기능의 상실은 진행성이다.
- [0511] 자율성 신경병증은 심장을 위해 진력하는 자율 신경계, 위장관계, 그리고 비뇨생식기계에 영향을 준다. 당뇨병에서 가장 일반적으로 인정되는 자율신경 기능장애 (autonomic dysfunction)는 기립성 저혈압 (orthostatic hypotension), 또는 일어설 때 혼절이다. 당뇨병 자율성 신경병증의 경우에, 이것은 심장과 동맥이 심박동수 (heart rate)와 혈관 긴장도 (vascular tone)를 적절하게 조정하여 혈액이 뇌로 지속적으로 및 충분하게 유동하도록 유지할 수 없음에 기인한다. 이러한 증상은 통상적으로, 정상적인 호흡에서 관찰되는 심박동수에서 통상적 변화의 상실을 동반한다. 이들 2가지 조사 결과는 자율성 신경병증을 암시한다.
- [0512] 위장관계 증상에는 위 배출 지연, 위마비 (gastroparesis), 메스꺼움, 팽창, 그리고 설사가 포함된다. 많은 당뇨병 환자들이 그들의 당뇨병을 위한 경구 약물을 복용하기 때문에, 이들 약물의 흡수는 위 배출 지연에 의해 상당한 영향을 받는다. 이것은 경구 당뇨병 작용제가 식사 전에 복용되고, 그리고 혈당이 이미 정상적이거나 낮은 수 시간까지, 또는 때때로 수 일후까지 흡수되지 않을 때 저혈당증을 유발할 수 있다. 소장의 완만한 움직임은 박테리아 이상증식을 유발하고, 고혈당증의 존재에 의해 악화될 수 있다. 이것은 팽창, 가스, 그리고 설사를 유발한다.
- [0513] 비뇨생식기계 증상에는 빈뇨 (urinary frequency), 급박뇨 (urinary urgency), 요실금 (urinary incontinence), 그리고 요폐 (urinary retention)가 포함된다. 요폐는 방광 계실 (bladder diverticula), 결석, 역류성 신증 (reflux nephropathy), 그리고 빈번한 요로 감염 (urinary tract infection)을 유발할 수 있다. 따라서 이들 방법 중에서 한 가지에서, 용어 "환자"는 자율성 신경병증의 하나 또는 그 이상의 증상을 앓는 개체를 지칭한다.
- [0514] 따라서 일부 구체예에서, 용어 "환자"는 당뇨병성 신경병증의 하나 또는 그 이상의 증상을 앓는 개체를 지칭한다. 이들 방법 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 환자는 "확립된 말초 신경병증"을 갖고, 이것은 장딴지 신경 (sural nerve)에서 감소된 감각 신경 전도 속도 (SCV) (대응된 정상적인 개체에 대한 체중-보정된 기준 값으로부터  $-1.5$  SD 이하)로 특징된다. 일정한 구체예에서, 용어 "환자"는 초발 신경병증의 하나 또는 그 이상의 증상을 앓는 개체를 지칭한다.
- [0515] 따라서 일정한 구체예에서, 본 발명은 개체 또는 환자의 신장-조정된 감각 또는 운동 신경 전도 속도에서 감소를 치료하거나 예방하는 방법을 포함한다. 이러한 방법의 한 양태에서, 운동 신경 전도 속도는 최초 신경 전도 속도이다. 다른 구체예에서, 운동 신경 전도 속도는 피크 신경 전도 속도이다.
- [0516] 일정한 구체예에서, 개체는 당뇨병을 앓는 환자이다. 일정한 구체예에서, 개체는 당뇨병의 적어도 하나의 장기 합병증을 앓는다. 한 양태에서, 환자는 유사한 신장-대응된 개체 그룹에 대한 평균 피크 신경 전도 속도로부터 적어도 약 2 표준 편차인 피크 신경 전도 속도를 나타낸다. 한 양태에서, 환자는 약  $35$  m/s 이상의 피크 신경 전도 속도를 갖는다. 청구된 방법 중에서 한 가지의 한 양태에서, 환자는 약  $40$  m/s 이상의 피크 신경 전도 속도를 갖는다. 한 양태에서, 환자는 약  $45$  m/s 이상의 피크 신경 전도 속도를 갖는다. 한 양태에서, 환자는 약  $50$  m/s 이상의 피크 신경 전도 속도를 갖는다.

- [0517] 청구된 방법 중에서 한 가지의 한 양태에서, 치료는 적어도 약 1.5 m/s의 신경 전도 속도에서 향상을 유발한다. 이들 방법의 다른 양태에서, 치료는 약 2.0 m/s의 신경 전도 속도에서 향상을 유발한다. 이들 방법의 다른 양태에서, 치료는 약 2.5 m/s의 신경 전도 속도에서 향상을 유발한다. 이들 방법의 다른 양태에서, 치료는 약 3.0 m/s의 신경 전도 속도에서 향상을 유발한다. 이들 방법의 다른 양태에서, 치료는 약 3.5 m/s의 신경 전도 속도에서 향상을 유발한다. 이들 방법의 다른 양태에서, 치료는 약 4.0 m/s의 신경 전도 속도에서 향상을 유발한다. 이들 방법의 다른 양태에서, 치료는 약 4.5 m/s의 신경 전도 속도에서 향상을 유발한다. 이들 방법의 다른 양태에서, 치료는 약 5.0 m/s의 신경 전도 속도에서 향상을 유발한다. 이들 방법의 다른 양태에서, 치료는 약 5.5 m/s의 신경 전도 속도에서 향상을 유발한다. 이들 방법의 다른 양태에서, 치료는 약 6.0 m/s의 신경 전도 속도에서 향상을 유발한다. 이들 방법의 다른 양태에서, 치료는 약 7.0 m/s의 신경 전도 속도에서 향상을 유발한다. 이들 방법의 다른 양태에서, 치료는 약 8.0 m/s의 신경 전도 속도에서 향상을 유발한다. 이들 방법의 다른 양태에서, 치료는 약 9.0 m/s의 신경 전도 속도에서 향상을 유발한다. 이들 방법의 다른 양태에서, 치료는 약 10.0 m/s의 신경 전도 속도에서 향상을 유발한다. 이들 방법의 다른 양태에서, 치료는 약 15.0 m/s의 신경 전도 속도에서 향상을 유발한다. 이들 방법의 다른 양태에서, 치료는 약 20.0 m/s의 신경 전도 속도에서 향상을 유발한다.
- [0518] 이들 방법 중에서 한 가지의 일정한 구체예에서, 치료는 폐길화된 C-펩티드 요법을 시작하기 이전에 피크 신경 전도 속도와 비교하여 피크 신경 전도 속도에서 적어도 10 %의 향상을 유발한다. 이들 방법 중에서 한 가지의 일정한 구체예에서,
- [0519] 치료는 폐길화된 C-펩티드 요법을 시작하기 이전에 피크 신경 전도 속도와 비교하여 피크 신경 전도 속도에서 적어도 15 %의 향상을 유발한다. 이들 방법 중에서 한 가지의 일정한 구체예에서, 치료는 폐길화된 C-펩티드 요법을 시작하기 이전에 피크 신경 전도 속도와 비교하여 피크 신경 전도 속도에서 적어도 20 %의 향상을 유발한다. 이들 방법 중에서 한 가지의 일정한 구체예에서, 치료는 폐길화된 C-펩티드 요법을 시작하기 이전에 피크 신경 전도 속도와 비교하여 피크 신경 전도 속도에서 적어도 25 %의 향상을 유발한다. 이들 방법 중에서 한 가지의 일정한 구체예에서, 치료는 폐길화된 C-펩티드 요법을 시작하기 이전에 피크 신경 전도 속도와 비교하여 피크 신경 전도 속도에서 적어도 30 %의 향상을 유발한다. 이들 방법 중에서 한 가지의 일정한 구체예에서, 치료는 폐길화된 C-펩티드 요법을 시작하기 이전에 피크 신경 전도 속도와 비교하여 피크 신경 전도 속도에서 적어도 40 %의 향상을 유발한다. 이들 방법 중에서 한 가지의 일정한 구체예에서, 치료는 폐길화된 C-펩티드 요법을 시작하기 이전에 피크 신경 전도 속도와 비교하여 피크 신경 전도 속도에서 적어도 50 %의 향상을 유발한다.
- [0520] 당뇨병 신증은 신장 사구체 내에 모세관의 혈관병증에 의해 유발된 진행성 신장 질환이다. 이것은 신장 증후군 (nephrotic syndrome) 및 미만성 사구체경화증 (diffuse glomerulosclerosis)으로 특징된다. 이것은 오래된 진성 당뇨병에 기인하고, 그리고 많은 서구 국가에서 투석의 주요 원인이다.
- [0521] 당뇨병 신증의 증상은 만성 당뇨병 (발병후 15년 또는 그 이상)을 앓는 환자에서 관찰될 수 있다. 상기 질환은 진행성이고 남성에서 더욱 빈번하다. 당뇨병 신증은 미국에서 만성 신부전과 말기 신장 질환의 가장 일반적인 원인이다. 1형과 2형 당뇨병을 앓는 환자는 위험에 처해 있다. 이러한 위험은 혈액-글루코오스 수준이 불량하게 제어되면 더욱 높다. 게다가, 일단 신증이 발생하면, 최대 진행 속도는 혈압의 제어가 불량한 환자에서 관찰된다. 또한, 혈액 내에 높은 콜레스테롤 수준을 갖는 사람 역시 다른 사람들보다 훨씬 위험하다.
- [0522] 당뇨병 신증의 진전 동안 최초 검출가능 변화는 사구체 여과 장벽 (glomerular filtration barrier)의 비정상이다. 이 단계에서, 신장은 소변 내에 정상보다 많은 혈청 알부민 (알부민뇨)을 허용하기 시작하고, 그리고 이것은 알부민에 대한 민감한 의학적 검사에 의해 검출될 수 있다. 이러한 단계는 "미세단백뇨"로 불린다. 당뇨병 신증이 진행됨에 따라, 증가하는 숫자의 사구체가 결절성 사구체경화증 (nodular glomerulosclerosis)에 의해 파괴된다. 이 시점에서 소변으로 배출되는 알부민의 양은 증가하고, 그리고 통상의 검뇨 기술에 의해 검출될 수 있다. 이 단계에서, 신장 생검은 당뇨병 신증을 명확하게 보여준다.
- [0523] 사구체경화증에 의해 촉발된 신부전은 유체 여과 결핍 (fluid filtration deficit) 및 신장 기능의 다른 장애를 유발한다. 혈압에서 증가 (고혈압)가 나타나고, 그리고 체내에서 유체 정체 (fluid retention) 및 감소된 혈장 콜로이드 삼투압 (plasma oncotic pressure)은 부종을 유발한다. 다른 합병증은 신동맥의 동맥경화증 및 단백뇨 일 수 있다.
- [0524] 초기 진전 내내, 당뇨병 신증은 증상이 없다. 이들은 후기 단계에서 발생하고, 그리고 소변 내에 많은 양의 단백질의 배출의 결과이거나, 또는 신부전에 기인할 수 있다. 증상에는 하기가 포함된다: 부종; 통상적으로 아침에 눈 주변의 수종; 그 이후, 전반적인 전신 수종, 예를 들면, 다리의 수종, 소변의 거품 같은 외형 또는 과도

한 거품 (단백뇨에 의해 유발됨), 의도하지 않은 체중 증가 (유체 축적으로부터), 식욕 부진, 메스꺼움과 구토, 으스스한 느낌, 피로, 두통, 빈번한 딸꾹질, 그리고 전반적인 가려움이 발생할 수 있다.

[0525] 따라서 일부 구체예에서, 용어 "환자"는 당뇨병 신증의 하나 또는 그 이상의 증상을 앓는 개체를 지칭한다.

[0526] 당뇨병 심근병증 (DCM)은 심장을 손상시켜 이완 기능장애 (diastolic dysfunction) 및 궁극적으로, 심부전을 유발한다. 당뇨병에서 매우 흔한 큰 혈관 질환 및 가속화된 동맥경화증 이외에, DCM은 심실 기능장애 (ventricular dysfunction)가 관상 동맥경화증 및 고혈압의 부재에서 당뇨병을 앓는 환자에서 발생할 때 진단되는 임상적 장애이다. DCM은 기능적으로, 심실 확장 (ventricular dilation), 근세포 비대 (myocyte hypertrophy), 현저한 간질성 섬유증 (interstitial fibrosis), 그리고 이완 기능장애의 존재에서 감소된 또는 보존된 심장수축 기능 (systolic function)으로 특징될 수 있다.

[0527] DCM의 한 가지 특이성은 긴 잠복기 (latent phase)인데, 이 기간 동안 상기 질환은 진행되지만 완전하게 무증후성이다. 대부분의 경우에, DCM은 동반된 고혈압 또는 관상 동맥 질환에 의해 검출된다. 최초 징후 중의 하나는 심실 충전 (ventricular filling)에 대한 효과가 거의 없는 경도도 좌심실 이완 기능장애 (left ventricular diastolic dysfunction)이다. 또한, 당뇨병 환자는 감소된 좌심실 유순도 (left ventricular compliance) 또는 좌심실 비대 (left ventricular hypertrophy) 또는 이들의 조합에 관련된 DCM의 미묘한 징후를 나타낼 수도 있다. 현저한 "a" 파동 역시 경정맥파 (jugular venous pulse)에서 관찰될 수 있고, 그리고 심장 심첨 맥박 (cardiac apical impulse)이 과활동성이거나, 또는 심장 수축 내내 지속될 수 있다. 수축 기능장애, 좌심실 팽창 및 증후성 심부전의 발생후, 경정맥압은 상승될 수 있고, 그리고 심첨 맥박은 아래쪽 및 왼쪽으로 바뀔 것이다. 이들 경우에 수축 승모판 잡음 (systolic mitral murmur)이 흔히 발생한다. 이들 변화는 비록 초기 무증후기에서 일반적이진 않지만, 구조적 심장 질환이 없는 환자 중에서 60 %에서 DCM과 연관될 수 있는 다양한 심전계 변화 (electrocardiographic change)를 동반한다. 이러한 진행에서 후기에, 연장된 QT 간격은 섬유증을 지시할 수 있다. DCM의 정의가 동반된 동맥경화증 또는 고혈압을 배제하는 점을 고려하면, 비대와 섬유증이 극히 현저해지는 상기 질환의 극후기 단계까지 관류에서 또는 심방 나트륨이뇨성 (atrial natriuretic) 펩티드 수준에서 변화가 없다.

[0528] 일정한 구체예에서, 용어 "환자"는 당뇨병 심근병증의 하나 또는 그 이상의 증상을 앓는 개체를 지칭한다.

[0529] 당뇨병의 거대혈관 질환에는 협심증 또는 심근 경색 ("심장마비")으로 이어지는 관상 동맥 질환, 뇌졸중 (주로, 허혈성 유형), 말초 혈관 질환 (이것은 간헐성 파행 (intermittent claudication) (운동-관련된 다리와 발 통증)의 원인이 된다), 그리고 당뇨병 발과 당뇨병 근육괴사 (myonecrosis) ("근육 소모 (muscle wasting)")가 포함된다.

[0530] 일정한 구체예에서, 용어 "환자"는 당뇨병의 거대혈관 질환의 하나 또는 그 이상의 증상을 앓는 개체를 지칭한다.

[0531]

[0532] 저혈당증을 예방하는 방법.

[0533] 일정한 구체예에서, 본 발명은 인슐린의 투여를 추가적으로 포함하는 섭생에서 인슐린 의존성 당뇨병을 앓는 인간 환자에서 저혈당증의 위험을 감소시키기 위한 임의의 개시된 폐길화된 C-펩티드의 용도를 포함하고, 상기 섭생은 하기를 포함한다; a) 인슐린을 환자에 투여; b) 환자의 인슐린 투여에 이용된 부위와 상이한 부위에서 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량을 투여; c) 치료 용량의 폐길화된 C-펩티드에 기인하는 환자의 변화된 인슐린 요구에 기초하여 투여되는 인슐린의 복용량, 유형, 또는 빈도를 조정.

[0534] 다른 양태에서, 본 발명은 인슐린-의존성 인간 환자에서 인슐린 사용량을 감소시키는 방법을 포함하고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다; a) 인슐린을 환자에 투여하는 단계; b) 환자의 인슐린 투여에 이용된 부위와 상이한 부위에서 임의의 개시된 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량을 환자에 피하 투여하는 단계; c) 치료 용량의 폐길화된 C-펩티드에 기인하는 환자의 변화된 인슐린 요구의 모니터링에 기초하여 투여되는 인슐린의 복용량, 유형, 또는 빈도를 조정하는 단계, 여기서 인슐린의 조정된 용량은 저혈당증을 유도하지 않고, 여기서 인슐린의 조정된 용량은 폐길화된 C-펩티드 치료를 시작하기 이전에 환자의 인슐린 용량보다 적어도 10% 적다 (예로써, US Patent No. 7,855,177을 참고하고, 이것은 본 발명에 참고문헌으로 편입된다).

[0535] 이들 방법 중에서 한 가지에서, 용어 "저혈당증" 또는 "저혈당 사건"은 환자를 잠재적 위해에 노출시키는 비정상적으로 낮은 혈장 글루코오스 농도의 모든 에피소드를 지칭한다. American Diabetes Association Workgroup

은 인슐린-의존성 당뇨병을 앓는 환자는 70 mg/dL (3.9 mmol/L) 이하의 혈장 글루코오스 농도에서 저혈당증이 발생할 가능성에 관해 우려된다고 권고하였다. 따라서 청구된 방법 중에서 한 가지의 한 양태에서, 용어 "저혈당증" 또는 "저혈당 사건"은 환자의 혈장 글루코오스 농도가 약 70 mg/dL (3.9 mmol/L) 이하로 하락하는 상황을 지칭한다.

[0536] 저혈당증은 당뇨병의 치료에서 심각한 의학적 합병증이고, 그리고 1형 당뇨병을 앓는 대부분의 환자에서 및 진행된 2형 당뇨병을 앓는 많은 환자에서 재발성 병적상태 (recurrent morbidity)를 유발하고 때때로 치명적이다. 이에 더하여, 저혈당증은 차후에 하락하는 혈장 글루코오스 농도에 대한 생리적 및 행동적 반응을 약화시키고, 따라서 재발성 저혈당증의 악순환을 유발한다. 따라서 저혈당증의 예방은 당뇨병의 치료에서뿐만 아니라 당뇨병의 장기 합병증의 치료에서 유의미한 중요성을 갖는다.

[0537] 유감스럽게도, 저혈당증은 1형 당뇨병을 앓는 대부분의 환자에게 어쩔 수 없는 현실이다 (Cryer PE et al.: *Diabetes* 57: 3169-3176, (2008)). 평균적인 환자는 무증후성 저혈당증의 에피소드가 무수히 일어나고, 그리고 매주 2번의 증후성 저혈당증 에피소드를 겪고 일생 동안 당뇨병의 이와 같은 에피소드를 수천 번이나 겪는다. 환자는 매년 발작 또는 혼수를 종종 동반하는 심각하고 일시적으로 무력화시키는 저혈당증의 에피소드를 한 번 또는 그 이상 겪는다.

[0538] 전반적으로, 저혈당증은 2형 당뇨병에서 덜 빈번하다; 하지만, 저혈당증의 위험은 점진적으로 더욱 빈번해지고 2형 당뇨병의 진전에서 후기에 혈당 제어를 제한한다. Donnelly et al., *Diabetes Med.* 22: 749-755, (2005)의 전향적, 개체군-기초된 데이터는 인슐린-치료된 2형 당뇨병에서 저혈당증의 전체 발생률이 1형 당뇨병에서 것의 대략 1/3이라는 것을 지시한다. 임의의 저혈당증 및 심각한 저혈당증의 발생률은 각각, 1형 당뇨병에서 100 환자년수 (patient years)당 4,300과 115 에피소드, 그리고 인슐린-치료된 2형 당뇨병에서 100 환자년수 (patient years)당 1600과 35 에피소드이었다.

[0539] 저혈당증은 저혈당 사건의 심각도에 기초하여 분류될 수 있다. 가령, American Diabetes Association Workgroup은 당뇨병에서 저혈당증의 하기 분류를 제안하였다: 1) 심각한 저혈당증 (즉, 다른 사람의 도움을 필요로 하는 저혈당성 혼수 (hypoglycemic coma)); 2) 보고된 증후성 저혈당증 (증상 및 70 mg/dL 이하의 혈장 글루코오스 농도); 3) 무증후성 저혈당증 (증상 없이, 70 mg/dL 이하의 혈장 글루코오스 농도); 4) 개연적 증후성 저혈당증 (저혈당증에 기인한 증상, 하지만 혈장 글루코오스 측정 없음); 그리고 5) 상대적 저혈당증 (70 mg/dL 이상의 혈장 글루코오스 농도, 하지만 상기 수준을 향해 하락).

[0540] 따라서 본 명세서에서 개시된 임의의 방법의 다른 양태에서, 용어 "저혈당증"은 심각한 저혈당증, 및/또는 저혈당성 혼수를 지칭한다. 이들 방법 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 용어 "저혈당증"은 증후성 저혈당증을 지칭한다. 이들 방법 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 용어 "저혈당증"은 개연적 증후성 저혈당증을 지칭한다. 이들 방법 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 용어 저혈당증은 무증후성 저혈당증을 지칭한다. 이들 방법 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 용어 "저혈당증"은 상대적 저혈당증을 지칭한다.

[0541] 인슐린 유형 및 투여 형태

[0542] 상이한 길이의 활성 (활성 프로필)을 제공하기 위해 개발된 180개 이상의 개인용 인슐린 제조물이 전세계적으로 이용가능하다. 이들 중에서 대략 25%는 가용성 인슐린 (변형되지 않은 형태)이다; 약 35%는 장기- 또는 단기-작용 기초 인슐린 (NPH [중성 프로타민 Hagedorn] 인슐린 또는 Lente 인슐린 [인슐린 아연 현탁액]과 혼합됨), 또는 증가된 등전점 (isoelectric point) [인슐린 glargine], 또는 아실화 [인슐린 detemir]을 갖도록 변형된 형태와 혼합됨; 이들 형태는 가용성 인슐린에 비하여 감소된 용해도, 느린 피하 흡수, 그리고 작용의 긴 지속 기간을 갖는다)이다; 약 2%는 신속-작용 인슐린 (가령, 이들은 아미노산 변화에 의해 조작되고, 그리고 감소된 자가-결합 및 증가된 피하 흡수를 갖는다)이다; 그리고 약 38%는 미리 혼합된 인슐린 (가령, 단기-, 중기-, 그리고 장기-작용 인슐린의 혼합물; 이들 제조물은 감소된 희수의 일일 주사의 이점을 갖는다)이다.

[0543] 미국에서 상업적으로 구입가능한 단기-작용 인슐린 제조물에는 정규 인슐린 및 신속-작용 인슐린이 포함된다. 정규 인슐린은 30-60분의 작용 발현 시간, 1.5 내지 2시간의 효과 피크 시간, 그리고 5 내지 12시간의 활성 지속 기간을 갖는다. Aspart (Novo Rapid), Lispro (Humalog), 그리고 Glulisine (Apidra)와 같은 신속-작용 인슐린은 10-30분의 작용 발현 시간, 대략 30분의 효과 피크 시간, 그리고 3 내지 5시간의 활성 지속 기간을 갖는다.

[0544] NPH 및 Lente 인슐린과 같은 중기-작용 인슐린은 1 내지 2시간의 작용 발현 시간, 4 내지 8시간의 효과 피크 시



간, 그리고 10 내지 20시간의 활성 지속 기간을 갖는다.

[0545] Ultralente 인슐린과 같은 장기-작용 인슐린은 2 내지 4시간의 작용 발현 시간, 8 내지 20시간의 효과 피크 시간, 그리고 16 내지 24시간의 활성 지속 기간을 갖는다. 장기-작용 인슐린의 다른 실패에는 Glargine 및 Determir이 포함된다. Glargine 인슐린은 1 내지 2시간의 작용 발현 시간, 그리고 24시간의 작용 지속 기간을 갖지만, 피크 효과가 없다.

[0546] 많은 경우에, 당뇨병의 관리에서 인슐린을 이용하는 섭생은 장기-작용 인슐린과 단기-작용 인슐린을 합동한다. 가령, Lantus (Aventis Pharmaceuticals Inc.)는 더욱 긴 작용 지속 기간 (24시간까지)이 더욱 느린 흡수율과 직접적으로 관련되는 장기-작용, 비경구 혈액-글루코오스-강하제인 재조합 인간 인슐린 유사체이다. Lantus는 하루 1회, 바람직하게는 취침 시간에 피하 투여되고, 그리고 정상적인 체장에 의해 제공되는 인슐린의 느리고 지속적인 (기저) 분비와 유사한 연속 수준의 인슐린을 제공한다고 한다. 이런 장기-작용 인슐린의 활성은 명백한 피크 없이 24시간에 걸쳐 상대적으로 일정한 농도/시간 프로필을 유발하고, 따라서 환자의 기저 인슐린으로서 하루 1회 투여될 수 있도록 한다. 이런 장기-작용 인슐린은 투여될 때 인슐린에 첨가에 의해서보다는 화학적 조성에 의해서 장기-작용 효과를 갖는다.

[0547] 인슐린의 연속 주입을 위한 더욱 최근에 자동화된 무선 제어 시스템, 예를 들면, 상품명 OMNIPOD™ 인슐린 관리 시스템으로 판매되는 시스템 (Insulet Corporation, Bedford, MA)이 개발되었다. 이들 시스템은 별개의 2-부분 시스템에서 혈당 모니터링 기술로 연속 피하 인슐린 전달을 제공한다. 이러한 시스템은 매일 인슐린 주사에 대한 요구를 제거하고, 그리고 배관을 거쳐 연결되는 전통적인 인슐린 펌프를 필요로 하지 않는다.

[0548] OMNIPOD™은 주입 세트와 유사하게 피부에 착용되는 작은 경량 장치이다. 이것은 Personal Diabetes Manager (PDM)로부터 무선으로 전송되는 미리 프로그래밍된 지시에 따라 인슐린을 전달한다. PDM은 맞춤형 인슐린 전달 지시로 OMNIPOD™ 인슐린 관리 시스템을 프로그래밍하고, 시스템의 작동을 모니터링하고, 그리고 상품명 FREESTYLE™으로 판매되는 혈당 검사 스트립을 이용하여 혈당 수준을 조사하는데 이용되는 무선 휴대용 장치이다. 상기 장치를 PDM에 연결하는 배관이 없다. OMNIPOD™ 인슐린 관리 시스템은 의복 아래 착용되고, 그리고 PDM은 배낭, 서류 가방, 또는 지갑에 넣어 별도로 운반될 수 있다. 현재 가용한 인슐린 펌프와 유사하게, OMNIPOD™ 인슐린 관리 시스템은 복합 기저 비율 (multiple basal rate)과 일시주사 옵션, 제한된 일시주사 계산, 안정성 체크, 그리고 경보 특징을 갖는 완전 프로그램가능 연속 피하 인슐린 전달을 특징으로 한다.

[0549] 당뇨병의 인슐린 치료의 목적은 전형적으로, 환자가 하루 내내 생리 범위 내에 혈당 수준 및 정상적인 탄수화물 대사를 갖도록 충분한 인슐린을 투여하는 것이다. 당뇨병 개체의 체장이 하루 내내 충분한 인슐린을 분비하지는 못하기 때문에, 인슐린 요법을 통해 당뇨병을 효과적으로 제어하기 위하여, 기저 인슐린으로 알려져 있는 장기-작용 인슐린 치료제는 혈당 농도를 제어하고, 그리고 음식물이 소화되지 않을 때 세포에 에너지가 공급되도록 하기 위해 필요한 인슐린의 느리고 지속적인 방출을 제공하도록 투여되어야 한다. 기저 인슐린은 식사와 하룻밤 사이에 글루코오스 생산을 억제하고, 바람직하게는 24-시간에 걸쳐 환자의 정상적인 체장 기저 인슐린 분비를 모방하는데 필요하다. 따라서 당뇨병 환자는 작용이 약 24시간 지속되는 장기-작용 인슐린의 단일 용량이 매일 피하 투여될 수 있다.

[0550] 게다가, 글루코오스 수준에서 식후 상승 (postprandial rise)을 처리함으로써 인슐린 요법을 통해 당뇨병을 효과적으로 제어하기 위해, 일시주사, 신속-작용 치료제 역시 투여되어야 한다. 일반적으로 피하 투여되는 일시주사 인슐린은 투여후 대략 1시간 시점에 혈장 인슐린 수준에서 상승을 제공하고, 따라서 식사후 고혈당증을 제한한다. 따라서 예로써, 5 내지 6시간의 작용 지속 기간을 갖는 정규 인슐린의 이들 추가적인 양은 하루 중에서, 환자의 혈당 수준이 너무 높게 상승하는 경향이 있는 시간, 예를 들면, 식사 시간에 피하 투여될 수 있다. 일시주사 인슐린과 공동으로 기저 인슐린을 투여하는 대안으로서, 일시주사 인슐린의 더욱 적은 반복과 정규 용량이 장기-작용 기저 인슐린 대신에 투여될 수 있고, 그리고 일시주사 인슐린이 필요에 따라 식후 투여될 수 있다.

[0551] 현재, 정규 피하 주사된 인슐린은 식사보다 30 내지 45분 앞서 투약되도록 권장된다. 결과로써, 당뇨병 환자 및 다른 인슐린 사용자는 식사 및 그들의 식사에 적절한 인슐린 투여의 사려 깊은 계획에 힘써야 한다. 유감스럽게도, 인슐린의 투여와 식사의 섭취 사이에 일어날 수 있는 개입적 사건 (intervening event)은 기대된 글루코오스 회유에 영향을 줄 수 있다.

[0552] 게다가, 투여된 인슐린이 너무 많은 시간에 걸쳐, 예를 들면, 식사의 섭취의 결과로서 일어나는 글루코오스 수

준에서 상승이 이미 낮아진 이후에도 치료 효과를 제공하면 저혈당증에 대한 가능성 역시 존재한다. 실시예에서 개설된 바와 같이, 저혈당증의 이러한 위험은 인슐린에 대한 감소된 필요로 인하여, C-펩티드로 치료된 환자에서 증가된다. 따라서 본 명세서에서 개시된 임의의 방법의 한 양태에서, 본 발명은 폐길화된 C-펩티드 요법을 시작한 이후에 환자에 투여되는 인슐린의 평균 일일 용량을 약 5% 내지 약 50% 감소시킴으로써, 환자에서 저혈당증이 발생하는 위험을 감소시키는 방법을 포함한다. 다른 양태에서, 투여된 인슐린의 용량은 폐길화된 C-펩티드 치료를 시작하기 이전에 환자의 인슐린 용량과 비교하여 약 5% 내지 약 45% 감소한다. 다른 양태에서, 투여된 인슐린의 용량은 폐길화된 C-펩티드 치료를 시작하기 이전에 환자의 인슐린 용량과 비교하여 약 5% 내지 약 40% 감소한다. 다른 양태에서, 투여된 인슐린의 용량은 폐길화된 C-펩티드 치료를 시작하기 이전에 환자의 인슐린 용량과 비교하여 약 5% 내지 약 35% 감소한다. 다른 양태에서, 투여된 인슐린의 용량은 폐길화된 C-펩티드 치료를 시작하기 이전에 환자의 인슐린 용량과 비교하여 약 5% 내지 약 30% 감소한다. 다른 양태에서, 투여된 인슐린의 용량은 폐길화된 C-펩티드 치료를 시작하기 이전에 환자의 인슐린 용량과 비교하여 약 5% 내지 약 25% 감소한다. 다른 양태에서, 투여된 인슐린의 용량은 폐길화된 C-펩티드 치료를 시작하기 이전에 환자의 인슐린 용량과 비교하여 약 5% 내지 약 20% 감소한다. 다른 양태에서, 투여된 인슐린의 용량은 폐길화된 C-펩티드 치료를 시작하기 이전에 환자의 인슐린 용량과 비교하여 약 5% 내지 약 15% 감소한다. 다른 양태에서, 투여된 인슐린의 용량은 폐길화된 C-펩티드 치료를 시작하기 이전에 환자의 인슐린 용량과 비교하여 약 5% 내지 약 10% 감소한다.

[0553] 다른 양태에서, 투여된 인슐린의 용량은 폐길화된 C-펩티드 치료를 시작하기 이전에 환자의 인슐린 용량과 비교하여 약 2% 내지 약 10% 감소한다. 다른 양태에서, 투여된 인슐린의 용량은 폐길화된 C-펩티드 치료를 시작하기 이전에 환자의 인슐린 용량과 비교하여 약 2% 내지 약 15% 감소한다. 다른 양태에서, 투여된 인슐린의 용량은 폐길화된 C-펩티드 치료를 시작하기 이전에 환자의 인슐린 용량과 비교하여 약 2% 내지 약 20% 감소한다.

[0554] 다른 양태에서, 투여된 인슐린의 용량은 폐길화된 C-펩티드 치료를 시작하기 이전에 환자의 인슐린 용량과 비교하여 약 10% 내지 약 50% 감소한다. 다른 양태에서, 투여된 인슐린의 용량은 폐길화된 C-펩티드 치료를 시작하기 이전에 환자의 인슐린 용량과 비교하여 약 10% 내지 약 45% 감소한다. 다른 양태에서, 투여된 인슐린의 용량은 폐길화된 C-펩티드 치료를 시작하기 이전에 환자의 인슐린 용량과 비교하여 약 10% 내지 약 40% 감소한다. 다른 양태에서, 투여된 인슐린의 용량은 폐길화된 C-펩티드 치료를 시작하기 이전에 환자의 인슐린 용량과 비교하여 약 10% 내지 약 35% 감소한다. 다른 양태에서, 투여된 인슐린의 용량은 폐길화된 C-펩티드 치료를 시작하기 이전에 환자의 인슐린 용량과 비교하여 약 10% 내지 약 30% 감소한다. 다른 양태에서, 투여된 인슐린의 용량은 폐길화된 C-펩티드 치료를 시작하기 이전에 환자의 인슐린 용량과 비교하여 약 10% 내지 약 25% 감소한다. 다른 양태에서, 투여된 인슐린의 용량은 폐길화된 C-펩티드 치료를 시작하기 이전에 환자의 인슐린 용량과 비교하여 약 10% 내지 약 20% 감소한다. 다른 양태에서, 투여된 인슐린의 용량은 폐길화된 C-펩티드 치료를 시작하기 이전에 환자의 인슐린 용량과 비교하여 적어도 10% 감소한다.

[0555] 이들 방법 중에서 한 가지의 한 양태에서, 투여된 단기-작용 인슐린의 용량은 앞서 열거된 임의의 규정된 범위에 의해 선택적으로 감소된다. 이들 방법 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 투여된 중기-작용 인슐린의 용량은 임의의 규정된 범위에 의해 선택적으로 감소된다. 이들 방법 중에서 한 가지의 한 양태에서, 투여된 장기-작용 인슐린의 용량은 앞서 열거된 임의의 규정된 범위에 의해 선택적으로 감소된다.

[0556] 이들 방법 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 투여된 중기-와 장기-작용 인슐린의 용량은 독립적으로 앞서 열거된 임의의 규정된 범위에 의해 감소되는 반면, 단기-작용 인슐린의 용량은 실질적으로 변화 없이 존속한다.

[0557] 이들 방법의 한 양태에서, 투여된 단기-작용 인슐린의 용량은 폐길화된 C-펩티드 치료를 시작하기 이전에 환자의 인슐린 용량과 비교하여 약 5% 내지 약 50% 감소한다. 다른 구체예에서, 투여된 단기-작용 인슐린의 용량은 폐길화된 C-펩티드 치료를 시작하기 이전에 환자의 인슐린 용량과 비교하여 약 5% 내지 약 35% 감소한다. 다른 구체예에서, 투여된 단기-작용 인슐린의 용량은 폐길화된 C-펩티드 치료를 시작하기 이전에 환자의 인슐린 용량과 비교하여 약 10% 내지 약 20% 감소한다. 이들 방법의 한 양태에서, 식사를 위해 식전 투여된 단기-작용 인슐린의 용량이 감소한다. 이들 방법의 다른 양태에서, 아침 또는 야간에 투여된 단기-작용 인슐린의 용량이 감소된다. 이들 방법 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 투여된 단기-작용 인슐린의 용량은 감소하는 반면, 환자에 투여된 장기-작용 및/또는 중기-작용 인슐린의 용량은 실질적으로 변화가 없다.

[0558] 본 명세서에서 개시된 임의의 방법의 다른 양태에서, 본 발명은 폐길화된 C-펩티드 요법을 시작한 이후에 환자에 투여되는 중기-작용 인슐린의 평균 일일 용량을 약 5% 내지 약 35% 감소시킴으로써 환자에서 저혈당증이 발생하는 위험을 감소시키는 방법을 포함한다. 이들 방법의 한 양태에서, 투여된 중기-작용 인슐린의 용량은 폐길

화된 C-펩티드 치료를 시작하기 이전에 환자의 인슐린 용량과 비교하여 약 5% 내지 약 50% 감소한다. 다른 구체예에서, 투여된 중기-작용 인슐린의 용량은 폐길화된 C-펩티드 치료를 시작하기 이전에 환자의 인슐린 용량과 비교하여 약 5% 내지 약 35% 감소한다. 다른 구체예에서, 투여된 중기-작용 인슐린의 용량은 폐길화된 C-펩티드 치료를 시작하기 이전에 환자의 인슐린 용량과 비교하여 약 10% 내지 약 20% 감소한다. 이들 방법의 다른 양태에서, 아침 또는 야간에 투여된 중기-작용 인슐린의 용량이 감소된다. 이들 방법 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 투여된 중기-작용 인슐린의 용량은 감소하는 반면, 환자에 투여된 단기-작용 인슐린의 용량은 실질적으로 변화가 없다.

[0559] 본 명세서에서 개시된 임의의 방법의 다른 양태에서, 본 발명은 폐길화된 C-펩티드 요법을 시작한 이후에 환자에 투여되는 장기-작용 인슐린의 평균 일일 용량을 약 5% 내지 약 50% 감소시킴으로써 환자에서 저혈당증이 발생하는 위험을 감소시키는 방법을 포함한다. 한 구체예에서, 투여된 장기-작용 인슐린의 용량은 폐길화된 C-펩티드 치료를 시작하기 이전에 환자의 인슐린 용량과 비교하여 약 5% 내지 약 35% 감소한다. 다른 구체예에서, 투여된 장기-작용 인슐린의 용량은 폐길화된 C-펩티드 치료를 시작하기 이전에 환자의 인슐린 용량과 비교하여 약 10% 내지 약 20% 감소한다. 이들 방법의 다른 양태에서, 아침 또는 야간에 투여된 장기-작용 인슐린의 용량이 감소된다. 이들 방법 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 투여된 장기-작용 인슐린의 용량은 감소하는 반면, 환자에 투여된 단기-작용 인슐린의 용량은 실질적으로 변화가 없다.

[0560] 일정한 바람직한 구체예에서, 환자는 치료 이전에 기준선 수준과 비교하여 폐길화된 C-펩티드로 치료후 저혈당증이 발생할 감소된 위험을 경험하면서 향상된 인슐린 활용과 인슐린 민감성을 달성한다. 바람직하게는, 향상된 인슐린 활용과 인슐린 민감성은 HOMA (항상성 모델 평가, Homeostasis Model Assessment) (Turner et al.: Metabolism 28(11): 1086-1096, (1979))에서 통계학적으로 유의한 감소에 의해 측정된다.

[0561] 폐길화된 C-펩티드의 피하 투여는 전형적으로, 인슐린 투여를 위해 가장 최근에 이용된 부위와 동일한 부위 내로 제공되지 않을 것이다, 다시 말하면, 폐길화된 C-펩티드 및 인슐린은 상이한 부위 내로 주사될 것이다. 구체적으로, 한 양태에서, 폐길화된 투여의 부위는 전형적으로, 인슐린 투여를 위해 가장 최근에 이용된 부위로부터 적어도 약 10 cm 떨어질 것이다. 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드 투여의 부위는 전형적으로, 인슐린 투여를 위해 가장 최근에 이용된 부위로부터 적어도 약 15 cm 떨어질 것이다. 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드 투여의 부위는 전형적으로, 인슐린 투여를 위해 가장 최근에 이용된 부위로부터 적어도 약 20 cm 떨어질 것이다.

[0562] 상이한 부위의 실례에는 예로써, 그리고 제한 없이, 왼쪽과 오른쪽 팔 내로 주사, 또는 왼쪽과 오른쪽 넓적다리 내로 주사, 또는 왼쪽 또는 오른쪽 궁둥이 내로 주사, 또는 복부의 대변 내로 주사가 포함된다. 상이한 부위의 다른 명백한 변이체에는 팔과 넓적다리에서 주사, 또는 팔과 궁둥이에서 주사, 또는 팔과 복부 내로 주사 등이 포함된다.

[0563] 게다가 당업자, 다시 말하면, 의사 또는 당뇨병 환자는 상이한 인슐린 주사 부위를 선택하는 방법에 관한 개시를 제공하는 선행 기술 교시, 그리고 인슐린 투여에 관한 다수의 교본과 가이드에 기초하여, 상이한 부위의 임의의 다른 조합 내로 폐길화된 C-펩티드와 인슐린을 주사하는 방법을 인식하고 이해할 것이다. 예로써, 하기 대표적인 교본 (Learning to live well with diabetes, Ed. Cheryl Weiler, (1991) DCI Publishing, Minneapolis, MN; American Diabetes Association Complete Guide to Diabetes, ISBN 0-945448-64-3 (1996)) 을 참고한다.

[0564] 청구된 방법 중에서 한 가지의 한 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 복부에서 인슐린 투여를 위해 가장 최근에 이용된 부위에 대략 15 내지 20 cm 떨어진 반대쪽에 투여된다.

[0565] VII. 제약학적 조성물

[0566] 한 양태에서, 본 발명은 폐길화된 C-펩티드, 그리고 제약학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 제약학적 조성물을 포함한다.

[0567] 폐길화된 C-펩티드의 전달에 적합한 제약학적 조성물 및 이들의 제조 방법은 당업자에게 명백할 것이고, 그리고 임의의 공지된 담체, 희석제, 또는 부형제를 포함할 수 있다. 이런 조성물 및 이들의 제조 방법은 예로써, Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Edition (Mack Publishing Company, 1995)에서 찾아볼 수 있다.

- [0568] 한 양태에서, 제약학적 조성물은 제약학적 활성 성분의 무균 수성 용액 및/또는 현탁액, 에어로졸, 연고 등의 형태일 수 있다. 수성 용액인 제제가 가장 바람직하다. 이런 제제는 전형적으로, 폐길화된 C-펩티드 자체, 물, 그리고 안정제로서 기능하는 하나 또는 그 이상의 완충액 (가령, 인산염-내포 완충액) 및 선택적으로 하나 또는 그 이상의 보존제를 내포한다. 이런 제제는 예로써, 약 1 내지 200 mg, 약 3 내지 100 mg, 약 3 내지 80 mg, 약 3 내지 60 mg, 약 3 내지 40 mg, 약 3 내지 30 mg, 약 0.3 내지 3.3 mg, 약 1 내지 3.3 mg, 약 1 내지 2 mg, 약 1 내지 3.3 mg, 약 2 내지 3.3 mg 또는 본 명세서에서 언급된 임의의 범위, 예를 들면, 약 200 mg, 약 150 mg, 약 120 mg, 약 100 mg, 약 80 mg, 약 60 mg, 약 50 mg, 약 40 mg, 약 30 mg, 약 20 mg, 또는 약 10 mg, 또는 약 8 mg, 또는 약 6 mg, 또는 약 5 mg, 또는 약 4 mg, 또는 약 3 mg, 또는 약 2 mg, 또는 약 1 mg, 또는 약 0.5 mg의 폐길화된 C-펩티드를 내포하고, 그리고 본 발명의 추가적인 양태를 구성한다.
- [0569] 제약학적 조성물은 폐길화된 C-펩티드의 제약학적으로 허용되는 염을 포함할 수도 있다. 적절한 염에 관한 검토를 위하여, *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use* by Stahl and Wermuth (Wiley-VCH, 2002)를 참고한다. 적절한 염기 염 (base salt)은 비-독성 염을 형성하는 염기로부터 형성된다. 대표적인 실례에는 알루미늄, 아르기닌, 벤자틴, 칼슘, 콜린, 디에틸아민, 디올라민, 글리신, 리신, 마그네슘, 메글루민, 올라민, 칼륨, 나트륨, 트로메타민, 그리고 아연 염이 포함된다. 산과 염기의 헤미염 (Hemisalt), 예를 들면 헤미설페이트 (hemisulphate) 및 헤미칼슘 염 (hemicalcium salt) 역시 형성될 수 있다. 한 구체예에서, 폐길화된 C-펩티드는 제약학적으로 허용되는 양으로 하전된 이온을 갖는 겔로서 제조될 수 있다.
- [0570] 한 양태에서, 양으로 하전된 이온은 일가 금속 이온 (monovalent metal ion)일 수 있다. 한 양태에서, 금속 이온은 나트륨과 칼륨에서 선택된다.
- [0571] 한 양태에서, 양으로 하전된 이온은 이가 금속 이온 (divalent metal ion)일 수 있다. 한 양태에서, 금속 이온은 칼슘, 마그네슘, 그리고 아연에서 선택된다.
- [0572] 폐길화된 C-펩티드는 하루 동안 임의의 시점에 투여될 수 있다. 인간의 경우에, 이용된 용량은 약 0.1 내지 200 mg/주의 폐길화된 C-펩티드, 예를 들면, 약 0.1 내지 0.3 mg/주, 약 0.3 내지 1.5 mg/주, 약 1 mg 내지 약 3.5 mg/주, 약 1.5 내지 2.25 mg/주, 약 2.25 내지 3.0 mg/주, 약 3.0 내지 6.0 mg/주, 약 6.0 내지 10 mg/주, 약 10 내지 20 mg/주, 약 20 내지 40 mg/주, 약 40 내지 60 mg/주, 약 60 내지 80 mg/주, 약 80 내지 100 mg/주, 약 100 내지 120 mg/주, 약 120 내지 140 mg/주, 약 140 내지 160 mg/주, 약 160 내지 180 mg/주, 그리고 약 180 내지 약 200 mg/주의 범위에서 변할 수 있다.
- [0573] 바람직하게는, 폐길화된 C-펩티드에 이용되는 총 매주 용량은 약 1 mg 내지 약 3.5 mg, 약 1 mg 내지 약 20 mg, 약 20 mg 내지 약 50 mg, 약 50 mg 내지 약 100 mg, 약 100 mg 내지 약 150 mg, 또는 약 150 mg 내지 약 200 mg이다.
- [0574] 폐길화된 C-펩티드의 총 매주 용량은 약 0.1 mg, 약 0.5 mg, 약 1 mg, 약 1.5 mg, 약 2 mg, 약 2.5 mg, 약 3 mg, 약 3.5 mg, 약 4 mg, 약 4.5 mg, 약 5 mg, 약 5.5 mg, 약 6 mg, 약 7 mg, 약 8 mg, 약 9 mg, 약 10 mg, 약 12 mg, 약 15 mg, 약 18 mg, 약 21 mg, 약 24 mg, 약 27 mg, 약 30 mg, 약 33 mg, 약 36 mg, 약 39 mg, 약 42 mg, 약 45 mg, 약 50 mg, 약 60 mg, 약 70 mg, 약 80 mg, 약 90 mg, 약 100 mg, 약 110 mg, 약 120 mg, 약 130 mg, 약 140 mg, 약 150 mg, 약 160 mg, 약 170 mg, 약 180 mg, 약 190 mg, 또는 약 200 mg일 수 있다 (앞서 지칭된 폐길화된 C-펩티드의 질량은 전달 시스템의 생체내 이용효율에 의존하고 대략 40,000 Da의 분자 질량을 갖는 폐길화된 C-펩티드의 이용에 기초되는 것으로 인지될 것이다).
- [0575] 이들 방법과 제약학적 조성물 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량은 약 1 mg 내지 약 45 mg 범위의 매주 용량을 포함한다. 이들 방법과 제약학적 조성물 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량은 약 3 mg 내지 약 15 mg 범위에서 변하는 매주 용량을 포함한다. 이들 방법과 제약학적 조성물 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량은 약 30 mg 내지 약 60 mg 범위에서 변하는 매주 용량을 포함한다. 이들 방법과 제약학적 조성물 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량은 약 60 mg 내지 약 120 mg 범위에서 변하는 매주 용량을 포함한다.
- [0576] 이들 방법과 제약학적 조성물 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량은 환자의 혈장 내에서 약 0.2 nM 내지 약 6 nM의 폐길화된 C-펩티드의 평균 정지-상태 농도 ( $C_{ss-ave}$ )를 지속한다. 이들 방법과 제약학적 조성물 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 3일 또는 그 이상의 투약 간격을 이용할 때 환자의 혈장 내에서 약 0.2 nM 내지 약 6 nM의 폐길화된 C-펩티드의 평균 정지-상태 농도를 지속하기 위한 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량이 환자에 제공된다. 이들 방법과 제약학적 조성물 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 4일 또는 그



이상의 투약 간격을 이용할 때 환자의 혈장 내에서 약 0.2 nM 내지 약 6 nM의 폐길화된 C-펩티드의 평균 정지-상태 농도를 지속하기 위한 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량이 환자에 제공된다. 이들 방법과 제약학적 조성물 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 5일 또는 그 이상의 투약 간격을 이용할 때 환자의 혈장 내에서 약 0.2 nM 내지 약 6 nM의 폐길화된 C-펩티드의 평균 정지-상태 농도를 지속하기 위한 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량이 환자에 제공된다. 이들 방법과 제약학적 조성물 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 적어도 1주일의 투약 간격을 이용할 때 환자의 혈장 내에서 약 0.2 nM 내지 약 6 nM의 폐길화된 C-펩티드의 평균 정지-상태 농도를 지속하기 위한 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량이 환자에 제공된다. 이들 방법과 제약학적 조성물 중에서 한 가지에서, 치료 용량은 매일 피하 주사에 의해 투여된다. 이들 방법과 제약학적 조성물 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 치료 용량은 지속 방출 제제 또는 장치에 의해 투여된다.

[0577] 이들 방법과 제약학적 조성물 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 3일 또는 그 이상의 투약 간격을 이용할 때 환자의 혈장 내에서 약 0.4 nM 내지 약 8 nM의 폐길화된 C-펩티드의 평균 정지-상태 농도를 지속하기 위한 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량이 환자에 제공된다. 이들 방법과 제약학적 조성물 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 4일 또는 그 이상의 투약 간격을 이용할 때 환자의 혈장 내에서 약 0.4 nM 내지 약 8 nM의 폐길화된 C-펩티드의 평균 정지-상태 농도를 지속하기 위한 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량이 환자에 제공된다. 이들 방법과 제약학적 조성물 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 5일 또는 그 이상의 투약 간격을 이용할 때 환자의 혈장 내에서 약 0.4 nM 내지 약 8 nM의 폐길화된 C-펩티드의 평균 정지-상태 농도를 지속하기 위한 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량이 환자에 제공된다. 이들 방법과 제약학적 조성물 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 7일 또는 그 이상의 투약 간격을 이용할 때 환자의 혈장 내에서 약 0.4 nM 내지 약 8 nM의 폐길화된 C-펩티드의 평균 정지-상태 농도를 지속하기 위한 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량이 환자에 제공된다.

[0578] 이들 방법과 제약학적 조성물 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 3일 또는 그 이상의 투약 간격을 이용할 때 환자의 혈장 내에서 약 0.6 nM 내지 약 8 nM의 폐길화된 C-펩티드의 평균 정지-상태 농도를 지속하기 위한 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량이 환자에 제공된다. 이들 방법과 제약학적 조성물 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 4일 또는 그 이상의 투약 간격을 이용할 때 환자의 혈장 내에서 약 0.6 nM 내지 약 8 nM의 폐길화된 C-펩티드의 평균 정지-상태 농도를 지속하기 위한 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량이 환자에 제공된다. 이들 방법과 제약학적 조성물 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 5일 또는 그 이상의 투약 간격을 이용할 때 환자의 혈장 내에서 약 0.6 nM 내지 약 8 nM의 폐길화된 C-펩티드의 평균 정지-상태 농도를 지속하기 위한 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량이 환자에 제공된다. 이들 방법과 제약학적 조성물 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 7일 또는 그 이상의 투약 간격을 이용할 때 환자의 혈장 내에서 약 0.6 nM 내지 약 8 nM의 폐길화된 C-펩티드의 평균 정지-상태 농도를 지속하기 위한 폐길화된 C-펩티드의 치료 용량이 환자에 제공된다.

[0579] 용량은 용해 상태에 있거나 용해 상태에 있지 않다. 용량이 용해 상태로 투여되면, 용량의 부피는 변할 수 있지만, 전형적으로 20  $\mu$ l - 2 mL인 것으로 인지될 것이다. 바람직하게는, S.C. 투여를 위한 용량은 2000  $\mu$ l, 1500  $\mu$ l, 1200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l, 900  $\mu$ l, 800  $\mu$ l, 700  $\mu$ l, 600  $\mu$ l, 500  $\mu$ l, 400  $\mu$ l, 300  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 또는 20  $\mu$ l의 부피로 제공될 것이다.

[0580] 용해 상태에서 폐길화된 C-펩티드 용량은 또한, 보존제 및/또는 완충액을 포함할 수 있다. 가령, 보존제 m-크레졸, 또는 페놀이 이용될 수 있다. 보존제의 전형적인 농도는 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL, 4 mg/mL, 또는 5 mg/mL를 포함한다. 따라서 보존제의 농도 범위는 0.2 내지 10 mg/mL, 특히 0.5 내지 6 mg/mL, 또는 0.5 내지 5 mg/mL를 포함할 수 있다. 이용될 수 있는 완충액의 실례에는 히스티딘 (pH 6.0), 인산나트륨 완충액 (pH 6 내지 7.5), 또는 나트륨 비카보네이트 완충액 (pH 7 내지 7.5)이 포함된다. 폐길화된 C-펩티드 용량은 고유 또는 본래 C-펩티드, 단편, 유도체, 또는 C-펩티드의 다른 기능적으로 동등한 변이체 중에서 한 가지 또는 그 이상을 포함하는 것으로 인지될 것이다.

[0581] VIII. 투여 방법

[0582] 폐길화된 C-펩티드의 용량은 전장 인간 C-펩티드 (서열 번호 1) 및 C-말단 C-펩티드 단편 EGSLQ (서열 번호 31) 및/또는 C-펩티드 동족체 또는 C-펩티드 유도체를 포함할 수 있다. 게다가, 용량은 원하는 경우에, C-펩티드의 단편, 예를 들면, EGSLQ만을 포함할 수도 있다. 따라서 용어 "C-펩티드"는 단일 C-펩티드 실체 또는 상이한 C-펩티드의 혼합물을 포함할 수 있다. 폐길화된 C-펩티드의 투여는 경구, 비경구, 국소, 또는 피하 투여, 흡입, 또는 지속된 전달 장치 또는 조성물의 이식을 비롯하여, 의학 분야에 공지된 임의의 적절한 방법에 의해 달성될 수 있다. 한 양태에서, 투여는 피하 투여이다.

- [0583] 경구 투여에 적합한 본 발명의 제약학적 조성물은 예로써, 장에서 약물의 분해로부터 보호하고, 따라서 잇몸으로부터 또는 소장에서 이들 물질의 흡수를 가능하게 하는 외피 또는 외피들 (엔테로캡슐)에 의해 가급적 덮인 무균 정제된 스톱 분말 형태에서 폐길화된 C-펩티드를 포함할 수 있다. 조성물 내에서 활성 성분의 총량은 중량으로 99.99 내지 0.01 퍼센트의 범위에서 변할 수 있다.
- [0584] 경구 투여의 경우에, 폐길화된 C-펩티드를 포함하는 제약학적 조성물은 용액, 현탁액, 정제, 알약, 캡슐, 분말 등의 형태를 취할 수 있다. 다양한 부형제, 예를 들면, 구연산나트륨, 탄산칼슘 및 인산칼슘을 내포하는 정제는 결합제 (binding agent), 예를 들면, 폴리비닐피롤리돈, 수크로오스, 젤라틴 및 아카시아와 함께, 다양한 분해제 (disintegrant), 예를 들면, 전분, 바람직하게는, 감자 또는 타피오카 전분 및 일정한 복합 규산염과 함께 이용된다. 부가적으로, 윤활제 (lubricating agent), 예를 들면, 마그네슘 스테아르산염, 나트륨 라우릴 황산염 및 활석이 정제화 (tableting) 목적에 매우 유용하다. 유사한 유형의 고형 조성물은 또한, 연성과 경성-충진된 젤라틴 캡슐에서 충진제 (filler)로서 이용된다; 이와 관련하여 바람직한 물질에는 락토오스 또는 유당뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 역시 포함된다. 수성 현탁액 및/또는 엘릭시르가 경구 투여를 위해 요망될 때, 본 발명의 화합물은 다양한 감미료 (sweetening agent), 풍미제 (flavoring agent), 착색제 (coloring agent), 유화제 (emulsifying agent) 및/또는 현탁제 (suspending agent), 그리고 희석제, 예를 들면, 물, 에탄올, 프로필렌 글리콜, 글리세린 및 이들의 다양한 유사 조합과 합동될 수 있다.
- [0585] 비경구 투여에 적합한 본 발명에 이용되는 제약학적 조성물은 전형적으로, 수용자의 혈액과 가급적 등장성이 되는 제약학적으로 활성 성분의 무균 수성 용액 및/또는 현탁액이다. 이런 조성물은 일반적으로, 부형제, 염, 탄수화물, 그리고 완충제 (바람직하게는, 3 내지 9의 pH로), 예를 들면, 염화나트륨, 글리세린, 글루코오스, 만니톨, 소르비톨 등을 포함한다.
- [0586] 일부 적용의 경우에, 비경구 투여를 위한 제약학적 조성물은 무균 비-수성 용액으로서, 또는 적절한 운반제, 예를 들면, 무균, 무-발열원 물과 공동으로 이용되는 건조된 형태로서 적절하게 조제될 수 있다. 무균 조건 하에, 예로써 동결 건조에 의한 비경구 제제의 제조는 당업자에게 공지된 표준 제약학적 기술을 이용하여 쉽게 달성될 수 있다.
- [0587] 본 발명에 이용을 위한 폐길화된 C-펩티드를 포함하는 제약학적 조성물은 또한, 국소, 피부(피내), 또는 피부 또는 점막에 경피 투여될 수 있다. 국소 투여를 위한 제약학적 조성물은 즉시 및/또는 변형된 방출이 되도록 조제될 수 있다. 변형된 방출 제제에는 지연된, 지속된, 펄스된, 제어된, 표적화된 및 프로그래밍된 방출이 포함된다. 이런 목적을 위한 전형적인 제제에는 겔, 히드로겔, 로션, 용액, 크림, 연고, 살포제, 드레싱, 거품, 필름, 피부 패치, 웨이퍼, 이식물, 스펀지, 섬유, 붕대, 그리고 마이크로에멀전이 포함된다. 리포솜 역시 이용될 수 있다. 전형적인 담체에는 알코올, 물, 미네랄 오일, 액상 바셀린, 백색 바셀린, 글리세린, 폴리에틸렌 글리콜, 그리고 프로필렌 글리콜이 포함된다. 침투 개선제 (penetration enhancer)가 통합될 수도 있다. 예로써, Finnin and Morgan: *J. Pharm. Sci.* 88(10): 955-958, (1999)를 참고한다. 국소 투여의 다른 수단에는 전기천공 (electroporation), 이온도입 (iontophoresis), 음성영동 (phonophoresis), 초음파침투 (sonophoresis), 그리고 미세바늘 또는 바늘-없는 (가령, POWDERJECT™, BOJECT™) 주사에 의한 전달이 포함된다.
- [0588] 비경구 투여를 위한 폐길화된 C-펩티드의 제약학적 조성물은 혈류, 근육, 또는 내부 장기 내로 직접적으로 투여될 수 있다. 비경구 투여를 위한 적절한 수단에는 정맥내, 동맥내, 복막내, 척추강내, 심실내, 요도내, 흉골내, 두개내, 근육내, 활액내, 그리고 피하가 포함된다. 비경구 투여를 위한 적절한 장치에는 바늘 (미세바늘 포함) 주사기, 바늘-없는 주사기, 그리고 주입 기술이 포함된다.
- [0589] 폐길화된 C-펩티드의 피하 투여는 전형적으로, 인슐린 투여를 위해 가장 최근에 투여된 부위와 동일한 부위로 제공되지 않을 것이다. 청구된 방법과 제약학적 조성물 중에서 한 가지의 한 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 복부에서 인슐린 투여를 위해 가장 최근에 이용된 부위의 맞은편에 투여된다. 청구된 방법과 제약학적 조성물 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 상완에 투여된다. 청구된 방법과 제약학적 조성물 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 복부에 투여된다. 청구된 방법과 제약학적 조성물 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 궁둥이의 위쪽 구역에 투여된다. 청구된 방법과 제약학적 조성물 중에서 한 가지의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 넓적다리의 정면에 투여된다.
- [0590] 비경구 투여를 위한 제제는 즉시 및/또는 지속된 방출이 되도록 조제될 수 있다. 지속 방출 조성물에는 지연된, 변형된, 펄스된, 제어된, 표적화된 및 프로그래밍된 방출이 포함된다. 따라서 폐길화된 C-펩티드는 현탁액으로서, 또는 지속된 방출을 제공하는 이식된 저장소로서 고형, 반-고형, 또는 투여를 위한 요변성 액체

(thixotropic liquid)로서 조제될 수 있다. 이런 제제의 실례에는 제한 없이, 약물-코팅된 스텐트, 그리고 약물-적하된 폴리(DL-락트산-글리콜산) (PGLA), 폴리(DL-락티드-글리콜리드) (PLG) 또는 폴리(락티드) (PLA) 층상 소포 또는 미립자, 히드로겔 (Hoffman AS: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 944: 62-73 (2001)), 폴리-아미노산 나노입자 시스템, 예를 들면, Flamel Technologies Inc.에 의해 개발된 Medusa 시스템, 비-수성 겔 시스템, 예를 들면, Atrix, Inc.에 의해 개발된 Atrigel, 그리고 Durect Corporation에 의해 개발된 SABER (수크로오스 아세테이트 이소부티레이트 연장된 방출), 그리고 지질-기초된 시스템, 예를 들면, SkyePharma에 의해 개발된 DepoFoam을 포함하는 반-고형물과 현탁액이 포함된다.

[0591] 연장된 기간에 걸쳐 원하는 용량의 폐길화된 C-펩티드를 전달할 수 있는 지속 방출 장치는 당분야에 공지되어 있다. 가령, US Pat. No. 5,034,229; 5,557,318; 5,110,596; 5,728,396; 5,985,305; 6,113,938; 6,156,331; 6,375,978; 그리고 6,395,292에서는 연장된 기간 (즉, 1주 이상 내지 1년 또는 그 이상의 범위의 기간)에 걸쳐 원하는 비율로, 활성제 제제, 예를 들면, 용액 또는 현탁액을 전달할 수 있는 삼투-피동된 장치를 교시한다. 다른 예시적인 지속 방출 장치에는 유익한 작용제 제제의 불변 흐름, 조정가능 흐름, 또는 프로그램가능 흐름을 제공하는 조절자-타입 펌프가 포함되고, 이들은 예로써, OmniPod<sup>TM</sup> 인슐린 관리 시스템 (Insulet Corporation, Codman of Raynham, MA, Medtronic of Minneapolis, MN, Intarcia Therapeutics of Hayward, CA, 그리고 Tricumed Medinzintechnik GmbH of Germany)으로부터 가용하다. 장치의 추가적인 실례는 US Pat. No. 6,283,949; 5,976,109; 5,836,935; 그리고 5,511,355에서 기술된다.

[0592] 이들이 원하는 활성제를 연장된 기간에 걸쳐 치료 수준으로 제공하도록 설계될 수 있기 때문에, 이식가능 전달 시스템은 건강관리 제공자에게 빈번한 방문 또는 반복적 자가-치료를 필요로 하지 않으면서, 원하는 활성제의 장기 치료 투약을 유리하게 제공할 수 있다. 이런 이유로, 이식가능 전달 장치는 증가된 환자 순응도, 투여 부위에서 감소된 자극, 건강관리 제공자에 대한 더욱 적은 직업적 위험 (occupational hazard), 감소된 폐기물 위험 (waste hazard), 그리고 증가된 투약 제어를 통한 증가된 치료 효능을 제공하는 역할을 할 수 있다.

[0593] 다른 과제 중에서, 이식된 전달 장치로부터 연장된 기간에 걸쳐 생체분자성 물질을 전달하려고 할 때 2가지 문제점은 반드시 해결되어야 한다. 첫째, 생체분자성 물질은 장치의 운전 수명 (operational life) 동안 상승된 온도 (즉, 37°C 및 그 이상)에 상기 물질의 안정성을 실질적으로 지속하는 제제 내에 포함되어야 한다. 둘째, 생체분자성 물질은 연장된 기간 동안 이식된 장치로부터 원하는 작업 환경으로 생체분자성 물질의 전달을 가능하게 하는 방식으로 조제될 수 있다. 이러한 두 번째 과제는 생체분자성 물질이 연장된 기간에 걸쳐 낮은 유속 (즉,  $\leq 100 \mu\text{l/day}$ )에서 장치로부터 전달되는 유동가능 조성물 내에 포함되는 경우에, 특히 어려운 것으로 증명된다.

[0594] C-펩티드와 같은 펩티드 약물은 탈아미드화 (deamidation), 산화 (oxidation), 가수분해 (hydrolysis), 그리고 라세미화 (racemization)를 비롯한 여러 상이한 기전 중에서 하나 또는 그 이상을 거쳐 분해될 수 있다. 유의미하게는, 물은 많은 관련된 분해 경로에서 반응체이다. 게다가, 물은 가소제 (plasticizer)로서 기능하고 생체분자성 물질의 폴립 (unfolding)과 비가역적 집합 (irreversible aggregation)을 조장한다. 생체분자성 물질의 수성 제제에 의해 발생된 안정성 문제를 해결하기 위하여, 공지된 입자 형성 공정을 이용하여, 예를 들면, 공지된 동결 건조, 분무 건조, 또는 건조 기술에 의해 생체분자성 물질의 건성 분말 제제가 산출되었다. 비록 생체분자성 물질의 건성 분말 제제가 적절한 안정성 특징을 제공하는 것으로 밝혀졌긴 하지만, 연장된 기간 동안 안정할 뿐만 아니라, 유동가능하고 이식가능 전달 장치로부터 쉽게 전달가능한 제제를 제공하는 것이 바람직할 것이다.

[0595] 따라서 청구된 방법과 제약학적 조성물 중에서 한 가지의 한 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 비-수성 약물 제제에 담겨 제공되고, 그리고 지속 방출 이식가능 장치로부터 전달되고, 여기서 폐길화된 C-펩티드는 37°C에서 적어도 2개월 동안 안정하다.

[0596] 폐길화된 C-펩티드에 대한 대표적인 비-수성 제제에는 중합체, 용매, 그리고 계면활성제 중에서 적어도 2개를 이용하여 조제되는 비-수성 운반제 제제를 기술하는 International Publication Number W000/45790에서 개시된 것들이 포함된다.

[0597] W098/27962에서는 중합체, 상기 중합체를 용해시켜 점성 겔 (viscous gel)을 형성할 수 있는 용매, 유익한 작용제, 그리고 점성 겔 내에 분산된 비말 상 (droplet phase)의 형태에서 유화제를 내포하는 주사가능 저장소 겔 조성물을 개시한다.

[0598] W004089335에서는 물에서 혼화성인 운반제를 유발하는 중합체와 용매의 조합을 이용하여 형성되는 비-수성 운반

제를 개시한다. 본 명세서에서 이용된 바와 같이, 용어 "물에서 혼화성"은 선택된 작업 환경의 대표적인 온도 범위에서, 고도 점성 중합체 상이 형성되도록 용매로부터 중합체의 상 분리 (phase separation)를 유발하지 않으면서 모든 비율에서 물과 혼합될 수 있는 운반제를 지칭한다. 본 발명에서, "고도 점성 중합체 상"은 운반제가 물과 혼합되기 이전에 운반제의 점성보다 큰 점성을 나타내는 조성물 내포하는 중합체를 지칭한다.

- [0599] 따라서 임의의 청구된 방법의 다른 양태에서, 폐길화된 C-펩티드는 적어도 하나의 약물 전달 구멍을 갖는 저장소, 그리고 안정된 비-수성 약물 제제를 포함하는 지속 방출 장치에 담겨 제공된다. 이들 방법과 제약학적 조성물의 한 양태에서, 제제는 적어도 폐길화된 C-펩티드; 그리고 적어도 하나의 중합체와 적어도 하나의 용매를 포함하는 비-수성, 단일-상 운반제를 포함하고, 상기 운반제는 물에서 혼화성이고, 여기서 상기 약물은 하나 또는 그 이상의 운반제 성분에서 불용성이고 폐길화된 C-펩티드 제제는 37°C에서 적어도 2개월 동안 안정하다. 한 양태에서, 용매는 글리코푸롤, 벤질 알코올, 테트라글리콜, n-메틸피롤리돈, 글리세롤 포르말, 프로필렌 글리콜, 그리고 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택된다.
- [0600] 특히, 비-수성 제제는 37°C에서 2개월의 기간 동안 상기 제제의 유지후 폐길화된 C-펩티드의 약 35 % 이하가 화학적 경로, 예를 들면, 산화, 탈아미드화, 그리고 가수분해에 의해 분해되면, 화학적으로 안정된 것으로 간주되고, 그리고 제제는 동일한 조건 하에, 제제 내에 포함된 C-펩티드 중에서 약 15 % 이하가 집합을 통해 분해되면, 물리적으로 안정한 것으로 간주된다. 약물 제제는 폐길화된 C-펩티드 중에서 적어도 약 65 %가 37°C에서 약 2개월후 물리적으로 및 화학적으로 안정되게 존속하면 본 발명에 따라 안정하다.
- [0601] 폐길화된 C-펩티드는 전형적으로, 건성 분말 흡입기로부터 건성 분말의 형태에서 (단독으로, 예로써 락토오스와 의 건성 혼합물에서 혼합물로서, 또는 예로써 인지질, 예를 들면, 포스파티딜콜린과 혼합된 혼성 성분 입자로서), 적절한 추진제, 예를 들면, 1,1,1,2-테트라플루오르에탄 또는 1,1,1,2,3,3,3-헵타플루오르프로판의 이용과 함께 또는 이용 없이 가압된 용기, 펌프, 스프레이, 흡입기 (바람직하게는, 미세한 연무를 생산하기 위해 전기유체역학 (electro hydrodynamics)을 이용하는 흡입기), 또는 분무기로부터 에어로졸 스프레이로서, 또는 코 점적약으로서 코내 또는 흡입에 의해 투여될 수 있다. 코내 이용을 위해, 분말은 생체접합체 (bioadhesive agent), 예를 들면, 키토산 또는 시클로텍스트린을 포함할 수 있다. 가압된 용기, 펌프, 스프레이, 흡입기, 또는 분무기는 예로써, 에탄올, 수성 에탄올, 또는 활성물질을 분산시키거나, 용해시키거나, 또는 이의 방출을 연장시키기 위한 적절한 대안적 작용제, 용매로서 추진제(들), 그리고 선택적 계면활성제, 예를 들면, 소르비탄 트리올리에이트 (sorbitan trioleate), 올레산 (oleic acid), 또는 올리고락트산 (oligolactic acid)을 포함하는 본 발명의 화합물(들)의 용액 또는 현탁액을 내포한다.
- [0602] 건성 분말 또는 현탁액 제제에서 이용에 앞서, 약물 산물은 흡입에 의한 전달에 적합한 크기 (전형적으로 5  $\mu$ m 이하)로 미분화된다. 이것은 임의의 적절한 방법, 예를 들면, 나선 제트 제분 (spiral jet milling), 유동층 제트 제분 (fluid bed jet milling), 나노입자를 형성하는 초임계 유체 가공 (supercritical fluid processing), 고압 균질화 (high pressure homogenization), 또는 분무 건조 (spray drying)에 의해 달성될 수 있다.
- [0603] 흡입 장치에 의해 전달되는 제제에서 본 발명의 폐길화된 C-펩티드의 입자 크기는 폐 내로, 그리고 바람직하게는 하부기도 (lower airway) 또는 폐포 (alveoli) 내로 들어가는 C-펩티드의 능력에 대하여 중요하다. 바람직하게는, 본 발명의 폐길화된 C-펩티드는 전달되는 폐길화된 C-펩티드 중에서 적어도 약 10 %, 바람직하게는 약 10 % 내지 약 20 %, 또는 그 이상이 폐 내에 침착하도록 조제된다. 구강 호흡 인간에 대한 폐 침착 (pulmonary deposition)의 최대 효율은 약 2  $\mu$ m 내지 약 3  $\mu$ m의 입자 크기에서 획득되는 것으로 알려져 있다. 입자 크기가 약 5  $\mu$ m을 초과하면, 폐 침착이 실질적으로 감소한다. 약 1  $\mu$ m 미만의 입자 크기는 폐 침착의 감소를 유발하고, 그리고 치료적으로 효과적인 만큼 충분한 질량을 갖는 입자를 전달하는 것이 어려워진다. 따라서 흡입에 의해 전달된 폐길화된 C-펩티드의 입자는 바람직하게는 약 10  $\mu$ m 이하, 더욱 바람직하게는 약 1  $\mu$ m 내지 약 5  $\mu$ m의 범위에서 입자 크기를 갖는다. 폐길화된 C-펩티드의 제제는 선택된 흡입 장치에서 원하는 입자 크기를 산출하도록 선택된다.
- [0604] 건성 분말로서 투여를 위해 유리하게는, 본 발명의 폐길화된 C-펩티드는 약 10  $\mu$ m 이하, 바람직하게는 약 1 내지 약 5  $\mu$ m의 입자 크기를 갖는 미립자 형태로 제조된다. 바람직한 입자 크기는 환자의 폐의 폐포에 전달하는데 효과적이다. 바람직하게는, 건성 분말은 생성된 입자로 거의 구성되고, 따라서 이들 입자 중에서 대부분은 원하는 범위에서 크기를 갖는다. 유리하게는, 건성 분말의 적어도 약 50 %는 약 10  $\mu$ m 이하의 직경을 갖는 입자로 만들어진다. 이런 제제는 본 발명의 폐길화된 C-펩티드 및 다른 원하는 성분을 내포하는 용액의 분무 건조, 제분, 또는 임계적 응축 (critical point condensation)에 의해 달성될 수 있다. 본 발명에 유용한 입자를 산출하는데 적합한 다른 방법 역시 당분야에 공지되어 있다.



- [0605] 입자는 통상적으로, 용기 내에 건성 분말 제제로부터 분리되고, 이후 담체 기류 (air stream)를 거쳐 환자의 폐 내로 운반된다. 전형적으로, 현재의 건성 분말 흡입기에서, 고체를 부수기 위한 힘은 순전히 환자의 흡입에 의해 제공된다. 다른 유형의 흡입기에서, 환자의 흡입에 의해 산출된 기류는 입자를 흐트리는 임펠러 모터 (impeller motor)를 활성화시킨다.
- [0606] 흡입기 또는 취입기에서 이용을 위한 캡슐 (예로써, 젤라틴 또는 히드록시프로필메틸셀룰로오스로부터 만들어짐), 블리스터 및 카트리지는 본 발명의 화합물, 적절한 분말 기부, 예를 들면, 락토오스 또는 전분, 그리고 성능 조절제 (performance modifier), 예를 들면, 1-류신, 만니톨, 또는 마그네슘 스테아르산염의 분말 혼합물을 내포하도록 조절될 수 있다. 락토오스는 무수성이거나 일수화물의 형태일 수 있고, 바람직하게는 후자이다. 다른 적절한 부형제에는 덱스트란, 글루코오스, 말토오스, 소르비톨, 자일리톨, 프럭토오스, 수크로오스, 그리고 트레할로스가 포함된다.
- [0607] 전기유체역학을 이용하여 미세한 연무를 생산하는 흡입기에서 이용하기 적합한 용액 제제는 구동 (actuation)마다 100  $\mu$ g 내지 200 mg의 폐길화된 C-펩티드를 내포할 수 있고, 그리고 구동 용적 (actuation volume)은 1  $\mu$ l 내지 100  $\mu$ l 범위에서 변할 수 있다. 전형적인 제제는 폐길화된 C-펩티드 프로필렌 글리콜, 무균수, 에탄올, 그리고 염화나트륨을 포함할 수 있다. 프로필렌 글리콜 대신에 이용될 수 있는 대안적 용매에는 글리세롤과 폴리 에틸렌 글리콜이 포함된다. 적절한 풍미제, 예를 들면, 멘톨과 레보멘톨, 또는 감미료, 예를 들면, 사카린 또는 사카린 나트륨이 흡입/코내 투여에 의도되는 본 발명의 제제에 첨가될 수 있다. 흡입/코내 투여를 위한 제제는 예로써, PGLA를 이용하여 즉시 및/또는 변형된 방출이 되도록 조절될 수 있다. 변형된 방출 제제에는 지연된, 지속된, 펄스된, 제어된, 표적화된, 그리고 프로그래밍된 방출이 포함된다.
- [0608] 건성 분말 흡입기와 에어로졸의 경우에, 투약 단위 (dosage unit)는 계량된 양을 전달하는 밸브에 의해 결정된다. 본 발명에 따른 단위는 전형적으로, 계량된 용량 또는 1 mg 내지 200 mg의 폐길화된 C-펩티드를 내포하는 "퍼프 (puff)"를 투여하도록 준비된다. 전체 일일 용량은 전형적으로, 하루 동안 단일 용량, 또는 더욱 통상적으로, 분할 용량 (divided dose)으로서 투여될 수 있는 1 mg 내지 200 mg 범위 내에 있을 것이다.
- [0609] 본 발명의 실시예에 적합한 상업적으로 구입가능한 흡입 장치의 실례는 상품명 TURBHALER™ (Astra), ROTAHALER® (Glaxo), DISKUS®, SPIROS™ 흡입기 (Dura), Inhale Therapeutics에 의해 상품명 AERX™ (Aradigm) 하에 시판되는 장치, 그리고 ULTRAVENT® 분무기 (Mallinckrodt), ACORN II® 분무기 (Marquest Medical Products), VENTOLIN® 계량된 용량 흡입기 (Glaxo), 그리고 SPINHALER® 분말 흡입기 (Fisons) 등이다.
- [0610] 키트 역시 본 발명에서 예기된다. 전형적인 키트는 제약학적으로 허용되는 제제에서 폐길화된 C-펩티드를 포함하는 폐길화된 C-펩티드 제제를 위한 용기, 바람직하게는 바이알, 그리고 사용설명서, 및/또는 제품 삽입물 또는 표지를 포함할 것이다. 한 양태에서, 사용설명서는 저혈당증의 위험, 발생률, 또는 심각도를 감소시키기 위해 인슐린-의존성 환자에 상기 폐길화된 C-펩티드의 투여를 위한 투약 섭생 (dosing regime)을 포함한다. 한 양태에서, 키트는 폐길화된 C-펩티드 요법을 시작할 때 인슐린의 투여를 약 5 % 내지 약 35 % 감소시키기 위한 사용설명서를 포함한다. 다른 양태에서, 사용설명서는 폐길화된 C-펩티드 요법을 시작할 때 환자의 혈당 수준을 면밀하게 모니터링하도록 하는 환자에 대한 지시사항을 포함한다. 다른 양태에서, 사용설명서는 폐길화된 C-펩티드 요법을 시작할 때 환자가 저혈당증에 걸리게 쉽게 만들 지도 모르는 상황 또는 환경을 피하도록 하는 환자에 대한 지시사항을 포함한다.

## 도면의 간단한 설명

### [0611] 도면의 간단한 설명

본 발명의 특징과 이점의 더욱 충실한 이해는 본 발명의 원리가 이용되는 예시적인 구체예를 설명하는 하기 상세한 설명, 그리고 첨부된 도면을 참고함으로써 획득될 수 있다:

도 1에서는 본 발명의 40 kDa 가지형 사슬 폐길화된 C-펩티드의 역상 크로마토그램을 도시한다.

도 2에서는 본 발명의 40 kDa 가지형 사슬 폐길화된 C-펩티드의 크기 배제 크로마토그램을 도시한다.

도 3에서는 본 발명의 20 kDa 선형 사슬 폐길화된 C-펩티드의 역상 크로마토그램을 도시한다.

도 4에서는 본 발명의 20 kDa 선형 사슬 폐길화된 C-펩티드의 크기 배제 크로마토그램을 도시한다.

도 5에서는 단일 피하 용량 이후에 개에서 변형되지 않은 C-펩티드의 혈장 농도-시간 프로필을 도시한다. 도 5A

에서는 1일의 시간 눈금에서 프로필을 도시하고, 도 5B에서는 12일의 시간 눈금에서 프로필을 도시한다.

도 6에서는 개에서 20 kDa 선형 사슬 폐길화된 C-펩티드 (다이아몬드) 및 40 kDa 가지형 사슬 폐길화된 C-펩티드 (사각형)의 단일 피하 용량 이후에, 선형 눈금을 이용한 C-펩티드의 혈장 농도-시간 프로필을 도시한다.

도 7에서는 개에서 20 kDa 선형 사슬 폐길화된 C-펩티드 (다이아몬드) 및 40 kDa 가지형 사슬 폐길화된 C-펩티드 (사각형)의 단일 피하 용량 이후에, 반-대수 눈금을 이용한 C-펩티드의 혈장 농도-시간 프로필을 도시한다.

도 8에서는 개에서 폐길화된 C-펩티드의 단일 피하 용량 이후에 C-펩티드의 혈장 농도-시간 프로필을 도시한다.

도 8A에서는 선형 눈금을 이용하여 제공된 데이터를 도시한다. 도 8B에서는 반-대수 형태로 제공된 데이터를 도시한다.

도 9에서는 개에서 폐길화된 C-펩티드의 단일 피하 용량 이후에 C-펩티드의  $C_{max}$ 와  $AUC(0-t)$ 를 도시한다. 도 9A에서는  $C_{max}$ 를 도시하고, 그리고 도 9B에서는  $AUC(0-t)$ 를 도시한다.

도 10에서는 Sprague Dawley 쥐에서 폐길화된 C-펩티드의 단일-용량 피하 투여 이후에 평균 ( $\pm$  SD) C-펩티드 혈장 농도-시간 프로필을 도시한다. 패널 A 선형 눈금; 패널 B 반-대수 눈금.

도 11에서는 필리핀 원숭이에서 폐길화된 C-펩티드의 단일-용량 피하 투여 이후에 평균 ( $\pm$  SD) C-펩티드 혈장 농도-시간 프로필을 도시한다. 패널 A 선형 눈금; 패널 B 반-대수 눈금.

도 12에서는 Sprague Dawley 쥐에서 폐길화된 C-펩티드의 복수 용량 피하 투여 이후에 평균 C-펩티드 혈장 농도-시간 프로필을 도시한다. 패널 A 수컷 선형 눈금; 패널 B 암컷 선형 눈금; 패널 C 수컷 반-대수 눈금; 패널 D 암컷 반-대수 눈금.

도 13에서는 Sprague Dawley 쥐에서 용량의 함수로서  $C_{max}$ 와  $AUC(0-\infty)$  사이에 상관관계를 도시한다; 패널 A  $C_{max}$ , 일차 용량; 패널 B  $AUC(0-\infty)$  일차 용량; 패널 C  $C_{max}$ , 최종 용량; 패널 D  $AUC(0-\infty)$  최종 용량.

도 14에서는 필리핀 원숭이에서 복수-용량 피하 투여 시에 평균 C-펩티드 혈장 농도-시간 프로필을 도시한다; 패널 A 수컷 선형 눈금; 패널 B 암컷 선형 눈금; 패널 C 수컷 반-대수 눈금; 패널 D 암컷 반-대수 눈금.

도 15에서는 필리핀 원숭이에서 용량의 함수로서  $C_{max}$ 와  $AUC(0-\infty)$  사이에 상관관계를 도시한다; 패널 A  $C_{max}$ , 일차 용량; 패널 B  $AUC(0-\infty)$  일차 용량; 패널 C  $C_{max}$ , 최종 용량; 패널 D  $AUC(0-\infty)$  최종 용량.

도 16에서는 8주까지 치료된 쥐의 4가지 치료 그룹 각각에서 미부 신경 전도 속도 (NCV)를 도시한다 (실시에 6 참고). 본 도면에서, 그리고 하기 3개의 도면에서, 1 그룹은 운반제 대조 (스트렙토조토신 [STZ] 없음)을 나타내고, 2 그룹은 STZ 치료된 그룹 + 운반제를 나타내고, 3 그룹은 STZ + 1.0 mg/kg/주(week) (1.0 mg/ml)의 인간 폐길화된 C-펩티드 (실시에 12)를 나타내고, 그리고 4 그룹은 STZ + 3.0 mg/kg/주(week) (1.0 mg/ml)의 인간 폐길화된 C-펩티드 (실시에 12)를 나타낸다. 도 16에서, 패널 A에서는 기준선 NCV 치수를 도시하고, 그리고 패널 B에서는 운반제 단독, 또는 1.0 또는 3.0 mg/kg/주(week)에서 폐길화된 C-펩티드의 투여의 4-주 기간 (기준선으로부터)후 미부 NCV를 도시한다. 도 16, 패널 C에서는 운반제 단독, 또는 1.0 또는 3.0 mg/kg/주(week)에서 폐길화된 C-펩티드의 투여의 8-주 기간 (기준선으로부터)후 미부 NCV를 도시한다.

도 17에서는 도 16에서 기술된 바와 동일한 4가지 동물 그룹 각각에서 손가락 NCV를 도시한다. 도 17에서, 패널 A는 기준선 치수를 도시하고, 그리고 패널 B에서는 운반제 단독, 또는 1.0 또는 3.0 mg/kg/주(week)에서 폐길화된 C-펩티드의 투여의 4-주 기간 (기준선으로부터)후 손가락 NCV를 도시한다. 도 17, 패널 C에서는 운반제 단독, 또는 1.0 또는 3.0 mg/kg/주(week)에서 폐길화된 C-펩티드의 투여의 8-주 기간 (기준선으로부터)후 손가락 NCV를 도시한다.

도 18에서는 연구의 전체 지속 기간에 걸쳐, 도 17에서 기술된 바와 동일한 4가지 치료 그룹에서 손가락 NCV의 상대적 변화를 도시한다.

도 19에서는 8주 치료후 기준선 치수와 비교하여, 도 16과 17에서 기술된 바와 동일한 4가지 치료 그룹에서 미부와 손가락 NCV에서 상대적 변화를 도시한다.

도 20에서는 C-펩티드, PEG 시약, 그리고 폐길화된 C-펩티드의 푸리에 변환 적외분광법 (FT-IR) 결과를 도시한다.

도 21에서는 C-펩티드, PEG 시약, 그리고 폐길화된 C-펩티드의 푸리에 변환 적외분광법 (FT-IR) 결과의 확대된 영역을 도시한다.

도 22에서는 D<sub>2</sub>O에서 수집된 C-펩티드, PEG 시약, 그리고 폐길화된 C-펩티드의 푸리에 변환 적외분광법 (FT-IR) 결과를 도시한다.

도 23에서는 D<sub>2</sub>O에서 수집된 C-펩티드, PEG 시약, 그리고 폐길화된 C-펩티드의 푸리에 변환 적외분광법 (FT-IR) 결과를 도시한다.

도 24에서는 키모트립신과 함께 항온처리 (incubation)후 C-펩티드 (1 mg/mL)와 폐길화된 C-펩티드 (10 mg/mL)에 대한 펩티드 지도를 도시한다.

도 25에서는 PBS 완충액에서 폐길화된 C-펩티드 (~0.6 mg/mL에서)에 대한 표준화된 침강 계수 분포를 도시한다.

도 26에서는 C-펩티드와 폐길화된 C-펩티드의 원편광 이색성 분석 결과를 도시한다.

도 27에서는 실시예 12의 폐길화된 C-펩티드의 샘플의 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)의 결과를 도시한다.

도 28에서는 실시예 12의 20 kDa 폐길화된 C-펩티드와 40 kDa 폐길화된 C-펩티드의 크로마토그램의 오버레이를 도시한다.

도 29에서는 나트륨 도데실 황산염 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 SDS-PAGE: 실시예 12의 폐길화된 C-펩티드의 겔 전기영동의 결과를 도시한다.

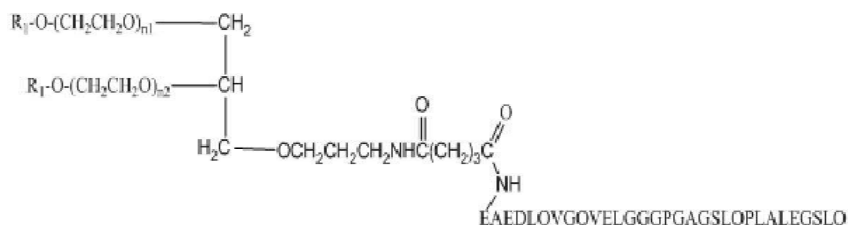
도 30에서는 ERK 인산화 측정법에서 고유 C-펩티드와 비교하여 폐길화된 C-펩티드의 생물학적 활성의 평가의 결과를 도시한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0612] 실시예

[0613] 약어. 하기 약어가 명세서 및 실시예에서 이용된다: ACN = 아세토니트릴; Bzl = Bn = 벤질; DIEA = N,N-디이소프로필에틸아민; DMF = N,N-디메틸포름아미드; tBu = tert-부틸; TSTU = O-(N-숙신이미딜)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 테트라플루오르보산염; THF = 테트라히드로푸란; EtOAc = 에틸 아세테이트; DIPEA = DIEA = 디이소프로필에틸아민; HOAt = 1-히드록시-7-아자벤조트리아졸; NMP = N-메틸피롤리딘-2-온; TEA = 트리에틸 아민; SA = 시나피닌산; Su = 1-숙신이미딜 = 2,5-디옥소-피롤리딘-1-일; TFA = 트리플루오르아세트산; DCM = 디클로로메탄; DMSO = 디메틸 설펝사이드; RT = 실온; 전반적인 절차: 하기 실시예 및 전반적인 절차는 명세서에서 확인된 중간 화합물과 최종 산물을 언급한다. 대안으로, 본 명세서에서 개시되거나 달리 전통적인 다른 반응은 본 발명의 상응하는 화합물의 제조에 적용될 수 있을 것이다. 모든 예비 방법에서, 모든 출발 물질은 공지되거나, 또는 공지된 출발 물질로부터 쉽게 제조될 수 있다. 모든 온도는 섭씨 (°C)로 제시되고, 그리고 달리 지시되지 않으면, 수율을 언급할 때 모든 분율과 백분율은 중량 단위 (즉, w/w)이고 용매와 용리액을 언급할 때 모든 분율은 부피 단위 (즉, v/v)이다.

[0614] 실시예 1: 가지형 사슬 폐길화된 C-펩티드의 제조



[0615] 여기서 R<sub>1</sub> = 메틸, 그리고 n<sub>1</sub>과 n<sub>2</sub>는 약 450 내지 약 520이다.

[0617] 1 g의 인간 C-펩티드 (서열 번호 1) (0.33 mM)는 25 mL DMF / 물 (20 mL / 5 mL)에 용해되었다. pH는 N-메틸모르폴린 (NMM)으로 7.8로 조정되었다. 이후, SUNBRIGHT GL2-400GS2 (NOF Corporation) 근사 분자량 40,000 Da의 용액 (DMF / 물 / ACN (25 mL / 5 mL / 10 mL)에서 1.85 g의 활성화된 PEG (0.04 mM))가 첨가되고, 그리고 반응물은 실온에서 하룻밤동안 교반되었다.

[0618] 상기 용액은 정제된 물로 700 mL로 희석되었다. DMF 농도는 6 % v/v이었다. pH는 아세트산으로 4 내지 4.5로 조정되고 여과되었다. 상기 용액은 0.5 % 아세트산 (이동상 A) / 100 mM 나트륨 아세테이트 (이동상 B) / ACN (이동상 C) 농도구배를 이용하여, YMC-ODS 칼럼 (2.5 x 30 cm)을 이용한 HPLC에 의해 정제되었다. 분리는 3 칼럼 부피의 90 % A / 10 % C로 칼럼을 평형화시킴으로써 완결되었다. 폐길화된 C-펩티드는 90 % B / 10 % C (3 칼럼 부피)에 적하되고 세척되며, 그 이후에 1 칼럼 부피의 90 % A / 10 % C로 등용매 세척 (isocratic washing)되었다. 용리는 2 칼럼 부피에서 90 % A / 10 % C 내지 70 % A / 30 % C로 시작하고, 그 이후에 5 칼럼 부피에서 70 % A / 30 % C 및 50 % A / 50 % C까지 상승으로 구성되는 선형 농도구배가 뒤를 잇는 다중-선형 농도구배를 거쳐 달성되었다.

[0619] HPLC로부터 풀 (pool) (140 mL)은 70 mL 정제된 물로 희석되고 25°C에서 130 mL의 부피로 증발되었다. 최종 농도는 12 g/L이었다. 상기 용액은 동결 건조되어 1500 mg의 폐길화된 C-펩티드 (80 % 수율)가 산출되었다.

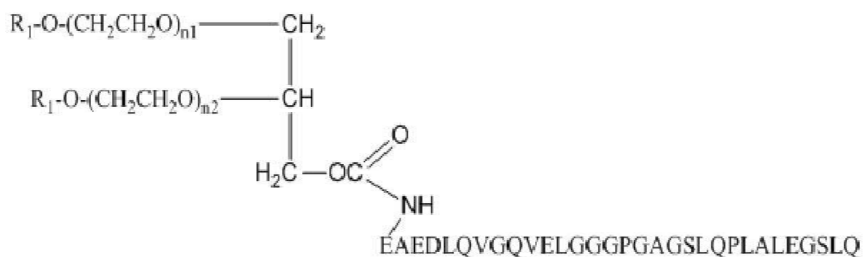
[0620] 정제후 수집된 분획물은 역상과 크기 배제 HPC에 의해 분석되었다. 역상 HPLC는 0.25 mL/min의 유속, 40°C의 칼럼 온도, 그리고 5 mg/mL의 샘플 농도에서 3분에 걸쳐 24 % 내지 40 % ACN, 그 이후에 1분에 걸쳐 40 % 내지 90 % ACN의 2 성분 선형 농도구배를 이용하여, ACN과 0.1 % TFA의 이동상을 이용한 Waters UPLCBEH C18 17  $\mu$ M 칼럼을 이용하여 수행되었다. 대표적인 크로마토그램은 도 1에 제공된다.

[0621] 크기 배제 크로마토그래피는 0.5 mL/min의 유속에서 2.7 mM KCl과 0.137 M NaCl을 내포하는 0.1 M 인산염 완충액 pH 7.4의 이동상으로 등용매 용리를 이용하여, Superdex 75, 10/300GL 칼럼을 이용하여 수행되었다. 대표적인 크로마토그램은 도 2에 제공된다.

[0622] 실시예 2: 추가의 가지형 사슬 폐길화된 C-펩티드의 제조

[0623] 실시예 1에서 기술된 바와 유사한 반응 조건, 그리고 SUNBRIGHT GL2-400GS2 대신에 하기 시약을 이용하여, MW 10 kDa 내지 80 kDa의 하기 폐길화된 C-펩티드가 쉽게 제조될 수 있다.

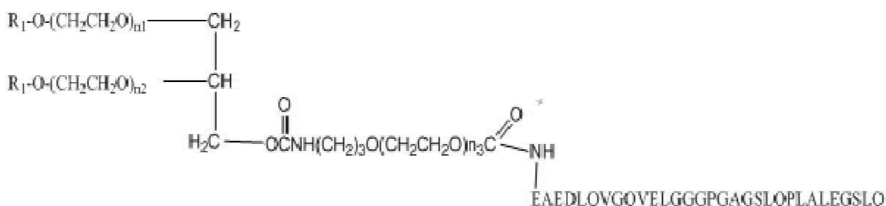
[0624] SUNBRIGHT GL2-400TS의 이용은 하기를 산출한다:



[0625]

[0626] 여기서  $R_1$  = 메틸.

[0627] SUNBRIGHT GL3-400TS100U의 이용은 하기를 산출한다:



[0628]

[0629] 여기서  $R_1$  = 메틸.

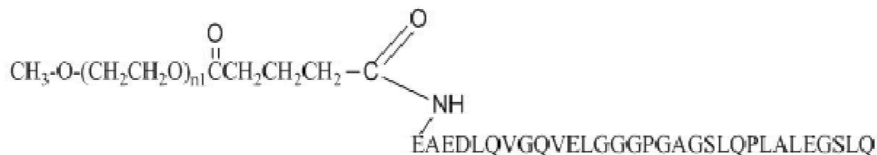


[0642] 여기서 R<sub>1</sub> = 메틸.

[0643] 실시예 3: 선형 사슬 폐결화된 C-펩티드의 제조

[0644] 실시예 1에서 기술된 바와 유사한 반응 조건, 그리고 SUNBRIGHT GL2-400GS2대신에 하기 시약을 이용하여, MW 5 kDa 내지 80 kDa의 하기 폐결화된 C-펩티드가 쉽게 제조될 수 있다.

[0645] SUNBRIGHT ME-200GS.



[0646]

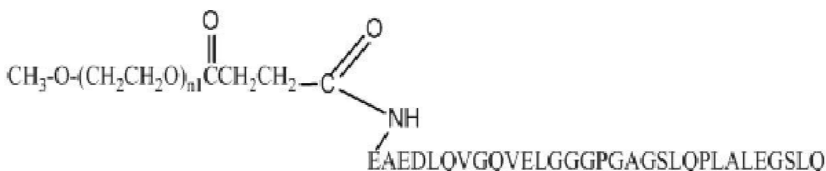
[0647] 정제후 수집된 분획물은 역상과 크기 배제 HPLC에 의해 분석되었다. 역상 HPLC는 0.25 mL/min의 유속, 40℃의 칼럼 온도, 그리고 5 mg/mL의 샘플 농도에서 3분에 걸쳐 24 % 내지 40 % ACN, 그 이후에 1분에 걸쳐 40 % 내지 90 % ACN의 2 성분 선형 농도구배를 이용하여, ACN과 0.1 % TFA의 이동상을 이용한 Waters UPLCBEH C18 17 μM 칼럼을 이용하여 수행되었다. 대표적인 크로마토그램은 도 3에 제공된다.

[0648] 크기 배제 크로마토그래피는 0.5 mL/min의 유속에서 2.7 mM KCl과 0.137 M NaCl을 내포하는 0.1 M 인산염 완충액 pH 7.4의 이동상으로 등용매 용리를 이용하여, Superdex 75, 10/300GL 칼럼을 이용하여 수행되었다. 대표적인 크로마토그램은 도 4에 제공된다.

[0649] 실시예 4: 추가적인 선형 사슬 폐결화된 C-펩티드의 제조

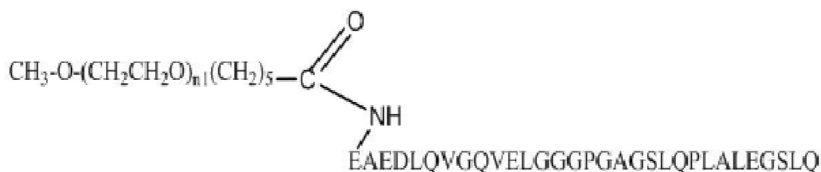
[0650] 실시예 1에서 기술된 바와 유사한 반응 조건, 그리고 SUNBRIGHT GL2-400GS2대신에 하기 시약을 이용하여, MW 5 kDa 내지 80 kDa의 하기 선형 폐결화된 C-펩티드가 쉽게 제조될 수 있다.

[0651] SUNBRIGHT ME-200CS의 이용은 하기를 산출한다:



[0652]

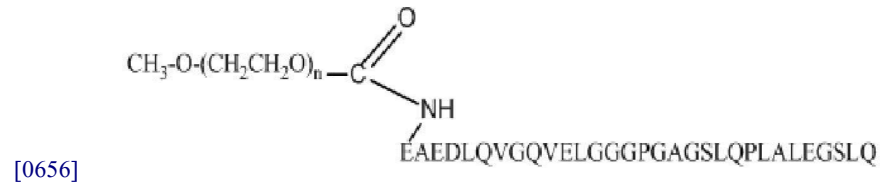
[0653] SUNBRIGHT ME-200HS의 이용은 하기를 산출한다:



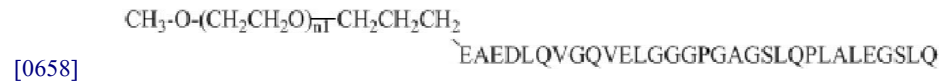
[0654]



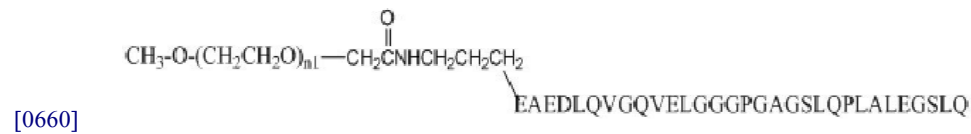
[0655] SUNBRIGHT ME-200TS의 이용은 하기를 산출한다:



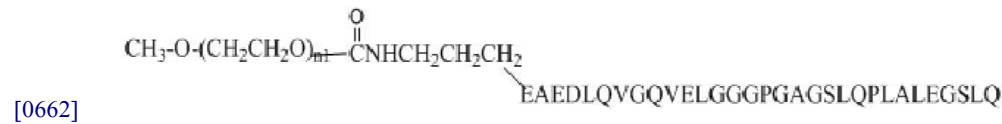
[0657] SUNBIO P1PAL-30의 이용은 하기를 산출한다:



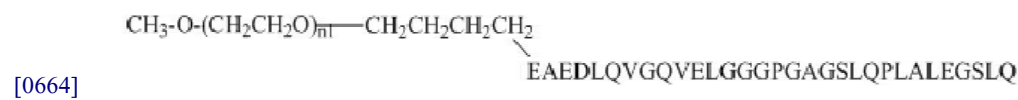
[0659] SUNBIO P1APAL-30의 이용은 하기를 산출한다:



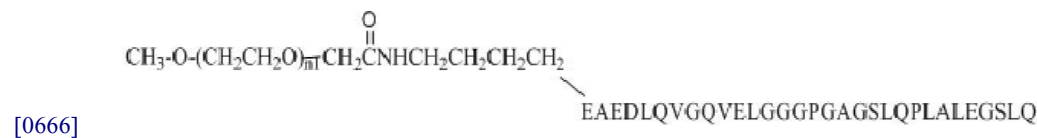
[0661] SUNBIO P1TPAL-5의 이용은 하기를 산출한다:



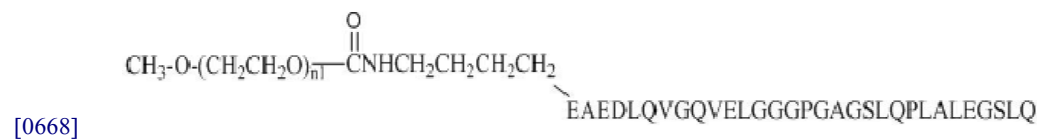
[0663] SUNBIO P1BAL-30의 이용은 하기를 산출한다:



[0665] SUNBIO P1ABAL-30의 이용은 하기를 산출한다:



[0667] SUNBIO P1TBAL-5의 이용은 하기를 산출한다:



[0669] 실시예 5: 개에서 약물동력학적 특징의 측정

[0670] 약물동력학적 (PK) 연구는 비글 개에서 변형되지 않은 C-펩티드로 C-펩티드 PK 프로필을 결정하기 위해 수행되

었다.

[0671] 방법: 2마리 수컷 및 1마리 암컷 개는 인산염 완충된 염수 (20 mg/mL)에서 제조된 변형되지 않은 합성 인간 C-펩티드 (0.5 mg/kg; 0.025 mL/kg)가 S.C. 제공되었다. 개는 정맥천자에 의해 방혈되고, 그리고 혈액 샘플은 14 일에 걸쳐 미리 결정된 시점에서 수집되었다. 혈장 샘플은 혈액의 원심분리 (10분 동안 3,000 rpm)후 획득되고 분석 때까지 -80°C에서 보관되었다. 우수 실험실 관리기준 (Good Laboratory Practice, GLP) 능력을 갖는 CRO (MicroConstants, Inc.; San Diego, CA)가 생물분석 작업을 수행하였다. C-펩티드의 혈장 수준은 제조업체의 사용설명서를 이용하여, 인간 C-펩티드 결정을 위한 상업적 키트 (Mercodia; 카탈로그 번호 10-1136-01)에 기초된 효소-결합 면역흡착 측정법 (ELISA) 기술에 의해 측정되었다. 결과는 C-펩티드 농도로서 표시되었다. PK 분석을 위해, 정량 미만 수준 (below quantitation level, BQL)은 0으로서 처리되고, 그리고 명목 시점 (nominal time point)이 모든 계산에 이용되었다. PK 파라미터는 WinNonlin Professional 5.2.1 (Pharsight Corp., Mountain View, CA)에서 모델 200을 이용하여 각 동물에 대한 개별 혈장 농도-시간 데이터에 기초된 표준 모델 독립적 방법에 의해 결정되었다.

[0672] 결과: 모든 동물은 연구의 지속 기간 동안 생존하였다. 각 치료는 임상적 비정상의 부재에 기초하여 충분히 용인되었다. 개에서 변형되지 않은 C-펩티드의 S.C. 투약 이후에, C-펩티드 최대 농도 ( $C_{max}$ )와 곡선 아래 면적 ( $AUC_{(0-t)}$ ) 값에 대한 평균  $\pm$  표준 편차 (SD)는 하기 표 E1에 제공된다. 투약후 1일과 12일 시점에 선형 눈금에서 상응하는 평균  $\pm$  SD C-펩티드 혈장 농도-시간 프로파일은 각각, 도 5A와 도 5B에 제공된다. 변형되지 않은 C-펩티드의 단일-용량 투여는 급속한 피크 측적을 유발하였고, 그리고 이후, 개에서 순환으로부터 C-펩티드의 급속한 상실을 유발하였다. 변형되지 않은 C-펩티드의 이용은 반날 이내에 BQL인 C-펩티드의 순환 수준을 유발하였다.

[0673] [표 E1]

표 E1				
변형되지 않은 수성 C-펩티드 (CP-AQ)의 단일 S.C. 용량 이후에, 개에서 C-펩티드의 평균 PK 파라미터				
	$C_{max}$ (ng/mL)		$AUC_{(0-t)}$ (ng·일/mL) <sup>a</sup>	
	평균	SD	평균	SD
CP-AQ	757	192	77.4	6.82
<sup>a</sup> $AUC_{(0-t)}$ 는 투약 직후에서부터 최종 측정가능 샘플링 시간까지 혈장 농도-시간 곡선 아래 면적이고, 그리고 선형 사다리꼴 공식에 의해 계산된다.				

[0674]

[0675] 비글 개에서 상이한 분자량의 2가지 대표적인 폐길화된 C-펩티드 (20 kDa 선형 PEG (실시예 3) 및 40 kDa 가지형 PEG (실시예 1))를 이용하여 C-펩티드 PK 프로파일을 결정하기 위한 두 번째 PK 연구가 수행되었다. 결과는 변형되지 않은 C-펩티드에 대한 결과와 비교되었다.

[0676] 방법: 3마리 수컷 개는 인산염 완충된 염수에서 조제된 20 kDa 폐길화된 합성 인간 C-펩티드 (0.5 mg/kg 당량의 C-펩티드; 0.09 mL/kg) (50.8 mg/mL 폐길화된 C-펩티드)가 S.C. 제공되고, 그리고 3마리 수컷 개는 인산염 완충된 염수에서 조제된 40 kDa 폐길화된 합성 인간 C-펩티드 (0.5 mg/kg 당량의 C-펩티드; 0.012 mL/kg) (82.5 mg/mL 폐길화된 C-펩티드)가 S.C. 제공되었다. 개는 정맥천자에 의해 방혈되고, 그리고 혈액 샘플은 21일에 걸쳐 미리 결정된 시점에서 수집되었다. 혈장 샘플은 혈액의 원심분리 (10분 동안 3,000 rpm)후 획득되고 분석 때까지 -80°C에서 보관되었다. 우수 실험실 관리기준 (Good Laboratory Practice, GLP) 능력을 갖는 CRO (MicroConstants, Inc.; San Diego, CA)가 생물분석 작업을 수행하였다. C-펩티드의 혈장 수준은 폐길화된 C-펩티드 품질 제어 표준을 이용하여, 인간 C-펩티드 결정을 위한 상업적 키트 (Mercodia; 카탈로그 번호 10-1136-01)에 기초된 효소-결합 면역흡착 측정법 (ELISA) 기술에 의해 측정되었다. 결과는 C-펩티드 농도로서 표시되었다. PK 분석을 위해, 정량 미만 수준 (below quantitation level, BQL)은 0으로서 처리되고, 그리고 명

목 시점 (nominal 시점)이 모든 계산에 이용되었다. PK 파라미터는 WinNonlin Professional 5.2.1 (Pharsight Corp., Mountain View, CA)에서 모델 200을 이용하여 각 동물에 대한 개별 혈장 농도-시간 데이터에 기초된 표준 모델 독립적 방법에 의해 결정되었다.

[0677] 결과: 모든 동물은 연구의 지속 기간 동안 생존하였다. 각 치료는 임상적 비정상의 부재에 기초하여 충분히 용인되었다. 변형되지 않은 C-펩티드와 비교하여, 폐길화된 C-펩티드의 이용은 개에서 C-펩티드 노출을 20 kDa 선형 폐길화된 C-펩티드로 투약후 적어도 4일, 그리고 40 kDa 가지형 사슬 폐길화된 C-펩티드로 투약후 적어도 15일까지 연장하였다.

[0678] 개에서 20 kDa 폐길화된 C-펩티드와 40 kDa 폐길화된 C-펩티드의 S.C. 투약 이후에, C-펩티드  $C_{max}$ ,  $AUC_{(0-t)}$ , 그리고 반감기 ( $T_{1/2}$ ) 값에 대한 평균  $\pm$  SD는 하기 표 E2에 제공된다. 선형과 반-대수 눈금에서 상응하는 평균  $\pm$  SD C-펩티드 혈장 농도-시간 프로파일은 각각, 도 6과 도 7에 제공된다.

[표 E2]

표 E2 20 kDa 와 40 kDa 폐길화된 C-펩티드 (CP)의 단일 S.C. 용량 이후에, 개에서 C-펩티드의 평균 PK 파라미터					
	PEG (20 kDa) CP		PEG (40 kDa) CP		PEG (40 kDa) CP 대(對) PEG (20 kDa) CP 의 비율
	평균	SD	평균	SD	
$C_{max}$ (ng/mL)	1,800	400	5,790	642	2.26
$AUC_{(0-t)}$ (ng·일/mL) <sup>a</sup>	4,060	588	38,600	8,200	6.67
$T_{1/2}$ <sup>b</sup> (일)	1.39	0.197	2.02	0.217	1.45
<sup>a</sup> $AUC_{(0-t)}$ 는 투약 직후에서부터 최종 측정가능 샘플링 시간까지 혈장 농도-시간 곡선 아래 면적이고, 그리고 선형 사다리꼴 공식에 의해 계산된다.					
<sup>b</sup> $T_{1/2}$ 는 $\ln(2)/\lambda$ 에 의해 계산된 종말 반감기이고, 여기서 $\lambda$ 는 종말 단계의 로그-선형 부분에 대한 제거 속도 상수를 나타낸다.					

[0680] 놀랍게도, 40 kDa 폐길화된 C-펩티드의 S.C. 투약 이후에  $C_{max}$ 와  $AUC_{(0-t)}$  값은 20 kDa 폐길화된 C-펩티드의 상응하는 값보다 각각, 2.26-배와 6.67-배 높았다. 따라서 40 kDa 가지형 사슬 폐길화된 C-펩티드는 20 kDa 폐길화된 C-펩티드와 비교하여, 또는 변형되지 않은 C-펩티드와 비교하여 유의미하게 향상된 PK 성질을 제공한다. 인산염 완충된 염수에서 조제된 더욱 낮은 용량의 40 kDa 가지형 사슬 폐길화된 C-펩티드 (0.006, 0.025, 그리고 0.1 mg/kg, 폐길화된 합성 인간 C-펩티드 (40 kDa PEG; SUNBRIGHT GL2-400GS2를 거쳐 만들어짐, 실시예 1)의 단일-용량 S.C. 주사에 의해)로 비글 개에서 세 번째 PK 연구가 수행되었다.

[0682] 방법: C-펩티드의 혈장 수준이 14일에 걸쳐 측정되었다. 비임상적 CRO (Bio-Quant, Inc.; San Diego, CA)가 본 연구의 동물 부분을 수행하였다. 9마리 수컷과 암컷 개의 체중은 용량 투여의 일자 (Day 0)에 각각, 대략 7-12 kg과 6-8 kg이었다. 동물은 본 연구 동안 사양되고, 그리고 사료 소비가 Day 0, 1, 그리고 2에 측정되었다. 체중은 또한, Day 7과 14에서 측정되었다. 각 동물의 등에서 주사 구역은 Day 0보다 2일 앞서 털이 제거되고 청결해졌다. 개의 3가지 그룹이 있었다 ( $n = 2$ 마리 수컷 및 1마리 암컷/그룹):

[0683] 1 그룹은 0.05 mL/kg의 용량에서 2 mg/mL 폐길화된 C-펩티드 (0.005 mg/kg 당량의 C-펩티드를 내포)의 25G 바늘을 거쳐 단일 S.C. 주사가 제공되었다.

[0684] 2 그룹은 0.0125 mL/kg의 용량에서 2 mg/mL 폐길화된 C-펩티드 (0.00125 mg/kg 당량의 C-펩티드를 내포)의 25G 바늘을 거쳐 단일 S.C. 주사가 제공되었다.

[0685] 3 그룹은 0.015 mL/kg의 용량에서 0.4 mg/mL 폐길화된 C-펩티드 (0.0003 mg/kg 당량의 C-펩티드를 내포)의 25G 바늘을 거쳐 단일 S.C. 주사가 제공되었다.

[0686] 개는 정맥천자에 의해 방혈되고, 그리고 혈액 샘플은 Day 0 (투약전, 30분, 1시간, 3시간, 그리고 6시간) 및

Day 1, 2, 3, 4, 7, 10, 그리고 14에 수집되었다. 혈장 샘플은 혈액의 원심분리 (10분 동안 3,000 rpm)후 획득되고 분석 때까지 -80℃에서 보관되었다. 우수 실험실 관리기준 (Good Laboratory Practice, GLP) 능력을 갖는 CRO (MicroConstants, Inc.; San Diego, CA)가 생물분석 작업을 수행하였다. C-펩티드의 혈장 수준은 폐길화된 C-펩티드 품질 제어 표준을 이용하여, 인간 C-펩티드 결정을 위한 상업적 키트 (Merckodia; 카탈로그 번호 10-1136-01)에 기초된 효소-결합 면역흡착 측정법 (ELISA) 기술에 의해 측정되었다. 결과는 C-펩티드 농도로서 표시되었다. PK 분석을 위해, 정량 미만 수준 (below quantitation level, BQL)은 0으로서 처리되고, 그리고 명목 시점 (nominal 시점)이 모든 계산에 이용되었다. PK 파라미터는 WinNonlin Professional 5.2.1 (Pharsight Corp., Mountain View, CA)에서 모델 200을 이용하여 각 동물에 대한 개별 혈장 농도-시간 데이터에 기초된 표준 모델 독립적 방법에 의해 결정되었다.

[0687] 결과: 모든 동물은 연구의 지속 기간 동안 생존하였다. 각 치료는 임상적 비정상의 부재에 기초하여 충분히 용인되었다. 개에서 폐길화된 C-펩티드의 단일 S.C. 용량 이후에, C-펩티드  $C_{max}$ ,  $AUC_{(0-t)}$ , 그리고 반감기 ( $T_{1/2}$ ) 값에 대한 평균  $\pm$  SD는 하기 표 E3에 제공된다. 선형과 반-대수 눈금에서 C-펩티드 혈장 농도-시간 프로필에 대한 상응하는 평균  $\pm$  SD는 각각, 도 8A와 도 8B에 제공된다. C-펩티드  $C_{max}$ 와  $AUC_{(0-t)}$  값에 대한 평균  $\pm$  SD는 각각, 도 9A와 도 9B에 제공된다.

[0688] [표 E3]

표 E3 폐길화된 C-펩티드 (40 kDa PEG)의 단일 S.C. 용량 이후에, 개에서 C-펩티드의 약물동력학적 파라미터						
	폐길화된 C-펩티드 용량 (mg/kg 당량의 C-펩티드)					
	0.005		0.00125		0.0003	
	평균	SD	평균	SD	평균	SD
$C_{max}$ (ng/mL)	73.2	2.23	19.0	4.00	1.74	1.53
$AUC_{(0-t)}$ (ng·일/mL) <sup>a</sup>	470	84.3	91.9	8.86	4.17	3.94
$T_{1/2}$ (일)	2.44	0.599	1.93	0.530	1.76 <sup>c</sup>	ND
<sup>a</sup> $AUC_{(0-t)}$ 는 투약 직후에서부터 최종 측정가능 샘플링 시간까지 혈장 농도-시간 곡선 아래 면적이고, 그리고 선형 사다리꼴 공식에 의해 계산된다. <sup>b</sup> $T_{1/2}$ 는 $\ln(2)/\lambda$ 에 의해 계산된 종말 반감기이고, 여기서 $\lambda$ 는 종말 단계의 로그-선형 부분에 대한 제거 속도 상수를 나타낸다. <sup>c</sup> $n = 1$ 이고, 그리고 SD는 ND (결정되지 않음)이었다.						

[0689]

[0690] 요약하면, 개에서 40 kDa 폐길화된 C-펩티드의 단일 S.C. 증가하는 용량 이후에, C-펩티드의 노출은 유의미하게 증가된다. 개에서 두 번째와 세 번째 PK 연구로부터 결과는 40 kDa 가지형 사슬 폐길화된 C-펩티드가 20 kDa 선형 사슬 폐길화된 C-펩티드와 비교하여, 또는 변형되지 않은 C-펩티드 (개에서 일차 PK 연구)와 비교하여 유의미하게 향상된 PK 성질을 제공한다는 것을 확증한다. 게다가, 40 kDa 가지형 폐길화된 사슬은 조사된 용량에서 유의미한 부작용 효과를 전혀 나타내지 않았다.

[0691] 실시예 7: 단일 용량 s.c. 투여 이후에, Sprague Dawley 쥐에서 약물동력학.

[0692] 40 kDa 폐길화된 C-펩티드 (실시예 12)의 PK는 0.0413, 0.167, 그리고 0.664 mg/kg의 단일-용량 s.c. 투여 이후에, Sprague Dawley 쥐 (2/성별/그룹)에서 평가되었다. 혈액 샘플은 투여에 앞서 및 투여후 14일 동안 수집되었다. 혈장 샘플은 개 연구에 대해 앞서 기술된 바와 같이, ELISA 방법을 이용하여 폐길화된 C-펩티드에 대해 분석되었다. 개별 PK 파라미터는 "비-구획" 방법을 이용하여 추정되었다. 단일-용량 s.c. 투여 이후에, 평균

( $\pm$  SD) 혈장 농도-시간 프로파일은 도 10에 도시되고 상응하는 PK 파라미터는 표 E4에 요약된다.

[0693] [표 E4]

표 E4 단일-용량 피하 투여 이후에, Sprague Dawley 쥐에서 폐길화된 C-펩티드 약물동력학						
약물동력학 적 파라미터 <sup>a</sup>	CBX129801 용량, mg/kg					
	0.0413		0.167		0.664	
	평균	SD	평균	SD	평균	SD
T <sub>1/2</sub> , 일	1.3 5	0.18 6	1.27	0.10 9	1.27	0.17 5
T <sub>max</sub> , 일	1.0 0	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00
C <sub>max</sub> , nM	3.3 8	0.86 9	12.3	2.61	34.1	10.4
AUC <sub>(0-7)</sub> , nM•일	8.1 3	1.45	33.0	7.27	101	18.7
AUC <sub>(0-7)</sub> , ng•일/mL	374	66.6	1,520	334	4,660	862
AUC <sub>(0-t)</sub> , nM•일	8.1 3	1.45	33.9	8.31	107	19.6
AUC <sub>(0-t)</sub> , ng•일/mL	374	66.6	1,560	382	4,920	900
AUC <sub>(0-inf)</sub> , nM•일	8.4 8	1.43	34.6	7.88	108	19.4
AUC <sub>(0-inf)</sub> , ng•일/mL	390	65.7	1,590	362	4,950	893
CL/F, mL/일/kg	109	20.5	109	25.5	138	25.5
Vd/F, mL/kg	214	62.0	201	50.6	250	42.9
<sup>a</sup> 는 용어의 정의를 위한 약어의 목록 (표 A)를 지칭한다.						

[0694]

[0695] 실시예 8: 단일 용량 s.c. 투여 이후에, 필리핀 원숭이에서 약물동력학

[0696] 40 kDa 폐길화된 C-펩티드 (실시예 12)의 PK는 0.0827 mg/kg의 단일-용량 s.c. 투여 이후에, 필리핀 원숭이 (2/성별)에서 평가되었다. 혈액 샘플은 투여에 앞서 및 투여후 14일 동안 수집되었다. 혈장 샘플은 개 연구에 대해 앞서 기술된 바와 같이, ELISA 방법을 이용하여 CBX129801에 대해 분석되었다. 개별 PK 파라미터는 "비-구획" 방법을 이용하여 추정되었다. 단일-용량 s.c. 투여 이후에, 평균 ( $\pm$  SD) 혈장 농도-시간 프로파일은 도 11에 도시되고 상응하는 PK 파라미터는 표 E5에 요약된다.

[0697] [표 E5]

표 E5 0.0827 mg/kg 에서, 필리핀 원숭이에서 폐길화된 C-펩티드의 약물동력학적 파라미터		
약물동력학적 파라미터	평균	SD
$T_{max}$ , 일	2.00	0.816
$T_{1/2}$ , 일	5.44	2.05
$C_{max}$ , nM	13.2	1.32
$AUC_{(0-7)}$ , nM•일	67.5	7.01
$AUC_{(0-7)}$ , ng•일/mL	3,110	323
$AUC_{(0-14)}$ , nM•일	95.7	16.9
$AUC_{(0-14)}$ , ng•일/mL	4,400	770
$AUC_{(0-inf)}$ , nM•일	121	37.0
$AUC_{(0-inf)}$ , ng•일/mL	5,560	1,710
CL/F, mL/일/kg	16.0	4.90
Vd/F, mL/kg	115	10.0
<sup>a</sup> 는 용어의 정의를 위한 약어의 목록 (표 A)를 지칭한다.		

[0698]

[0699] 이들 결과는 피크 농도가 2일 이내에 발생한다는 것을 지시한다;  $T_{1/2}$ 는 ~ 5.4일이다. 이들 원숭이가 공복이 아니고, 그리고 검출 항체가 원숭이 C-펩티드와 교차-반응하기 때문에, 40 kDa 폐길화된 C-펩티드 (실시예 12)에 대한 결과는 내인성 C-펩티드 수준을 포함한다. 이런 이유로, 측정된 폐길화된 C-펩티드 수준이 더욱 낮은 후기 시점 (즉, Day 10과 14)에서, 내인성 원숭이 C-펩티드의 기여는 이들 결과를 혼란스럽게 할 수 있었다. Day 14 시점을 분석으로부터 제외하면,  $T_{1/2}$ 은 3.7일이다. 이들 단일-용량 PK 연구에 대한 요약에서, s.c. 투여 이후에, 피크 폐길화된 C-펩티드 혈장 농도는 일반적으로, 1 내지 5일 이내에 발생한다. AUC와  $C_{max}$ 는 용량이 증가함에 따라 증가하고, 그리고 일반적으로, 용량 비례한다.

[0700] 실시예 9: 변형되지 않은 C-펩티드로 반복-용량 약물동력학적 연구

[0701] 쥐에서 4주 및 필리핀 원숭이에서 13주 동안, 비-폐길화된 C-펩티드로 수행된 5가지 GLP 독성학 연구에서, C-펩티드는 이식된 삼투성 펌프를 거쳐 연속으로 s.c. 주입되었다. C-펩티드의 혈장 농도는 전체 연구 기간 동안 주기적으로 측정되고, 그리고 노출의 지속 기간에 걸쳐 정지-상태 농도 ( $C_{ss}$ )가 표 E6에 제시된 바와 같이 각 연구에 대해 결정되었다.



[0702] [표 E6]

표 E6 관찰된 효과 수준 없음에서 반복-용량 독성 연구 동안 변형되지 않은 C-펩티드 농도의 요약			
종	지속 기간	관찰된 효과 수준 없음	C-펩티드 C <sub>ss</sub> <sup>a</sup> (nM)
Sprague Dawley 쥐	14 일	2 mg/kg/일	27 <sup>b</sup>
Sprague Dawley 쥐	14 일	2 mg/kg/일	16 <sup>b</sup>
Sprague Dawley 쥐	4 주	0.5 mg/kg/일	4.2 <sup>c</sup>
필리핀 원숭이	14 일	2 mg/kg/일	84 <sup>b</sup>
필리핀 원숭이	13 주	3.6 mg/kg/일	40 <sup>d</sup>
<sup>a</sup> 연속 s.c. 주입에 의해 전달된 검사 물품. <sup>b</sup> Day 2, 10, 그리고 14 에서 C-펩티드 혈장 수준으로부터 추정된 평균 C <sub>ss</sub> . <sup>c</sup> Day 2, 14, 그리고 28 에서 C-펩티드 혈장 수준으로부터 추정된 평균 C <sub>ss</sub> . <sup>d</sup> Day 2, 28, 37/38, 56, 그리고 91 에서 C-펩티드 혈장 수준으로부터 추정된 평균 C <sub>ss</sub> .			

[0703]

[0704] 결론적으로, 이들 독성학 연구에서 투약의 지속 기간 내내 지속된 C-펩티드 수준이 관찰되었다.

[0705]

[0706] 실시예 10: 반복-용량 약물동력학적 연구

[0707] 40 kDa 폐길화된 C-펩티드 (실시예 12)의 PK는 쥐와 원숭이에서 복수 용량 투여 이후에 평가되었다. 이들 연구는 하기에 요약된다.

[0708] 28일 동안 반복-용량 피하 투여 (매주) 이후에, Sprague Dawley 쥐에서 약물동력학.

[0709] 방법: 40 kDa 폐길화된 C-펩티드 (실시예 12)의 PK는 5회 투약을 위한 2.74, 8.22, 그리고 27.4 mg/kg/주 (week)의 복수 용량 피하 투여 이후에, Sprague Dawley 쥐 (시점마다 3/성별/그룹)에서 평가되었다. 혈액 샘플은 일차 용량에 앞서 및 일차 용량 이후에 7일 동안 수집되었다. 트로프 혈액 샘플은 2차 내지 4차 용량후 수집되었다. 최종 용량 (5차 용량) 이후에, 혈액 샘플은 28일 동안 수집되었다. 혈장 샘플은 앞서 기술된 바와 같이, ELISA 방법을 이용하여 폐길화된 C-펩티드에 대해 분석되었다. PK 파라미터는 "비-구획" 방법 및 성별로 각 용량에 대한 평균 농도-시간 프로필을 이용하여 추정되었다.

[0710] 결과: 성별로 복수 용량 s.c. 투여 시에 평균 (± SD) 혈장 농도-시간 프로필은 도 12에 도시되고 상응하는 PK 파라미터는 표 E7에 요약된다. 용량 및 노출의 일차 파라미터 (AUC와 C<sub>max</sub>) 사이에 상관관계는 도 14에 도시된다.

[0711] [표 E7]

표 E7 28 일 동안 반복-용량 피하 투여 (매주) 이후에, Sprague Dawley 쥐에서 약물동력학적 특징의 요약						
성별	수컷			암컷		
용량, mg/kg/주(week)	2.74	8.22	27.4	2.74	8.22	27.4
일차-용량 파라미터 <sup>a</sup>						
C <sub>max</sub> , nM	156	440	1,540	412	564	2,210
T <sub>max</sub> , 일 <sup>b</sup>	1.00	1.00	2.00	3.00	1.00	1.00
T <sub>1/2</sub> , 일	1.52	1.49	1.62	1.47	1.26	1.46
AUC <sub>tau</sub> , nM•일	507	1,580	4,580	1,020	2,110	7,590
AUC <sub>inf</sub> , nM•일	539	1,690	4,950	1,060	2,190	8,050
CL/F, mL/일/kg	108	103	118	55.1	79.7	72.5
V <sub>d</sub> /F, mL/kg	237	222	275	117	145	153
C <sub>max</sub> 수컷/암컷 비율	0.379	0.780	0.697	-	-	-
AUC <sub>inf</sub> 수컷/암컷 비율	0.508	0.772	0.615	-	-	-
CL/F 수컷/암컷 비율	1.96	1.30	1.63	-	-	-
V <sub>d</sub> /F 수컷/암컷 비율	2.03	1.53	1.80	-	-	-
반복-용량 파라미터 <sup>a</sup>						
C <sub>max</sub> , nM	147	438	1,070	311	846	2,660
T <sub>max</sub> , 일 <sup>b</sup>	2.00	1.00	2.00	1.00	1.00	2.00
T <sub>1/2</sub> , 일	1.43	1.51	1.66	1.65	1.35	1.84
AUC <sub>tau</sub> , nM•일	524	1,710	4,150	1,090	3,000	9,590
CLss/F, mL/일/kg	111	102	141	53.6	58.3	60.9
V <sub>dss</sub> /F, mL/kg	230	223	337	128	114	161

[0712]

C <sub>max</sub> 수컷/암컷 비율	0.473	0.518	0.402	-	-	-
AUC <sub>tau</sub> 수컷/암컷 비율	0.481	0.570	0.433	-	-	-
CLss/F 수컷/암컷 비율	2.07	1.75	2.32	-	-	-
V <sub>dss</sub> /F 수컷/암컷 비율	1.80	1.96	2.09	-	-	-
반복/일차 용량 C <sub>max</sub> 비율	0.942	0.995	0.695	0.755	1.50	1.20
반복/일차 용량 AUC <sub>tau</sub> 비율	1.03	1.08	0.906	1.07	1.42	1.26
<sup>a</sup> 는 용어의 정의를 위한 약어의 목록 (표 A)을 지칭한다: <sup>b</sup> 는 중간값 (median)으로서 표시됨.						

[0713]

- [0714] 전체적으로, 이들 결과는 정상 상태가 Day 14 내지 Day 21까지 달성된다는 것을 달성된다는 것을 지시한다. 노출은 용량이 증가함에 따라 증가하였고 피크 혈장 농도는 Day 1과 Day 3 사이에 발생하였다. 일차와 최종 용량 이후에 AUC와  $C_{max}$ 는 일차 용량 이후에 것과 유사한 정상 상태에서 AUC로 평가된 범위에서 용량 비례하는 것으로 나타난다 (0.7 내지 1.5 범위의 AUC 정지-상태 대(對) 일차 용량 비율).  $T_{1/2}$ 는 이들 3회 용량을 교차하여, 그리고 일차와 최종 용량 이후에 유사한 것으로 나타난다 (~1.5일). 암컷에서 전신 노출은 수컷보다 ~2배 높다. 검출가능 약물 수준은 투약의 중단 이후에 28-일 회복 기간 동안 모든 용량에서 대략 2주 동안 지속되었고, 회복 기간의 종결 시점에서 약물은 1마리 수컷 (2.74 mg/kg/주(week)) 및 1마리 암컷 (8.22 mg/kg/주(week))을 제외하고, 검출되지 않았다. 항-약물 항체 (ADA) 측정법으로 최초 기술적 어려움으로 인하여, 결과는 항 폐길화된 C-펩티드 항체에 가용하지 않다. 높은 노출, 전반적으로 용량 비례한 결과, 그리고 폐길화된 C-펩티드로 최초와 최종 용량 사이에 일관된 클리어런스는 임의의 항체 형성이 노출에 유의미한 정도로 영향을 줄 가능성이 없다는 명제를 뒷받침한다.
- [0715] 28일 동안 반복-용량 피하 투여 (매주) 이후에, 필리핀 원숭이에서 약물동력학.
- [0716] 방법: 40 kDa 폐길화된 C-펩티드 (실시에 12)의 PK는 5회 투약을 위한 1.33, 4.0, 그리고 13.3 mg/kg/주(week)의 복수 용량 s.c. 투여 시에 필리핀 원숭이 (5/성별/그룹)에서 평가되었다. 혈액 샘플은 일차 용량에 앞서 및 일차 용량 이후에 7일 동안 수집되었다. 트로프 혈액 샘플은 2차 내지 4차 용량후 수집되었다. 최종 용량 (5차 용량) 이후에, 혈액 샘플은 28일 동안 수집되었다. 혈장 샘플은 앞서 기술된 바와 같이, ELISA 방법을 이용하여 폐길화된 C-펩티드에 대해 분석되었다. PK 파라미터는 "비-구획" 방법을 이용하여 추정되었다.
- [0717] 결과: 성별로 복수 용량 s.c. 투여 시에 평균 혈장 농도-시간 프로파일은 도 14에 도시되고 상응하는 PK 파라미터는 표 E8에 요약된다. 용량 및 노출의 일차 파라미터 (AUC와  $C_{max}$ ) 사이에 상관관계는 도 15에 도시된다.

[0718] [표 E8]

표 E8									
28 일 동안 반복-용량 피하 투여 (매주) 이후에, 필리핀 원숭이에서 약물동력학적 특징의 요약									
	수컷			암컷			통합된 성		
용량, mg/kg	1.33	4.0	13.3	1.33	4.0	13.3	1.33	4.0	13.3
일차-용량 파라미터 <sup>a</sup>									
C <sub>max</sub> , nM	250	881	2,780	252	877	2,400	251	879	2,590
T <sub>max</sub> , 일 <sup>b</sup>	2.00	1.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	1.50	2.00
T <sub>1/2</sub> , 일	4.67	3.30	2.85	3.33	3.53	2.63	4.00	3.42	2.74
AUC <sub>tau</sub> , nM•일	1,180	4,210	13,200	1,280	3,920	0	1,230	4,060	0
AUC <sub>inf</sub> , nM•일	1,920	5,770	17,700	1,800	5,410	0	1,860	5,590	0
CL/F, mL/일/kg	15.3	15.5	16.9	16.1	16.5	21.0	15.7	16.0	19.0
V <sub>d</sub> /F, mL/kg	101	72.7	68.0	77.4	81.7	79.8	89.0	77.2	73.9
C <sub>max</sub> M/F 비율	0.922	1.00	1.16	-	-	-	-	-	-
AUC <sub>tau</sub> M/F 비율	0.922	1.07	1.18	-	-	-	-	-	-
반복-용량 파라미터 <sup>a</sup>									
C <sub>max</sub> , nM	308	1,250	3,780	371	1,350	4,900	340	1,300	4,340
T <sub>max</sub> , 일 <sup>b</sup>	2.00	1.00	2.00	2.00	1.00	2.00	2.00	1.00	2.00
T <sub>1/2</sub> , 일	4.78	2.93	3.91	4.62	3.34	3.07	4.70	3.17	3.49
AUC <sub>tau</sub> , nM•일	1,650	5,610	0	0	0	0	1,750	5,810	0
AUC <sub>inf</sub> , nM•일	2,740	7,330	28,300	0	0	0	0	7,790	0
CL <sub>ss</sub> /F, mL/일/kg	18.3	15.7	15.8	15.9	14.7	13.6	17.1	15.2	14.7
V <sub>dss</sub> /F, mL/kg	121	67.8	86.0	110	71.4	61.0	116	69.6	73.5

[0719]

C <sub>max</sub> M/F 비율	0.830	0.926	0.771	-	-	-	-	-	-
AUC <sub>tau</sub> M/F 비율	0.887	0.935	0.869	-	-	-	-	-	-
반복/일차 용량 C <sub>max</sub> 비율	1.23	1.42	1.36	1.47	1.54	2.04	1.35	1.48	1.68
반복/일차 용량 AUC <sub>tau</sub> 비율	1.40	1.33	1.41	1.45	1.53	1.91	1.42	1.43	1.64
<sup>a</sup> 는 용어의 정의를 위한 약어의 목록 (표 A)를 지칭한다; <sup>b</sup> 는 중관값 (median)으로서 표시됨.									

[0720]

[0721] 전체적으로, 이들 결과는 정상 상태가 대략 Day 14까지 달성된다는 것을 달성된다는 것을 지시한다. 노출은 용량이 증가함에 따라 증가하였고 피크 혈장 농도는 Day 1과 Day 2 사이에 발생하였다. 일차와 최종 용량 이후에 AUC와 C<sub>max</sub>는 일차 용량 이후에 관찰된 것보다 대략 30% 내지 90% 높은 정상 상태에서 AUC<sub>tau</sub>로 평가된 범위에서 용량 비례하는 것으로 나타난다. T<sub>1/2</sub>는 이들 3회 용량을 교차하여, 그리고 일차와 최종 용량 이후에 유사한 것

으로 나타난다 (~3일). 암컷에서 전신 노출은 수컷에서 관찰된 것과 유사하였다. 검출가능 약물 수준은 투약의 중단 이후에 회복 용량 (4.0과 13.3 mg/kg/주(week)) 둘 모두에서 지속하였다; 하지만, 폐길화된 C-펩티드의 혈장 농도는 시간의 흐름에서 눈에 띄게 감소하였고, 그리고 회복 기간의 종결 시점까지 모든 용량에서 훨씬 낮았다 (정량의 하한선의 대략 2-3배). 회복 기간의 종결 시점에서, 더욱 낮은 2가지 용량에서 온전한 ADA 반응 및 높은 용량에서 강한 반응이 있었다; 하지만, 유의미한 약물 수준이 투약 내내 및 투약의 완결후 상당 기간 존재했기 때문에, 항체의 존재는 폐길화된 C-펩티드에 원숭이의 노출에 유의미한 영향을 주지 않았다.

[0722] 실시예 11: STZ 유도된 당뇨병 쥐에서 신경 전도 속도 (NCV)에 대한 효과.

[0723] 당뇨병 쥐에서 신경 전도 속도에 대한 폐길화된 C-펩티드의 효과를 평가하기 위해, 40 kDa 가지형 PEG (실시예 12))가 STZ 유도된 당뇨병 쥐에 8주 동안 투여되었다. 결과는 변형되지 않은 인간 C-펩티드, 실시예 1에서 기술된 바와 같이 동일한 40 kDa 가지형 PEG에 커플링된 폐길화된 쥐 C-펩티드, 그리고 변형되지 않은 쥐 C-펩티드에 대한 것들과 비교되었다.

[0724] 프로토콜과 방법: 스트렙토조토신 (STZ)은 1 ml의 STZ의 50 mg/mL 표준 용액의 주사에 의해 50 mg/kg의 용량으로 I.V. 투여되었다. Sprague Dawley 수컷 쥐는 Harlan로부터 구입되었다. 쥐는 대략 400 g의 평균 체중을 가졌고, 표준 사료가 (TD2014) 사육되고, 그리고 옥수수 속대 깔짚 (corn cob bedding)이 있는 표준 고정 바닥 8-인치 깊이 플라스틱에서 개별적으로 사육되었다. 동물은 연구의 지속 기간 동안, 정상적인 12시간 명, 12시간 암 밝음 주기 및 72 ± 8°F의 평균 온도와 30% - 70%의 상대 습도에서 사육되었다. 동물은 표 E9에 열거된 용량과 체제에 따라, 8주 기간 동안 투약되었다.

[0725] [표 E9]

표 E9 투약 프로토콜의 요약								
그룹	화합물	STZ 용량	용량	용량 체적	루트	빈도	동물 수	동물 번호
		50 mg/kg	mg/kg	ml/kg				
1	운반제	아니오	0	1	SC	1/wk* *	5	1-5
2	운반제	예	0	1	SC	1/wk* *	10	6-15
3	폐길화된 인간 C- 펩티드	예	1	1	SC	1/wk* *	10	16-25
4	폐길화된 인간 C- 펩티드	예	3	1	SC	1/wk* *	10	26-35
5	변형되지 않은 인간 C-펩티드	예	1.5*	펌프	펌프	2 회	10	36-45
6	변형되지 않은 쥐 C- 펩티드	예	0.3*	펌프	펌프	2 회	10	46-55
7	폐길화된 쥐 C-펩티드	예	0.3	1	SC	1/wk* *	10	56-65
							총 동물	65
* 24 시간 마다; ** 투약의 첫 주 동안 2/주 (week)								

[0726]

[0727] 각 동물에 투여된 각 약물의 요구되는 용량은 가장 최근 체중에 기초하여 계산되었다. 무균 인산염-완충된 염수가 운반제로서 이용되었다.

[0728] 전치료 단계 연구 시행: 치료를 시작하기에 앞서, 동물은 임의의 비정상, 통증 또는 고통의 징후를 확인하기 위해 관찰되었고, 그리고 기록된 임의의 조사 결과는 관찰될 때, 임상 수의사와 논의되었다. 체중은 STZ 치료 (Day 1)에 앞서, 치료 그룹으로 무작위화 시점에, Day 7과 11, 그리고 그 이후 주 1회 측정되었다. 식품 중량 (Food Weight)은 STZ (Day 1) 이전, 치료 그룹으로 무작위화 시점에, 그리고 Day 7과 11, 그리고 그 이후 주 1회 측정되었다. 동물은 C-펩티드 (<0.4 nM), 전혈당 값 (400-600 mg/dL) 및 체중 값에 기초하여 치료 단계에 대

해 무작위화되었다 (표 E5를 참고한다). 무작위화는 B.R.A.T. (block randomization allocation tool)를 이용하여 달성되었다. 피하 펌프 이식물 (Alzet 펌프 모델 2ML4)은 Day 10과 Day 39에 외과적으로 이식되었다.

[0729] 치료 단계 연구 시행: 혈액은 무작위화를 위한 Day 3, Day 7, Day 11, 그리고 그 이후 주 1회, 글루코오스 및/또는 C-펩티드에 대한 꼬리 방혈에 의해 수집되었다. 동물은 STZ 주사에 앞서 6시간 동안 굶겨지고, 모든 글루코오스 평가에 앞서 3시간 동안 굶겨지고, 그리고 나머지 연구 기간 동안 자유롭게 사양되었다 (표 E10을 참고한다).

[0730] [표 E10]

표 E10 연구 일정		
평일	Day	과제
월요일	~ -7	동물 도착
월요일	1	6 시간 공복. 신체와 식품 중량. STZ (Zanosar)의 IV 투여
수요일	3	혈액 수집에 앞서 3 시간 공복 (6:00 am). 신체와 식품 중량. 혈당측정기를 이용하여 이종으로 전혈당 평가 및 EDTA 혈장 C-펩티드 분석을 위한 꼬리 방혈 (9:00 am)
일요일	7	혈액 수집에 앞서 3 시간 공복 (6:00 am). 신체와 식품 중량. 혈당측정기를 이용하여 이종으로 전혈당 평가 및 EDTA 혈장 C-펩티드 분석을 위한 꼬리 방혈 (9:00 am)
월요일	8	치료 그룹으로 무작위화 (am). 기준선 NCV 측정 (pm)
화요일	9	기준선 NCV 측정
수요일	10	펌프의 이식 및 주 2회 SC 투약 (8:00 am) 시작
목요일	11	혈액 수집에 앞서 3 시간 공복 (6:00 am). 신체와 식품 중량. 혈당측정기를 이용하여 이종으로 전혈당 평가 및 EDTA 혈장 C-펩티드 분석을 위한 꼬리 방혈 (9:00 am) (그룹 3, 4 와 7. Day 12 에서, 첫 5 마리 동물은 투약후 24 시간 시점에 방혈되고, 두 번째 5 마리는 투약후 48 시간 시점에 방혈될 것이다)
금요일	12	그룹 3, 4 와 7로부터 두 번째 5 마리 동물에서 EDTA 혈장에 대한 혈액 수집 - 투약후 48 시간 시점에 수집.
토요일	13	SC 투약 (8:00 am)
수요일	17	혈액 수집에 앞서 3 시간 공복 (6:00 am). 신체와 식품 중량. SC 투약 (8:00 am). 혈당측정기를 이용하여 이종으로 전혈당 평가 및 EDTA 혈장 C-펩티드 분석을 위한 꼬리 방혈 (9:00 am)
수요일	24	혈액 수집에 앞서 3 시간 공복 (6:00 am). 신체와 식품 중량. SC 투약 (8:00 am). 혈당측정기를 이용하여 이종으로 전혈당 평가 및 EDTA 혈장 C-펩티드 분석을 위한 꼬리 방혈 (9:00 am) (그룹 3, 4 와 7. 첫 5 마리 동물은 투약후 24 시간 시점에 방혈되고, 두 번째 5 마리는 투약후 48 시간 시점에 방혈될 것이다)
목요일	25	그룹 3, 4 와 7로부터 첫 5 마리 동물에서 EDTA 혈장에 대한 혈액 수집 - 투약후 24 시간 시점에 수집.
금요일	26	그룹 3, 4 와 7로부터 두 번째 5 마리 동물에서 EDTA 혈장에 대한 혈액 수집 - 투약후 48 시간 시점에 수집.
토요일	27	SC 투약 (8:00 am)

[0731]



수요일	31	혈액 수집에 앞서 3 시간 공복 (6:00 am). 신체와 식품 중량. SC 투약 (8:00 am). 혈당측정기를 이용하여 이종으로 전혈당 평가를 위한 꼬리 방혈 (9:00 am).
토요일	34	SC 투약 (8:00 am)
월요일	36	혈액 수집에 앞서 3 시간 공복 (6:00 am). 신체와 식품 중량. SC 투약 (8:00 am). 혈당측정기를 이용하여 이종으로 전혈당 평가 및 EDTA 혈장 C-펩티드 분석을 위한 꼬리 방혈 (9:00 am)
화요일	37	NCV 측정
수요일	38	SC 투약 (8:00 am), NCV 측정
목요일	39	이전 펌프를 제거하고 새로운 펌프를 이식.
토요일	41	SC 투약 (8:00 am)
수요일	45	혈액 수집에 앞서 3 시간 공복 (6:00 am). 신체와 식품 중량. SC 투약 (8:00 am). 혈당측정기를 이용하여 이종으로 전혈당 평가를 위한 꼬리 방혈 (9:00 am)
토요일	48	SC 투약 (8:00 am)
수요일	52	혈액 수집에 앞서 3 시간 공복 (6:00 am). 신체와 식품 중량. SC 투약 (8:00 am). 혈당측정기를 이용하여 이종으로 전혈당 평가를 위한 꼬리 방혈 (9:00 am)
토요일	55	SC 투약 (8:00 am)
수요일	59	혈액 수집에 앞서 3 시간 공복 (6:00 am). 신체와 식품 중량. SC 투약 (8:00 am). 혈당측정기를 이용하여 이종으로 전혈당 평가를 위한 꼬리 방혈 (9:00 am)
토요일	62	SC 투약 (8:00 am)
월요일	64	NCV 측정
화요일	65	NCV 측정
수요일	66	혈액 수집에 앞서 3 시간 공복 (6:00 am). 신체와 식품 중량. SC 투약 (8:00 am). 혈당측정기를 이용하여 이종으로 전혈당 평가 및 EDTA 혈장 C-펩티드 분석을 위한 꼬리 방혈 (9:00 am). 오후에 신장 부검.

[0732]

[0733] 전기생리학적 중점: 손가락 신경 활동 전위는 발목에서, 외측과 뒤에 위치한 활성 기록 전극 (active recording electrode), 그리고 뒷발가락 (hindpaw)의 두 번째 발가락의 기부에서 위치한 자극 캐소드 (stimulating cathode)로 기록되었다. 속도는 자극 캐소드와 활성 전극 사이에 거리를 최초 탈분극 전류 (initial depolarizing current)의 절대 잠복 시간 (absolute onset latency)으로 나눔으로써 계산되었다.

[0734] 미부 신경 활동 전위는 꼬리에서 헤어 라인 (hair line) 아래 10 mm (시각적으로 결정됨) 위치한 활성 기록 전극, 그리고 60-70 mm 더욱 원위에 위치한 자극 캐소드로 기록되었다. 속도는 자극 캐소드와 활성 전극 사이에 거리를 최초 탈분극 전류 (initial depolarizing current)의 절대 잠복 시간 (absolute onset latency)으로 나눔으로써 계산되었다.

[0735] 경골 운동 전도는 뒷발가락의 내재성 근육 (intrinsic muscle) 내에 위치한 활성 전극, 그리고 발목 인근에, 외측과 뒤에 위치한 자극 캐소드로 기록되었다.

[0736] 동물의 준비: 모든 기록 세션 동안, 동물은 이소푸루란으로 마취되고 엎드린 자세 (prone position)로 배치되었다. 호흡과 온도는 전기생리학적 기록 절차 동안 모니터링되었다.

[0737] 전극: 활성 전극, 참고 전극 및 접지 전극의 배치는 각 양상 (modality)에 맞춤되고, 그리고 각 개체에서 골 지표 (bony landmark)에 대하여 위치되었다. 대략 50 kohms @ 1,000 Hz의 임피던스 (impedance)를 갖는 백금 바늘 전극 (Grass-Telefactor, Co.)은 모든 PNS 기록을 위한 활성과 참고 리드 둘 모두로서 이용되었다.

[0738] 온도 제어: 직장 온도는 전체 기록 세션 동안 35.5와 38.0°C 사이에 지속되었다.

[0739] 데이터 처리: 신경전기 신호는 단위 이득 전증폭기 (unity gain preamplifier)를 이용하여 임피던스 대응되고, 다중-폴 여과기를 이용하여 적절하게 대역-통과되고, 그리고 0.5-50K의 이득 계수 (gain factor)을 이용하여 더

욱 차별적으로 증폭되었다. 여과기 설정은 각 양상에 대해 조정되었다. 공통 모드 제거 (common-mode rejection) 수준 및 이득 계수 (gain factor)는 60 Hz 간섭을 최소화하고, 그리고 각 기록 시리즈 (recording series)에 대한 신호-대-잡음비를 최적화하기 위해 조정되었다. 증폭된 신호는 유발 자극 (evoking stimulus)에 시간-잠금 (time-lock)되고, 선별된 채널 내로 다중 송신되고, 그리고 샘플링 (sampling)된 최대 주파수 (frequency)보다 5배 이상의 비율로 디지털화되었다. 데이터는 잡파 (artifact) (미리 결정된 제거 수준 - 디지털화된 원도우의 80%를 이용)에 대해 스캐닝 (scanning)되고, 그리고 연구 중인 양상에 적절한 획기적 사건에 대해 디지털 방식으로 평균화되었다. 각 평균에 포함된 스위프 (sweep)의 숫자는 신호-대-잡음비 (signal-to-noise ratio)을 최적화하고, 그리고 잠복 시간과 피크 진폭 적도 둘 모두의 정확한 평가를 용이하게 하기 위해 각 적도에 대해 조정되었다.

[0740] 데이터의 스코어링: 모든 전기생리학적 데이터는 신호의 최적화 이후에 스코어링되었다. 잠복 시간은 자극 잡파 (stimulus artifact)에서부터 최인점 0.01 msec로 탈분극의 개시까지 측정되었다; 진폭은 기준선에서부터 감각 반응의 경우에 최인점 0.01  $\mu$ V로, 그리고 운동 반응의 경우에 최인점 0.01 mV로 탈분극의 피크까지 측정되었다. 모든 측정은 디지털화된 자취 (digitized trace)를 추적하는 내부 컴퓨터 커서 (internal computer cursor)로 수행되었다. 모든 파동 형태는 디지털 방식으로 저장되고 추가 오프-라인 분석에 가용하였다.

[0741] 보정: 증폭기와 여과기는 전기생리학적 기록의 각일에 현장에서 보정되었다.

[0742] 종말 단계 연구 시행: 동물은 CO<sub>2</sub> 흡입에 의해 마취되고, 그 이후에 특정한 시점에서 심장 천자 (cardiac puncture)가 수행되었다.

[0743] 결과: 신경 전도 속도 (NCV)의 기준선 측정

[0744] 첫 번째 NCV 평가는 STZ의 투여후 8-9일 시점에, 그리고 고혈당증의 존재가 그룹 2-4 (상기 표 E4를 참고한다)에서 각 쥐에서 확증된 이후에 발생하였다. 운반제 또는 폐경화된 인간 C-펩티드의 투여 이전인 상기 시점 (즉, 기준선)에서, STZ-유도된 말초 다발성신경병증의 명확하고 유의미한 증거가 관찰되었다. 기준선 평가에서, 최대 미부 NCV는 연령-대응된 대조 그룹에서 조사 결과와 비교하여 각 STZ-치료된 그룹에서 10 m/sec (대략 18%)보다 약간 더 감소하였다 (도 16A). 상기 시점에서, 최대 손가락 NCV는 3-4 m/sec 감소하고 (도 17A), 그리고 경골 원위 잠복 (distal latency)은 대략 동일한 10% 값으로 연장되었다 (느려진 속도와 일치함).

[0745] 신경 전도 속도 (NCV)의 4주 측정.

[0746] 도 16B와 17B에서는 운반제 단독, 또는 1.0 또는 3.0 mg/kg/주(week)에서 폐경화된 인간 C-펩티드의 4-주 기간 (기준선으로부터) 투여후 4가지 그룹 각각에서 미부와 손가락 NCV를 도시한다. 이러한 4-주 기간 동안, 2 그룹에서 1마리 쥐, 3 그룹에서 5마리 쥐 및 4 그룹에서 1마리 쥐가 폐사하였다. 도 16A와 17A에서 기준선 값은 개체의 동일한 부분집합 전역에서 비교를 유지하기 위해 이들 없어진 쥐로부터 데이터를 제외하였다.

[0747] 대조 그룹에서 NCV는 조사된 4-주 기간에 걸쳐 미부와 손가락 신경 둘 모두에 대해 상대적으로 일정하게 유지되었다 (도 18). 하지만, 예측된 바와 같이, 미부와 손가락 신경 둘 모두에서 속도는 STZ-단독 그룹에서 지속적으로 감소하였다. 순수하게 감각 원위 손가락 신경의 경우에, 최초 4-주 치료 기간에 걸쳐 대략 3 m/sec (10%)의 추가적인 느려짐이 관찰되었다 (도 18). NCV의 지속된 느려짐은 고혈당증과 내인성 C-펩티드 결핍을 유발하고, 결과로써 변화된 막통과 전류 (transmembrane current), 결절에서 미세-환경의 변화, 축삭 위축 (axonal atrophy), 그리고 궁극적으로 월러 변성 (Wallerian degeneration)을 초래하는 체장 베타 세포의 STZ-유도된 파괴로 인한 원위 신경에 진행성 손상과 일치한다.

[0748] 경골 운동 반응의 절대 잠복은 모든 그룹에서 4주 평가에서 약간 더 길었고, 이것은 지속된 동물 성장을 반영하지만, 본 연구의 최초 4주의 진전 동안 이러한 적도로부터 그룹간 (across group) 차이가 거의 또는 전혀 없었다 (데이터는 제시되지 않음).

[0749] NCV는 기준선으로부터 4-주 기간에 걸쳐 폐경화된 인간 C-펩티드로 공동-치료된 각 그룹에서 생존자의 경우에, STZ 단독 그룹에서 조사 결과와 비교하여 더욱 느린 비율로 감소하였다 (도 18). 하지만, 4-주 시점에서, 이들 효과는 미약하였다.

[0750] 신경 전도 속도 (NCV)의 8주 측정

[0751] 도 16C와 17C에서는 8주 시점에서 4가지 그룹 각각에서 미부와 손가락 NCV를 도시한다. 연구 기간에 걸쳐, 혼성

미부 신경에 대한 대조 그룹에서 NCV는 기준선 값으로부터 대략 4 m/sec (7%) 증가하였다 (도 19). 이러한 변화는 미엘린과 축삭 횡단면 직경 (cross-sectional diameter)에서 상세히 기록된 지속적인 출산후 (post-natal) 증가와 일치한다. 임의의 그룹에서 어떤 추가의 동물도 기준선 평가후 4주와 8주 사이에 폐사하지 않았다. 기준선으로부터 8-주 기간에 걸쳐 대조 그룹에서 손가락 신경에 대한 NCV에서 변화가 상대적으로 거의 없었다 (도 18과 19). 대조적으로, STZ 단독 그룹 (2 그룹)에서 NCV는 이 기간에 걸쳐 지속적으로 저하되었다. 이러한 진행성 악화는 고혈당증 및 내인성 C-펩티드 생산의 부족에 의해 유도된 지속된 손상과 일치한다. 8주까지, STZ-단독 그룹에서 손가락 NCV는 기준선으로부터 >4 m/sec (14%), 그리고 연령-대응된 대조 그룹에서 값으로부터 20% 이상 하락하였다. 대조적으로, 손가락 신경 NCV는 폐길화된 인간 C-펩티드로 공동-치료된 그룹에서 8주 연구 기간에 걸쳐 안정되거나 (3 그룹), 또는 실질적으로 향상되었다 (4 그룹) (도 18).

[0752] 표 E11과 E12에서는 각각, 기준선에서부터 8-주 평가 시점까지 손가락과 미부 NCV에서 변화 퍼센트를 개설했다.

[표 E11]

표 E11 손가락 NCV에서 변화 퍼센트				
손가락 신경 NCV (m/sec)				
	기준선	4주	8주	기준선에서부터 8주까지의 변화
대조 (STZ 없음)	34.4	34.0	32.9	- 4.4%
운반제 대조(폐길화된 C-펩티드 없음)	30.5	27.3	26.2	-14.1%
폐길화된 인간 C-펩티드 (1 mg / kg /주 (week))	29.7	28.8	29.8	+0.3%
폐길화된 인간 C-펩티드 ( 3 mg/kg /주 (week))	28.6	27.8	30.1	+5.2%

[표 E12]

표 E12 미부 NCV에서 변화 퍼센트				
미부 신경 NCV (m/sec)				
	기준선	4주	8주	기준선에서부터 8주까지의 변화
대조 (STZ 없음)	53.0	52.9	56.8	+7.2
운반제 대조 (폐길화된 C- 펩티드 없음)	41.1	40.3	42.1	+2.4
폐길화된 인간 C-펩티드 (1 mg / kg /주 (week))	42.1	43.2	46.1	+9.5
폐길화된 인간 C-펩티드(3 mg/kg /주 (week))	43.8	44.3	46.1	+5.3

[0757] 결론: 연령-대응된 대조 그룹과 비교하여 STZ로 치료된 그룹 (그룹 2-4)에서 손가락과 미부 NCV 둘 모두의 실질적인 느려짐이 나타났다 (1 그룹). 이들 효과는 기준선, STZ의 투여후 8-9일, 하지만 폐길화된 C-펩티드의 공동-투여 이전에 명백하였다.

[0758] NCV의 진행성 느려짐은 STZ 단독으로 치료된 그룹에서 8주 연구 기간에 걸쳐 손가락 신경에 대해 상세히 기록되었다. 1.0 또는 3.0 mg/kg/주(week)에서 폐길화된 C-펩티드의 공동-투여는 이러한 지속된 악화를 예방하였다. 3.0 mg/kg/주(week)의 폐길화된 C-펩티드로 공동-치료된 그룹에서, STZ-유도된 신경병증 이후에 8주 기간 동안 손가락 신경 NCV의 심지어 약간의 향상이 관찰되었다.

[0759] 본 연구로부터 결과는 조사된 기간에 걸쳐, 폐길화된 C-펩티드로 공동-치료는 STZ 단독에 의해 유도된 신경병증에 대한 신경보호 (neuroprotection)를 제공한다는 것을 명백하게 암시한다. 이러한 효과는 순수한 감각 손가락 신경에서 특히 명백하였다. 부분적으로 개체의 초기 상실로 인하여, 본 연구는 폐길화된 C-펩티드의 편익에서 용량-관련된 차이에 단지 초기 통찰을 제공할 뿐이지만, 손가락 데이터에서 암시는 고용량 그룹에 대한 약간 더 많은 편익을 뒷받침한다.

[0760] 미부 신경 데이터는 STZ 치료의 실질적으로 부정적인 영향을 증명하였는데, 이것은 그룹 2-4에서 기준선에서 명백하였다. 8주 연구 기간 동안 미부 NCV에서 느려짐의 추가적인 증거는 없었다. 하지만, 대조 그룹에서 추세와 비슷한, 폐결화된 C-펩티드로 공동-치료된 두 그룹의 경우에서 속도가 향상되었다 (표 E12). 그룹 3과 4에서 향상은 STZ 단독 그룹에서 관찰된 것보다 컸다. 4주의 경우에서처럼, 그룹간 경골 운동 반응에서 변화가 거의 없다 (데이터 제시되지 않음).

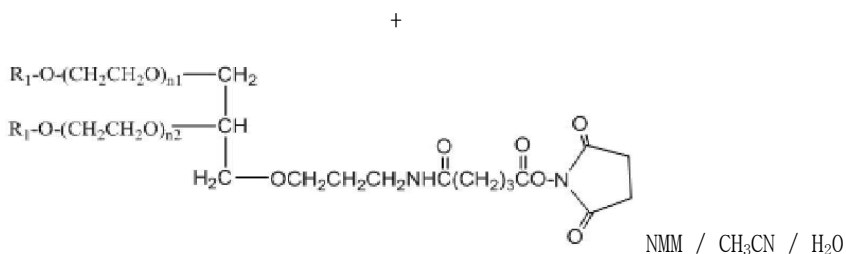
[0761] 이들 결과는 고유 C-펩티드의 생물학적 활성이 상기 펩티드가 폐길화될 때 유지된다는 것을 증명하고, 이것은 순환 반감기를 연장하고, 따라서 대체 투약의 빈도를 줄인다. 저-용량, 그리고 고-용량 폐길화된 인간 C-펩티드, 그리고 폐길화된 쥐 C-펩티드 그룹에서 3번째 주에서 투약후 2일 시점에 평가된 평균 최대 혈장 농도는 각각, 대략 129 nM, 431 nM, 그리고 12 nM이었다 (데이터 제시되지 않음). 연구의 종결 시점에서 평균 최소 혈장 농도는 저-용량과 고-용량 폐길화된 인간 C-펩티드, 그리고 폐길화된 쥐 C-펩티드 그룹에서 각각, 대략 22 nM, 94 nM, 그리고 2 nM이었다. 폐길화된 인간 C-펩티드는 변형되지 않은 C-펩티드의 유익한 생물학적 성질을 유지하고, 그리고 당뇨병의 장기 합병증의 치료와 예방 둘 모두에 효과적인 것으로 결론된다. 특히, 이들 현재의 실험은 인간 폐길화된 C-펩티드가 당뇨병과 연관된 신경병증의 치료에 효과적이라는 것을 확립한다.

[0762] 실시예 12: 폐결화된 C-펩티드의 GMP 배치 (batch) 제조

[0763] 개요

[0764] 인간 C-펩티드 (EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ) (서열 번호 1)

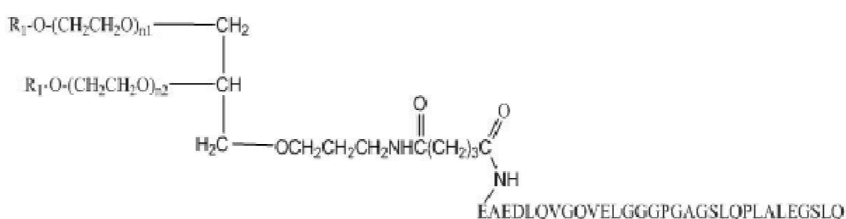
[0765]



[0766]

[0767]                        ↓                        1. 정제 / 탈염 / 이온 교환  
크로마토그래피 / 탈염

[0768] 2. 동결 건조



[0769]



[0770]

[0771] 폐길화: 인간 폐길화된 C-펩티드의 합성은 *N*-메틸 모르폴린의 존재에서 인간 C-펩티드 (나트륨 염)의 *N*-말단을 가지형, 대략 40 kDa-NHS 에스테르 PEG 유도체 (SUNBRIGHT GL2-400GS2 (NOF Corporation)와 커플링함으로써 단일 단계에서 수행되었다.

[0772] SUNBRIGHT GL2-400GS2 (115 g)는 먼저, 600mL의 (50/50) 아세토니트릴/물의 용액에서 용해된다. 결과의 용액은 교반되고 175 mL의 아세토니트릴/물의 용액에서 인간 C-펩티드 (7.9g)를 내포하는 다른 용액으로 채워지고, 그 이후에 1.2 mL의 *N*-메틸 모르폴린 (NMM)이 첨가되었다. NMM의 첨가는 ~1hr 간격에서 여러 번 반복되었고, 반응의 진행은 각 첨가에 앞서 HPLC에 의해 모니터링되었다. 이러한 과정은 약 8 내지 10회 반복되고, 이후 반응물은 약 8 내지 12시간 동안 하룻밤 교반되었다. 결과의 반응 혼합물은 일단 반응이 HPLC 분석에 의해 완결된 것으로 확증되면, 정제 단계로 이행되었다. 전형적으로, 이러한 과정 동안 여러 서브-로트 (sub-lot)가 준비되고, 이후 하기에 기술된 바와 같이 정제를 위해 합동되었다.

[0773] 예비 역상 크로마토그래피에 의한 가공되지 않은 폐길화된 C-펩티드의 정제

[0774] 가공되지 않은 폐길화된 C-펩티드 용액은 0.1% TFA/물에서 6 부피로 희석되었다. pH는  $\leq 3$ 의 pH로 조정되고, 그리고 역상 실리카 (Diasogel C-18, 15  $\mu$ m, 300 Angstrom)를 이용한 예비 HPLC에 의해 정제되었다. 흡착된 폐길화된 C-펩티드는 희석된 수성 TFA에서 아세토니트릴의 농도구배를 적용함으로써 칼럼으로부터 용리되었다 (완충액 A는 0.1% TFA이고, 완충액 B는 100% ACN이다: 5분 동안 0 내지 25% B, 이후 100분 동안 25% 내지 50% B, 그 이후 산물이 용리될 때까지 유지). 용리액은 230 nm에서 UV에 의해 모니터링되었다. 순도  $\geq 90$ , NSI  $>6.0\%$ 을 갖는 분획물은 모아진다. 순도  $>70\%$ 을 갖는 분획물은 재활용될 수도 있다.

[0775] 예비 역상 크로마토그래피에 의한 폐길화된 C-펩티드의 탈염과 정제

[0776] 앞선 단계에서 획득된 합동된 순수한 분획물은 탈염되고, 그리고 역상 실리카를 이용한 예비 HPLC에 의해 정제되었다. 칼럼은 희석된 수성 TFA, 그 이후에 희석된 수성 암모늄 아세테이트로 세척되었다. 폐길화된 C-펩티드는 이후, 희석된 수성 AcOH에서 아세토니트릴의 농도구배 (완충액 A는 2% 아세트산이고, 완충액 B는 100% ACN이다: 5분 동안 0 내지 25% B, 이후 75분 동안 25% 내지 50% B, 그 이후 산물이 용리될 때까지 유지)를 적용함으로써 칼럼으로부터 용리되었다. 용리액은 230 nm에서 UV에 의해 모니터링되었다. 크로마토그래피로부터 획득된 순수한 분획물은 모아지고 (순도  $\geq 95\%$ , NSI  $>3.0\%$ ) 동결 건조되었다. 순도  $>80\%$ 을 갖는 분획물은 추가 정제를 위해 재활용될 수도 있다.

[0777] 예비 HPLC에 의한 폐길화된 C-펩티드의 이온 교환 정제

[0778] 앞선 단계로부터 가공되지 않은 동결 건조된 폐길화된 인간 C-펩티드 (~180g)는 5% 아세토니트릴/물에 용해되고 이온 교환 칼럼 (DEAE52 셀룰로오스)에 적용되었다. 상기 칼럼은 이후, ~50L의 물로 세척되고, 그리고 산물은 ~40L의 염화나트륨 (1M)/암모늄 아세테이트 (1M)의 수성 용액으로 칼럼으로부터 용리되었다. 용리액은 230 nm에서 UV에 의해 모니터링되었다. 크로마토그래피로부터 획득된 순수한 분획물은 모아지고 ( $\geq 92\%$  순도; 단일 불순물 없음 (NSI)  $>4\%$ ) 탈염/정제 단계로 이행되었다. 순도  $>80\%$ 을 갖는 분획물은 재활용될 수도 있다.

[0779] 예비 역상 크로마토그래피에 의한 CBX129801의 탈염과 정제

[0780] 이온 교환 크로마토그래피 단계로부터 순수한 분획물은 동부피의 물로 희석되고 예비 HPLC 칼럼 (실리카)에 적용되었다. 상기 칼럼은 이후, 희석된 2% 아세트산 (1BV)으로 세척되고, 그리고 산물은 희석된 아세트산에서 아세토니트릴의 용액으로 용리되었다 (완충액 A는 2% 아세트산이고, 완충액 B는 100% ACN이다: 5분 동안 0 내지 25% B, 이후 50분 동안 25% 내지 50% B, 그 이후 산물이 용리될 때까지 유지). 용리액은 230 nm에서 UV에 의해 모니터링되었다. 크로마토그래피로부터 획득된 순수한 분획물 (순도  $\geq 95\%$ , NSI  $>3.0\%$ )은 모아지고 동결 건조되었다. 순도  $>80\%$ 을 갖는 분획물은 재활용될 수도 있다.

[0781] 페길화된 C-펩티드의 동결 건조

[0782] 앞선 정제로부터 산물은 2% 수성 아세트산에서 약 15-20 g/L의 농도로 재구성되고 동결 건조되어 유리 산으로서 순수한 페길화된 C-펩티드 약물 물질이 제공되었다.

[0783] 실시예 13: 페길화된 C-펩티드의 생물물리학적 특징

[0784] UV 검출과 함께 RP-HPLC에 의한 측정에서 99.5%의 순도를 갖는, 상기 실시예 12에서 기술된 바와 같이 제조된 페길화된 C-펩티드의 배치 (batch)가 달리 명시되지 않으면, 하기에 기술된 분석 조사에 이용되었다. 수행된 구조적 연구는 표 E13에 열거된다. 모든 분석은 약물 물질의 화학 구조를 확증한다.

[0785] [표 E13]

표 E13 수행된 구조적 검사	
검사	분석 기술
분자 질량	MALDI-TOF MS
정체	FT-IR
개별 아미노산의 정체와 비율	DS 에 대한 아미노산 분석
개별 아미노산의 정체와 키랄성	키랄 아미노산 분석
아미노산의 분자 질량과 서열 (FI 단계에서 수행됨)	CID-MS/MS
펩티드 맵핑 (페길화된 펩티드에서 서열을 확인하기 위해)	키모트립신 절단, 그 이후에, 단편의 HPLC 와 MS/MS 분석
반대 이온의 부재	이온 크로마토그래피, RP-HPLC, ICP-MS

[0786]

[0787] 앞서 기술된 구조 석명 시험에 더하여, 추가적인 특성화 연구가 상기 실시예 12에서 기술된 페길화된 C-펩티드에서 수행되었고, 그리고 이들 추가의 연구는 표 E14에 열거된다.

[0788] MS에 의한 분자 질량: 약물 물질의 분자 질량을 확인하기 위해 매트릭스 보조 레이저 탈착 이온화 비행시간 (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight, MALDI-TOF)이 이용되었다. 샘플은 넓은 단일-하전된 유사분자 이온 클러스터 (pseudomolecular ion cluster)가 대략 m/z 45743에서 집중적으로 관찰되는 양 이온 MALDI-TOF 질량 스펙트럼을 제공하였다.

[0789] 푸리에 변환 적외분광법 (FT-IR): C-펩티드, PEG 시약, 그리고 페길화된 C-펩티드의 FT-IR 스펙트럼은 TGS 검출기 및 ATR 부속물에 적재된 단일-산란 (single-bounce) ZnSe 결정이 구비된 Jasco 4200 FT-IR 분광계에서 수집되었다. 고형 샘플은 Teflon rod로 Zn Se 결정에 대해 압박되었다. 잔류 수분 피크 (residual moisture peak)는 스펙트럼으로부터 제외되었다. 결과는 도 20과 도 21에 도시된다 (확대된 영역). 페길화된 C-펩티드의 스펙트럼은 PEG 시약의 스펙트럼과 매우 유사하다. 펩티드 대(對) PEG의 질량비 (mass ratio)를 고려하면, 이것은 놀라운 것이 아니다.

[0790] 하지만, 도 21에서 도시된 바와 같이 아마이드 I 영역에서 약간의 차이가 나타난다. 구체적으로, 페길화된 C-펩티드의 아마이드 I 띠는 1627과 1653  $\text{cm}^{-1}$ 에서 2개의 피크를 보이는 반면, 유리 C-펩티드의 스펙트럼은 1634  $\text{cm}^{-1}$ 에서 단지 하나의 넓은 아마이드 I 띠 피크를 보인다. 1630  $\text{cm}^{-1}$  인근에 아마이드 I 띠는  $\beta$ -시트 구조 또는  $\beta$ -턴과 정상적으로 연관되는 반면, 1650  $\text{cm}^{-1}$  인근에 아마이드 I 띠는  $\alpha$ -나선 구조, 불규칙 구조, 또는 무작위 코일 구조에 정상적으로 지정된다. 1653  $\text{cm}^{-1}$ 에서 흡광도의 상황은 C-펩티드와 비교하여 페길화된 펩티드에 대한 더욱 무작위 구조와 일치한다.

[0791] 아마이드 I 영역에서 차이가 아마이드 기와 용매 물 사이에 수소 결합 (hydrogen bonding)에서 차이에 기인하는 지



를 조사하기 위하여, FT-IR 스펙트럼은 도 22와 도 23에 도시된 바와 같이 D<sub>2</sub>O에서 수집되었다. D<sub>2</sub>O 스펙트럼의 수집을 위해, D<sub>2</sub>O 용액에서 샘플은 6  $\mu$ m 스페이서 (spacer)를 갖는 2개의 CaF<sub>2</sub> 윈도우 사이에 배치되었다.

[0792] D<sub>2</sub>O에서 폐길화된 C-펩티드의 FT-IR 스펙트럼은 최소 아마이드 II 띠 강도 (1566 cm<sup>-1</sup>에서)를 보여주고, 이것은 모든 아마이드 기가 H-D 교환을 겪는다는 것을 지시한다. H-D 교환 시에, 아마이드 II 띠는 1566에서 1465 cm<sup>-1</sup>로 이동된다 (아מיד II' 띠가 된다). 유리 C-펩티드에 대한 아마이드 II 강도는 D<sub>2</sub>O에서 더욱 높은 농도 (~25 mg/mL) 및 더욱 낮은 농도 (~12.5 mg/mL) 둘 모두에서 존속하는데, 이것은 일부 교환되지 않은 아마이드 기를 지시한다. 교환되지 않은 아마이드 기는 아마도, 베타-턴 내에 분자내 수소 결합 (intra-molecular hydrogen bond) 또는 높은 농도에서 펩티드 올리고머 (집합체) 사이에 형성된 분자간 수소 결합 (inter-molecular hydrogen bond)에 의해 보호된다. D<sub>2</sub>O에서 폐길화된 C-펩티드의 경우에, 효과적 C-펩티드 농도는 C-펩티드 대(對) 40 kDa PEG의 낮은 질량비로 인하여 훨씬 낮다.

[0793] 하지만, 두 번째 유도체 FT-IR 스펙트럼 (도 23에 도시됨)으로부터 확인할 수 있는 바와 같이, C-펩티드의 고농도 샘플 (~25 mg/mL)에 대한 아마이드 I' 띠는 1639 cm<sup>-1</sup>에서 주요 피크 및 1645 cm<sup>-1</sup>에서 어깨를 보이는 반면, 저 농도 샘플 (~12.5 mg/mL)은 1639 cm<sup>-1</sup>과 1645 cm<sup>-1</sup> 둘 모두에서 주요 피크를 보인다. 이것은 아마이드 I' 영역에서 차이가 농도 관련될 수 있다는 것을 지시한다. 폐길화된 C-펩티드의 스펙트럼과 비교하여, 유리 C-펩티드의 스펙트럼은 1635-1640 cm<sup>-1</sup> 인근에서 더욱 높은 강도를 보이는데, 이것은 유리 C-펩티드에서 더욱 많은  $\beta$ -턴 구조를 지시한다. 주목할 점은 신호 대 잡음이 더욱 낮은 농도의 평가를 제외하고, C-펩티드 샘플의 더욱 희석된 샘플에서 불량하다는 것이다.

[0794] 아미노산 분석에 의한 개별 아미노산의 정체와 비율: 구성 아미노산의 정체와 정확한 비율을 담보하기 위해, 실시예 12에서 제조된 폐길화된 C-펩티드에서 아미노산 분석이 수행되었다. 이러한 방법은 강산에서 펩티드를 가수분해시키고, 이온-교환 칼럼에서 아미노산을 분리시키고, 그리고 최종적으로, 닐하이드린 유도체화 (ninhydrin derivatization)후 용리액을 검출하는 것을 수반한다. 본 연구의 결과는 표 E14에 제시된다. 아미노산 분석으로부터 결과는 실험 오차 (experimental error) 내에서 폐길화된 C-펩티드에서 아미노산의 정체와 이론적 상대적 발생률을 확증한다.

[0795] [표 E14]

표 E14: 아미노산 분석의 결과		
아미노산	이론적 상대적 발생률	관찰된 상대적 발생률
Asp	1	1.1
Pro	2	2.1
Ser	2	2.2
Glx*	8	6.9
Gly	7	7.3
Ala	3	3.0
Val	2	2.0
Leu	6	6.5
주의: *Glx = Gln + Glu로부터 결과.		

[0796]

[0797] GC에 의한 개별 아미노산의 정체와 키랄성: 실시예 12의 키랄 아미노산 분석은 구성 아미노산 잔기의 키랄 정체를 조사하기 위해 수행되었다. 펩티드는 중수소화된 용매 (DCI/D<sub>2</sub>O)에서 가수분해되고, N(O,S)-플루오르아세틸 아미노산 에스테르로서 유도체화되고, 그리고 각 아미노산 거울상이성질체를 결정하기 위해 GC-MS로 분석되었다. GC는 Chirasil-Val로 코팅된 비활성화된 유리 모세관 (glass capillary)을 이용하여 수행되었다. 담체 가스는 수소이었다. 결과는 표 E15에 제시된다. 획득된 값은 실시예 12의 폐길화된 C-펩티드의 구조를 구

성하는 아미노산에 대해 예측된 키랄성을 확증한다.

[표 E15]

표 E15: 키랄 아미노산 분석의 결과	
아미노산	L-아미노산의 함량 (%)
Asp	> 99.9
Pro	99.86
Ser	99.51
Glx	> 99.9
Ala	99.9
Val	> 99.9
Leu	99.89

MS/MS에 의한 아미노산의 서열: PEG의 큰 크기와 다분산성 (polydispersity)을 고려할 때, MS/MS에 의한 염기서열 분석 (sequencing)은 최종 중간 단계에서 수행된다. 실시예 12의 폐길화된 C-펩티드의 아미노산 서열은 본래의 샘플 분자가 이러한 과정에 산출된 산물 이온 스펙트럼으로부터 구조적 정보를 얻을 의도로 고의적으로 파편화되는 기술인 CID (충돌 유도 분리, Collision Induced Dissociation)를 이용한 MS/MS를 수행함으로써 조사되었다.

MS/MS 스펙트럼에서 관찰된 단편 이온 (fragment ion)의 유형은 일차 서열, 내부 에너지 (internal energy)의 양, 에너지 도입 방법, 전하 상태 등을 비롯한 많은 인자에 좌우된다. 단편 이온에 대한 인정된 명명법은 Roepstorff and Fohlman [*Biomedical Spectrometry*, 1984, 11(11): 601]에 의해 최초로 제안되었고, 그리고 Johnson *et al.* [*Annals of Chemistry*, 1987, 59(21): 2621-2625]에 의해 차후에 변형되었다.

단편은 그들이 적어도 하나의 전하를 운반하면 검출될 것이다. 이러한 전하가 N-말단 단편 상에 유지되면, 이온은 *a*, *b*, 또는 *c*로 분류된다. 전하가 C-말단 상에 유지되면, 이온 유형은 *x*, *y*, 또는 *z*이다. 첨자는 단편 내의 잔기의 숫자를 지시한다.

전하를 보유하는 양성자(들) 이외에, *c* 이온과 *y* 이온은 전구체 펩티드로부터 추가의 양성자를 제거한다. 따라서 6개의 단일-하전된 연속 이온이 가능하다. 이들 구조는 단일 전하-보유 양성자를 포함한다는 점에 주목한다. 전기분무 이온화 (electrospray ionization)에서, 펩티드는 일반적으로, 2개 또는 그 이상의 전하를 보유하고, 따라서 단편 이온은 하나 이상의 양성자를 보유할 수 있다.

예측된, 복수-하전된 *b*와 *y* 및 단편 이온은 Croker *et al.* [*Journal of Biomolecular Techniques*, 2000, volume 11, issue 3, 135-141]에 의해 개발된 컴퓨터 프로그램을 이용하여 계산되었다. 결과는 표 E16과 E17에 제시된다. 단편화 및 MS/MS와 MS/MS/MS에 의한 서열 분석은 실시예 12 최종 중간물질의 폐길화된 C-펩티드의 제안된 일차 서열을 확증하였다.

[0805] [표 E16]

표 E16							
MS 단편화와 서열 분석의 요약							
서열	N-말단 이온 시리즈						
실시에 12	Pos.	예측된 b <sup>1+</sup>	관찰된 m/z	예측된 b <sup>2+</sup>	관찰된 m/z	예측된 b <sup>3+</sup>	관찰된 m/z
Glu	b1	130.1	-	65.5	-	44	-
Ala	b2	201.1	201.1	101.1	-	67.7	-
Glu	b3	330.1	330.1	165.6	-	110.7	-
Asp	b4	445.2	445.1	223.1	-	149.1	-
Leu	b5	558.2	558.2	279.6	-	186.8	-
Gln	b6	686.3	686.2	343.7	-	229.4	-
Val	b7	785.4	785.3	393.2	-	262.5	-
Gly	b8	842.4	842.3	421.7	-	281.5	-
Gln	b9	970.5	970.4	485.7	-	324.2	-
Val	b10	1069.5	1069.5	535.3	-	357.2	-
Glu	b11	1198.6	1198.4	599.8	-	400.19	-
Leu	b12	1311.6	1311.6	656.3	-	437.9	-
Gly	b13	1368.7	1368.6	684.8	684.8	456.9	-
Gly	b14	1425.7	1425.6	713.4	713.3	475.9	-
Gly	b15	1482.7	1482.6	741.9	741.8	494.9	-
Pro	b16	1579.8	-	790.4	-	527.3	-
Gly	b17	1636.8	1636.8	818.9	818.8	546.3	-
Ala	b18	1707.8	1707.8	854.4	854.3	569.9	-
Gly	b19	1764.8	1764.9	882.9	882.8	589	-
Ser	b20	1851.9	1851.8	926.4	926.4	618	-
Leu	b21	1965	1964.9	983	982.9	655.7	-
Gln	b22	2093	-	1047	1046.9	698.3	-
Pro	b23	2190.1	-	1095.5	-	730.7	-
Leu	b24	2303.2	-	1152.1	1151	768.4	-
Ala	b25	2374.2	-	1187.6	1187.5	792.1	-
Leu	b26	2487.3	-	1244.1	1244.1	829.8	-
Glu	b27	2616.3	-	1308.7	1308.6	872.8	-
Gly	b28	2673.3	-	1337.2	1337.1	891.8	-
Ser	b29	2760.4	-	1380.7	1380.6	920.8	-
Leu	b30	2873.5	-	1437.2	1437.1	958.5	958.3
Gln	b31	3001.5	-	1501.3	1501.2	1001.2	-
OH	-	-	-	-	-	-	-

[0806]

[0807] [표 E17]

표 E17 MS 단편화와 서열 분석의 요약							
서열	C-말단 이온 시리즈						
실시예 12	Pos.	예측된 $y^{1+}$	관찰된 m/z	예측된 $y^{2+}$	관찰된 m/z	예측된 $y^{3+}$	관찰된 m/z
Glu	y31	3019.5	-	1510.3	1510.3	1007.2	1007.2
Ala	y30	2890.5	-	1445.7	-	964.2	-
Glu	y29	2819.4	-	1410.2	-	940.5	-
Asp	y28	2690.4	-	1345.7	1345.5	897.5	-
Leu	y27	2575.4	-	1288.2	1288.1	859.1	-
Gln	y26	2462.3	-	1231.7	1231.5	821.4	-
Val	y25	2334.2	-	1167.6	1167.5	778.8	-
Gly	y24	2235.2	-	1118.1	1117.9	745.7	-
Gln	y23	2178.1	-	1089.6	1089.4	726.7	-
Val	y22	2050.1	-	1025.5	-	684	-
Glu	y21	1951	1951	976	975.9	651	-
Leu	y20	1822	1821.9	911.5	911.4	908	-
Gly	y19	1708.9	1708.8	855	-	570.3	-
Gly	y18	1651.9	1651.9	826.4	826.4	551.3	-
Gly	y17	1594.8	1594.9	797.9	797.8	532.3	-
Pro	y16	1537.8	1537.8	769.4	769.3	513.3	-
Gly	y15	1440.8	-	720.9	-	480.9	-
Ala	y14	1383.8	1383.7	692.4	-	461.9	-
Gly	y13	1312.7	1312.6	656.9	-	438.2	-
Ser	y12	1255.7	1255.6	928.4	-	419.2	-
Leu	y11	1168.7	1168.6	584.8	-	390.2	-
Gln	y10	1055.6	1055.5	528.3	-	352.5	-
Pro	y9	927.5	927.5	464.3	-	309.8	-
Leu	y8	830.5	-	415.7	-	277.5	-
Ala	y7	717.4	717.3	359.2	-	239.8	-
Leu	y6	646.3	646.3	323.7	-	516.1	-
Glu	y5	533.3	533.2	267.1	-	178.4	-
Gly	y4	404.2	404.2	202.6	-	135.4	-
Ser	y3	347.2	347.2	174.1	-	116.4	-
Leu	y2	260.2	260.2	130.6	-	87.4	-
Gln	y1	147.1	-	-	-	49.7	-
OH	-	-	-	-	-	-	-

[0808]

[0809] 펩티드 맵핑: 펩티드 지도는 단백분해 효소 (proteolytic enzyme)로 단백질의 절단에 의해 산출된 단편화 패턴이다. 펩티드 단편의 패턴은 특정한 단백질의 특징이고, 그리고 구조를 확인하는데 이용될 수 있다. C-펩티드를 맵핑하기 위한 방법은 이전에 개발되었고, 그리고 4개의 단편이 질량 분석 (mass spectrometry)에 의해 확인되었다. 이들 4개의 단편은 도 24의 아래쪽 패널에서 도시된 바와 같이, 아미노산 25-31 (단편 A로서 표지됨), 13-24 (단편 B로서 표지됨), 1-12 (단편 C로서 표지됨), 그리고 1-24 (단편 D로서 표지됨)를 내포한다.

[0810] 나란히 비교 (side-by-side comparison)가 수행되었는데, 여기서 C-펩티드 (1 mg/mL) 및 폐길화된 C-펩티드 (10 mg/mL)가 25 mM 암모늄 비카보네이트 완충액에 용해되었다. 각 1 mL의 샘플에, 40  $\mu$ L의 0.25 mg/mL 키모트립신이 첨가되고, 그리고 이들 샘플은 37°C에서 4시간 동안 배양되었다. 절단은 포름산의 첨가에 의해 중단되고, 그리고 이들 샘플은 RP-HPLC에 의해 분석되었다. 결과는 도 24에 제시된다.

[0811] 폐길화된 C-펩티드에서 예측된 바와 같이, 단편 C (1-12)과 D (1-24)는 관찰되지 않았는데, 그 이유는 PEG 모이 어티가 N-말단에서 부착되기 때문이다. 단편 25-31과 13-24는 실시예 12의 폐길화된 C-펩티드에서 관찰되었다. 14분에서 피크가 절단되지 않은 폐길화된 C-펩티드인지를 조사하기 위해, 절단에 대한 시간 진전 연구가 27시간에 걸쳐 수행되었다. 어떤 추가의 단편도 획득되지 않았는데, 이것은 완결된 절단과 일치하였다. 이에 더하여, 절단되지 않은 폐길화된 C-펩티드와 절단된 폐길화된 C-펩티드의 50/50 혼합물은 임의의 분리가 달성될 수 있는지를 알아보기 위해 연장된 농도구배를 이용한 RP-HPLC에 의해 분석되었다; 하지만, 단지 단일 피크만 관찰되었다. 이런 이유로, 14분에서 피크는 실시예 12의 폐길화된 112와 1-24 단편 및 아마도 일부 본래의 폐길화된 C-펩티드를 내포하는 것으로 결론된다. 이들 단편을 분해하는 능력 없음은 예측된 것인데, 그 이유는 분자의 크로



마토그래피 행태 (chromatographic behavior)가 큰 PEG 모이어티에 의해 지배되기 때문이다.

- [0812] 반대이온의 부재: 탈염 절차후 반대 이온이 거의 또는 전혀 남아있지 않는 지를 확인하기 위해, 암모늄 함량은 이온 크로마토그래피 (IC)에 의해, 아세트산은 HPLC에 의해, 그리고 나트륨 함량은 ICP/MS에 의해 측정되었다.
- [0813] 암모늄 함량은 0.035% w/w인 것으로 결정되었고, 그리고 나트륨 함량은 규격 한계 (specification limit) 미만인 0.02% w/w인 것으로 밝혀졌다.
- [0814] 약물 물질 내에 반대이온의 수준은 몰 기초 (molar basis)에서 계산될 때 낮은 하지만, 최종 약물 물질에 암모니아 (0.9 몰 비율) 및/또는 나트륨 (0.4 몰 비율)의 다소의 연관을 지시할 수 있다.
- [0815] 분석 초원심분리에 의한 침강 속도 (sedimentation velocity): 폐길화된 C-펩티드에서 임의의 집합체의 균질성과 분포를 평가하기 위해, 분석 초원심분리기에서 침강 속도가 측정되었다. 이러한 기술을 이용하여, 집합체는 그들의 상이한 침강 계수 (sedimentation coefficient)의 기초에서 검출될 수 있다. 침강 속도는 단순한 물리적 원리에 기초된 절대 방법이다. 이의 보정은 길이와 시간의 기본 단위 (fundamental unit)에 기초되고, 기준으로서 표준 분자를 필요로 하지 않는다. 침강 계수는 분자 형상 및 분자 질량에 의존하고, 따라서 단위체 침강 계수가 알려져 있을 때에도 올리고머에 대한 침강 계수를 예측하는 것이 가능하지 않다.
- [0816] PBS 완충액에서 폐길화된 C-펩티드 로트 1008-134 (~0.6 mg/mL에서)에 대한 규준화된 침강 계수 분포는 도 25에 도시된다. 0.802 S에서 주요 피크는 98.1%인데, 이것은 샘플이 균질하다는 것을 지시한다. C-펩티드 (폐길화되지 않음)의 침강 계수는 이전에, ~0.4-0.5 S의 범위 내에 있는 것으로 결정되었다. 이 범위 내에서 어떤 신호도 검출되지 않았는데, 이것은 유리 C-펩티드가 없음을 지시하였다. 이에 더하여, 침강 계수는 40 kDa 가지형 PEG (0.82 S)와 일치한다.
- [0817] C-펩티드와 폐길화된 C-펩티드의 원편광 이색성 분석: 근거리 및 원거리 UV 원편광 이색성 (CD) 분석이 C-펩티드 및 폐길화된 C-펩티드에서 수행되었다. 샘플은 C-펩티드의 1 mg/mL에서 및 폐길화된 C-펩티드의 경우에 ~10.4 mg/mL (0.69 mg/mL의 C-펩티드에 상당함)에서 4.7% 소르비톨, pH 6.0을 내포하는 20 mM 인산염 완충액에서 용해되었다. 용매 제외된 스펙트럼은 펩티드 농도 (1 또는 0.69 mg/mL), 평균 잔기 무게 (97.4) 및 셀의 통로-길이 (path-length) (흡광도 측정의 경우에 1 cm 또는 CD의 경우에 0.02 cm)를 이용하여 평균 잔기 타원율 (mean residue ellipticity)로 전환되었다. 측정은 Jasco J-715 분광편광계 (spectropolarimeter)에서 수행되었다.
- [0818] 도 26에 도시된 바와 같이, UV 인접 영역에서 C-펩티드 (위쪽 라인)와 폐길화된 C-펩티드 (아래쪽 라인)의 평균 잔기 타원율은 양쪽 샘플에서 본질적으로 0인데, 그 이유는 방향족 기 및 이황화 결합이 없기 때문이다 (도 26의 위쪽 패널에 도시됨).
- [0819] C-펩티드와 폐길화된 C-펩티드의 원거리 UV CD 스펙트럼은 이차 구조가 상당히 무질서하다는 것을 보여준다.  $\alpha$ -나선에 전형적인 220과 208 nm에서 이중 최소점 (double minima) 및 역병렬  $\beta$ -시트에 전형적인 217 nm에서 벨리 (valley)가 없다.
- [0820] CD 분석은 농도에 대해 보정될 때, C-펩티드와 폐길화된 C-펩티드에 대한 거의 동일한 스펙트럼 형상을 보여준다 (도 26의 아래쪽 패널) (샘플 무게가 물 또는 염/용매에 대해 보정되지 않았기 때문에, 농도 추정치에서 일부 오차가 있다는 점에 주의한다). 이런 이유로, 폐길화는 펩티드의 이차 구조를 변화시키지 않는 것으로 결론될 수 있다.
- [0821] 크기 배제 크로마토그래피 (SEC): 실시예 12의 폐길화된 C-펩티드의 샘플 (20 mM 인산염 완충액에서 100  $\mu$ g, 4.7% 소르비톨, pH 6.0)은 도 27에 도시된 바와 같이 크기 배제 크로마토그래피에 의해 분석되었다.
- [0822] SEC 방법 정량화의 일부로서, 20 kDa 폐길화된 펩티드는 독립적으로 합성되고, 그리고 상기 방법이 크기에 기초하여 관련된 화합물을 구별할 수 있는 지를 증명하기 위해 SEC에 의해 분석되었다. 20 kDa 폐길화된 C-펩티드 (100  $\mu$ g 하중에서 양쪽 샘플, 동일한 완충액 시스템에서)의 크로마토그램과 실시예 12의 폐길화된 C-펩티드의 오버레이는 도 28에 도시된다. 도 28에서 확인할 수 있는 바와 같이, 더욱 낮은 분자량의 피크는 SEC 칼럼으로부터 후기에 용리한다. 주요 피크 이전에 피크의 부재는 실시예 12의 폐길화된 C-펩티드 내에 더욱 높은 분자량 종류가 감지가 가능한 수준으로 존재하지 않는다는 것을 지시한다. 유사하게, 주요 피크 이후에 피크의 부재는 더욱 낮은 분자량 종류가 감지가 가능한 수준으로 존재하지 않는다는 것을 지시한다.
- [0823] SDS-PAGE: 겔 전기영동은 4-12% 트리스-글리신 겔을 이용하여 수행되었다. 분자량 표준 (Blue Plus2, Prestained Standards, Invitrogen)이 도 29에 전시된 바와 같이 레인 2와 10에 적용되었다. 2  $\mu$ g 내지 10  $\mu$ g

범위에서 상이한 양의 폐길화된 C-펩티드가 레인 4, 6, 그리고 8에서 겔에 적용되었다. 64-98 kDa 사이에 단일한 강한 띠는 Coomassie 염색에 의해 가시화되었다. PEG의 유체역학적 반경 (hydrodynamic radius)은 단백질 마커의 분자량에 기초하여 예측된 크기보다 큰 것으로 알려져 있다. 이런 이유로, 이러한 결과는 예측되지 않은 것이다. SDS-PAGE 결과는 또한, 다른 더욱 높은 분자량 불순물의 부재를 증명한다.

[0824] 활성 프로파일링: 폐길화된 C-펩티드의 샘플은 폐길화된 산물이 표지되지 않은 펩티드의 활성을 유지한다는 것을 확증하기 위해, 인증된 표지되지 않은 C-펩티드와 비교되었다.

[0825] 방법: 인간 신장 (HK2) 세포는 (비-코팅된) 96 웰 (b1/c1) 평판에서 20,000개 세포 / 웰의 밀도로 접종되고 48 시간 동안 배양되었다. 실험 당일에, HK2 세포는 세척되고 DMEM+0.5% BSA에서 1시간 동안 기아 배양되었다. 세포는 1 nM (최종 농도)에서 5분 동안 10개 복제물로 처리되었다. C-펩티드 PEG GMP (로트# 1-FIN-0988, C-펩티드 PEG Tox (1007-119), C-펩티드 PEG Tox (1008-090), 변형되지 않은 C-펩티드 (209400-3) 및 C-펩티드 PEG 기준 (1008-134)은 동등한 부피로 첨가되었다. 평판은 1000 rpm에서 5분 동안 회전되었다. 총 처리 시간은 7-10 분이었다. 처리 직후에, 세포는 2% (최종) 파라포름알데히드로 고정되고 얼음같이 차가운 메탄올로 투과되었다. 세포는 이후, 항-pERK 항체로 처리되고, 그리고 평판은 표준 프로토콜에 따라, IF + 티라미드 증폭을 이용하여 처리되었다.

[0826] 결과: 도 30에 도시된 결과는 폐길화된 C-펩티드가 폐길화되지 않은 산물의 활성을 유지하고, 그리고 이러한 활성이 C-펩티드의 여러 상이한 로트를 교차하여 일치한다는 것을 증명한다.

[0827] 실시예 14: 약제 개발

[0828] 폐길화된 C-펩티드 (실시예 1)가 수성 용액으로서 조제되기 때문에, 제제의 성과에 영향을 줄 수 있는 핵심 물리화학적 성질은 약물 물질의 용해도, pH, 이온 강도 (ionic strength), 그리고 긴장 (tonicity)이다. 이들 인자 모두 폐길화된 C-펩티드의 PEG 부분의 안정성에 영향을 줄 수 있고 여기에서 평가된다.

[0829] 20 mg/mL에서, 약물 물질은 제제 완충액에서 용해도 한계 (최대 100 mg/mL)보다 훨씬 낮다. 약물 물질과 양립하는 부형제는 하기에 기술된 바와 같은 산물의 안정성을 최적화하도록 선택된다. 약물 산물에서 이용된 부형제는 인산나트륨 (일염기성과 이염기성), 소르비톨, 수산화나트륨, 그리고 주사용 증류수이다. 모든 부형제는 공정서 부형제이고, 그리고 USP에서 개설된 기준을 충족한다. 부형제의 선택 및 그들의 수준은 본 실시예에서 기술된다.

[0830] 완충액 선택: 인산염 완충액은 최초 평가 동안 선택되었는데, 그 이유는 이것이 제약학적 제조물에서 통상적으로 이용되고 생리 pH에서 우수한 완충 능력 (buffering capacity)을 갖기 때문이다. pH 스크리닝 연구는 ~1 mg/mL의 폐길화된 C-펩티드 (실시예 12)를 변하는 pH (6.0, 6.5, 7.0, 그리고 7.5)에서 10 mM 인산나트륨 완충액에 용해시킴으로써 수행되었다. 샘플은 40°C에서 9일 동안 보관되고, 이후 RP-HPLC에 의해 분석되었다. 모든 샘플은 유의미하게 분해되었는데 (~40% 또는 그 이상), 이것은 펩티드-PEG 접합체의 PEG 성분의 분해와 일치하였다. 이에 더하여, 모든 제제의 pH는 0.7-1.0 pH 단위로 하향되었는데, 이것은 완충 능력이 불충분하는 것을 지시하였다. 그럼에도 불구하고, 더욱 낮은 pH에서 증가된 안정성으로 명백한 추세가 관찰될 수 있었다. 다시 말하면, pH 6.0에서 시작하는 제제가 각각, 6.5, 7.0, 그리고 7.5보다 선호되었다. 이런 이유로, 6.0의 표적 pH가 선택되었다.

[0831] 긴장제 (tonicity Agent): 긴장제 (염수 또는 소르비톨)를 선택하기 위해 두 번째 제제 연구가 수행되었다. 염수 (0.9%) 또는 소르비톨 (4.7%)의 농도는 약물 산물 용액을 등장성으로 만들기 위해 선택되었다. 폐길화된 C-펩티드 (실시예 1) (1 mg/mL)는 염수 (0.9%) 또는 소르비톨 (4.7%)을 포함하는 20 mM 인산나트륨 완충액에 용해되었다. pH는 6.0으로 조정되었다. 샘플은 5°C와 40°C에서 보관되었다. 이들 제제의 안정성은 긴장제의 첨가에 의해 크게 향상되었다 (데이터 제시되지 않음). 40°C에서 4주후, 양쪽 긴장제는 ~2-3%의 구역-순도%에서 하락으로 동등한 결과를 제공하였다. 40°C에서 12주후, 소르비톨-내포 제제는 ~72%의 구역-순도%에서 하락 (PEG 분해에 상응)을 보인 염수-내포 제제와 비교하여, ~7%의 구역-순도%에서 하락으로 명백하게 우월하였다. 5°C에서, 12주후 어떤 제제에서도 분해가 거의 내지 전혀 관찰되지 않았다. 가속화된 안정성 결과에 기초하여, 소르비톨이 긴장제로서 선택되었다.

[0832] 이온 강도: 제제의 안정성에 대한 이온 강도의 영향을 평가하기 위해 세 번째 제제 연구가 수행되었다. 폐길화된 C-펩티드 (실시예 12)의 용액은 4.7% 소르비톨을 내포하는 10, 20, 그리고 50 mM의 인산염 완충액에서 ~20



mg/mL로 제조되고 pH 6.0으로 조정되었다. 샘플은 5℃와 40℃에서 보관되었다. 결과는 표 E18에 요약된다.

[0833] [표 E18]

표 E18 완충액 농도의 함수로서 폐결화된 C-펩티드 (실시에 12) 의 안정성									
완충액 농도	최초			5°C 에서 3 개월			40°C 에서 3 개월		
	함량 (mg/m L)	순도 (%)	pH	함량 (mg/m L)	순도 (%)	pH	함량 (mg/m L)	순도 (%)	pH
10 mM	22.3	99.4	5.9	21.4	99.3	6.0	8.1	40.3	4. 1
20 mM	21.4	99.8	6.0	21.3	99.4	6.1	4.0	22.3	4. 0
50 mM	22.1	99.9	6.1	21.1	99.6	6.2	4.2	21.8	4. 9

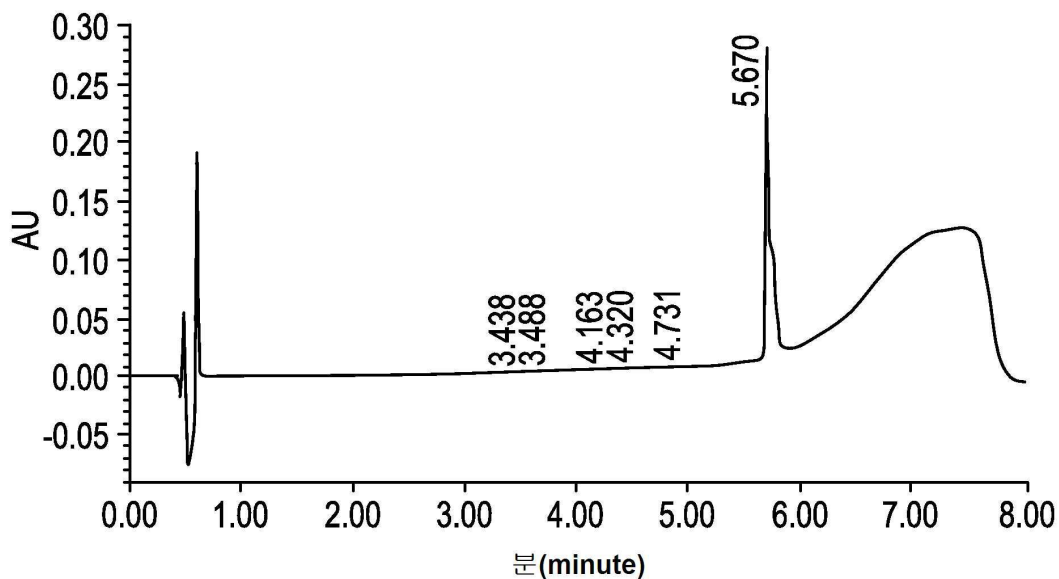
[0834]

[0835] 5℃에서, 모든 제제는 3개월후 유사한 것으로 보였다. pH 함량 또는 구역-순도%에서 감지가능한 변화는 없었다. 40℃에서, 모든 제제에 대한 pH, 순도, 그리고 함량에서 감소가 나타났다. 최고의 결과는 10 mM 인산염 농도에 서 획득되었는데, 이것은 높은 이온 강도가 안정성에 부정적인 영향을 줄 수 있다는 것을 지시하였다. 이런 이 유로, 10 mM 인산염이 완충액 농축으로서 선택되었다.

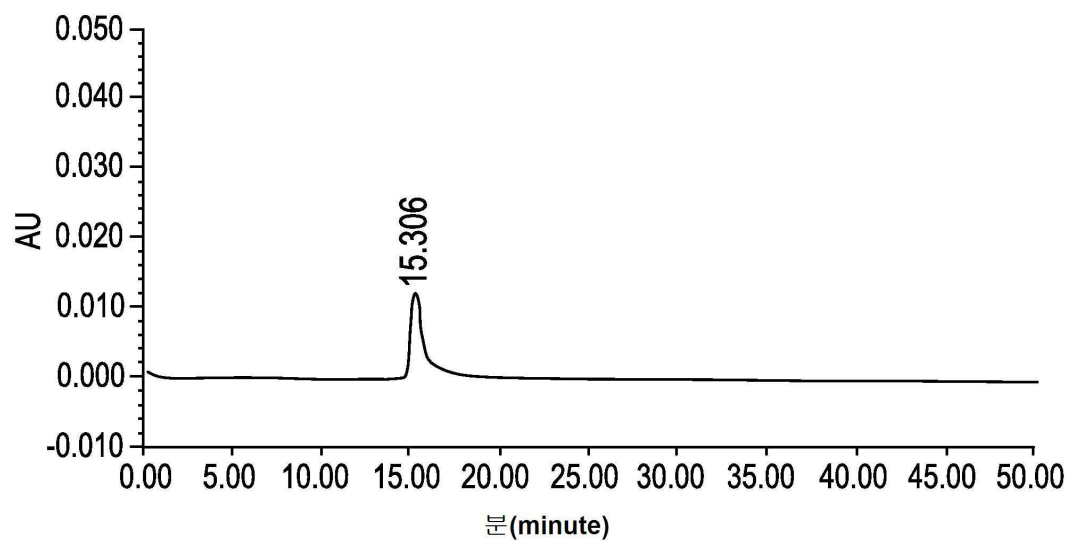
[0836] 상기한 설명으로부터, 당업자는 본 발명의 본질적 특징을 쉽게 확인할 수 있고, 그리고 본 발명의 기술적 사상 과 범위로부터 벗어남 없이, 다양한 용법과 조건에 적합되도록 본 발명의 다양한 개변을 만들 수 있다.

도면

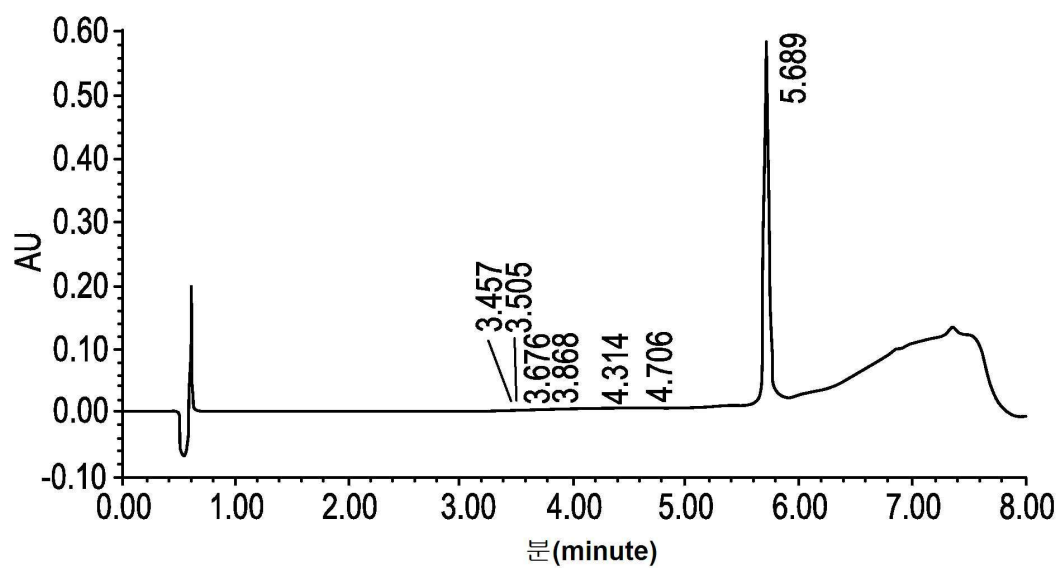
도면1



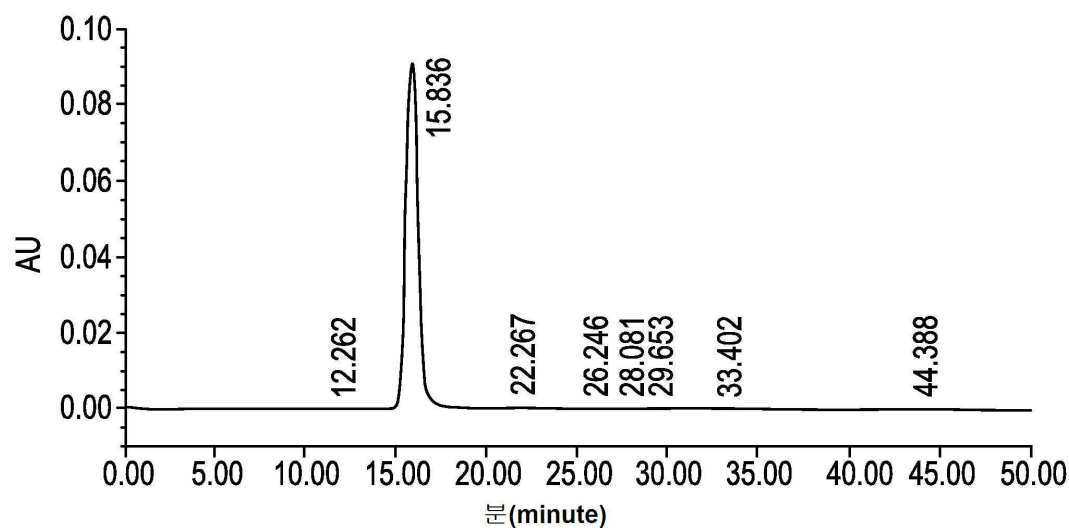
도면2



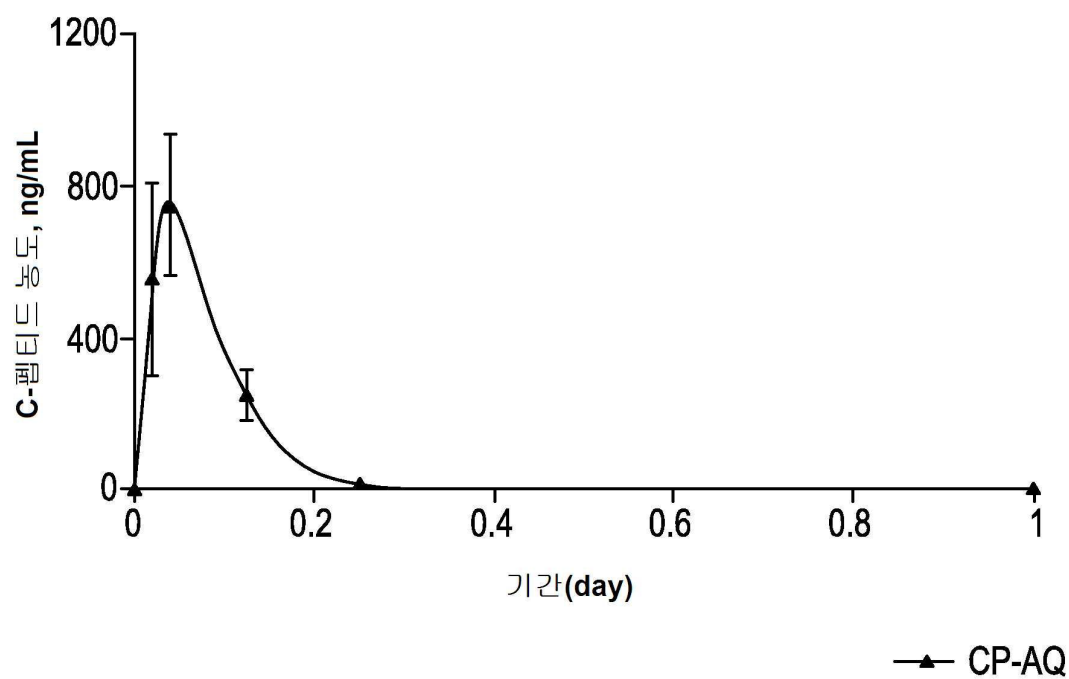
도면3



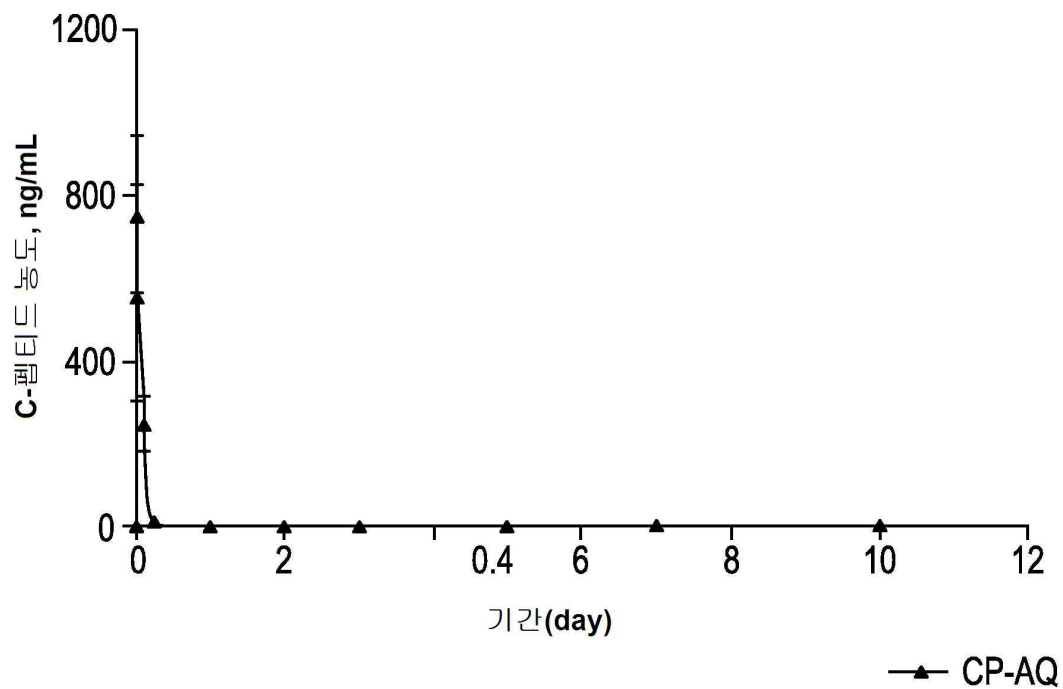
도면4



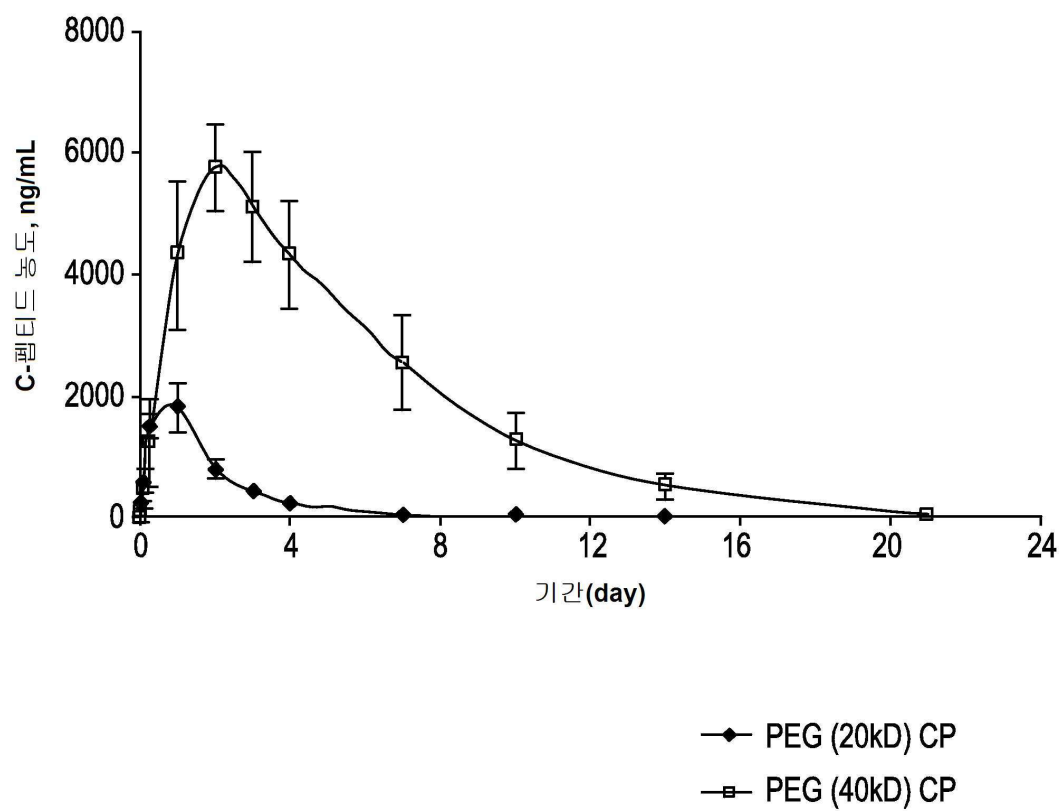
도면5a



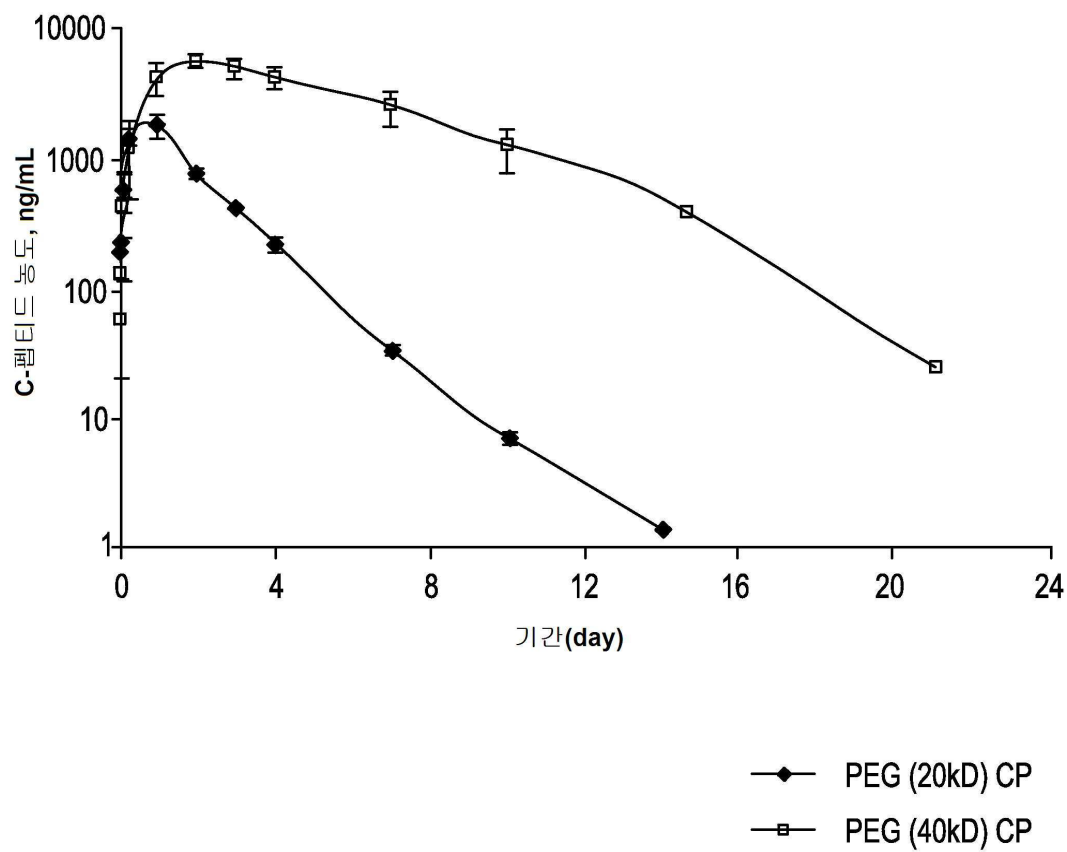
도면5b



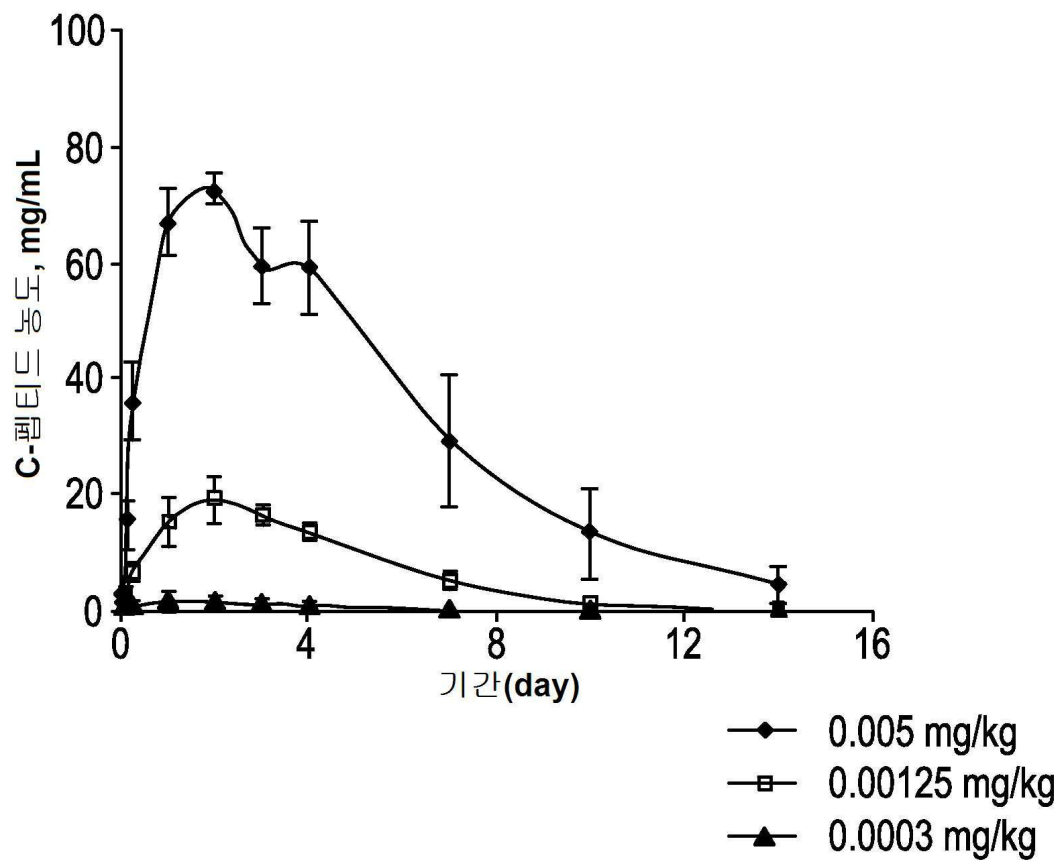
도면6



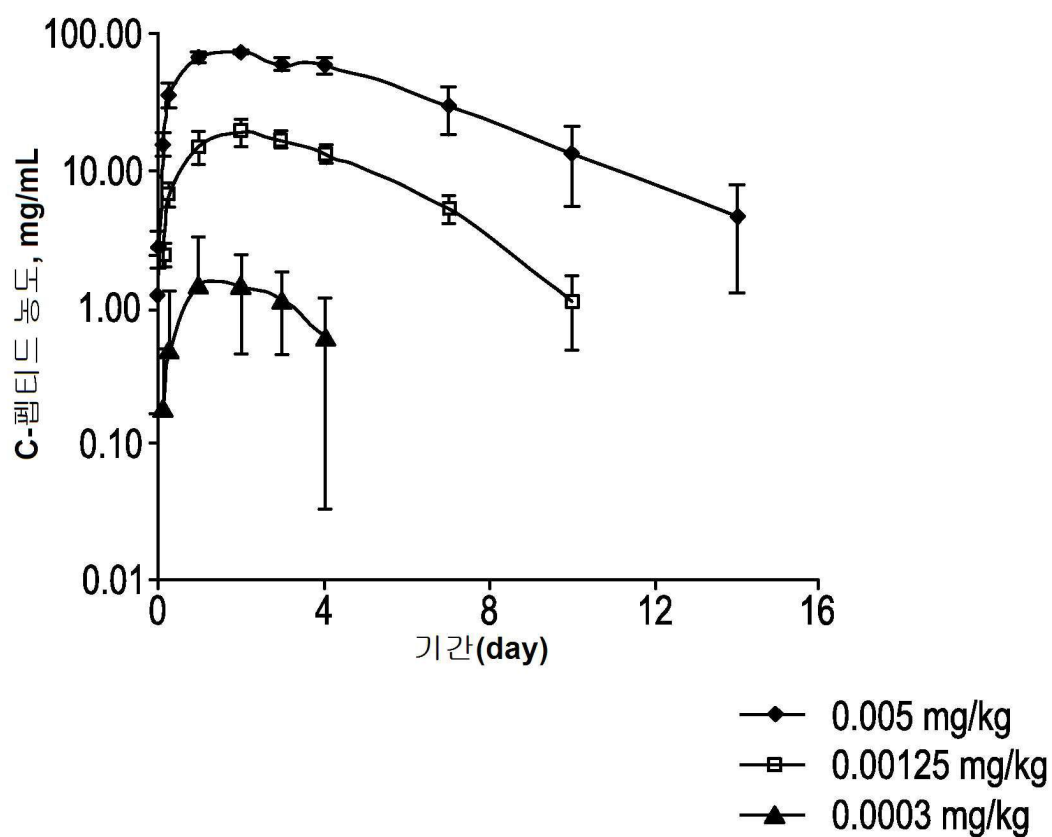
도면7



도면8a

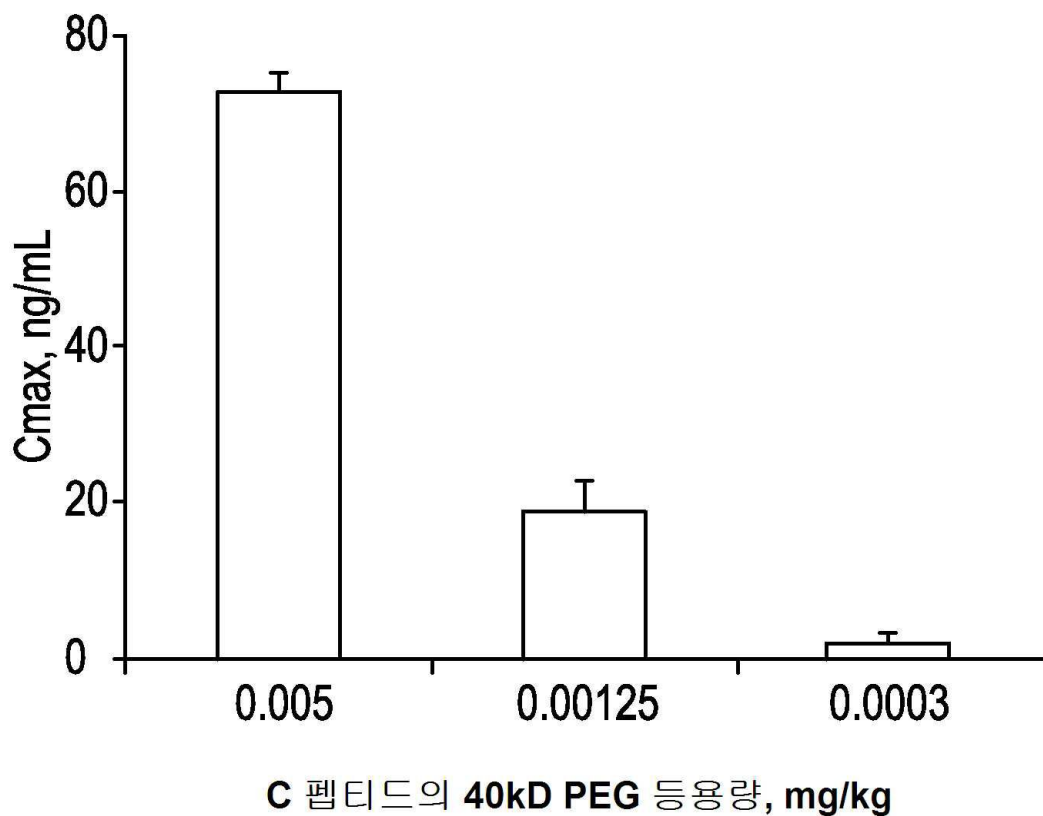


도면8b

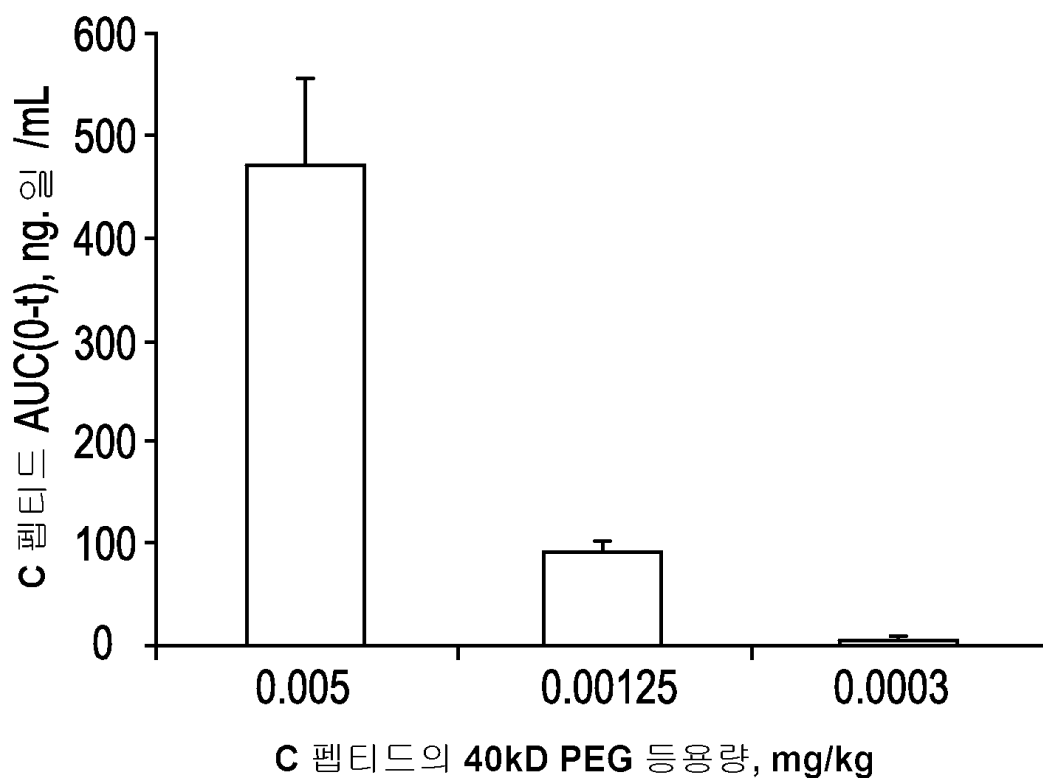




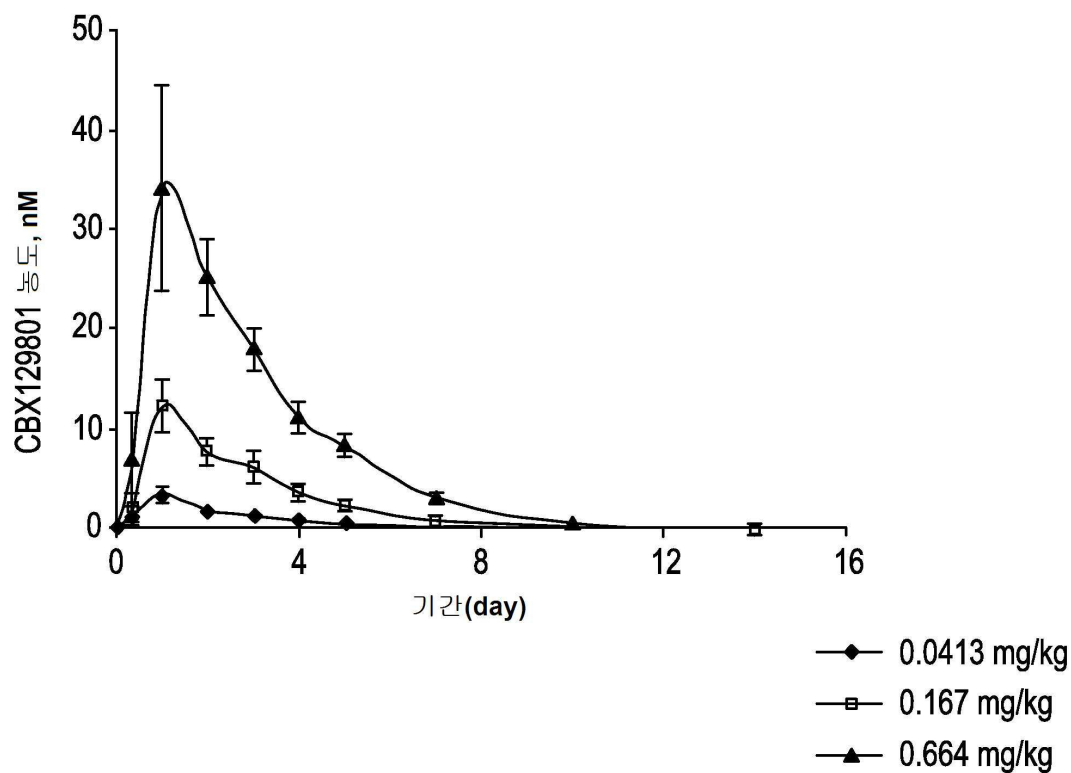
도면9a



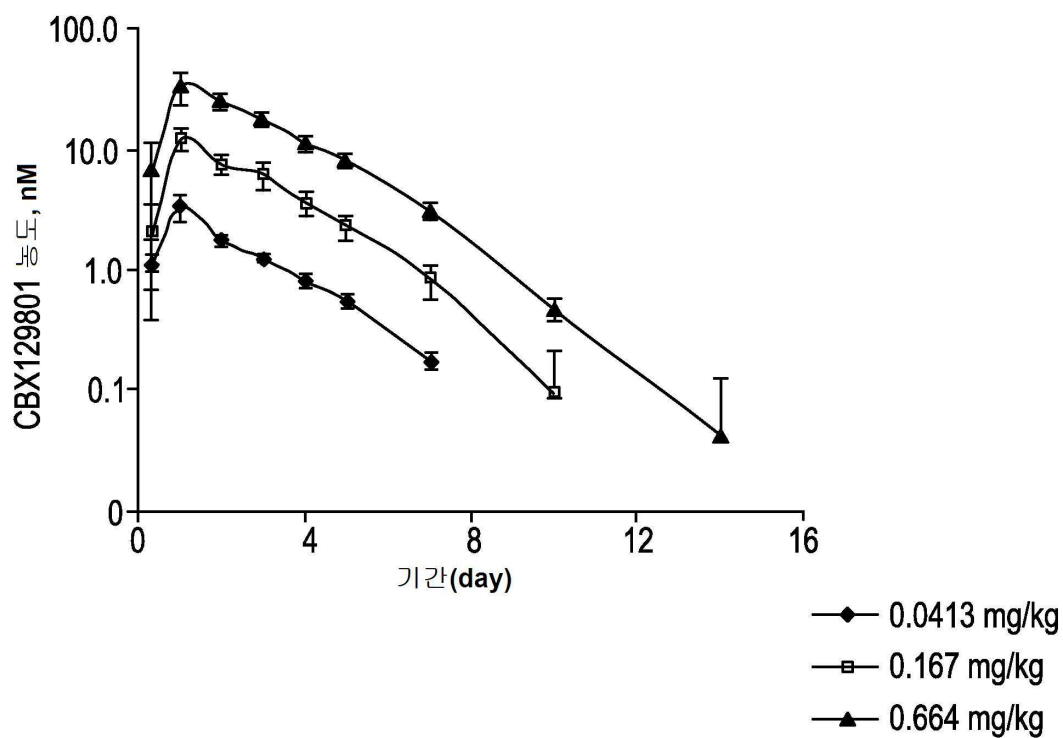
도면9b



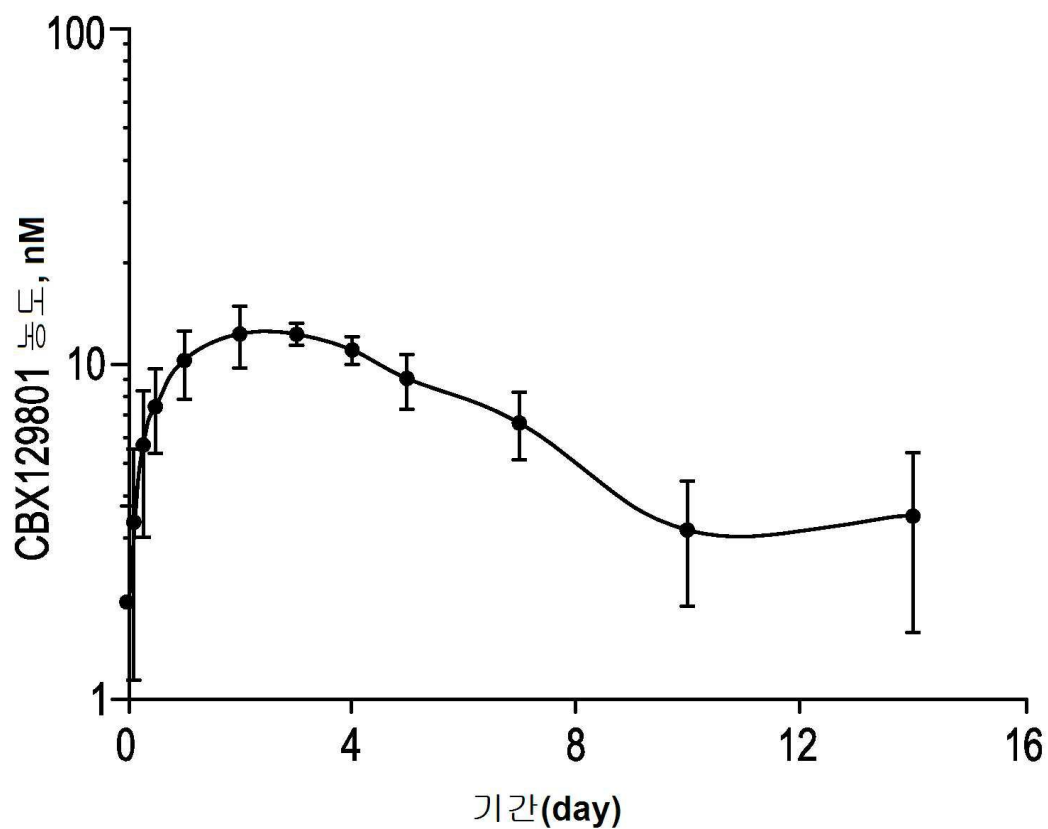
도면10a



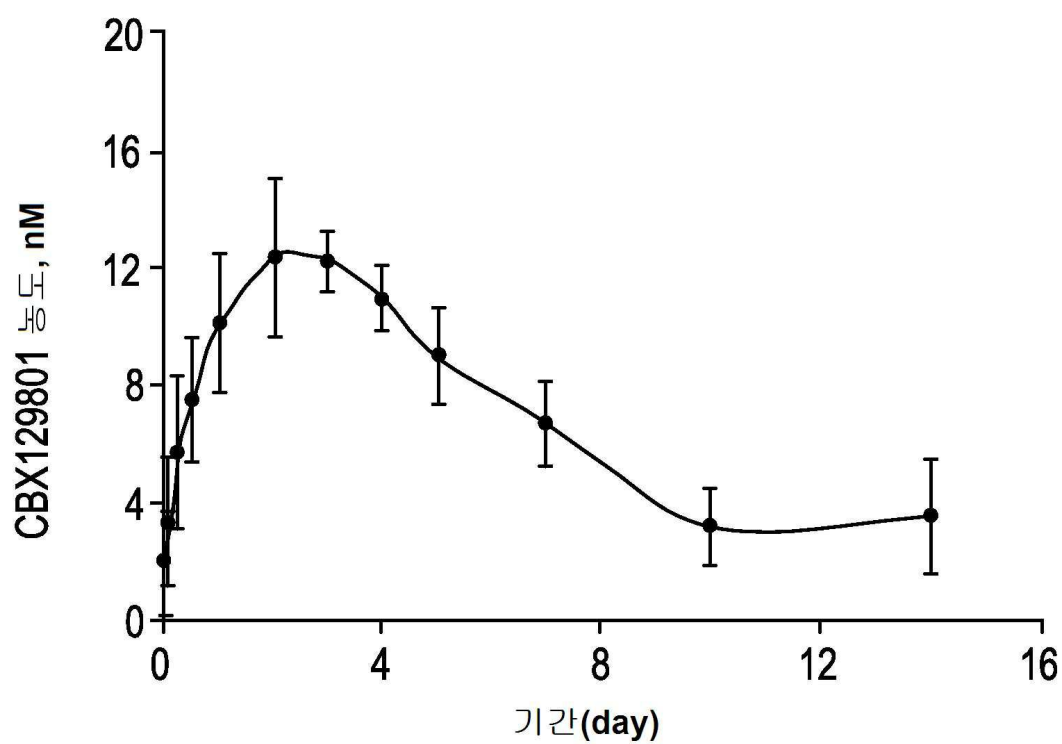
도면10b



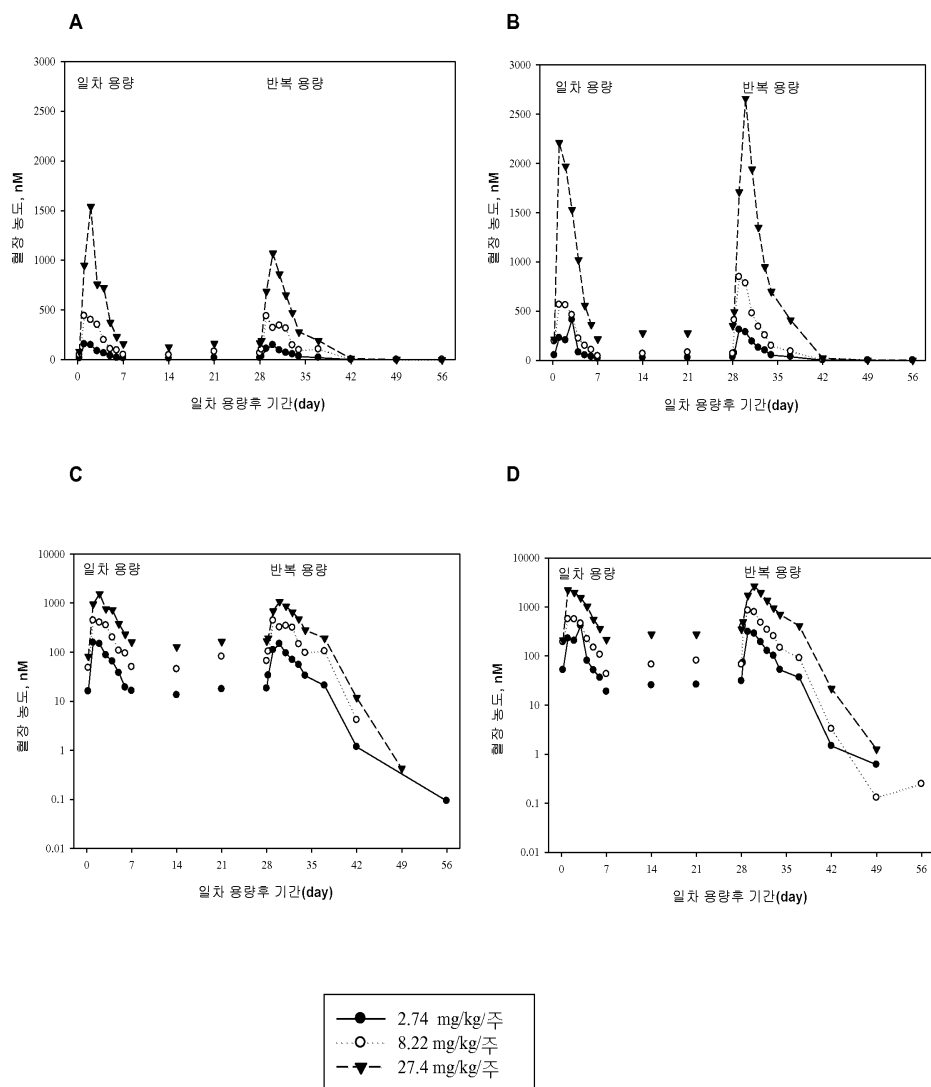
도면11a



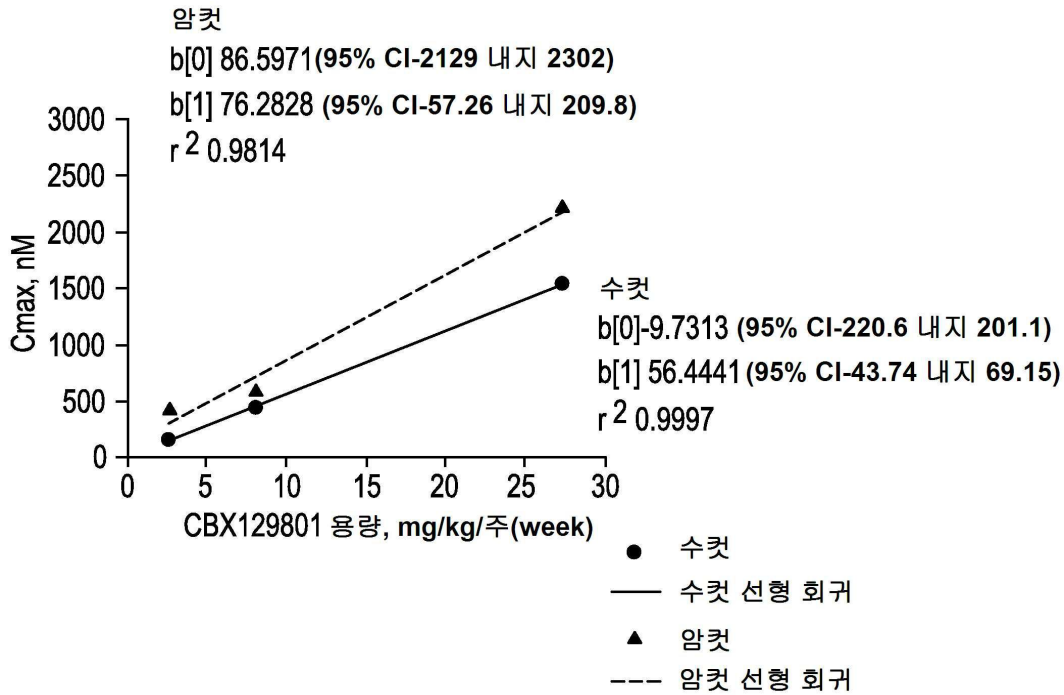
도면11b



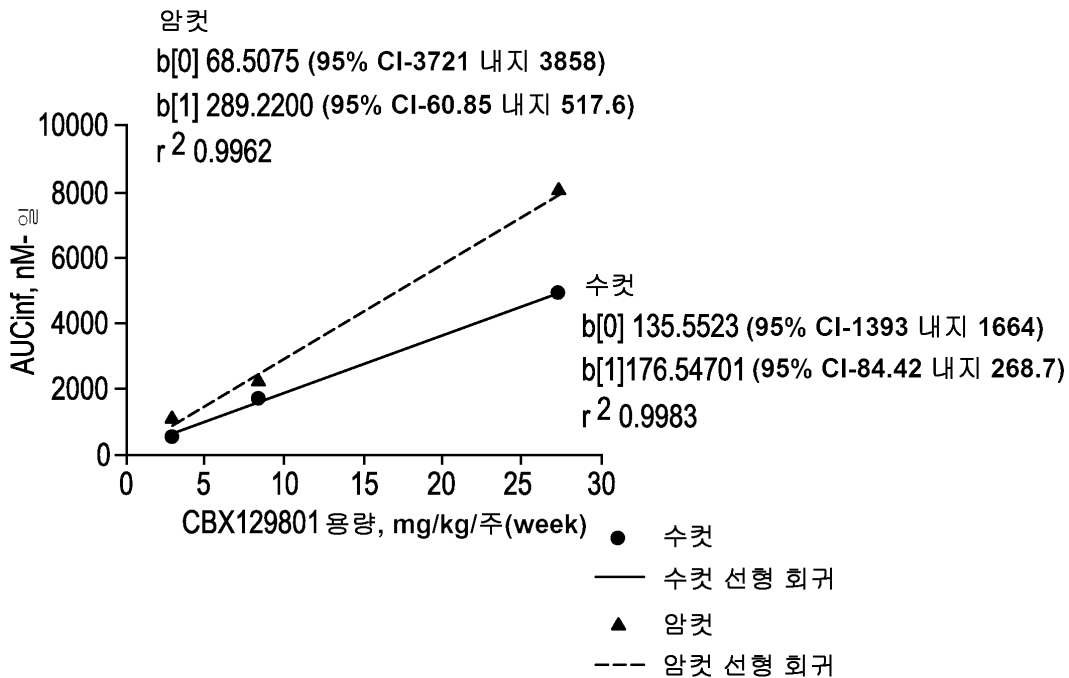
도면12



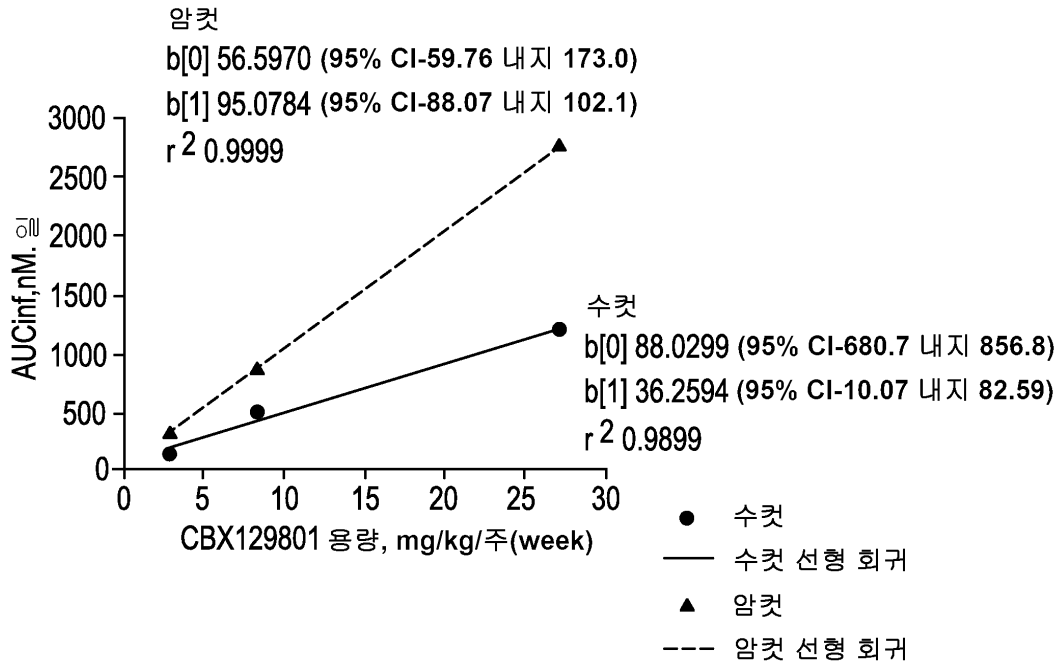
도면13a



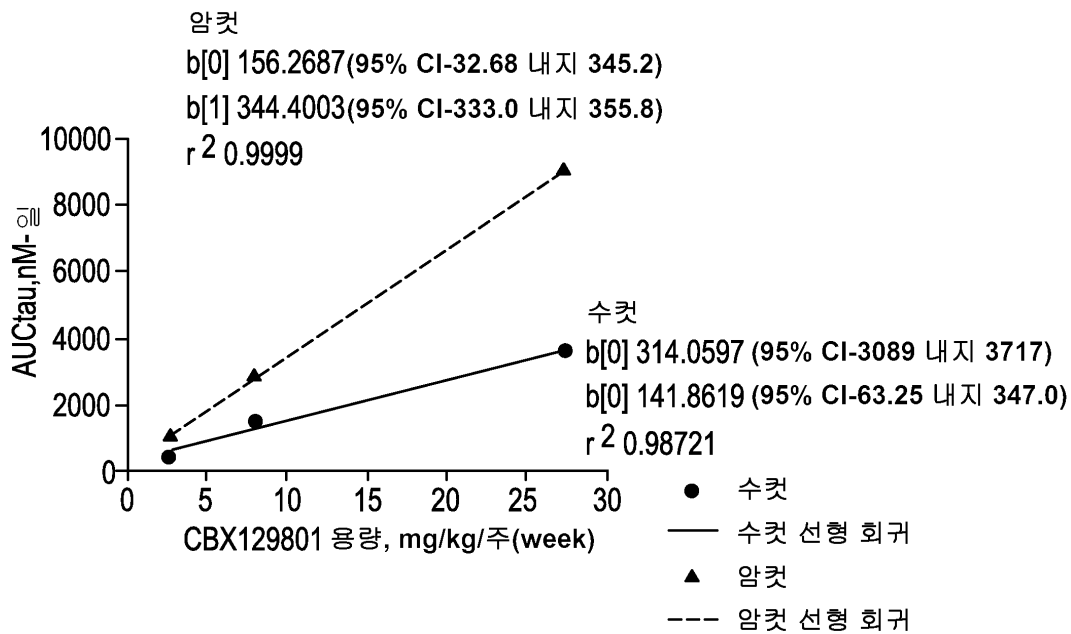
도면13b



도면13c

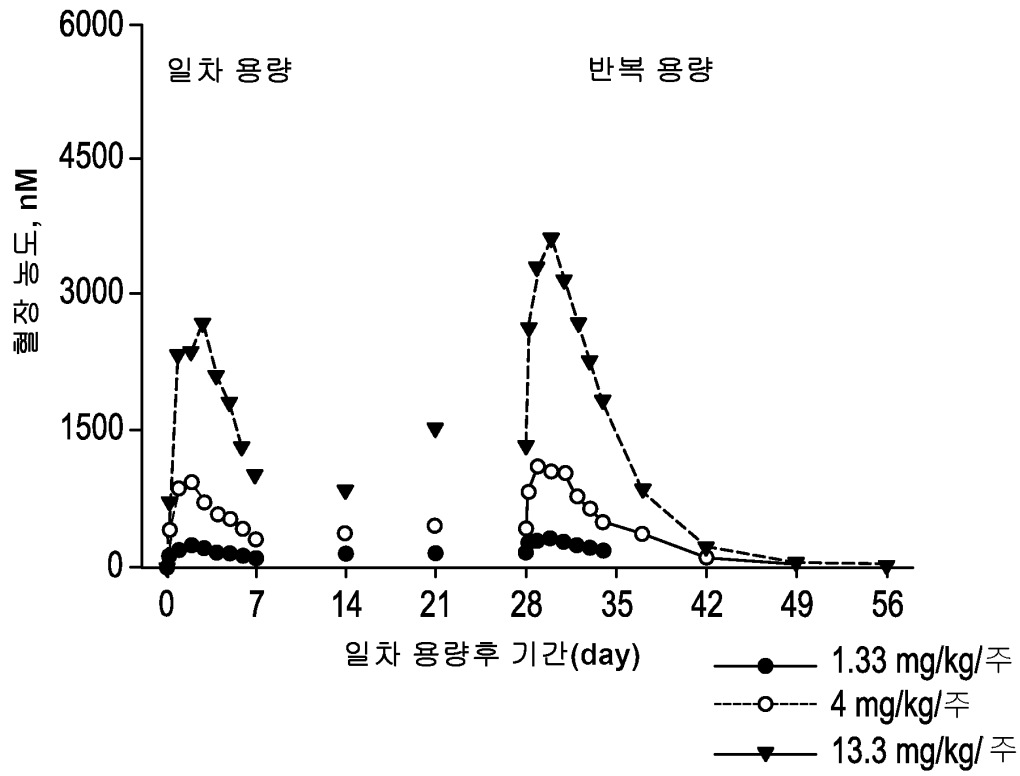


도면13d

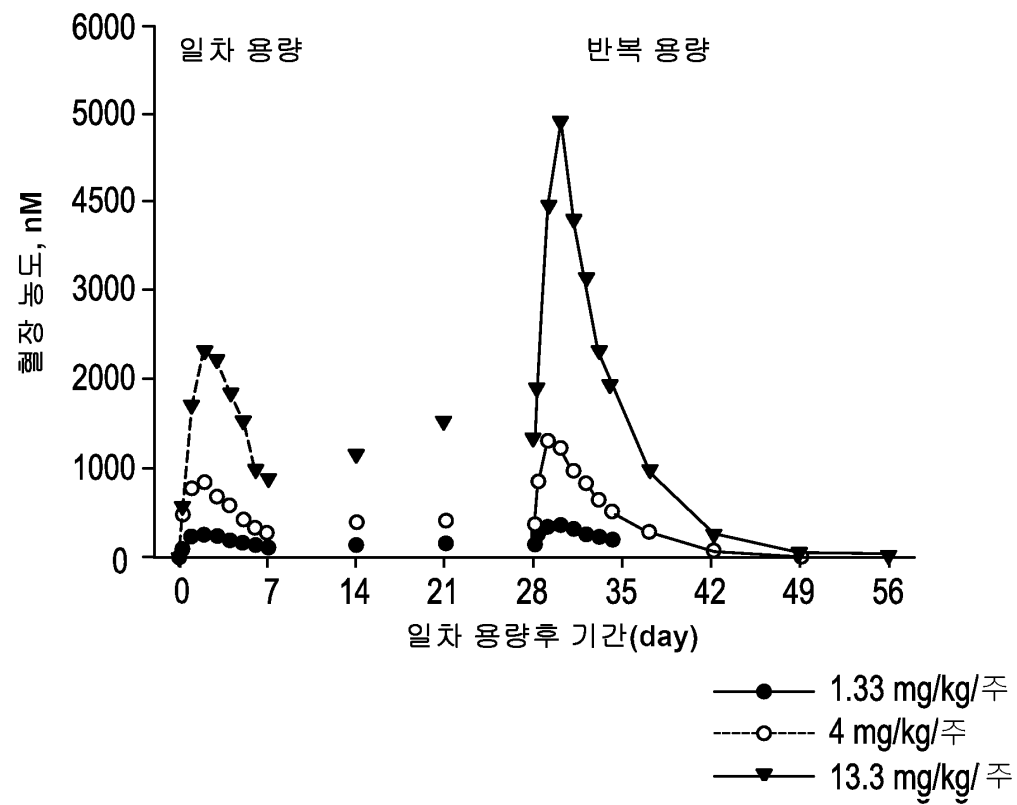




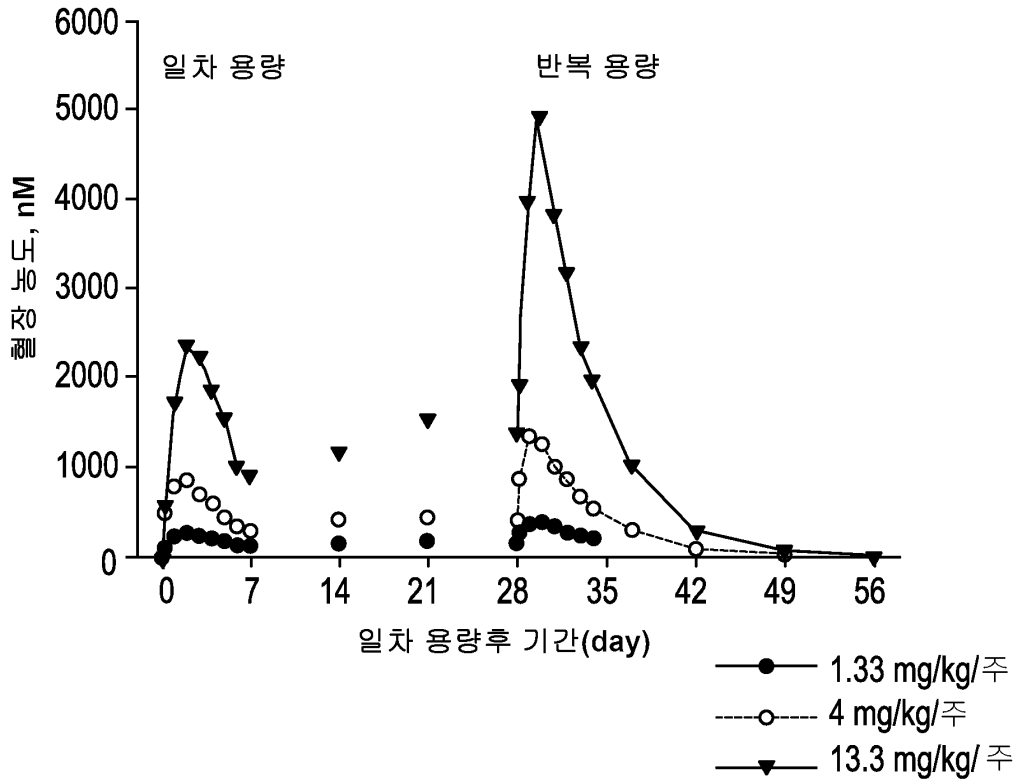
도면14a



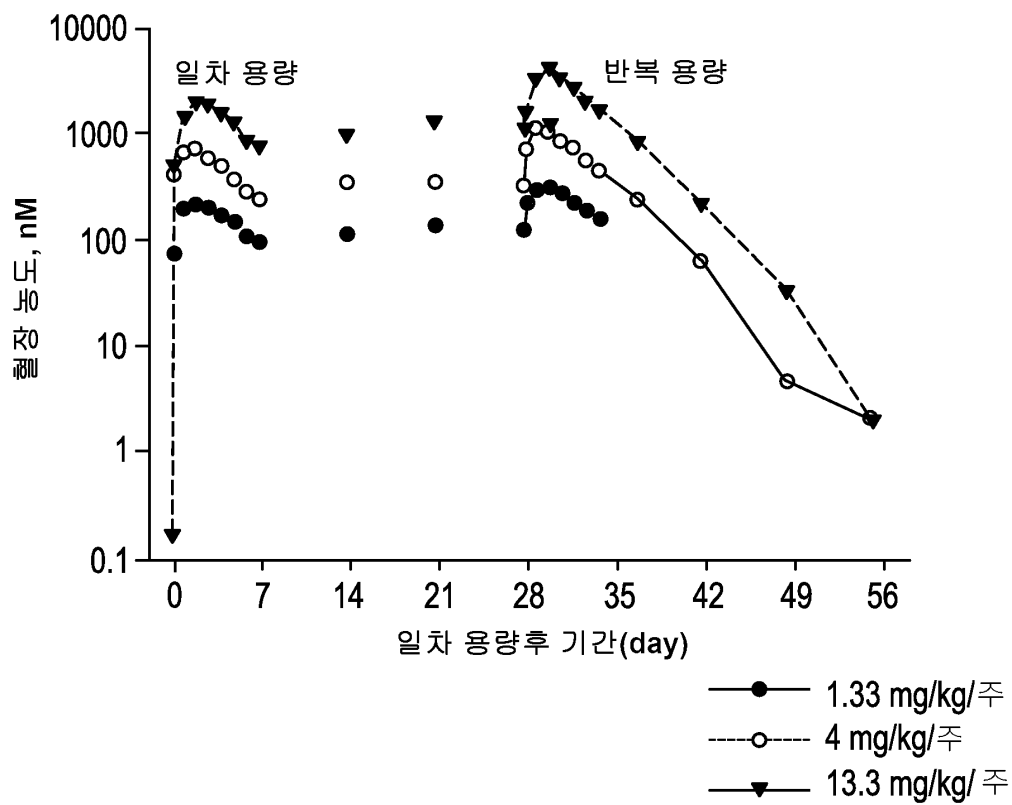
도면14b



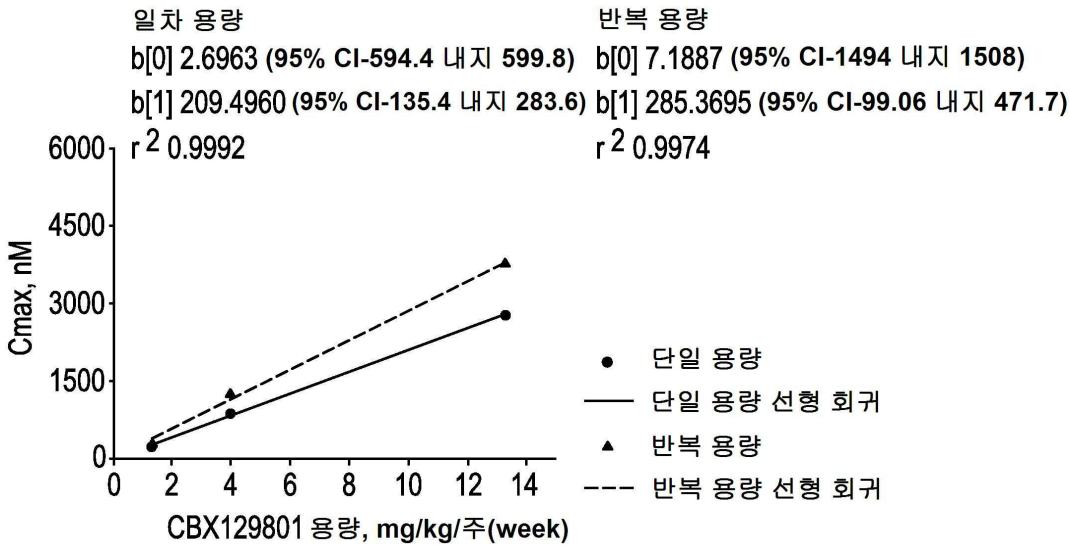
도면14c



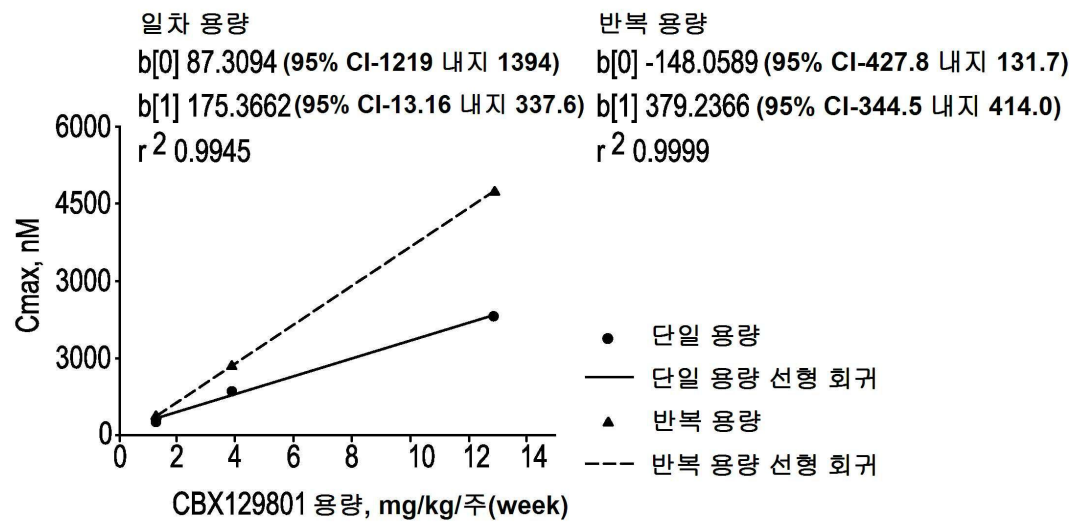
도면14d



도면15a



도면15b



도면15c

일차 용량

b[0] 21.3551 (95% CI-3103 내지 3146)

b[1] 994.4141 (95% CI-606.5 내지 1382)

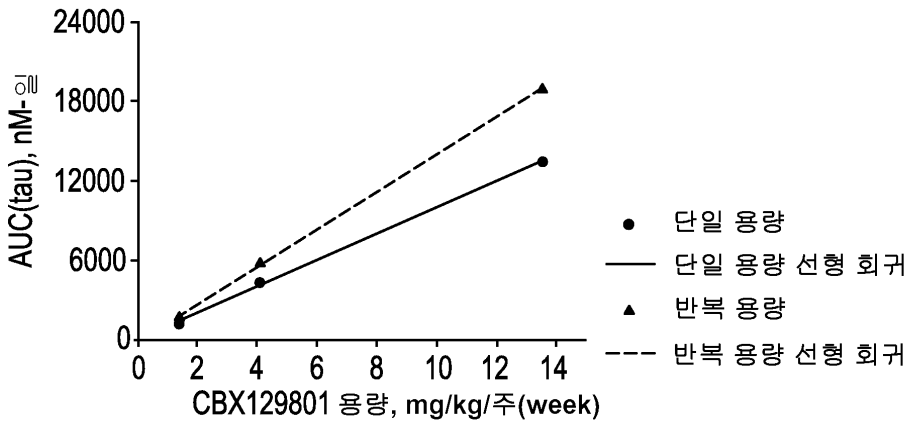
$r^2$  0.9991

반복 용량

b[0]-142.4694 (95% CI-1747 내지 1462)

b[1] 1411.0256 (95% CI-1212 내지 1610)

$r^2$  0.9999



도면15d

일차 용량

b[0] 394.45814 (95% CI-3433 내지 4222)

b[1] 816.7808 (95% CI-341.7 내지 1292)

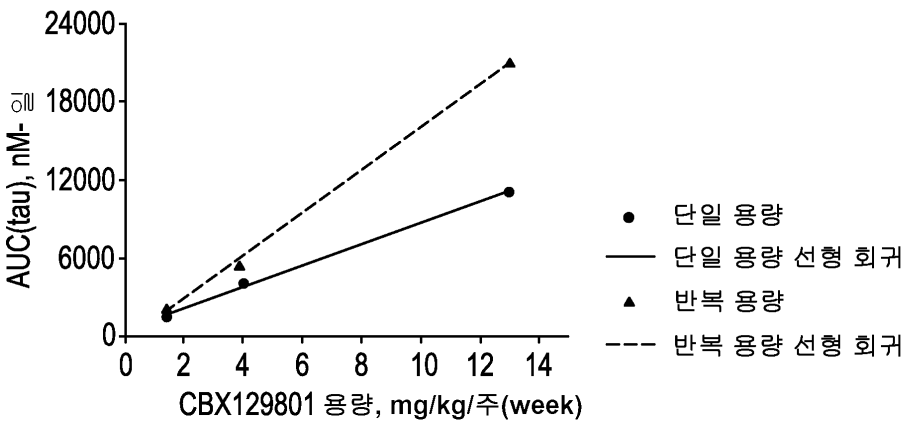
$r^2$  0.9979

반복 용량

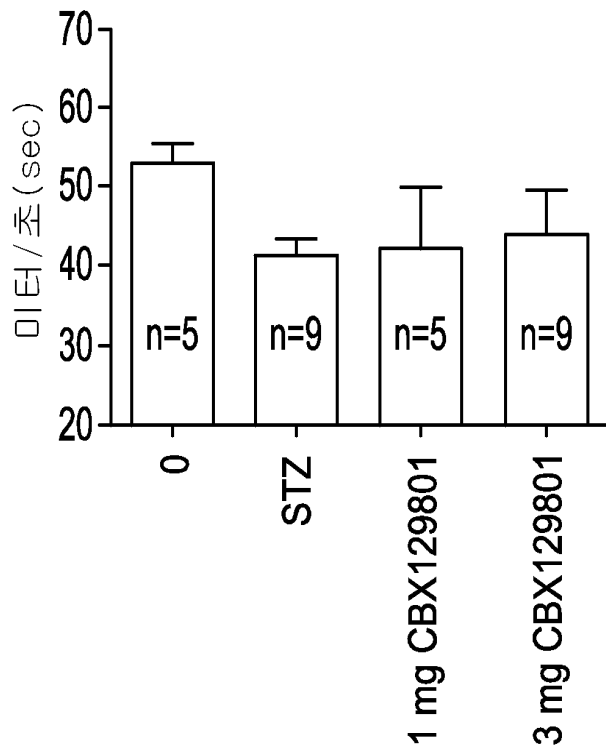
b[0] -421.9424 (95% CI-2380 내지 1536)

b[1] 1638.5307 (95% CI-1396 내지 1882)

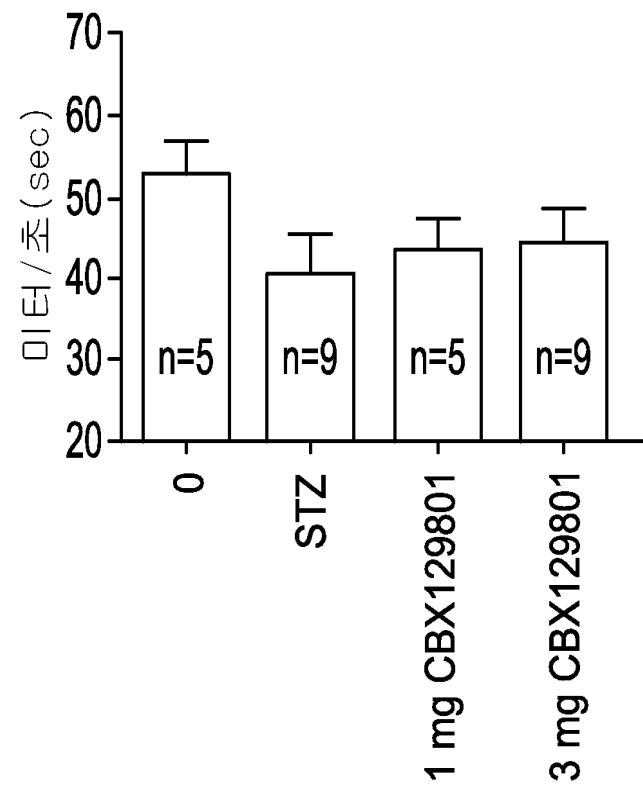
$r^2$  0.9999



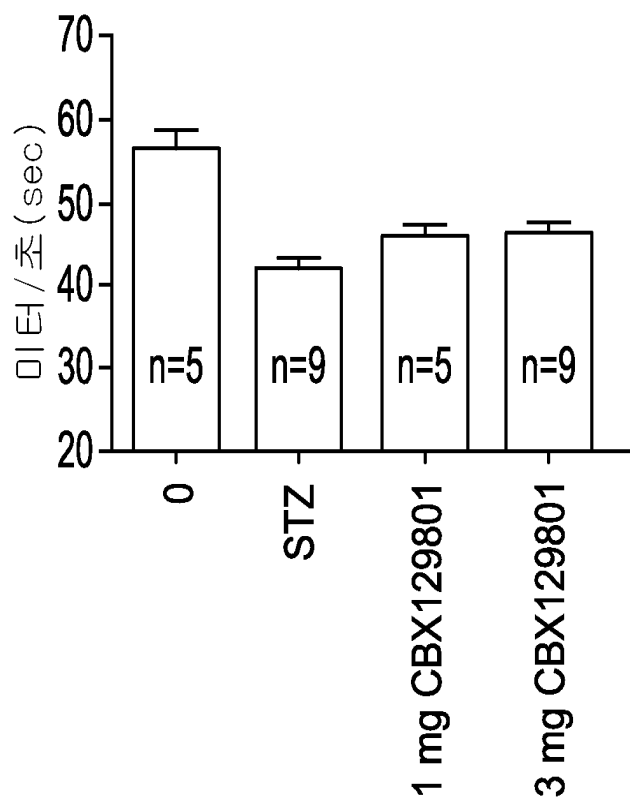
도면16a



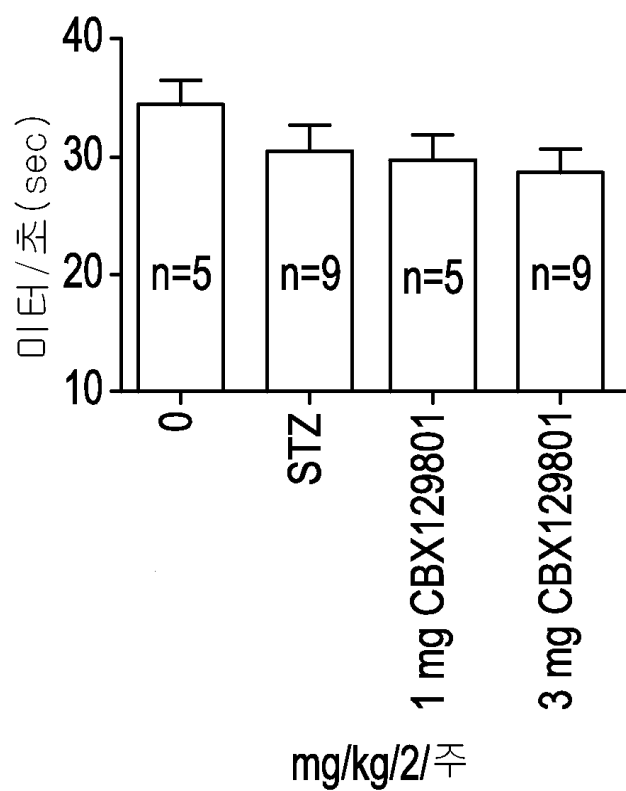
도면16b



도면16c

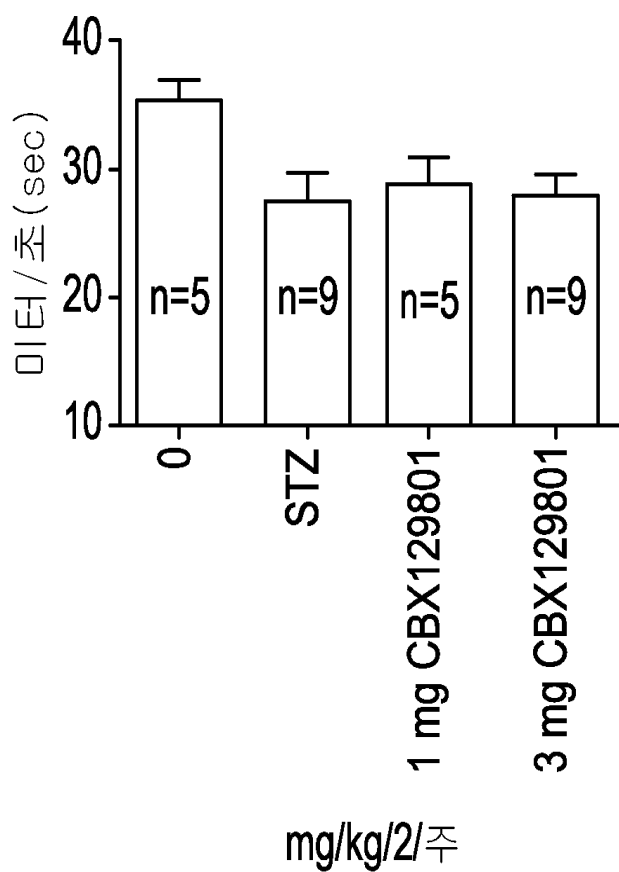


도면17a

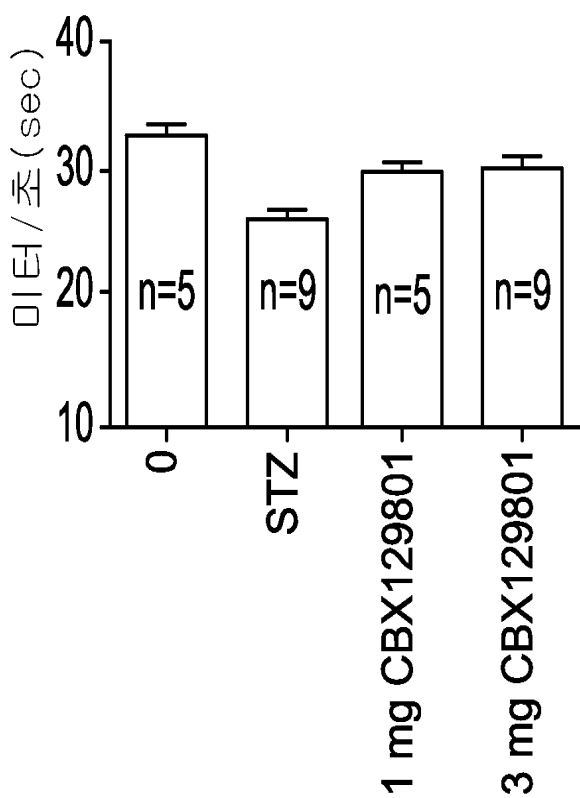




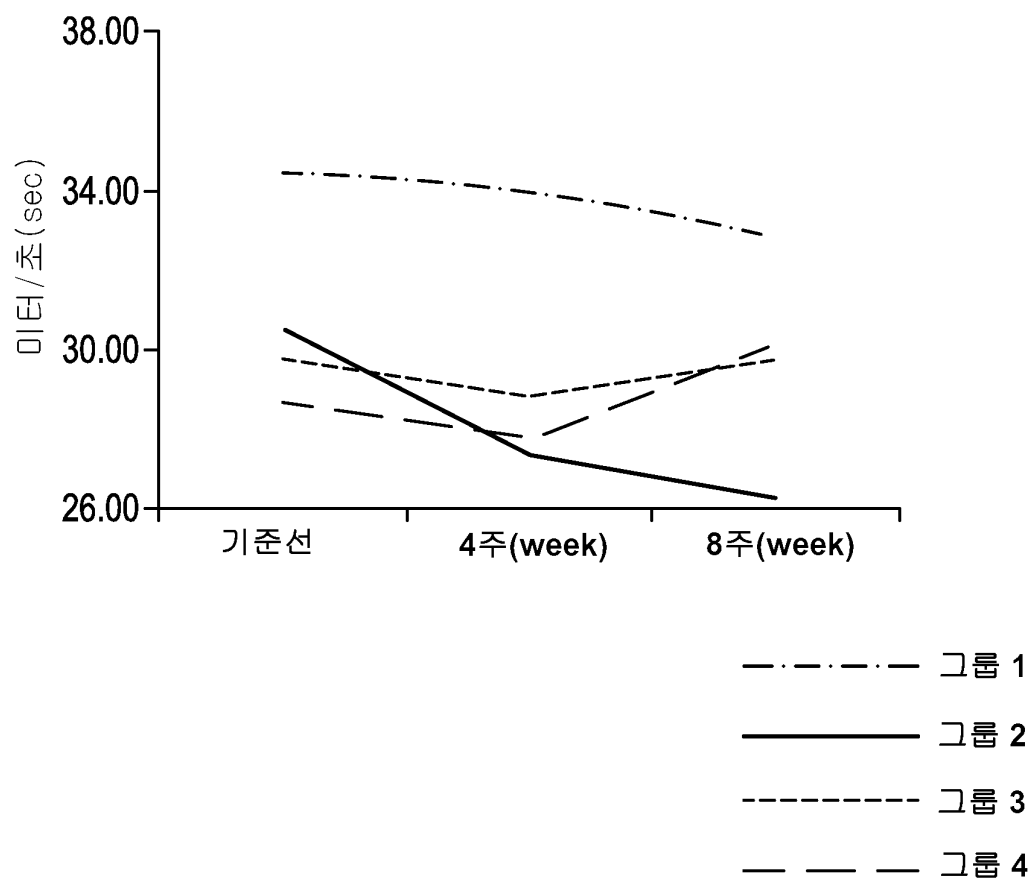
도면17b



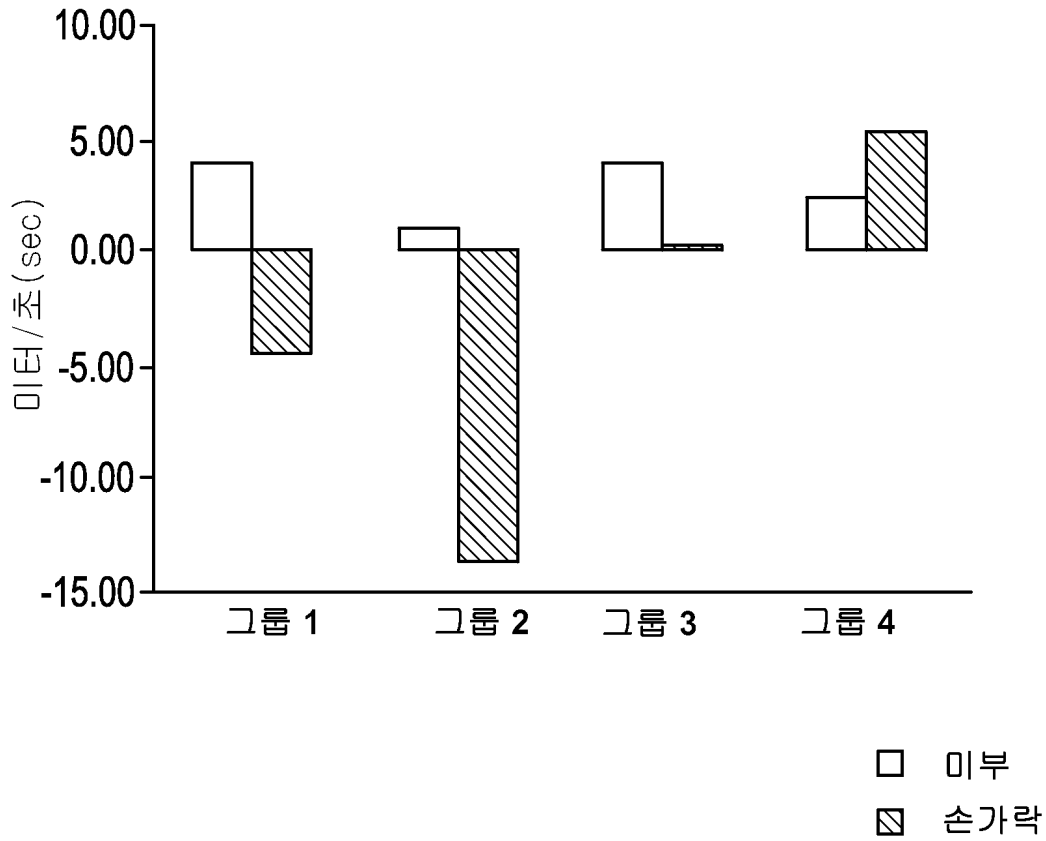
도면17c



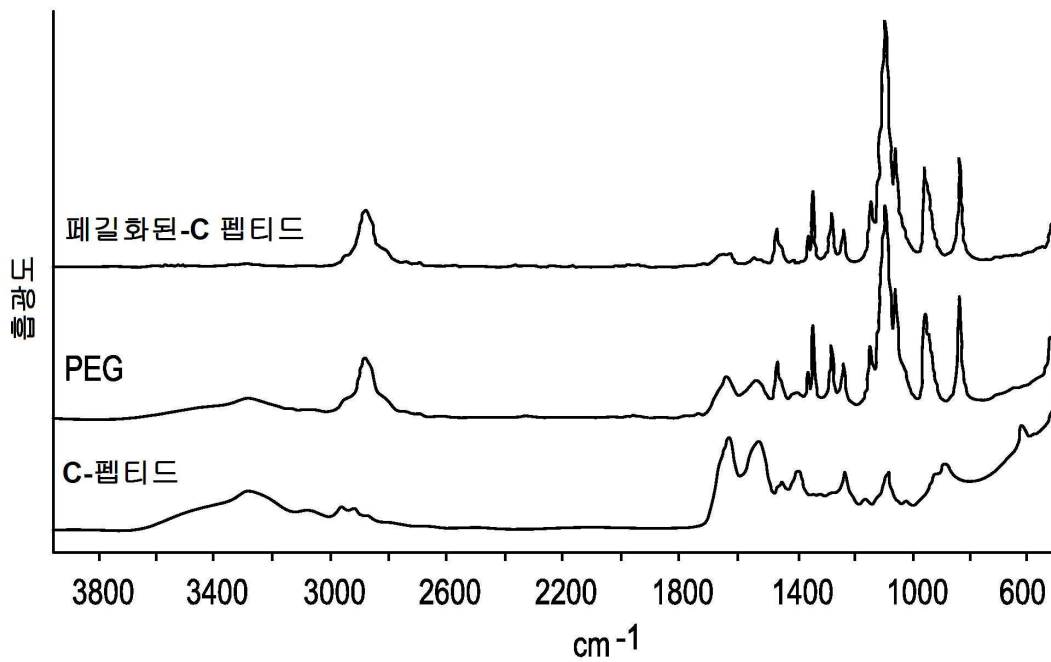
도면18



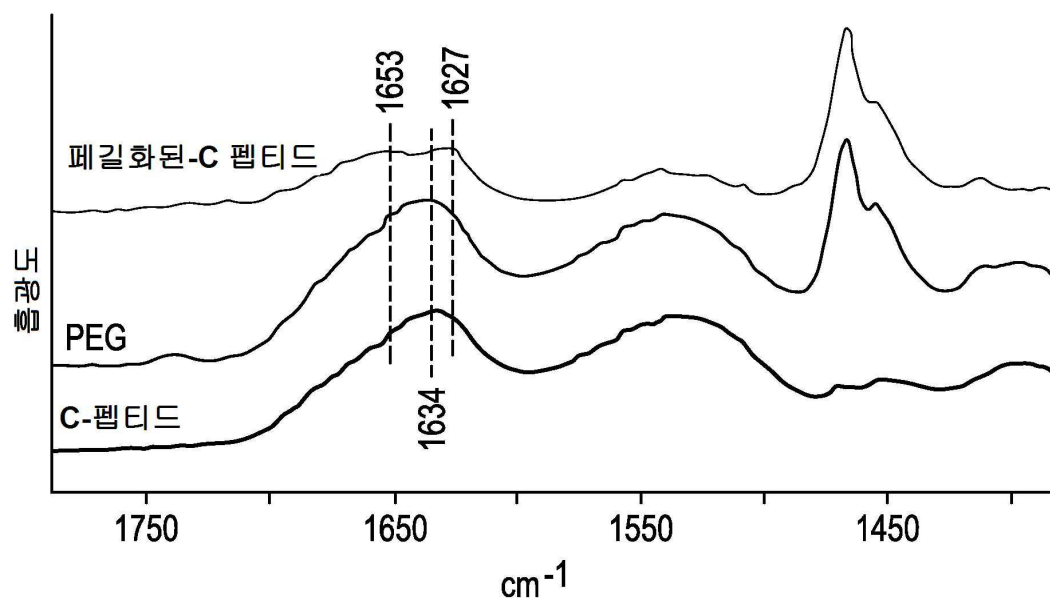
도면19



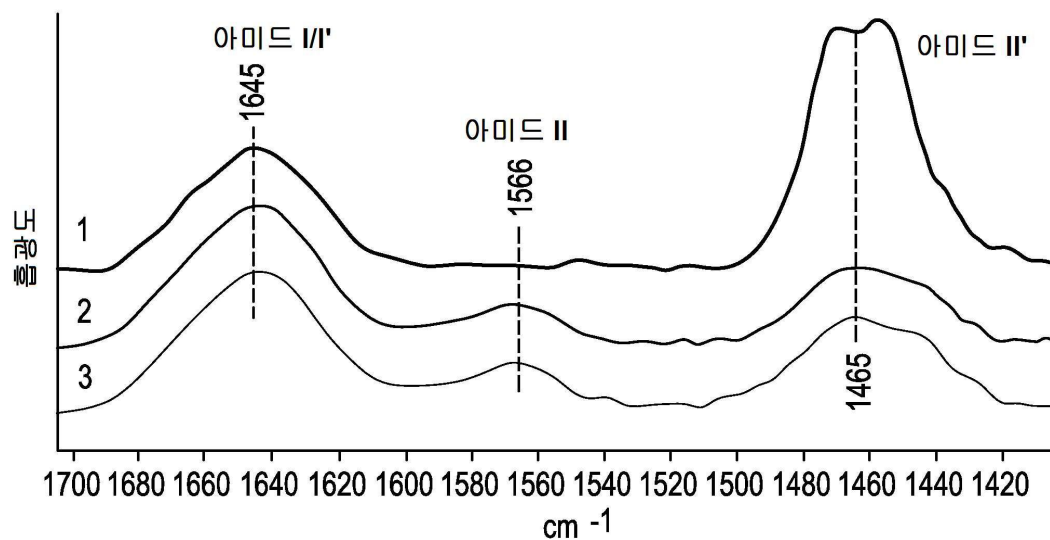
도면20



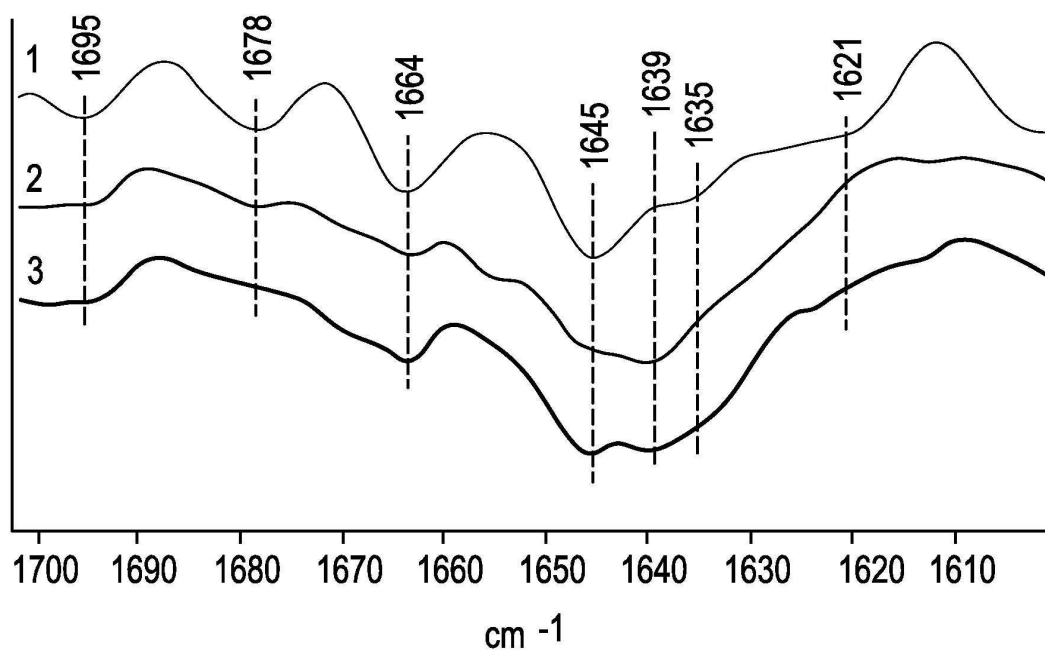
도면21



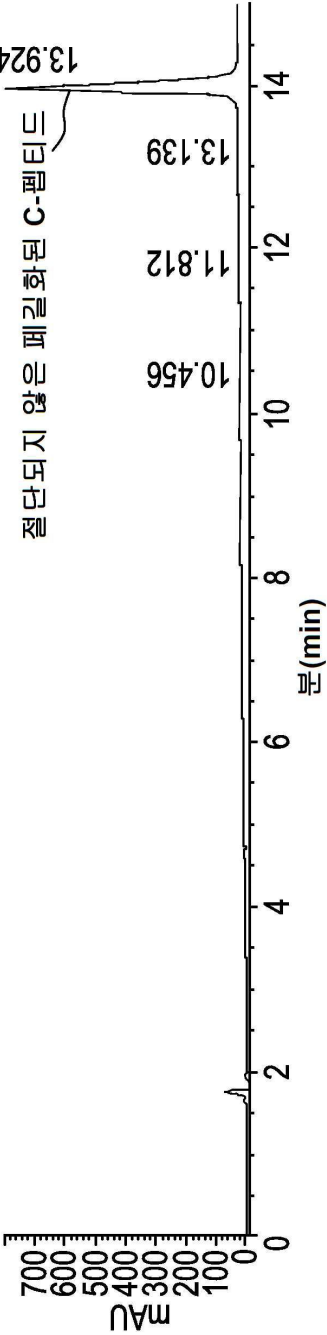
도면22



도면23

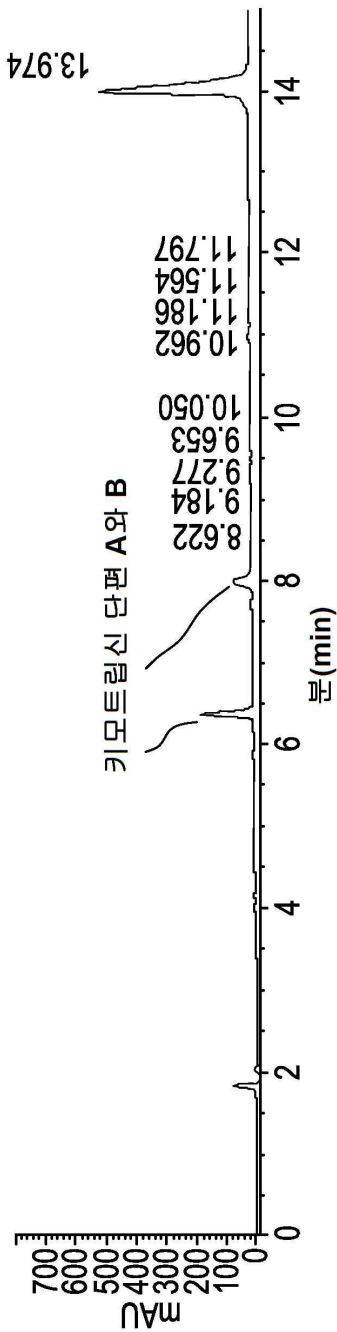


도면24a

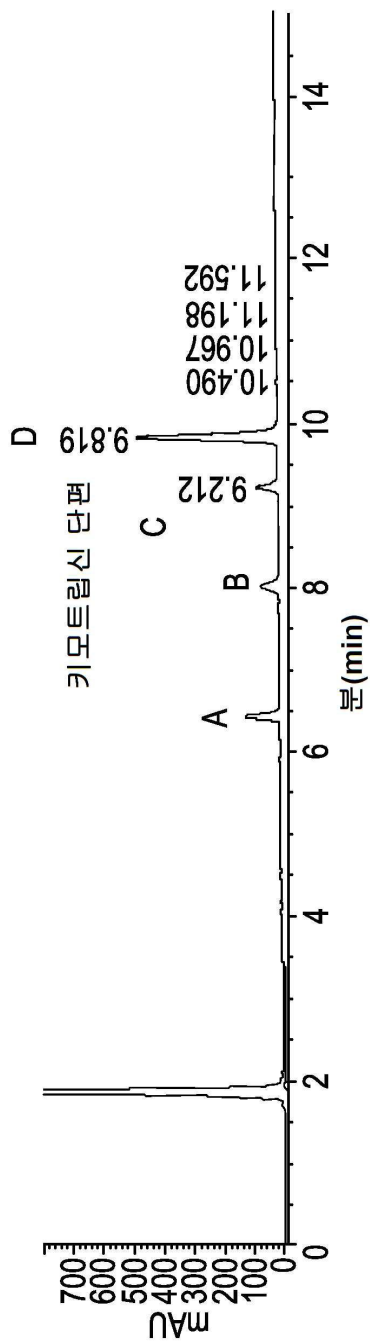




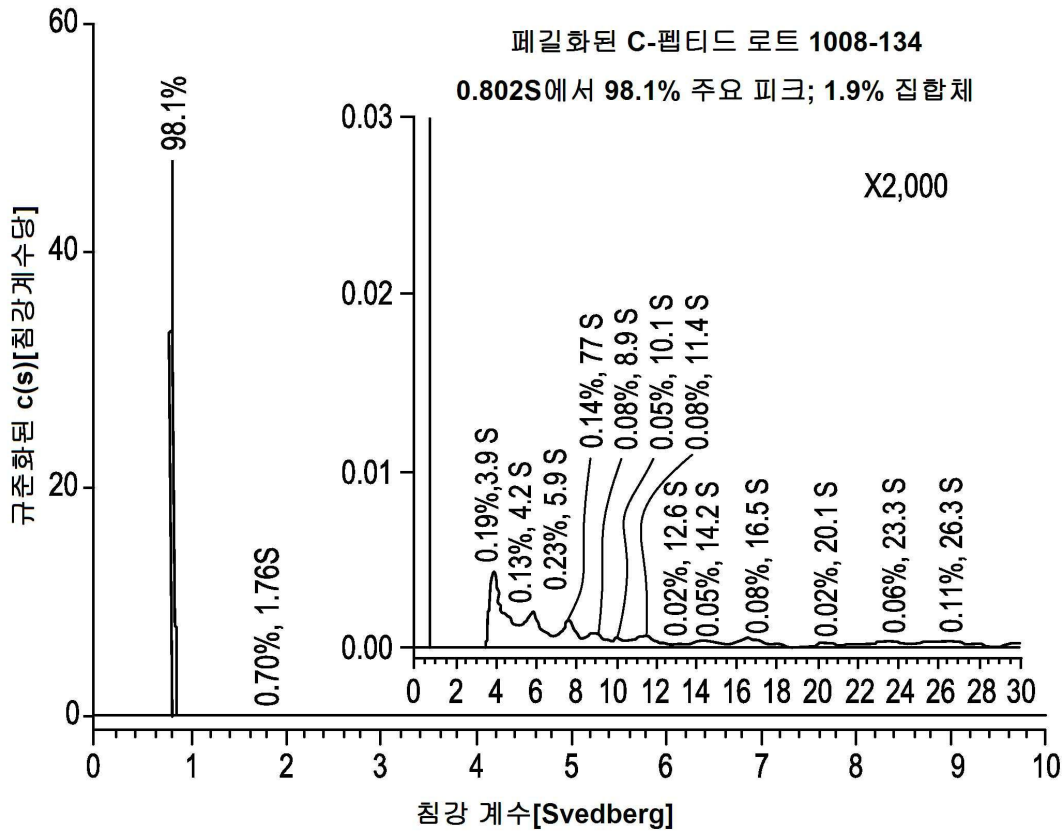
도면24b



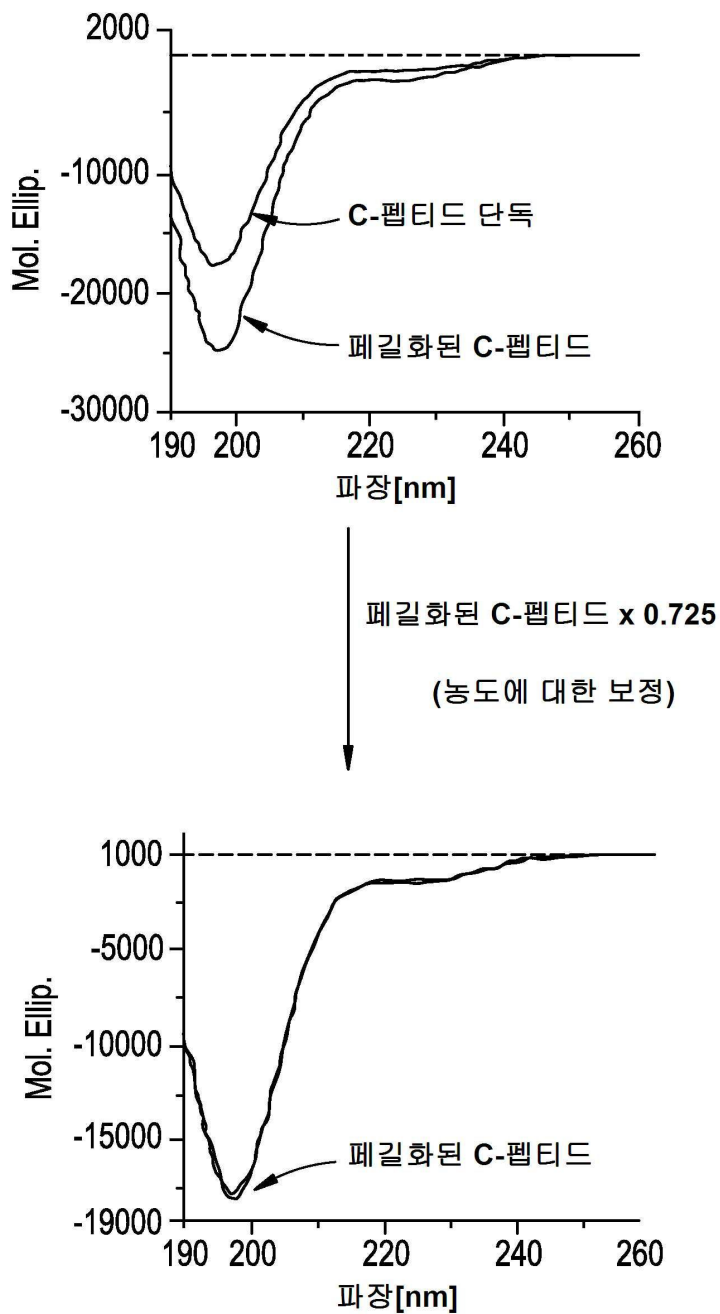
도면24c



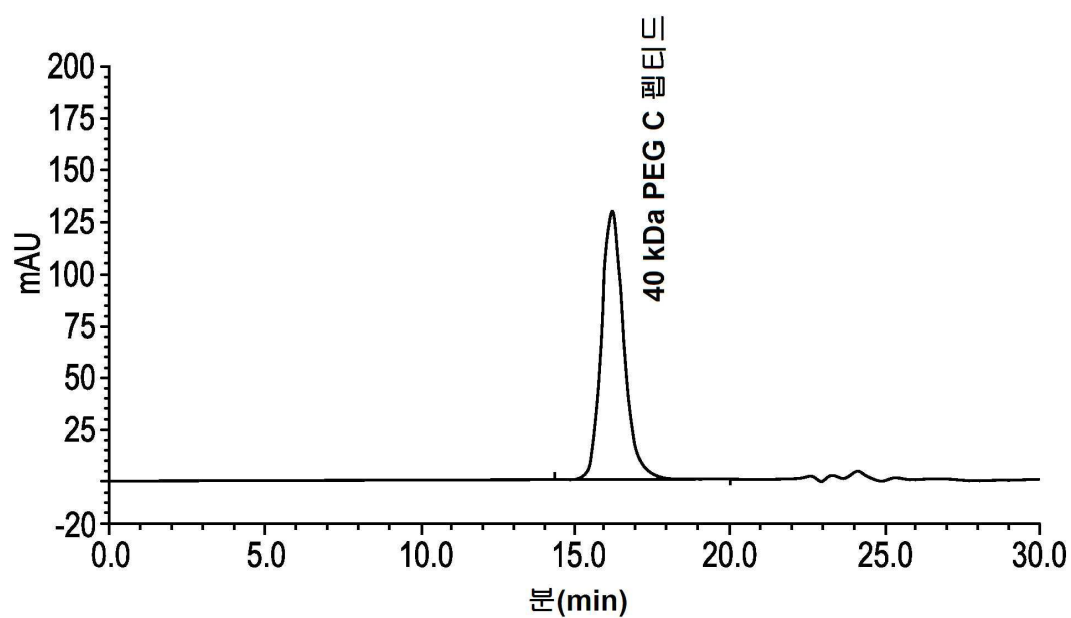
도면25



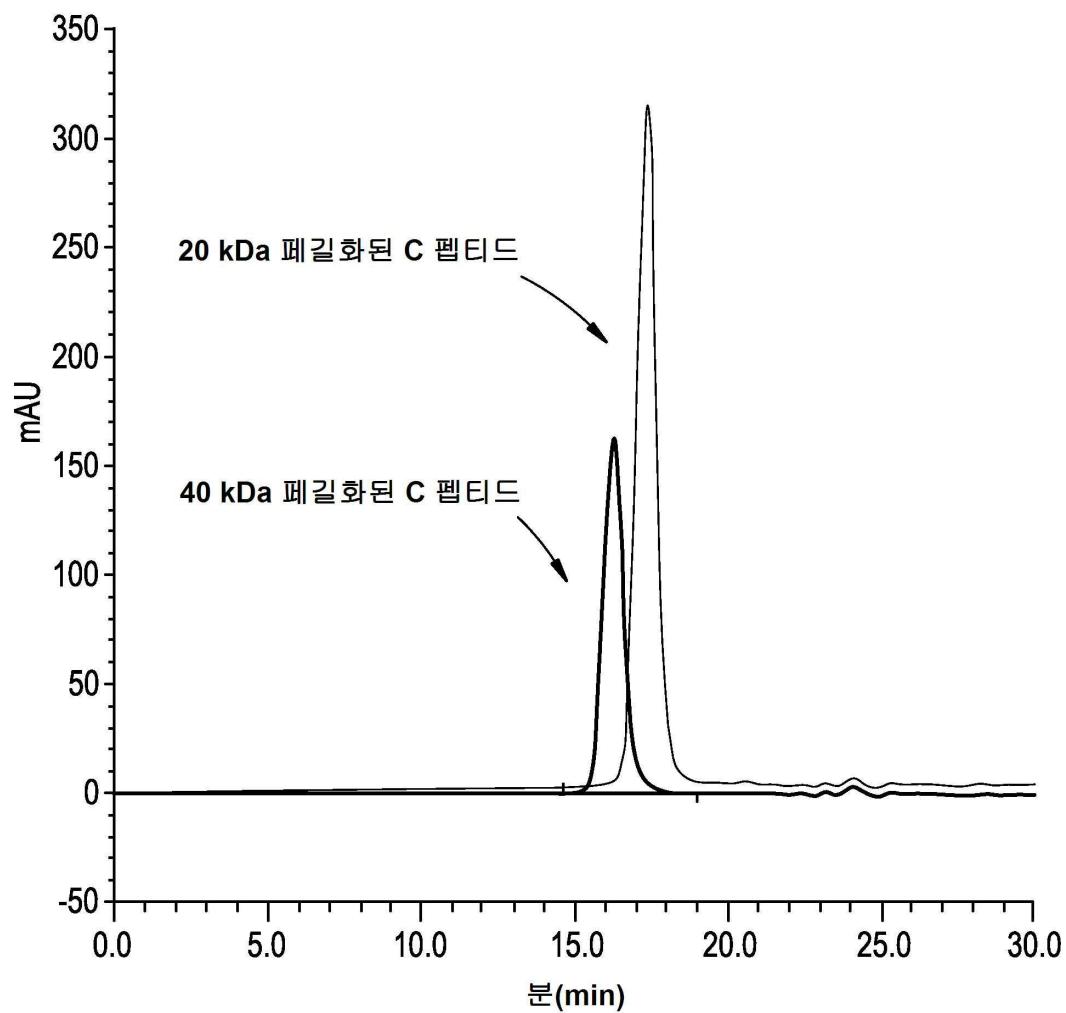
도면26



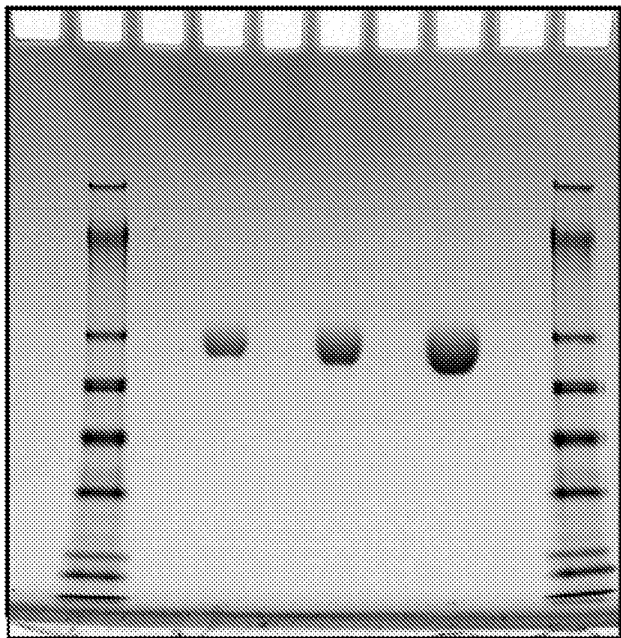
도면27



도면28



도면29



도면30

