



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0084300  
(43) 공개일자 2017년07월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 47/50 (2017.01) A61K 38/28 (2006.01)  
C07K 14/62 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
A61K 47/481 (2013.01)  
A61K 38/28 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7016516
- (22) 출원일자(국제) 2015년11월19일  
심사청구일자 2017년06월15일
- (85) 번역문제출일자 2017년06월15일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/061445
- (87) 국제공개번호 WO 2016/081670  
국제공개일자 2016년05월26일
- (30) 우선권주장  
62/082,857 2014년11월21일 미국(US)  
62/242,503 2015년10월16일 미국(US)

- (71) 출원인  
머크 샤프 앤드 돔 코퍼레이션  
미국 뉴저지 (우편번호 07065-0907) 라웨이 이스  
트 링컨 애비뉴 126
- (72) 발명자  
린, 송니안  
미국 07033 뉴저지주 케닐워쓰 갠로핑 힐 로드  
2000  
얀, 린  
미국 07033 뉴저지주 케닐워쓰 갠로핑 힐 로드  
2000  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
양영준, 심미성

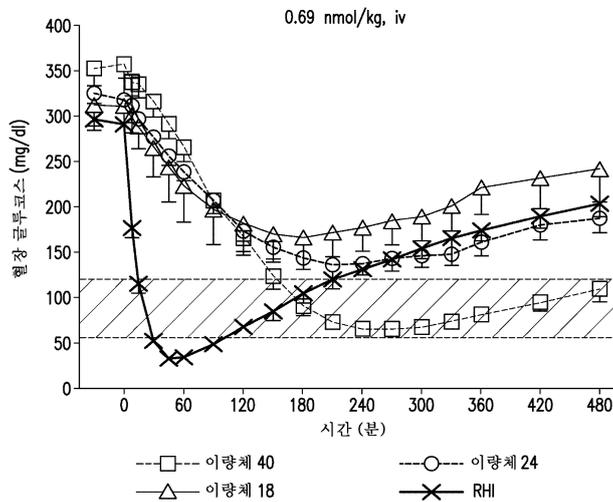
전체 청구항 수 : 총 93 항

(54) 발명의 명칭 인슐린 수용체 부분 효능제

(57) 요약

인슐린 수용체에서 부분 효능제로서 작용하는 인슐린 이량체 및 인슐린 유사체 이량체가 개시된다.

대표도



(52) CPC특허분류

*A61K 47/48215* (2013.01)

*C07K 14/62* (2013.01)

*C07K 2319/00* (2013.01)

(72) 발명자

**후오, 페이**

미국 07033 뉴저지주 케널워쓰 갠로핑 힐 로드  
2000

**피사르니트스키, 드미트리**

미국 07033 뉴저지주 케널워쓰 갠로핑 힐 로드  
2000

**펑, 단칭**

미국 07033 뉴저지주 케널워쓰 갠로핑 힐 로드  
2000

**나르겐드, 라비**

미국 07033 뉴저지주 케널워쓰 갠로핑 힐 로드  
2000

**주, 유평**

미국 07033 뉴저지주 케널워쓰 갠로핑 힐 로드  
2000

**케케크, 아메트**

미국 07033 뉴저지주 케널워쓰 갠로핑 힐 로드  
2000

**매드슨-더건, 크리스티나, 비.**

미국 07033 뉴저지주 케널워쓰 갠로핑 힐 로드  
2000

**시, 지-카이**

미국 07033 뉴저지주 케널워쓰 갠로핑 힐 로드  
2000

**우, 지카이**

미국 07033 뉴저지주 케널워쓰 갠로핑 힐 로드  
2000

**무, 잉준**

미국 07033 뉴저지주 케널워쓰 갠로핑 힐 로드  
2000

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

제1 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체를 포함하며, 각각의 이중이량체는 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드를 포함하는 것인 인슐린 수용체 부분 효능제이며, 여기서 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드는 쇠간 디설피드 결합을 통해 함께 연결되고;

여기서 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체는 2개의 각각의 B-쇄 폴리펩티드의 카르복시 말단에 또는 그 근처에 있는 아미노산의 측쇄를 연결하는 연결 모이어티를 통해 함께 공유 연결되고;

여기서 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드 중 적어도 하나의 아미노 말단은 치환기에 공유 연결되고,

단 연결 모이어티는 디설피드 결합을 포함하지 않는 것인

인슐린 수용체 부분 효능제.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 인슐린 수용체 부분 효능제가 동일한 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체를 포함하거나 또는 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체가 상이한 것인 인슐린 수용체 부분 효능제.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 제1 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체를 그의 각각의 B-쇄 폴리펩티드의 카르복시 말단에 또는 그 근처에 있는 리신 잔기의 엡실론 아미노 기를 통해 공유 연결하는 연결 모이어티를 포함하는 인슐린 수용체 부분 효능제.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 치환기가 화학식 RC(O)-를 포함하며, 여기서 R은 R'CH<sub>2</sub>, R'NH, R'O일 수 있고, R'는 H, 선형 알킬 쇠, 아미노산, 펩티드, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 및 사카라이드일 수 있는 것인 인슐린 수용체 부분 효능제.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 아세틸, 페닐아세틸, 카르바모일, N-알킬 카르바모일, 이소부틸, 메톡시 아세틸, 글리신, 아미노에틸글루코스 (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, N-디메틸, 및 알콕시카르보닐로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기를 포함하는 인슐린 수용체 부분 효능제.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 천연 인간 인슐린, 인슐린 리스프로, 인슐린 아스파르트, desB30 인슐린, 및 인슐린 글라진으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체를 포함하는 인슐린 수용체 부분 효능제.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 각각의 A-쇄 폴리펩티드가 독립적으로 아미노산 서열 GX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>EQCCX<sub>8</sub>SICSLYQLX<sub>17</sub>NX<sub>19</sub>CX<sub>23</sub> (서열식별번호: 3)을 포함하고, 각각의 B-쇄 폴리펩티드가 독립적으로 아미노산 서열 X<sub>25</sub>LCGX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>LVEALYLVCGERGFX<sub>27</sub>YTX<sub>31</sub>X<sub>32</sub> (서열식별번호: 4) 또는 X<sub>22</sub>VNQX<sub>25</sub>X<sub>26</sub>CGX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>LVEALYLVCGERGFX<sub>27</sub>YTX<sub>31</sub>X<sub>32</sub>X<sub>33</sub>X<sub>34</sub>X<sub>35</sub> (서열식별번호: 5)를 포함하며, 여기서 X<sub>2</sub>는 이소류신 또는 트레오닌이고; X<sub>3</sub>은 발린, 글리신, 또는 류신이고; X<sub>8</sub>은 트레오닌 또는 히스티딘이고; X<sub>17</sub>은 글루탐산 또는 글루타민이고; X<sub>19</sub>는 티로신, 4-메톡시-페닐알라닌, 알라닌, 또는 4-아미노 페닐알라닌이고; X<sub>23</sub>은 아스파라긴 또는 글리신이고; X<sub>25</sub>는 페닐알라닌 또는 테스아미노-페닐알라닌이고; X<sub>29</sub>는 히스티딘 또는 트

레오닌이고;  $X_{26}$ 은 류신 또는 글리신이고;  $X_{27}$ 은 페닐알라닌 또는 아스파르트산이고;  $X_{29}$ 는 알라닌, 글리신, 또는 세린이고;  $X_{30}$ 은 히스티딘, 아스파르트산, 글루탐산, 호모시스테인, 또는 시스테인이고;  $X_{31}$ 은 아스파르트산, 프롤린, 또는 리신이고;  $X_{32}$ 는 리신 또는 프롤린이고;  $X_{33}$ 은 트레오닌, 알라닌이거나, 또는 부재하고;  $X_{34}$ 는 아르기닌이거나 또는 부재하고;  $X_{35}$ 는 아르기닌이거나 또는 부재하고; 단  $X_{31}$  또는  $X_{32}$  중 적어도 하나는 리신인 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 8**

제1항에 있어서, 연결 모이어티가 2가, 직쇄형 또는 분지형, 포화 또는 불포화, 임의로 치환된 C1-C20 탄화수소쇄를 포함하며, 여기서 1개 이상의 메틸렌 단위는 -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -N(R)SO<sub>2</sub>-, SO<sub>2</sub>N(R)-, 헤테로시클릭 기, 아릴 기, 또는 헤테로아릴 기에 의해 임의로 및 독립적으로 대체되고, 각 경우의 R은 독립적으로 수소, 적합한 보호 기, 아실 모이어티, 아릴알킬 모이어티, 지방족 모이어티, 아릴 모이어티, 헤테로아릴 모이어티, 또는 헤테로지방족 모이어티, 및 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG)을 포함하는 것인 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 9**

제1항에 있어서, 연결 모이어티가 알킬디오일, -C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(O)-, 아실 모이어티, -C(O)RC(O)-를 포함하며, 여기서 n = 0-4이고, R은 알킬 쇠, 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 쇠, 아마이드-함유 쇠, 트리아졸(들)-함유 쇠, 시클로옥틴-함유 모이어티, 치환된 아실 쇠, 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 쇠인 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 10**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 인슐린 수용체 부분 효능제 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물.

**청구항 11**

하기 화학식을 포함하는 인슐린 수용체 부분 효능제.



여기서  $D^1$  및  $D^2$ 는 각각 독립적으로 인슐린 또는 인슐린 유사체 폴리펩티드이고,

여기서 각각의 인슐린 폴리펩티드는 쇠간 디설피드 결합을 통해 함께 연결된 A-쇠 폴리펩티드 및 B-쇠 폴리펩티드를 포함하는 이중이량체이고;

L은 연결 모이어티이며, 여기서 링커 모이어티의 하나의 말단은  $D^1$ 의 카르복실 기에 또는 그 근처에 있는 아미노산 잔기에 부착되고, 링커 모이어티의 다른 말단은  $D^2$ 의 카르복실 말단에 또는 그 근처에 있는 아미노산 잔기에 부착되고, 단 L은 디설피드 연결을 포함하지 않고;

여기서 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 폴리펩티드는 A-쇠 폴리펩티드 및 B-쇠 폴리펩티드의 아미노 말단에 부착된 치환기를 포함한다.

**청구항 12**

제11항에 있어서, 동일한  $D^1$  및  $D^2$  또는 상이한  $D^1$  및  $D^2$ 를 포함하는 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 13**

제11항에 있어서,  $D^1$  및  $D^2$ 의 카르복시 말단에 또는 그 근처에 있는 리신 잔기의 엡실론 아미노 기를 통해  $D^1$  및  $D^2$ 를 공유 연결하는 연결 모이어티를 포함하는 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 14**

제11항에 있어서, 인슐린 수용체 부분 효능제가 화학식 RC(O)-를 갖는 치환기를 포함하며, 여기서 R은 R'CH<sub>2</sub>, R'NH, R'O일 수 있고, R'는 H, 선형 알킬 쇠, 아미노산, 펩티드, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 및 사카라이드일 수

있는 것인 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 15**

제11항에 있어서, 아세틸, 페닐아세틸, 카르바모일, N-알킬 카르바모일, 이소부틸, 메톡시 아세틸, 글리신, 아미노에틸글루코스 (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, N-디메틸, 및 알콕시카르보닐로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기를 포함하는 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 16**

제11항에 있어서, 천연 인간 인슐린, 인슐린 리스프로, 인슐린 아스파르트, desB30 인슐린, 및 인슐린 글라진으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 D<sup>1</sup> 및 D<sup>2</sup>를 포함하는 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 17**

제11항에 있어서, 각각의 A-쇄 폴리펩티드가 독립적으로 아미노산 서열 GX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>EQCCX<sub>8</sub>SICSLYQLX<sub>17</sub>NX<sub>19</sub>CX<sub>23</sub> (서열식별번호: 3)을 포함하고, 각각의 B-쇄 폴리펩티드가 독립적으로 아미노산 서열 X<sub>25</sub>LCGX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>LVEALYLVCGERGFX<sub>27</sub>YTX<sub>31</sub>X<sub>32</sub> (서열식별번호: 4) 또는 X<sub>22</sub>VNQX<sub>25</sub>X<sub>26</sub>CGX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>LVEALYLVCGERGFX<sub>27</sub>YTX<sub>31</sub>X<sub>32</sub>X<sub>33</sub>X<sub>34</sub>X<sub>35</sub> (서열식별번호: 5)를 포함하며, 여기서 X<sub>2</sub>는 이소류신 또는 트레오닌이고; X<sub>3</sub>은 발린, 글리신, 또는 류신이고; X<sub>8</sub>은 트레오닌 또는 히스티딘이고; X<sub>17</sub>은 글루탐산 또는 글루타민이고; X<sub>19</sub>는 티로신, 4-메톡시-페닐알라닌, 알라닌, 또는 4-아미노 페닐알라닌이고; X<sub>23</sub>은 아스파라긴 또는 글리신이고; X<sub>22</sub>는 페닐알라닌 또는 데스아미노-페닐알라닌이고; X<sub>25</sub>는 히스티딘 또는 트레오닌이고; X<sub>26</sub>은 류신 또는 글리신이고; X<sub>27</sub>은 페닐알라닌 또는 아스파르트산이고; X<sub>29</sub>는 알라닌, 글리신, 또는 세린이고; X<sub>30</sub>은 히스티딘, 아스파르트산, 글루탐산, 호모시스테인, 또는 시스테인이고; X<sub>31</sub>은 아스파르트산, 프롤린, 또는 리신이고; X<sub>32</sub>는 리신 또는 프롤린이고; X<sub>33</sub>은 트레오닌, 알라닌이거나, 또는 부재하고; X<sub>34</sub>는 아르기닌이거나 또는 부재하고; X<sub>35</sub>는 아르기닌이거나 또는 부재하고; 단 X<sub>31</sub> 또는 X<sub>32</sub> 중 적어도 하나는 리신인 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 18**

제11항에 있어서, 연결 모이어티가 2가, 직쇄형 또는 분지형, 포화 또는 불포화, 임의로 치환된 C1-C20 탄화수소쇄를 포함하며, 여기서 1개 이상의 메틸렌 단위는 -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -N(R)SO<sub>2</sub>-, SO<sub>2</sub>N(R)-, 헤테로시클릭 기, 아릴 기, 또는 헤테로아릴 기에 의해 임의로 및 독립적으로 대체되고, 여기서 각 경우의 R은 독립적으로 수소, 적합한 보호 기, 아실 모이어티, 아릴알킬 모이어티, 지방족 모이어티, 아릴 모이어티, 헤테로아릴 모이어티, 또는 헤테로지방족 모이어티, 및 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG)을 포함하는 것인 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 19**

제11항에 있어서, 연결 모이어티가 알킬디오일, -C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(O)-, 아실 모이어티, -C(O)RC(O)-를 포함하며, 여기서 n = 0-4이고, R은 알킬쇄, 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG)쇄, 아마이드-함유쇄, 트리아졸(들)-함유쇄, 시클로옥틴-함유 모이어티, 치환된 아실쇄, 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)쇄인 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 20**

제11항 내지 제19항 중 어느 한 항의 인슐린 수용체 부분 효능제 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물.

**청구항 21**

제1 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체를 포함하며, 각각의 이중이량체는 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드를 포함하는 것인 인슐린 수용체 부분 효능제이며, 여기서 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드는쇄간 디설피드 결합을 통해 함께 연결되고;

여기서 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체는 2개의 각각의 B-쇄 폴리펩티드의 카르복시 말단에 또는 그 근처에 있는 아미노산의 측쇄를 연결하는 연결 모이어티를 통해 함께 공유 연결되고;

임의로 여기서 제1 인슐린 폴리펩티드 또는 제2 인슐린 폴리펩티드의 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드 중 적어도 하나의 아미노 말단은 치환기에 공유 연결되고,

단 (1) 연결 모이어티는 디설피드 결합을 포함하지 않고, (2) A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드의 아미노 말단이 치환기를 포함하지 않는 경우, 연결 모이어티는 옥살릴 (C2) 모이어티, 수베리올 (C8) 모이어티, 또는 도데칸디오일 (C12) 모이어티가 아닌 것인

인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 22**

제21항에 있어서, 인슐린 수용체 부분 효능제가 동일한 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체를 포함하거나 또는 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체가 상이한 것인 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 23**

제21항에 있어서, 제1 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체를 그의 각각의 B-쇄 폴리펩티드의 카르복시 말단에 또는 그 근처에 있는 리신 잔기의 엡실론 아미노 기를 통해 공유 연결하는 연결 모이어티를 포함하는 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 24**

제21항에 있어서, 인슐린 수용체 부분 효능제가 화학식 RC(O)-를 갖는 치환기를 포함하며, 여기서 R은 R'CH<sub>2</sub>, R'NH, R'O일 수 있고, R'는 H, 선형 알킬 쇠, 아미노산, 펩티드, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 및 사카라이드일 수 있는 것인 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 25**

제21항에 있어서, 아세틸, 페닐아세틸, 카르바모일, N-알킬 카르바모일, 이소부틸, 메톡시 아세틸, 글리신, 아미노에틸글루코스 (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, N-디메틸, 및 알콕시카르보닐로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기를 포함하는 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 26**

제21항에 있어서, 천연 인간 인슐린, 인슐린 리스프로, 인슐린 아스파르트, desB30 인슐린, 및 인슐린 글라진으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체를 포함하는 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 27**

제21항에 있어서, 각각의 A-쇄 폴리펩티드가 독립적으로 아미노산 서열 GX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>EQCCX<sub>8</sub>SICSLYQLX<sub>17</sub>NX<sub>19</sub>CX<sub>23</sub> (서열식별번호: 3)을 포함하고, 각각의 B-쇄 폴리펩티드가 독립적으로 아미노산 서열 X<sub>25</sub>LCGX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>LVEALYLVCGERGFX<sub>27</sub>YTX<sub>31</sub>X<sub>32</sub> (서열식별번호: 4) 또는 X<sub>22</sub>VNQX<sub>25</sub>X<sub>26</sub>CGX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>LVEALYLVCGERGFX<sub>27</sub>YTX<sub>31</sub>X<sub>32</sub>X<sub>33</sub>X<sub>34</sub>X<sub>35</sub> (서열식별번호: 5)를 포함하며, 여기서 X<sub>2</sub>는 이소류신 또는 트레오닌이고; X<sub>3</sub>은 발린, 글리신, 또는 류신이고; X<sub>8</sub>은 트레오닌 또는 히스티딘이고; X<sub>17</sub>은 글루탐산 또는 글루타민이고; X<sub>19</sub>는 티로신, 4-메톡시-페닐알라닌, 알라닌, 또는 4-아미노 페닐알라닌이고; X<sub>23</sub>은 아스파라긴 또는 글리신이고; X<sub>25</sub>는 페닐알라닌 또는 데스아미노-페닐알라닌이고; X<sub>26</sub>은 히스티딘 또는 트레오닌이고; X<sub>29</sub>은 류신 또는 글리신이고; X<sub>27</sub>은 페닐알라닌 또는 아스파르트산이고; X<sub>29</sub>은 알라닌, 글리신, 또는 세린이고; X<sub>30</sub>은 히스티딘, 아스파르트산, 글루탐산, 호모시스테인, 또는 시스테인이고; X<sub>31</sub>은 아스파르트산, 프롤린, 또는 리신이고; X<sub>32</sub>는 리신 또는 프롤린이고; X<sub>33</sub>은 트레오닌, 알라닌이거나, 또는 부재하고; X<sub>34</sub>는 아르기닌이거나 또는 부재하고; X<sub>35</sub>는 아르기닌이거나 또는 부재하고; 단 X<sub>31</sub> 또는 X<sub>32</sub> 중 적어도 하나는 리신인 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 28**

제21항에 있어서, 연결 모이어티가 2가, 직쇄형 또는 분지형, 포화 또는 불포화, 임의로 치환된 C1-C20 탄화수

소쇄를 포함하며, 여기서 1개 이상의 메틸렌 단위는 -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -N(R)SO<sub>2</sub>-, SO<sub>2</sub>N(R)-, 헤테로시클릭 기, 아릴 기, 또는 헤테로아릴 기에 의해 임의로 및 독립적으로 대체되고, 여기서 각 경우의 R은 독립적으로 수소, 적합한 보호 기, 아실 모이어티, 아릴알킬 모이어티, 지방족 모이어티, 아릴 모이어티, 헤테로아릴 모이어티, 또는 헤테로지방족 모이어티, 및 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG)을 포함하는 것인 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 29**

제21항에 있어서, 연결 모이어티가 알킬디오일, -C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(O)-, 아실 모이어티, -C(O)RC(O)-를 포함하며, 여기서 n = 0-4이고, R은 알킬쇄, 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG)쇄, 아마이드-함유쇄, 트리아졸(들)-함유쇄, 시클로옥틴-함유 모이어티, 치환된 아실쇄, 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)쇄인 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 30**

제21항 내지 제29항 중 어느 한 항의 인슐린 수용체 부분 효능제 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물.

**청구항 31**

하기 화학식을 포함하는 인슐린 수용체 부분 효능제.



여기서 D<sup>1</sup> 및 D<sup>2</sup>는 각각 독립적으로 인슐린 또는 인슐린 유사체 폴리펩티드이고, 여기서 각각의 인슐린 폴리펩티드는 쇠간 디설피드 결합을 통해 함께 연결된 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드를 포함하는 이중이량체이고;

L은 연결 모이어티이며, 여기서 링커 모이어티의 하나의 말단은 D<sup>1</sup>의 카르복실기에 또는 그 근처에 있는 아미노산 잔기에 부착되고, 링커 모이어티의 다른 말단은 D<sup>2</sup>의 카르복실 말단에 또는 그 근처에 있는 아미노산 잔기에 부착되고, 단 L은 디설피드 연결을 포함하지 않고;

임의로, 여기서 D<sup>1</sup> 또는 D<sup>2</sup> 중 적어도 하나는 D<sup>1</sup> 또는 D<sup>2</sup>의 A-쇄 폴리펩티드 또는 B-쇄 폴리펩티드의 아미노 말단에 부착된 치환기를 포함하고;

단 (1) 연결 모이어티는 디설피드 결합을 포함하지 않고, (2) 인슐린 또는 인슐린 유사체가 인간 인슐린 또는 인슐린 유사체가 아니고 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드의 아미노 말단이 치환기를 포함하지 않는 경우, 연결 모이어티는 옥살릴 (C2) 모이어티, 수베리올 (C8) 모이어티, 또는 도데칸디오일 (C12) 모이어티가 아니다.

**청구항 32**

제31항에 있어서, 인슐린 수용체 부분 효능제가 동일한 D<sup>1</sup> 및 D<sup>2</sup>를 포함하거나 또는 D<sup>1</sup> 및 D<sup>2</sup>가 상이한 것인 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 33**

제31항에 있어서, D<sup>1</sup> 및 D<sup>2</sup>의 카르복시 말단에 또는 그 근처에 있는 리신 잔기의 엡실론 아미노기를 통해 D<sup>1</sup> 및 D<sup>2</sup>를 공유 연결하는 연결 모이어티를 포함하는 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 34**

제31항에 있어서, 치환기가 화학식 RC(O)-를 포함하며, 여기서 R은 R'CH<sub>2</sub>, R'NH, R'O일 수 있고, R'는 H, 선형 알킬쇄, 아미노산, 펩티드, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 및 사카라이드일 수 있는 것인 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 35**

제31항에 있어서, 아세틸, 페닐아세틸, 카르바모일, N-알킬 카르바모일, 이소부틸, 메톡시 아세틸, 글리신, 아미노에틸글루코스 (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, N-디메틸, 및 알콕시카르보닐로 이루어진 군으로부터 선택된 치

환기를 포함하는 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 36**

제31항에 있어서, 천연 인간 인슐린, 인슐린 리스프로, 인슐린 아스파르트, desB30 인슐린, 및 인슐린 글라진으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된  $D^1$  및  $D^2$ 를 포함하는 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 37**

제31항에 있어서, 각각의 A-쇄 폴리펩티드가 독립적으로 아미노산 서열  $GX_2X_3EQCCX_8SICSLYQLX_{17}NX_{19}CX_{23}$  (서열식별번호: 3)을 포함하고, 각각의 B-쇄 폴리펩티드가 독립적으로 아미노산 서열  $X_{25}LCGX_{29}X_{30}LVEALYLVCGERGFYTX_{31}X_{32}$  (서열식별번호: 4) 또는  $X_{22}VNX_{25}X_{26}CGX_{29}X_{30}LVEALYLVCGERGFYTX_{31}X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}$  (서열식별번호: 5)를 포함하며, 여기서  $X_2$ 는 이소류신 또는 트레오닌이고;  $X_3$ 은 발린, 글리신, 또는 류신이고;  $X_8$ 은 트레오닌 또는 히스티딘이고;  $X_{17}$ 은 글루탐산 또는 글루타민이고;  $X_{19}$ 는 티로신, 4-메톡시-페닐알라닌, 알라닌, 또는 4-아미노 페닐알라닌이고;  $X_{23}$ 은 아스파라긴 또는 글리신이고;  $X_{25}$ 는 페닐알라닌 또는 데스아미노-페닐알라닌이고;  $X_{26}$ 는 히스티딘 또는 트레오닌이고;  $X_{29}$ 은 류신 또는 글리신이고;  $X_{30}$ 은 페닐알라닌 또는 아스파르트산이고;  $X_{31}$ 은 알라닌, 글리신, 또는 세린이고;  $X_{32}$ 은 히스티딘, 아스파르트산, 글루탐산, 호모시스테인, 또는 시스테인이고;  $X_{33}$ 은 아스파르트산, 프롤린, 또는 리신이고;  $X_{34}$ 는 리신 또는 프롤린이고;  $X_{35}$ 은 트레오닌, 알라닌이거나, 또는 부재하고;  $X_{36}$ 은 아르기닌이거나 또는 부재하고;  $X_{37}$ 은 아르기닌이거나 또는 부재하고; 단  $X_{31}$  또는  $X_{32}$  중 적어도 하나는 리신인 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 38**

제31항에 있어서, 연결 모이어티가 2가, 직쇄형 또는 분지형, 포화 또는 불포화, 임의로 치환된 C1-C20 탄화수소쇄를 포함하며, 여기서 1개 이상의 메틸렌 단위는 -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -N(R)SO<sub>2</sub>-, SO<sub>2</sub>N(R)-, 헤테로시클릭 기, 아릴 기, 또는 헤테로아릴 기에 의해 임의로 및 독립적으로 대체되고, 여기서 각 경우의 R은 독립적으로 수소, 적합한 보호 기, 아실 모이어티, 아릴알킬 모이어티, 지방족 모이어티, 아릴 모이어티, 헤테로아릴 모이어티, 또는 헤테로지방족 모이어티, 및 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG)을 포함하는 것인 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 39**

제31항에 있어서, 연결 모이어티가 알킬디오일, -C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(O)-, 아실 모이어티, -C(O)RC(O)-를 포함하며, 여기서 n = 0-4이고, R은 알킬쇄, 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG)쇄, 아마이드-함유쇄, 트리아졸(들)-함유쇄, 시클로옥틴-함유 모이어티, 치환된 아실쇄, 또는 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG)쇄인 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 40**

제31항 내지 제39항 중 어느 한 항의 인슐린 수용체 부분 효능제 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물.

**청구항 41**

제1 인슐린 유사체 이중이량체 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체를 포함하며, 각각의 이중이량체는 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드를 포함하는 것인 인슐린 유사체 이량체이며, 여기서 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드는쇄간 디설피드 결합을 통해 함께 연결되고;

여기서 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체는 2개의 각각의 B-쇄 폴리펩티드의 카르복시 말단에 또는 그 근처에 있는 아미노산의 측쇄를 연결하는 연결 모이어티를 통해 함께 공유 연결되고;

여기서 인슐린 유사체는 인슐린 리스프로, 인슐린 아스파르트, desB30 인슐린, 및 인슐린 글라진으로부터 선택되고;

임의로 여기서 제1 인슐린 폴리펩티드 또는 제2 인슐린 폴리펩티드의 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드 중 적어도 하나의 아미노 말단은 치환기에 공유 연결되고,

단 연결 모이어티는 디설피드 결합을 포함하지 않는 것인  
인슐린 유사체 이량체.

**청구항 42**

제41항에 있어서, 인슐린 유사체 이량체가 동일한 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체를 포함하거나 또는 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체가 상이한 것인 인슐린 유사체 이량체.

**청구항 43**

제41항에 있어서, 제1 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체를 그의 각각의 B-쇄 폴리펩티드의 카르복시 말단에 또는 그 근처에 있는 리신 잔기의 엡실론 아미노 기를 통해 공유 연결하는 연결 모이어티를 포함하는 인슐린 유사체 이량체.

**청구항 44**

제41항에 있어서, 치환기가 화학식 RC(O)-를 포함하며, 여기서 R은 R'CH<sub>2</sub>, R'NH, R'O일 수 있고, R'는 H, 선형 알킬 쇠, 아미노산, 펩티드, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 및 사카라이드일 수 있는 것인 인슐린 유사체 이량체.

**청구항 45**

제41항에 있어서, 인슐린 이량체가 아세틸, 페닐아세틸, 카르바모일, N-알킬 카르바모일, 이소부틸, 메톡시 아세틸, 글리신, 아미노에틸글루코스 (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, N-디메틸, 및 알콕시카르보닐로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기에 접합된 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 중 적어도 하나를 포함하는 것인 인슐린 유사체 이량체.

**청구항 46**

제41항에 있어서, 연결 모이어티가 2가, 직쇄형 또는 분지형, 포화 또는 불포화, 임의로 치환된 C1-C20 탄화수소 쇠를 포함하며, 여기서 1개 이상의 메틸렌 단위는 -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -N(R)SO<sub>2</sub>-, SO<sub>2</sub>N(R)-, 헤테로시클릭 기, 아릴 기, 또는 헤테로아릴 기에 의해 임의로 및 독립적으로 대체되고, 각 경우의 R은 독립적으로 수소, 적합한 보호 기, 아실 모이어티, 아릴알킬 모이어티, 지방족 모이어티, 아릴 모이어티, 헤테로아릴 모이어티, 또는 헤테로지방족 모이어티, 및 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG)을 포함하는 것인 인슐린 유사체 이량체.

**청구항 47**

제41항에 있어서, 연결 모이어티가 알킬디오일, -C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(O)-, 아실 모이어티, -C(O)RC(O)-를 포함하며, 여기서 n = 0-4이고, R은 알킬 쇠, 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 쇠, 아미드-함유 쇠, 트리아졸(들)-함유 쇠, 시클로옥틴-함유 모이어티, 치환된 아실 쇠, 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 쇠인 인슐린 유사체 이량체.

**청구항 48**

제41항 내지 제47항 중 어느 한 항의 인슐린 유사체 이량체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물.

**청구항 49**

하기 화학식을 포함하는 인슐린 유사체 이량체.



여기서 D<sup>1</sup> 및 D<sup>2</sup>는 각각 독립적으로 인슐린 또는 인슐린 유사체 폴리펩티드이고, 여기서 각각의 인슐린 폴리펩티드는 쇠간 디설피드 결합을 통해 함께 연결된 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드를 포함하는 이중이량체이고;

L은 연결 모이어티이며, 여기서 링커 모이어티의 하나의 말단은 D<sup>1</sup>의 카르복실 기에 또는 그 근처에 있는 아미노산 잔기에 부착되고, 링커 모이어티의 다른 말단은 D<sup>2</sup>의 카르복실 말단에 또는 그 근처에 있는 아미노산 잔기에 부착되고, 단 L은 디설피드 연결을 포함하지 않고;

여기서 인슐린 유사체는 인슐린 리스프로, 인슐린 아스파르트, desB30 인슐린, 및 인슐린 글라진으로부터 선택되고;

임의로, 여기서  $D^1$  또는  $D^2$  중 적어도 하나는  $D^1$  또는  $D^2$ 의 A-쇄 폴리펩티드 또는 B-쇄 폴리펩티드의 아미노 말단에 부착된 치환기를 포함하고;

단 연결 모이어티는 디설피드 결합을 포함하지 않는다.

**청구항 50**

제49항에 있어서, 인슐린 유사체 이량체가 동일한  $D^1$  및  $D^2$ 를 포함하거나 또는  $D^1$  및  $D^2$ 가 상이한 것인 인슐린 유사체 이량체.

**청구항 51**

제49항에 있어서,  $D^1$  및  $D^2$ 의 카르복시 말단에 또는 그 근처에 있는 리신 잔기의 엡실론 아미노 기를 통해  $D^1$  및  $D^2$ 를 공유 연결하는 연결 모이어티를 포함하는 인슐린 유사체 이량체.

**청구항 52**

제49항에 있어서, 치환기가 화학식  $RC(O)-$ 를 포함하며, 여기서 R은  $R'CH_2$ ,  $R'NH$ ,  $R'O$ 일 수 있고, R'는 H, 선형 알킬 쇠, 아미노산, 펩티드, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 및 사카라이드일 수 있는 것인 인슐린 유사체 이량체.

**청구항 53**

제49항에 있어서, 아세틸, 페닐아세틸, 카르바모일, N-알킬 카르바모일, 이소부틸, 메톡시 아세틸, 글리신, 아미노에틸글루코스 (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, N-디메틸, 및 알콕시카르보닐로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기를 포함하는 인슐린 유사체 이량체.

**청구항 54**

제49항에 있어서, 연결 모이어티가 2가, 직쇄형 또는 분지형, 포화 또는 불포화, 임의로 치환된 C1-C20 탄화수소 쇠를 포함하며, 여기서 1개 이상의 메틸렌 단위는  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-N(R)-$ ,  $-C(O)-$ ,  $C(O)O-$ ,  $OC(O)-$ ,  $-N(R)C(O)-$ ,  $-C(O)N(R)-$ ,  $-S(O)-$ ,  $-S(O)_2-$ ,  $-N(R)SO_2-$ ,  $SO_2N(R)-$ , 헤테로시클릭 기, 아릴 기, 또는 헤테로아릴 기에 의해 임의로 및 독립적으로 대체되고, 여기서 각 경우의 R은 독립적으로 수소, 적합한 보호 기, 아실 모이어티, 아릴알킬 모이어티, 지방족 모이어티, 아릴 모이어티, 헤테로아릴 모이어티, 또는 헤테로지방족 모이어티, 및 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG)을 포함하는 것인 인슐린 유사체 이량체.

**청구항 55**

제49항에 있어서, 연결 모이어티가 알킬디오일,  $-C(O)(CH_2)_nC(O)-$ , 아실 모이어티,  $-C(O)RC(O)-$ 를 포함하며, 여기서  $n = 0-4$ 이고, R은 알킬 쇠, 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 쇠, 아마이드-함유 쇠, 트리아졸(들)-함유 쇠, 시클로옥틴-함유 모이어티, 치환된 아실 쇠, 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 쇠인 인슐린 유사체 이량체.

**청구항 56**

제49항 내지 제55항 중 어느 한 항의 인슐린 유사체 이량체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물.

**청구항 57**

제1 인슐린 또는 인슐린 유사체 이종이량체 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이종이량체를 포함하며, 각각의 이종이량체는 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드를 포함하는 것인 인슐린 수용체 부분 효능제이며, 여기서 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드는 쇠간 디설피드 결합을 통해 함께 연결되고;

여기서 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이종이량체는 2개의 각각의 B-쇄 폴리펩티드의 카르복시 말단에 또는 그 근처에 있는 아미노산의 측쇄를 연결하는 연결 모이어티를 통해 함께 공유 연결되고;

임의로 여기서 제1 인슐린 폴리펩티드 또는 제2 인슐린 폴리펩티드의 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드 중

적어도 하나의 아미노 말단은 치환기에 공유 연결되고; 여기서 인슐린 수용체 부분 효능제의 인간 인슐린 수용체 (IR)를 향한 최대 반응은 기능적 인산화 검정에 의해 결정시에 IR을 향한 천연 인간 인슐린의 최대 반응의 약 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 또는 70%인

인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 58**

제57항에 있어서, 인슐린 수용체 부분 효능제가 디술피드 결합을 포함하지 않는 연결 모이어티를 포함하며, A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드의 아미노 말단이 치환기를 포함하지 않는 경우, 연결 모이어티는 옥살릴 (C2) 모이어티, 수베리올 (C8) 모이어티, 또는 도데칸디오일 (C12) 모이어티가 아닌 것인 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 59**

제57항에 있어서, 인슐린 수용체 부분 효능제가 동일한 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체를 포함하거나 또는 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체가 상이한 것인 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 60**

제57항에 있어서, 인슐린 수용체 이량체가 제1 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체를 그의 각각의 B-쇄 폴리펩티드의 카르복시 말단에 또는 그 근처에 있는 리신 잔기의 엡실론 아미노 기를 통해 공유 연결하는 연결 모이어티를 포함하는 것인 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 61**

제57항에 있어서, 치환기가 화학식 RC(O)-를 포함하며, 여기서 R은 R'CH<sub>2</sub>, R'NH, R'O일 수 있고, R'는 H, 선형 알킬 쇠, 아미노산, 펩티드, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 및 사카라이드일 수 있는 것인 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 62**

제57항에 있어서, 아세틸, 페닐아세틸, 카르바모일, N-알킬 카르바모일, 이소부틸, 메톡시 아세틸, 글리신, 아미노에틸글루코스 (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, N-디메틸, 및 알콕시카르보닐로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기를 포함하는 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 63**

제57항에 있어서, 독립적으로 천연 인간 인슐린, 인슐린 리스프로, 인슐린 아스파르트, desB30 인슐린, 또는 인슐린 글라진인 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체를 포함하는 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 64**

제57항에 있어서, 각각의 A-쇄 폴리펩티드가 독립적으로 아미노산 서열 GX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>EQCCX<sub>8</sub>SICSLYQLX<sub>17</sub>NX<sub>19</sub>CX<sub>23</sub> (서열식별번호: 3)을 포함하고, 각각의 B-쇄 폴리펩티드가 독립적으로 아미노산 서열 X<sub>25</sub>LCGX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>LVEALYLVCGERGFX<sub>27</sub>YTX<sub>31</sub>X<sub>32</sub> (서열식별번호: 4) 또는 X<sub>22</sub>VNQX<sub>25</sub>X<sub>26</sub>CGX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>LVEALYLVCGERGFX<sub>27</sub>YTX<sub>31</sub>X<sub>32</sub>X<sub>33</sub>X<sub>34</sub>X<sub>35</sub> (서열식별번호: 5)를 포함하며, 여기서 X<sub>2</sub>는 이소류신 또는 트레오닌이고; X<sub>3</sub>은 발린, 글리신, 또는 류신이고; X<sub>8</sub>은 트레오닌 또는 히스티딘이고; X<sub>17</sub>은 글루탐산 또는 글루타민이고; X<sub>19</sub>는 티로신, 4-메톡시-페닐알라닌, 알라닌, 또는 4-아미노 페닐알라닌이고; X<sub>23</sub>은 아스파라긴 또는 글리신이고; X<sub>25</sub>는 페닐알라닌 또는 데스아미노-페닐알라닌이고; X<sub>26</sub>은 히스티딘 또는 트레오닌이고; X<sub>29</sub>은 류신 또는 글리신이고; X<sub>27</sub>은 페닐알라닌 또는 아스파르트산이고; X<sub>29</sub>는 알라닌, 글리신, 또는 세린이고; X<sub>30</sub>은 히스티딘, 아스파르트산, 글루탐산, 호모시스테인, 또는 시스테인이고; X<sub>31</sub>은 아스파르트산, 프롤린, 또는 리신이고; X<sub>32</sub>는 리신 또는 프롤린이고; X<sub>33</sub>은 트레오닌, 알라닌이거나, 또는 부재하고; X<sub>34</sub>는 아르기닌이거나 또는 부재하고; X<sub>35</sub>는 아르기닌이거나 또는 부재하고; 단 X<sub>31</sub> 또는 X<sub>32</sub> 중 적어도 하나는 리신인 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 65**

제57항에 있어서, 연결 모이어티가 2가, 직쇄형 또는 분지형, 포화 또는 불포화, 임의로 치환된 C1-C20 탄화수소쇄를 포함하고, 여기서 1개 이상의 메틸렌 단위가 -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -N(R)SO<sub>2</sub>-, SO<sub>2</sub>N(R)-, 헤테로시클릭 기, 아릴 기, 또는 헤테로아릴 기에 의해 임의로 및 독립적으로 대체되고, 여기서 각 경우의 R은 독립적으로 수소, 적합한 보호 기, 아실 모이어티, 아릴알킬 모이어티, 지방족 모이어티, 아릴 모이어티, 헤테로아릴 모이어티, 또는 헤테로지방족 모이어티, 및 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG)을 포함하는 것인 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 66**

제57항에 있어서, 연결 모이어티가 알킬디오일, -C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(O)-, 아실 모이어티, -C(O)RC(O)-를 포함하며, 여기서 n = 0-4이고, R은 알킬쇄, 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG)쇄, 아마이드-함유쇄, 트리아졸(들)-함유쇄, 시클로옥틴-함유 모이어티, 치환된 아실쇄, 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)쇄인 인슐린 수용체 부분 효능제.

**청구항 67**

제57항 내지 제66항 중 어느 한 항의 인슐린 수용체 부분 효능제 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물.

**청구항 68**

제1항 내지 제9항, 제11항 내지 제19항, 제21항 내지 제29항, 제31항 내지 제39항, 제41항 내지 제47항, 제49항 내지 제55항, 및 제57항 내지 제66항 중 어느 한 항의 인슐린 수용체 부분 효능제를 포함하는 조성물의 치료 유효량을 당뇨병을 갖는 개체에 투여하는 것을 포함하는, 당뇨병을 치료하는 방법.

**청구항 69**

제68항에 있어서, 당뇨병이 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병 또는 임신성 당뇨병인 방법.

**청구항 70**

제1항 내지 제9항, 제11항 내지 제19항, 제21항 내지 제29항, 제31항 내지 제39항, 제41항 내지 제47항, 제49항 내지 제55항, 및 제57항 내지 제66항 중 어느 한 항의 인슐린 수용체 부분 효능제를 포함하는, 당뇨병의 치료를 위한 조성물.

**청구항 71**

제70항에 있어서, 당뇨병이 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병 또는 임신성 당뇨병인 조성물.

**청구항 72**

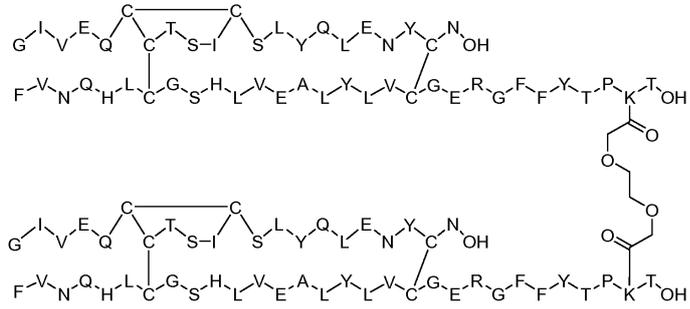
당뇨병의 치료를 위한 의약의 제조를 위한, 제1항 내지 제9항, 제11항 내지 제19항, 제21항 내지 제29항, 제31항 내지 제39항, 제41항 내지 제47항, 제49항 내지 제55항, 및 제57항 내지 제66항 중 어느 한 항의 인슐린 수용체 부분 효능제의 용도.

**청구항 73**

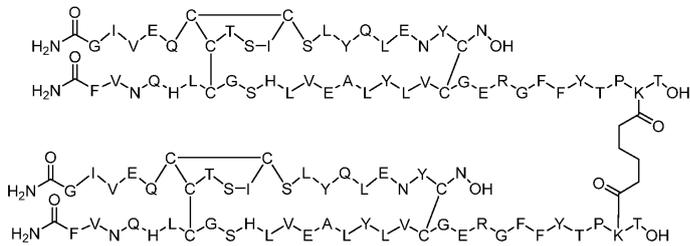
제72항에 있어서, 당뇨병이 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병 또는 임신성 당뇨병인 용도.

청구항 74

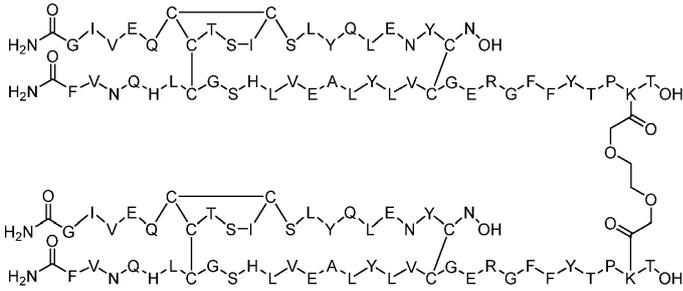
하기로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물:



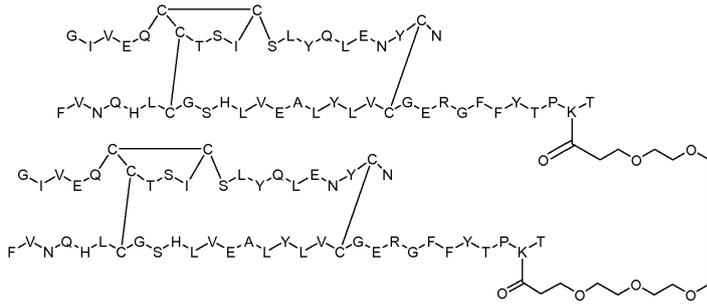
이량체 1;



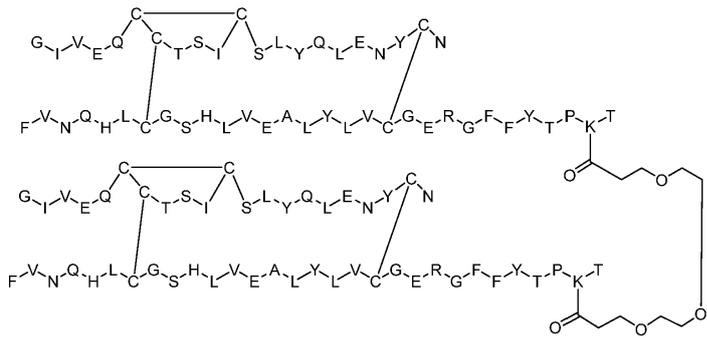
이량체 2;



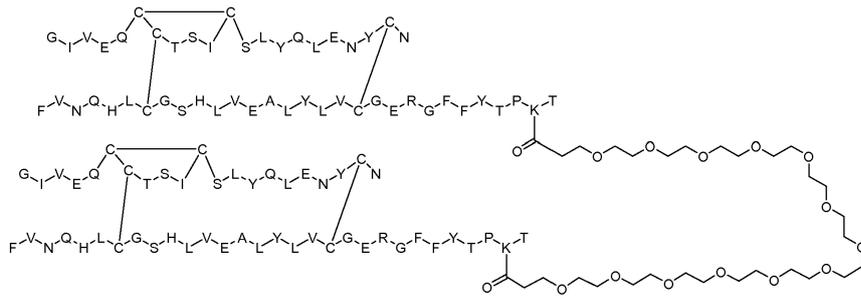
이량체 3;



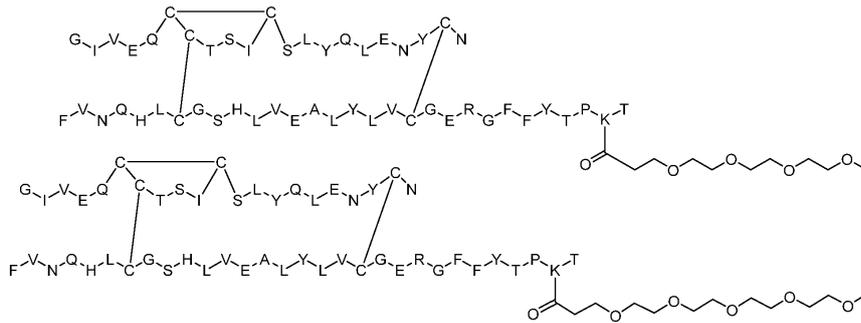
이량체 4;



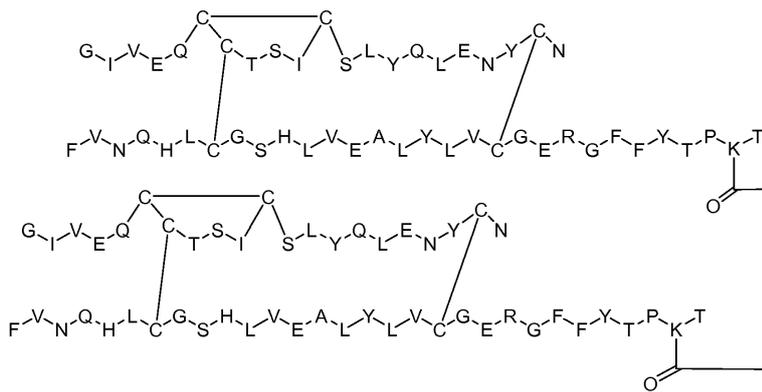
이량체 5;



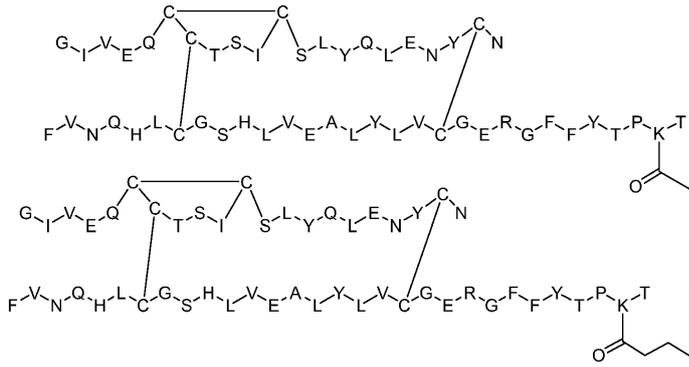
이량체 6;



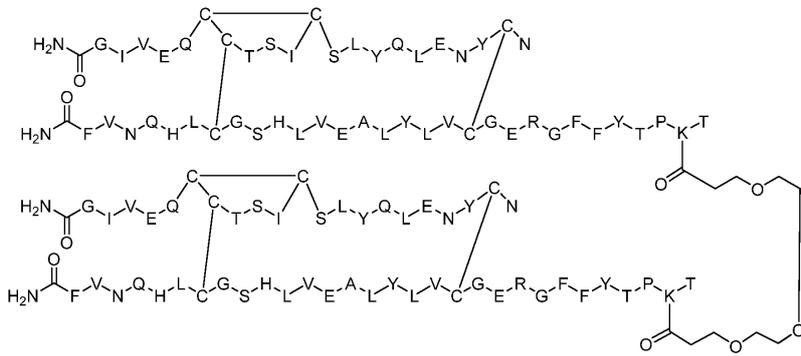
이량체 7;



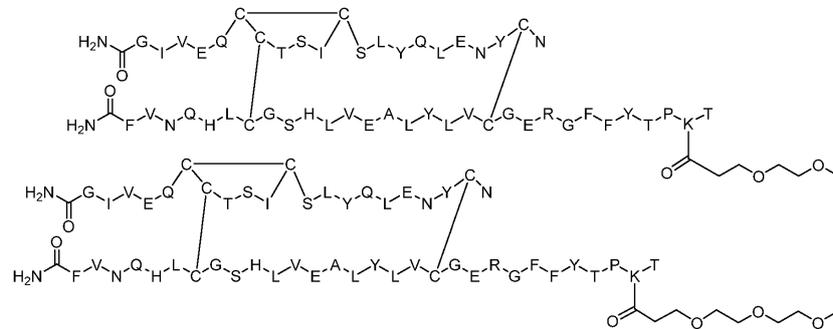
이량체 8;



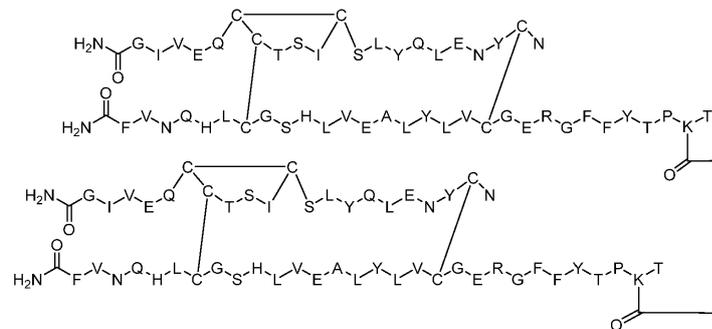
이량체 9;



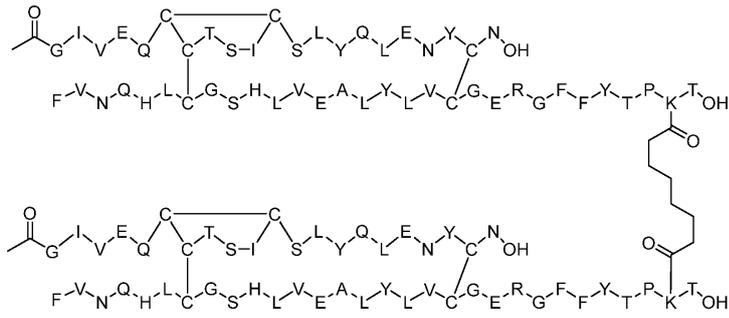
이량체 10;



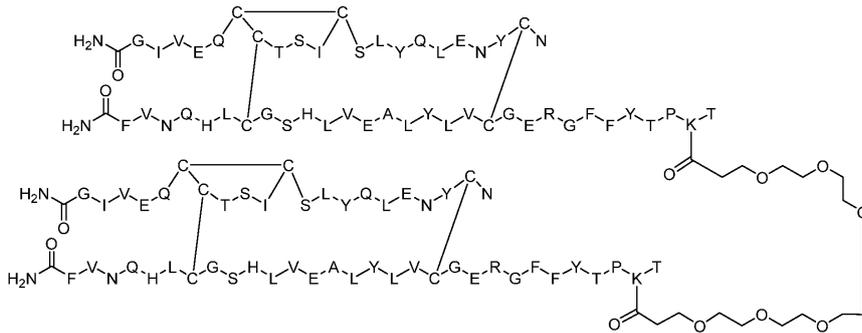
이량체 11;



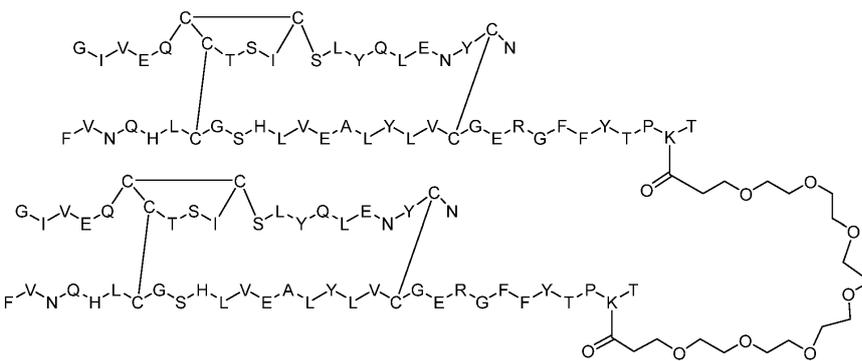
이량체 12;



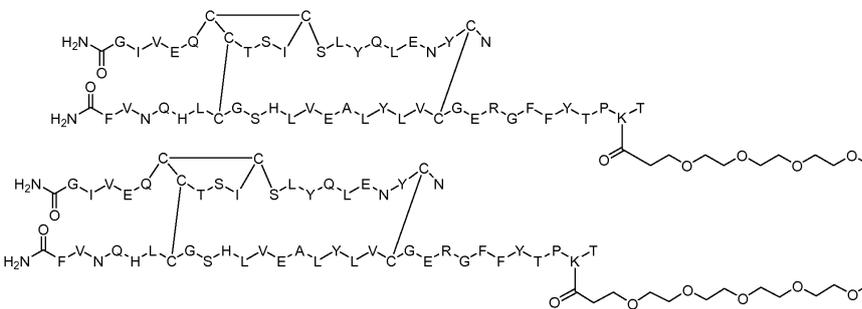
이량체 13;



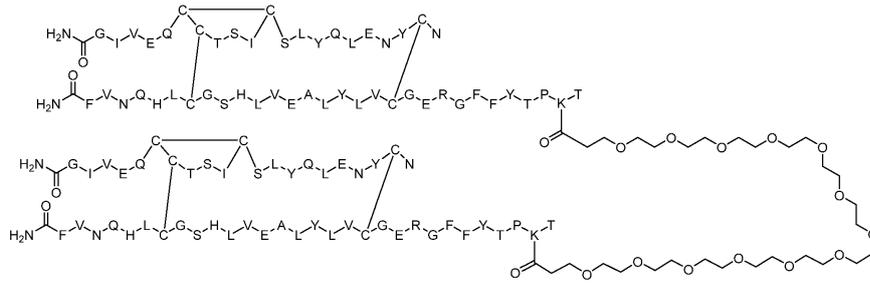
이량체 14;



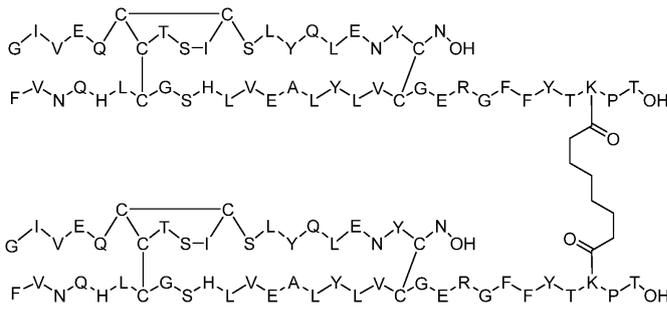
이량체 15;



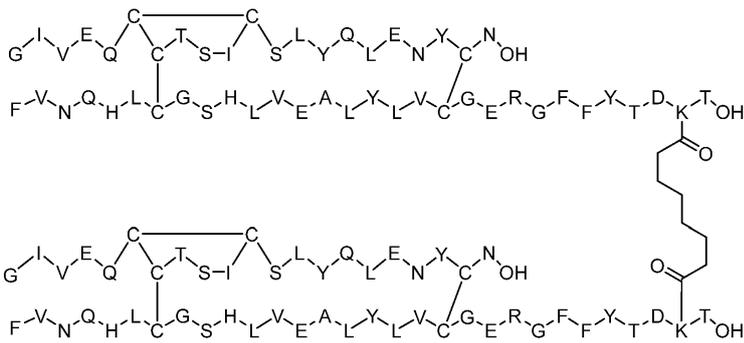
이량체 16;



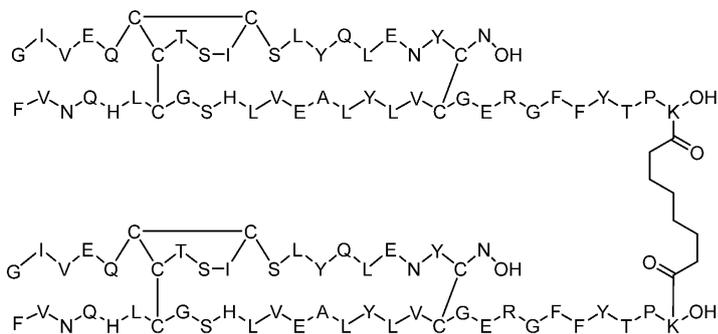
이량체 17;



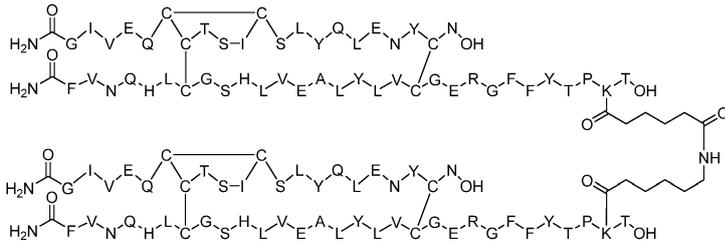
이량체 18;



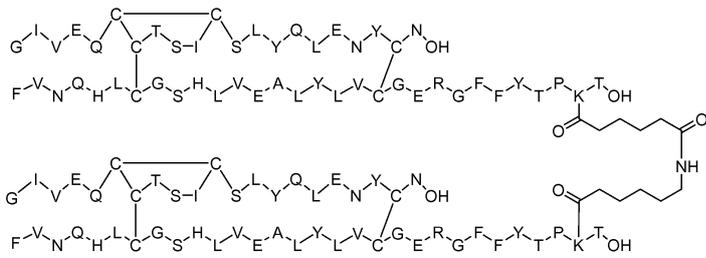
이량체 19;



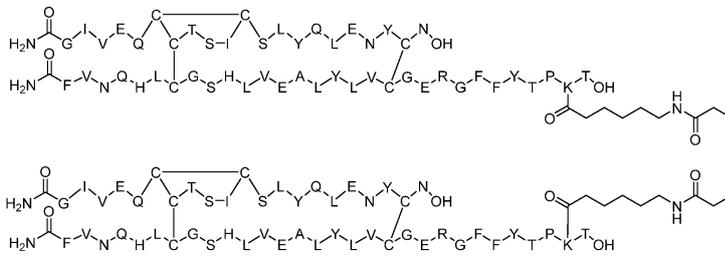
이량체 20;



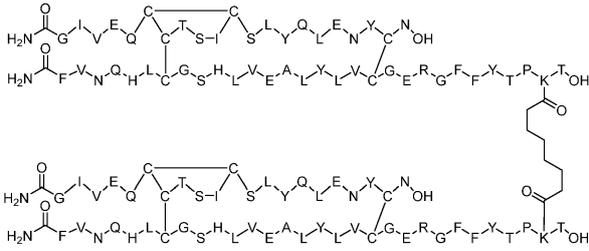
이량체 21;



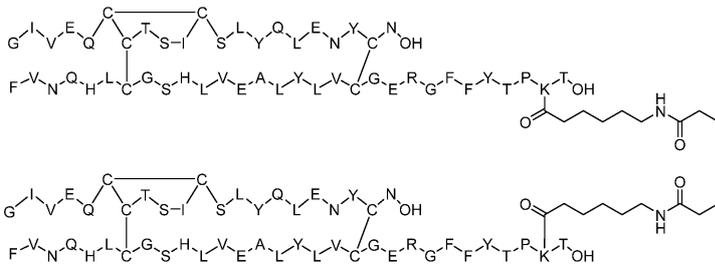
이량체 22;



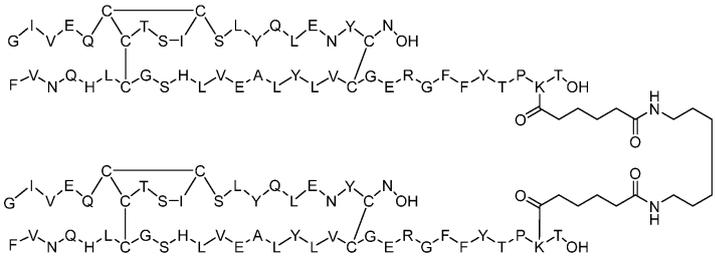
이량체 23;



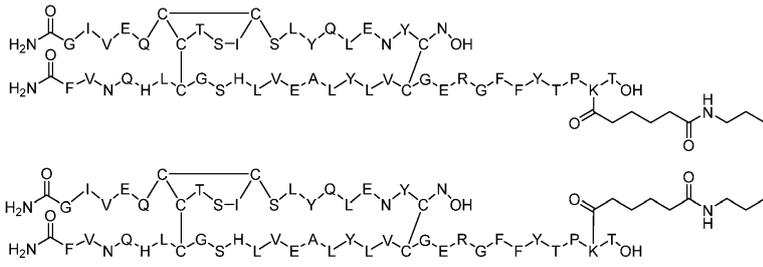
이량체 24;



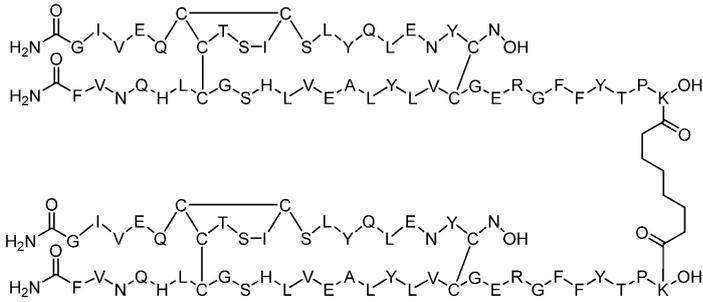
이량체 25;



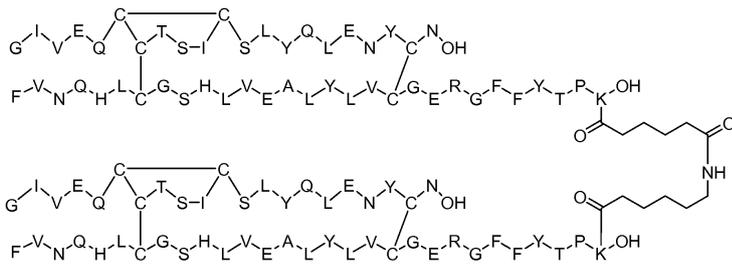
이량체 26;



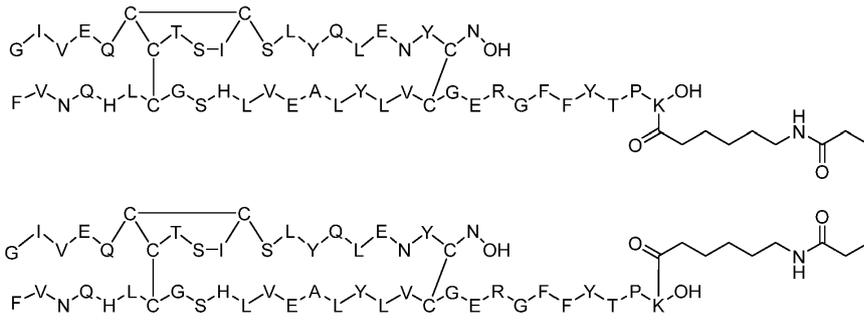
이량체 27;



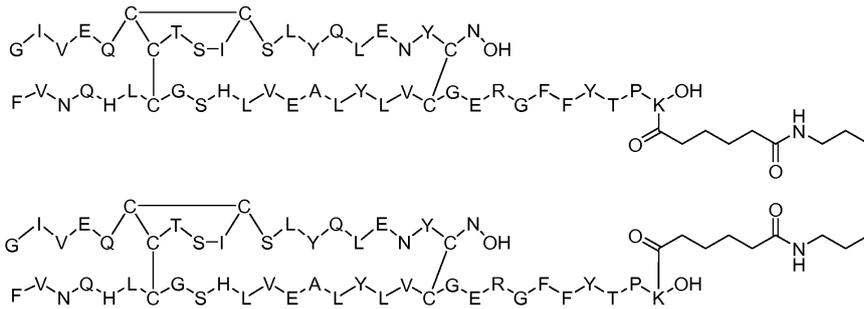
이량체 28;



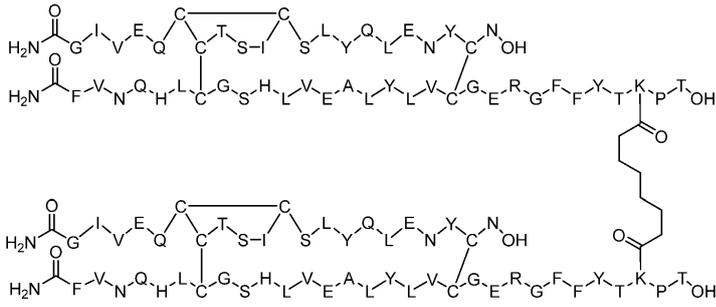
이량체 29;



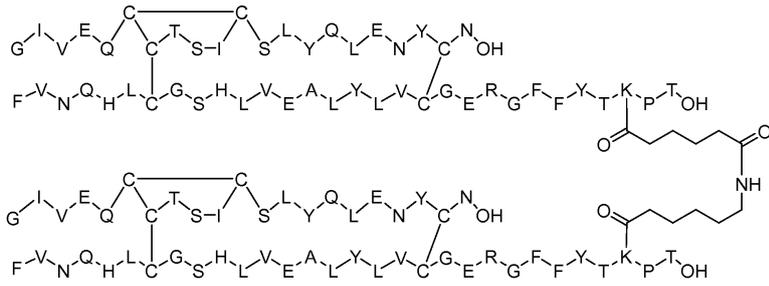
이량체 30;



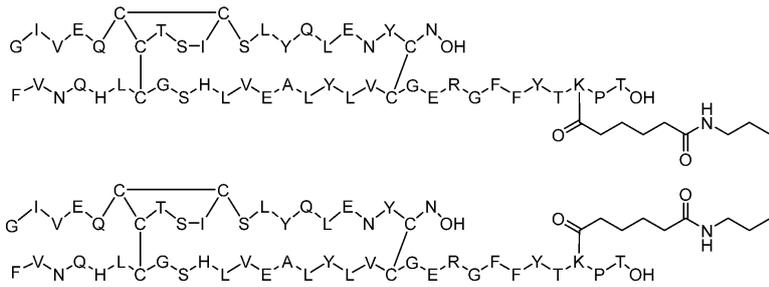
이량체 31;



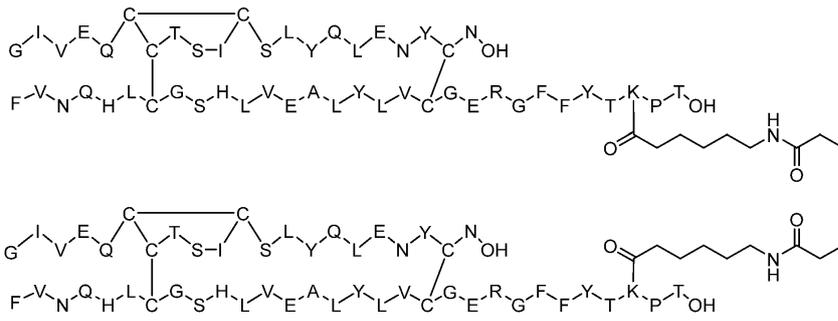
이량체 32;



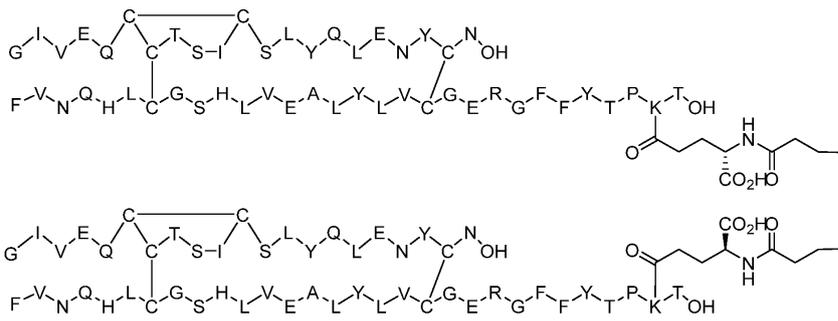
이량체 33;



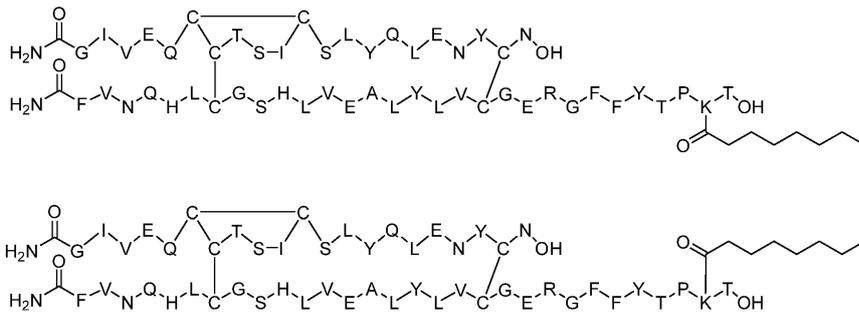
이량체 34;



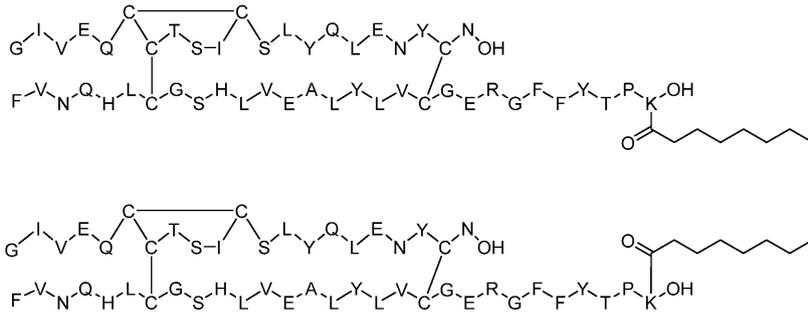
이량체 35;



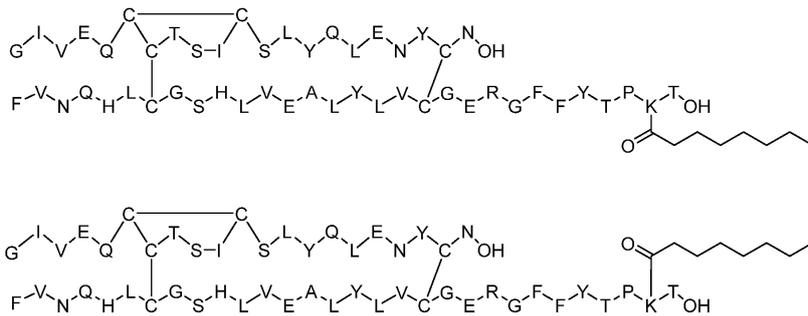
이량체 36;



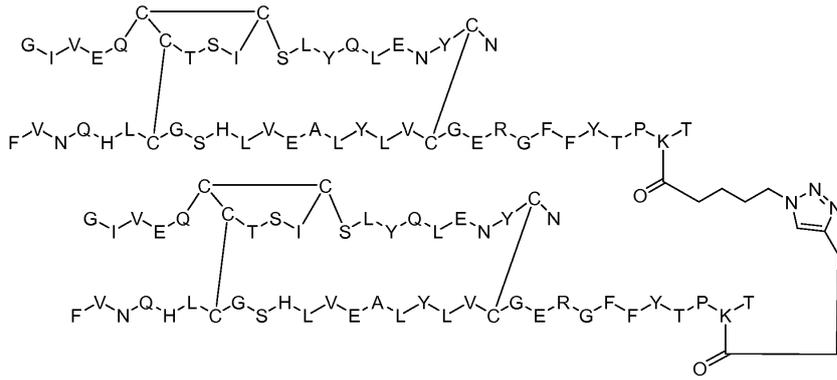
이량체 37;



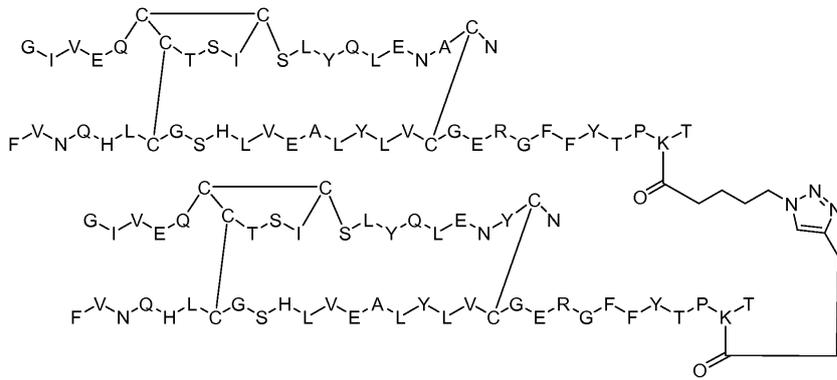
이량체 38;



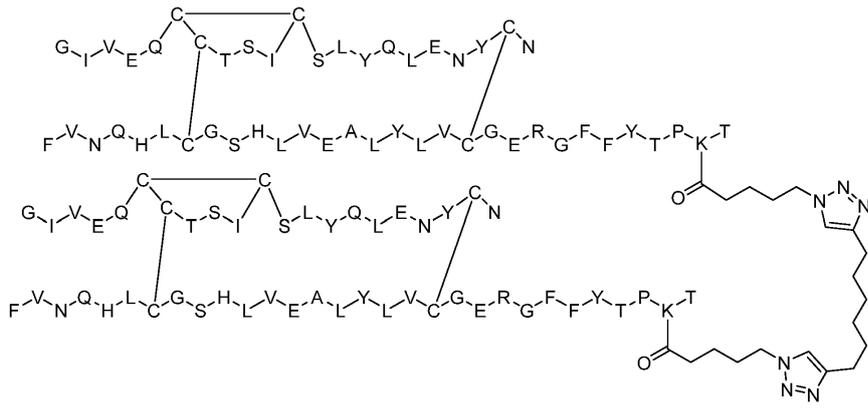
이량체 39;



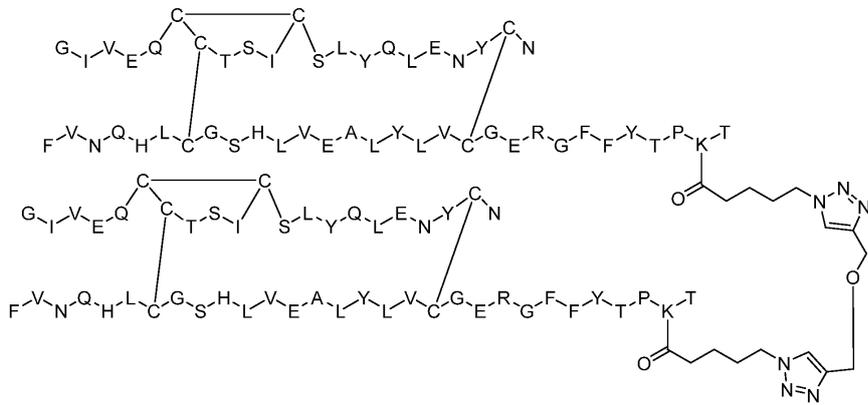
이량체 40;



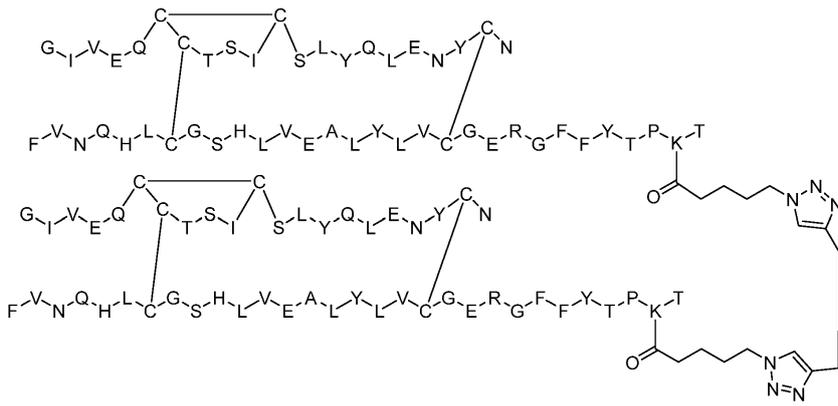
이량체 41;



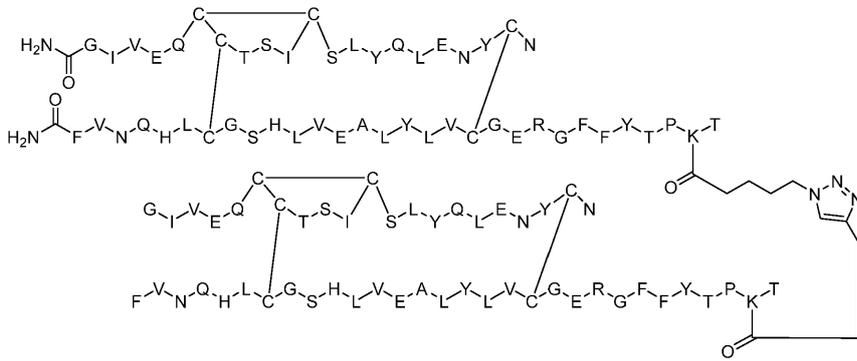
이량체 42;



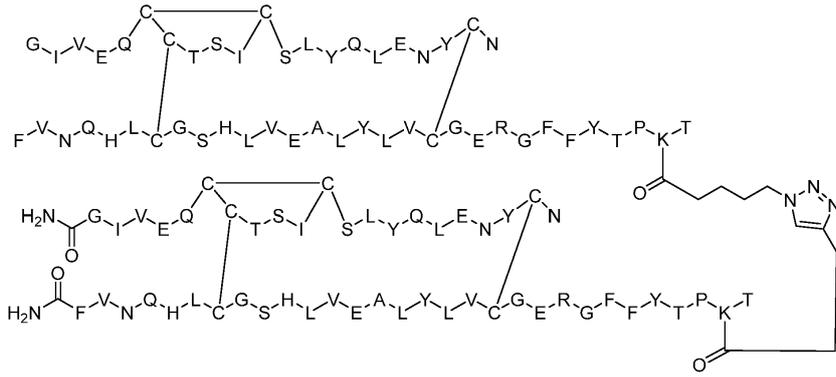
이량체 43;



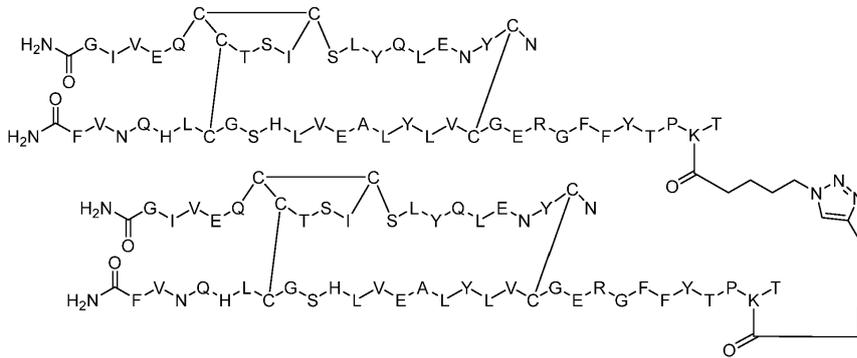
이량체 44;



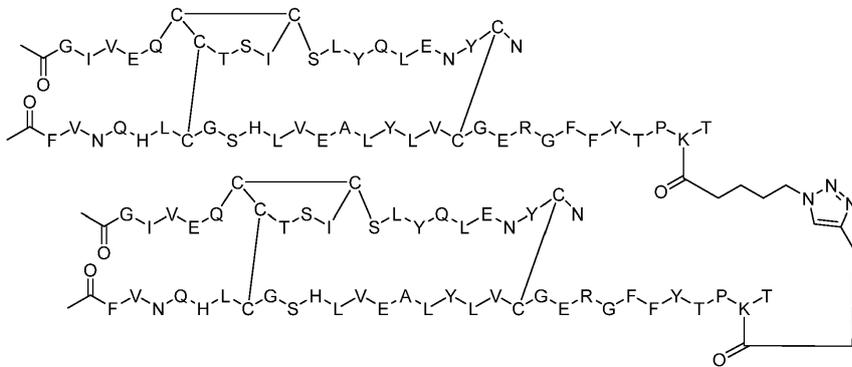
이량체 45;



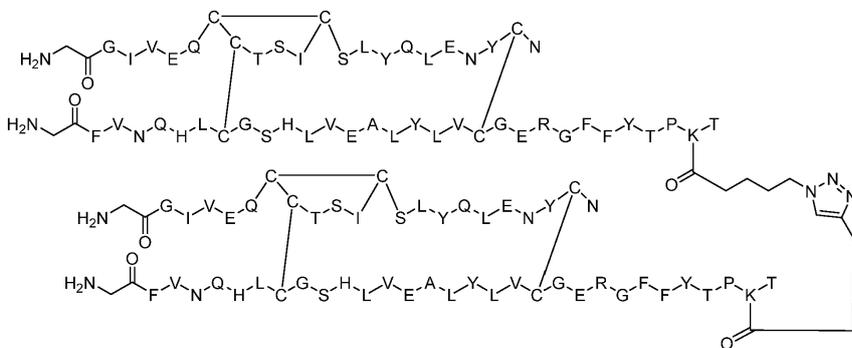
이량체 46;



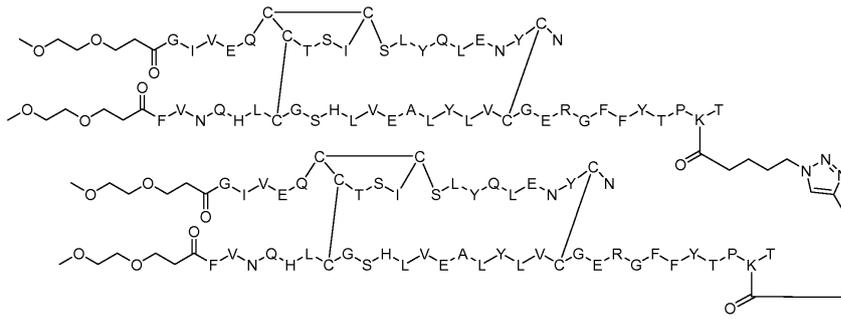
이량체 47;



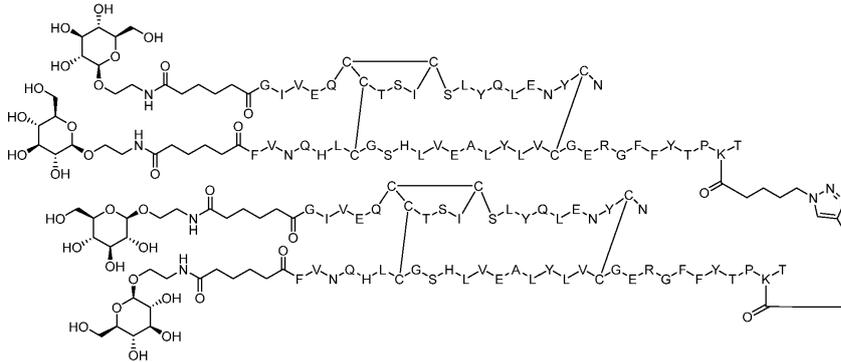
이량체 48;



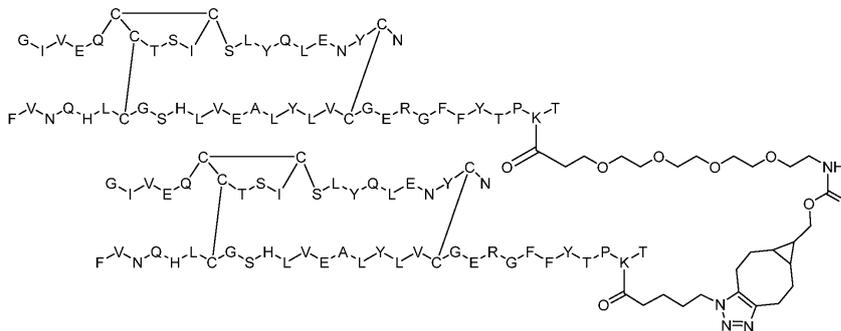
이량체 49;



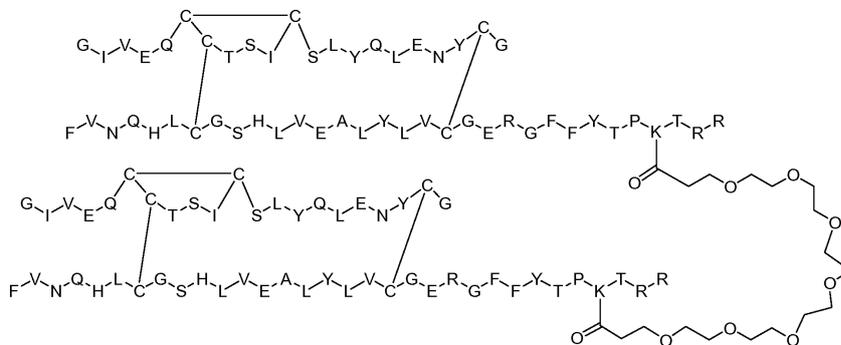
이량체 50;



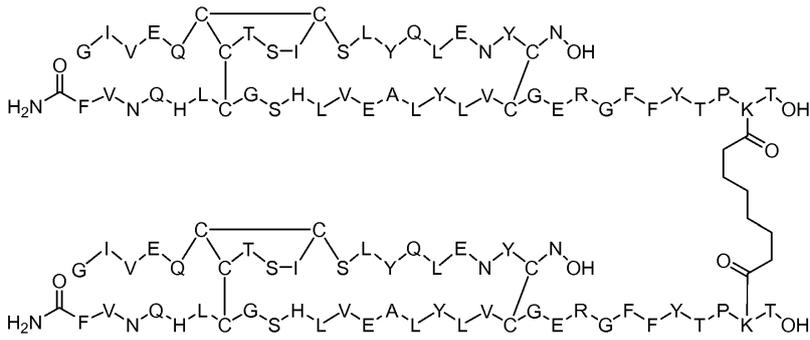
이량체 51;



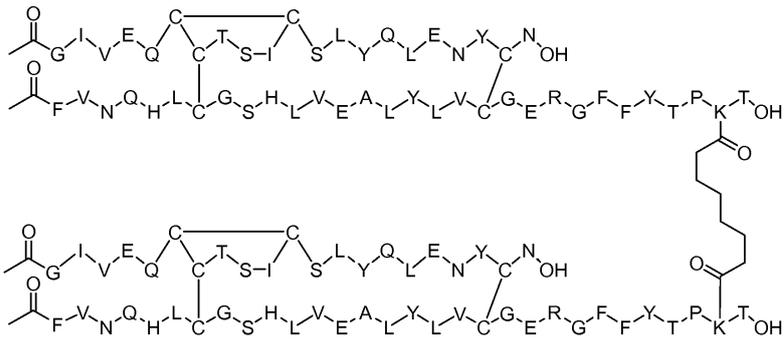
이량체 52;



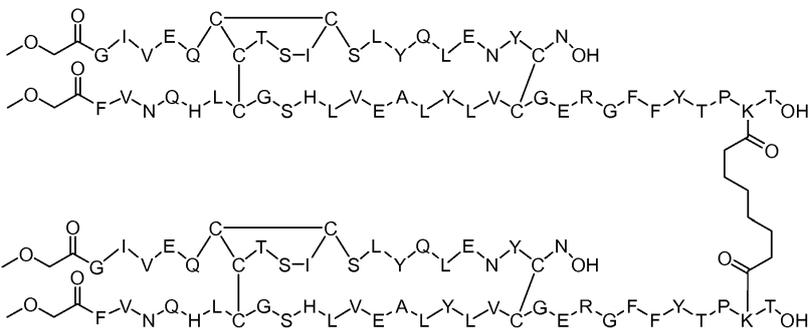
이량체 53;



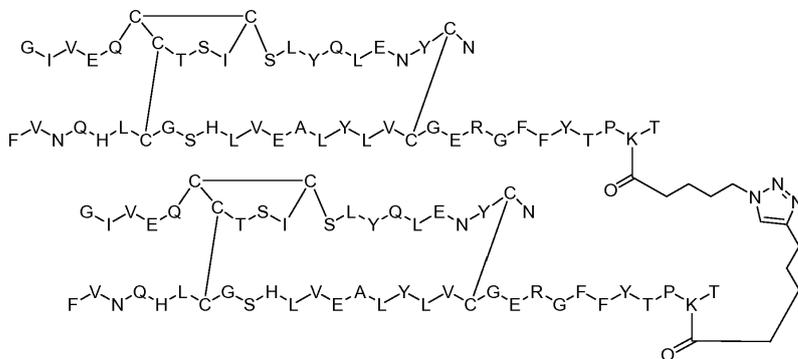
이량체 54;



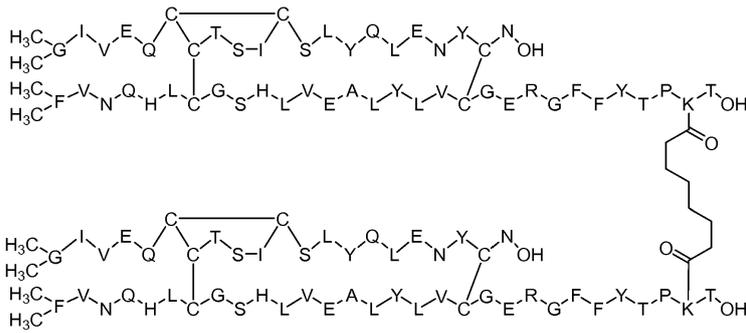
이량체 55;



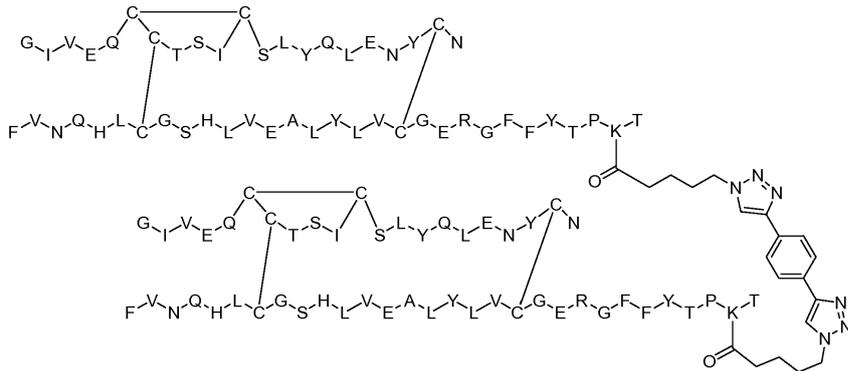
이량체 56;



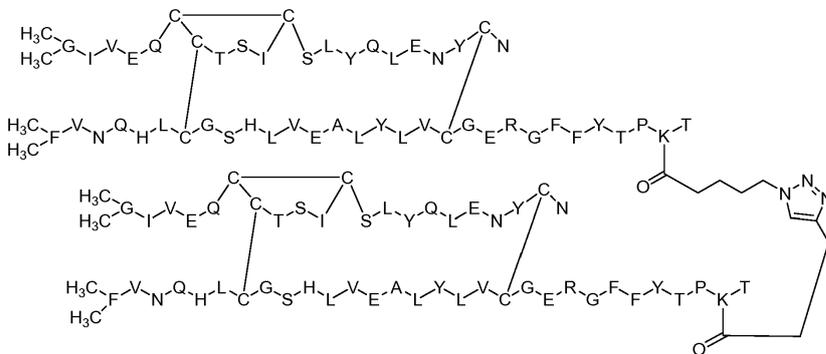
이량체 57;



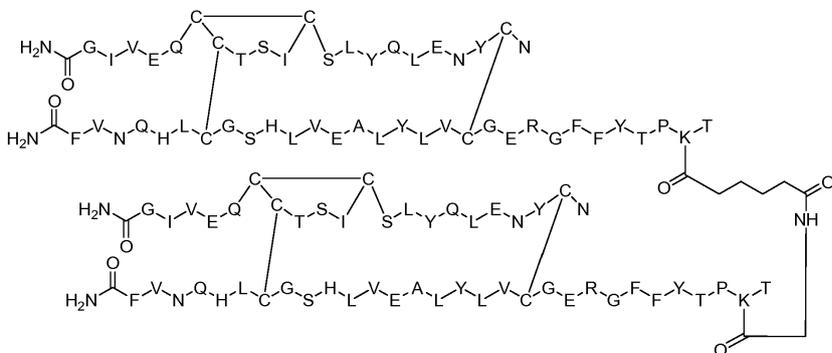
이량체 58;



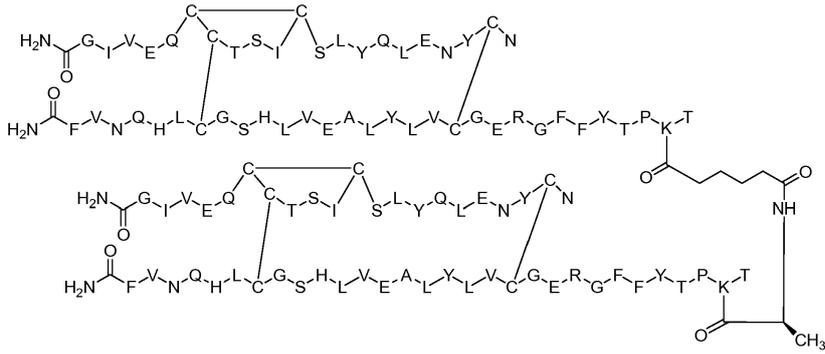
이량체 59;



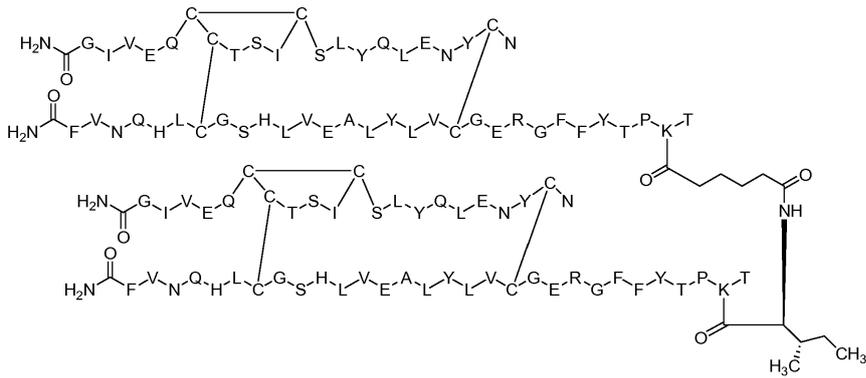
이량체 60;



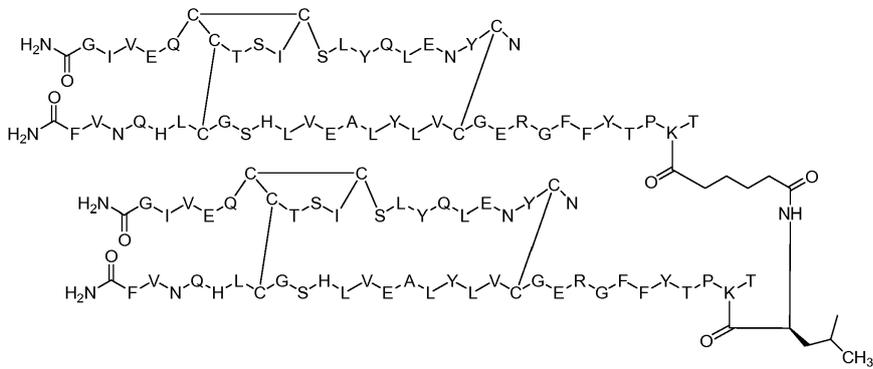
이량체 61;



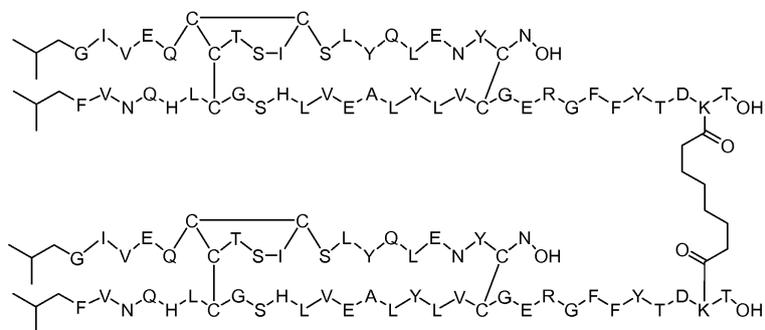
이량체 62;



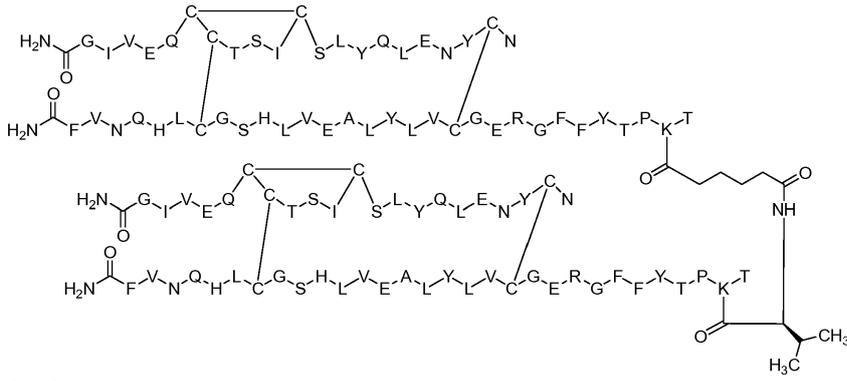
이량체 63;



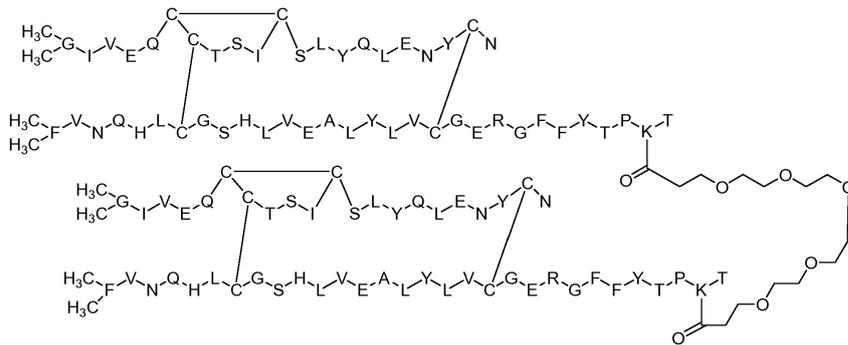
이량체 64;



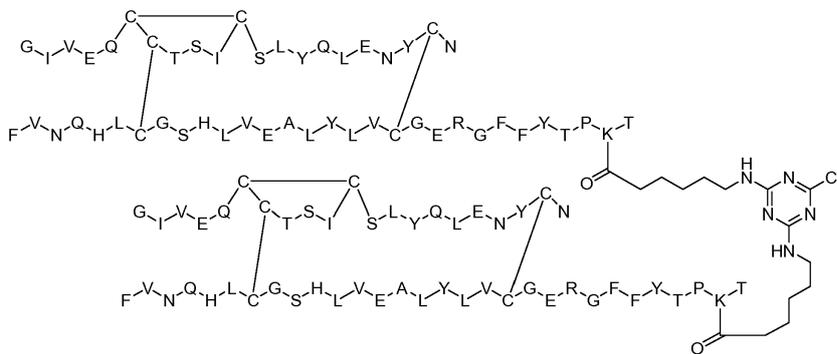
이량체 65;



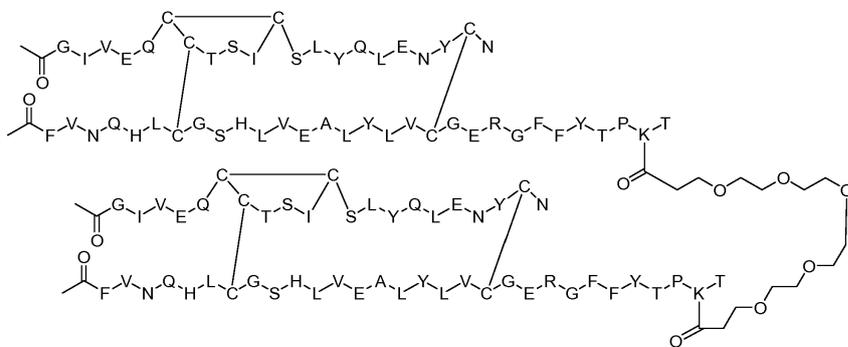
이량체 66;



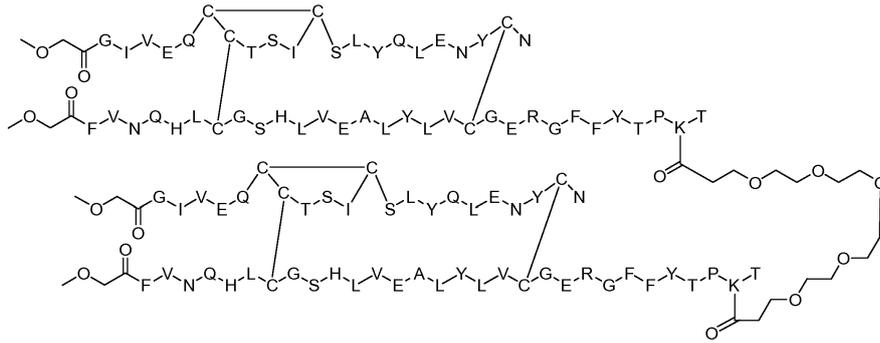
이량체 67;



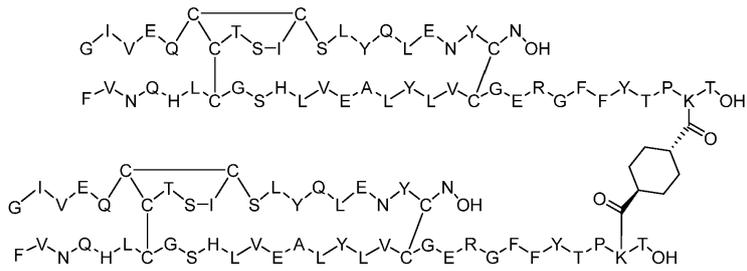
이량체 68;



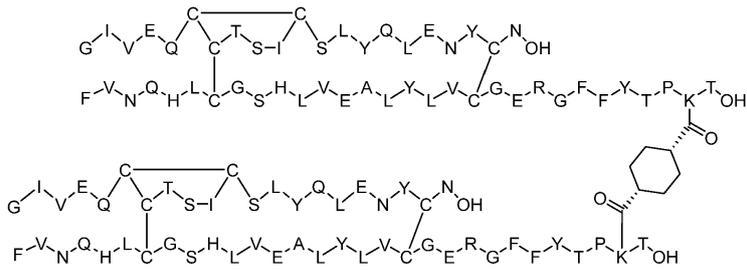
이량체 69;



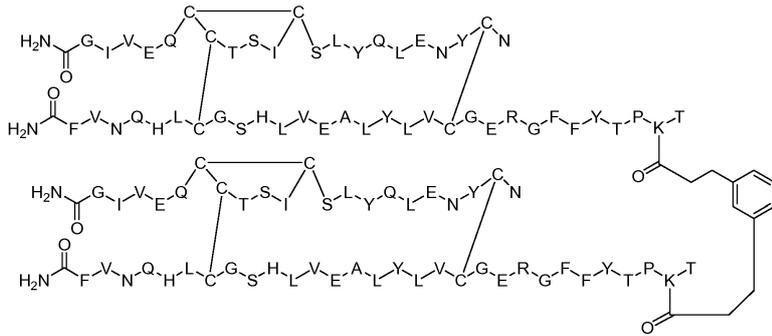
이량체 70;



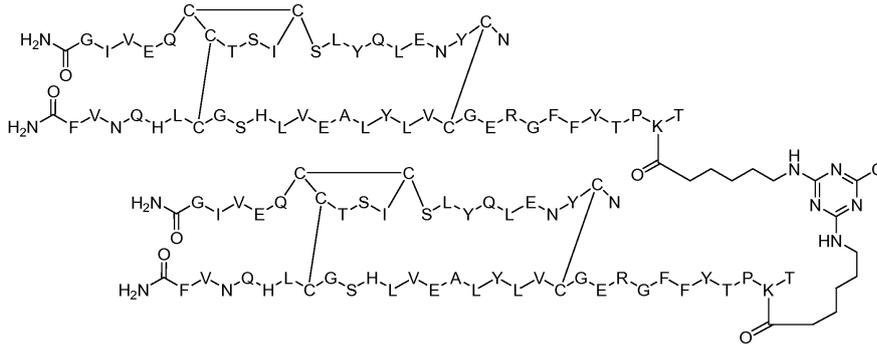
이량체 71;



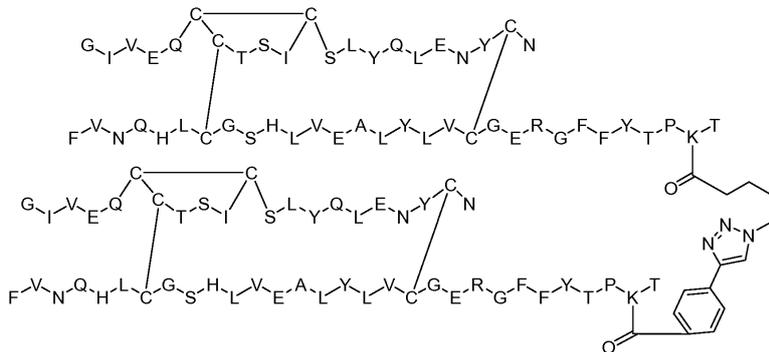
이량체 72;



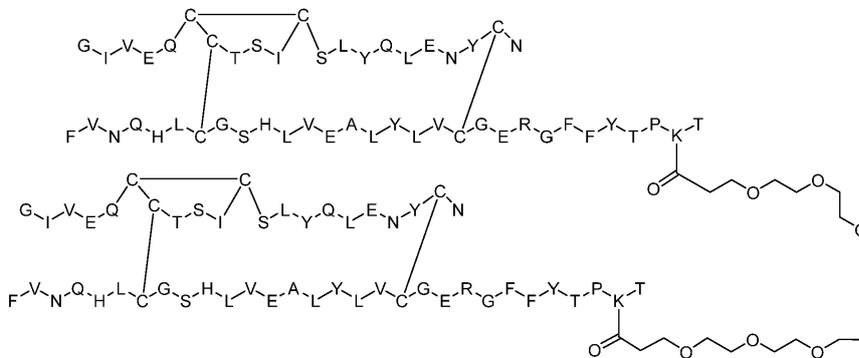
이량체 73;



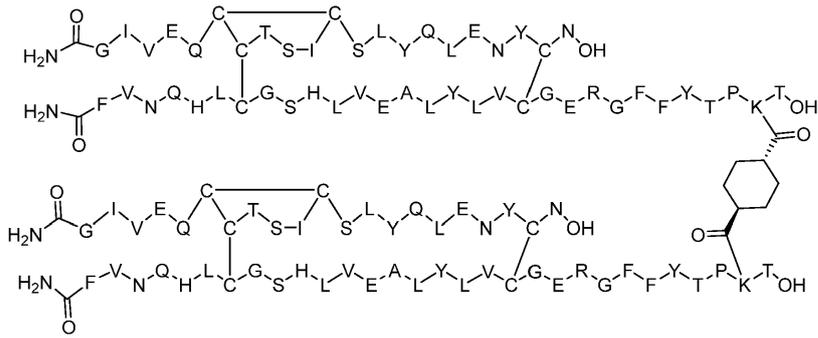
이량체 74;



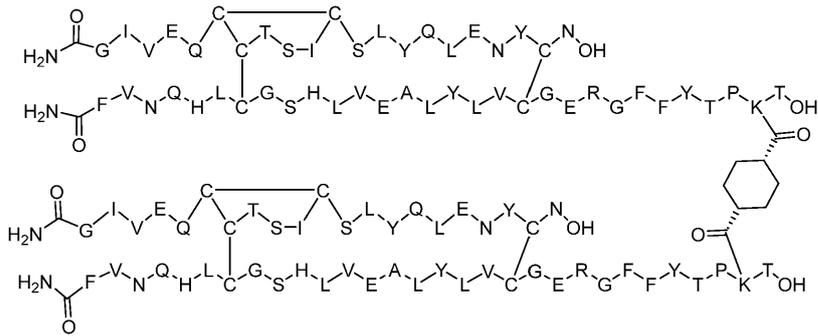
이량체 75;



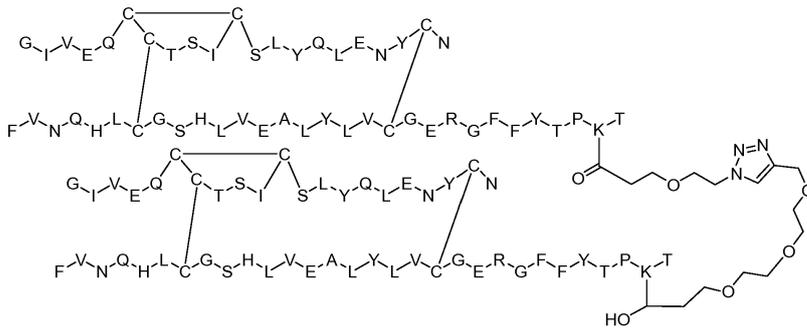
이량체 76;



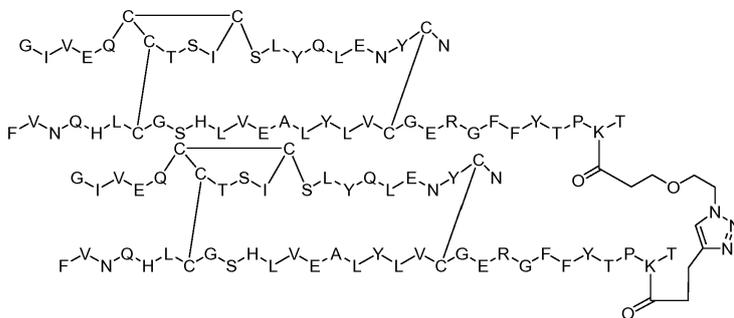
이량체 77;



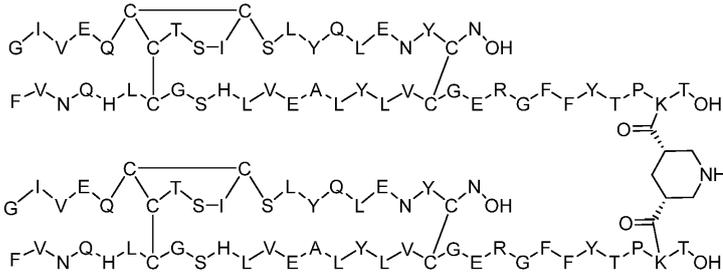
이량체 78;



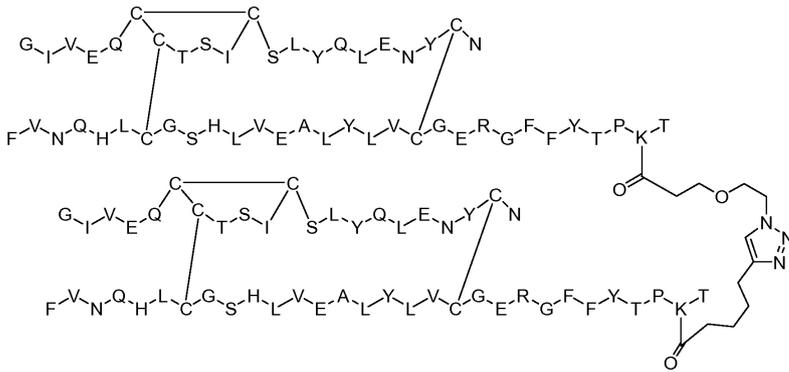
이량체 79;



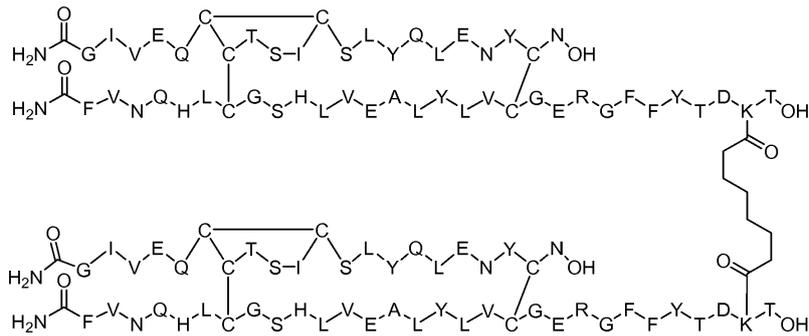
이량체 80;



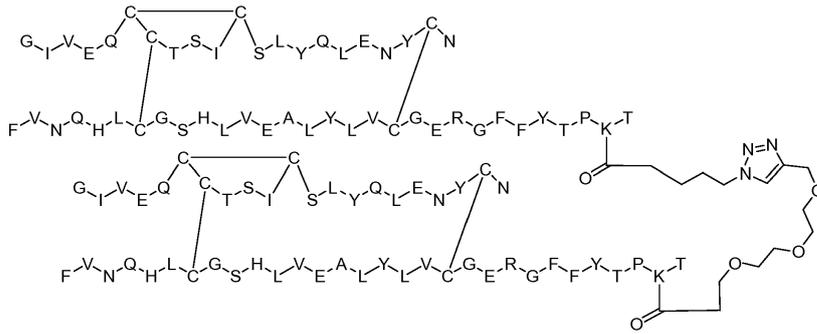
이량체 81;



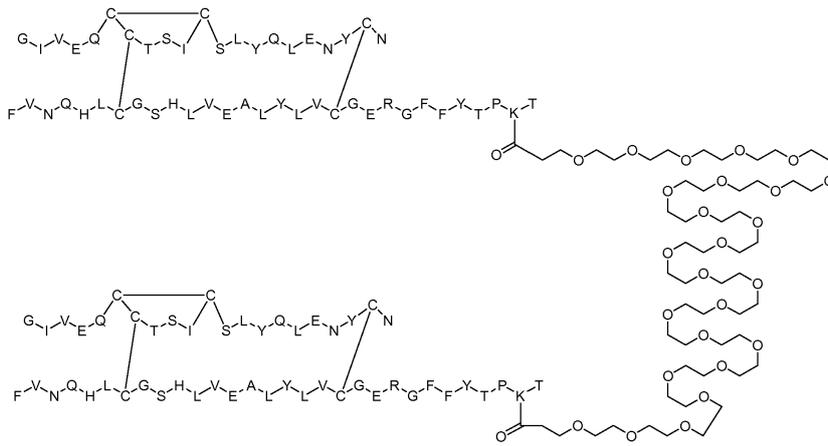
이량체 82;



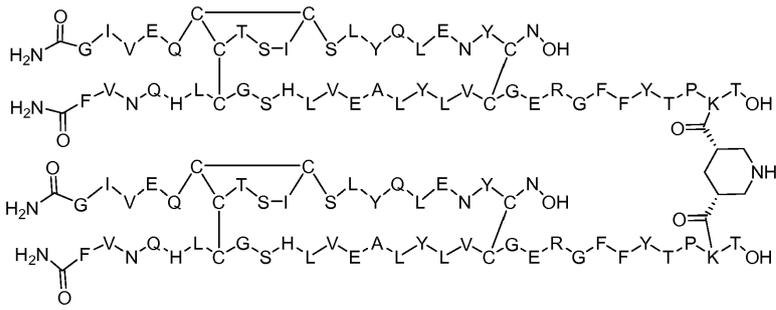
이량체 83;



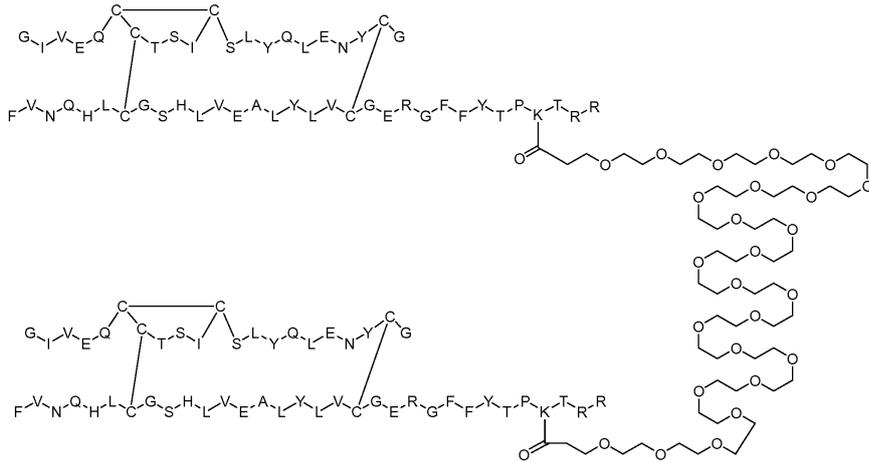
이량체 84;



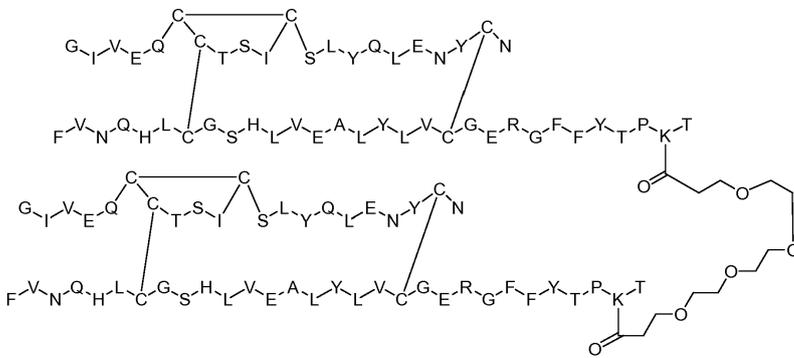
이량체 85;



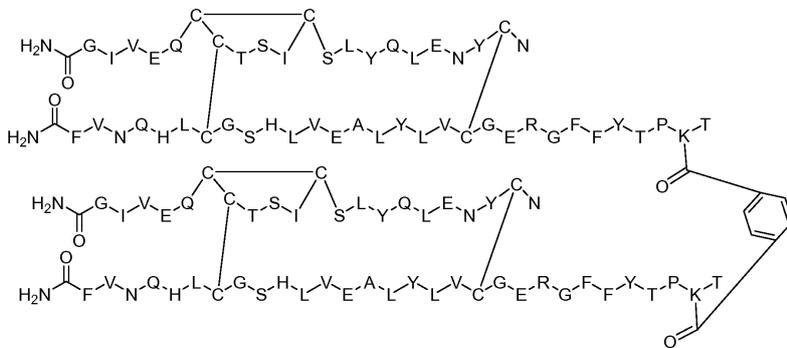
이량체 86;



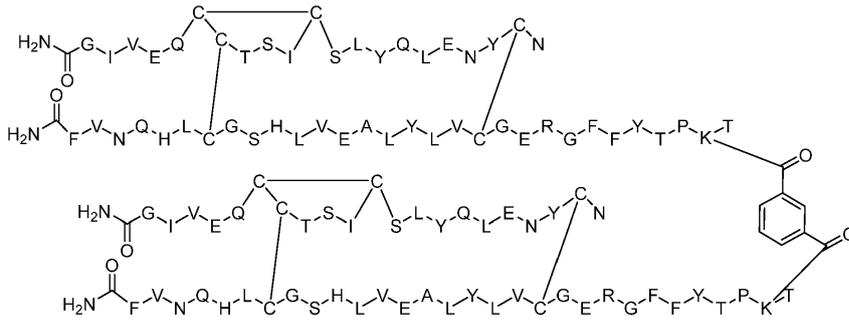
이량체 87;



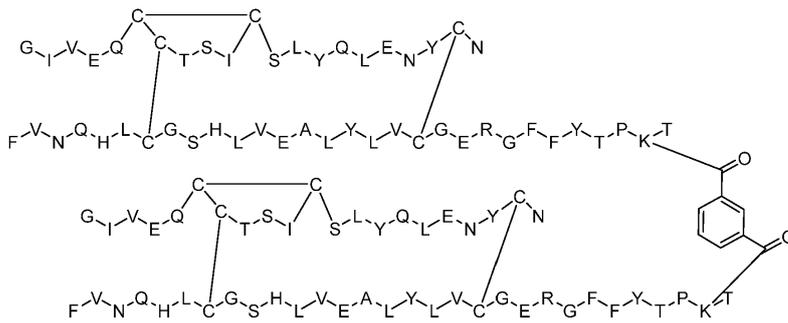
이량체 88;



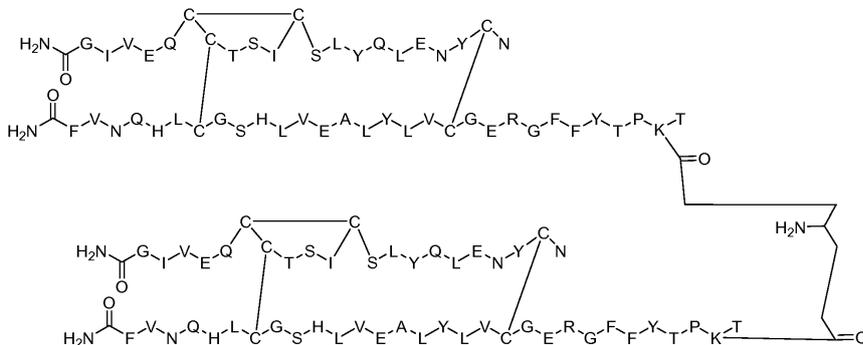
이량체 89;



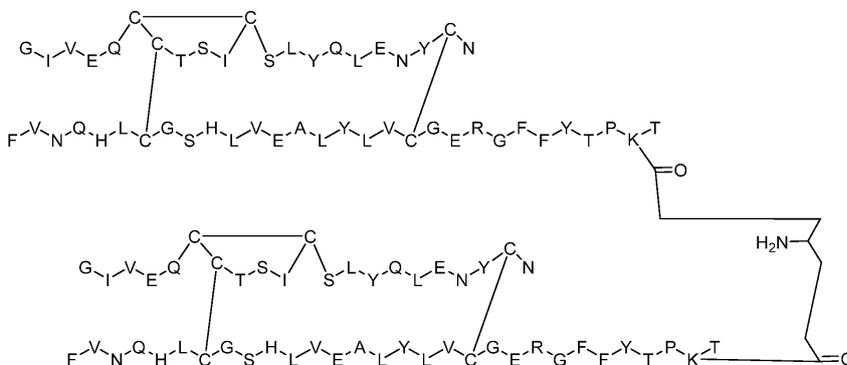
이량체 90;



이량체 91;



이량체 93; 또는



이량체 94

여기서 B-쇄 폴리펩티드의 Cys<sub>7</sub> 및 Cys<sub>19</sub>에 대한 A-쇄 폴리펩티드의 Cys<sub>6</sub> 및 Cys<sub>11</sub> 잔기 사이의 디설피드 연결 및 A-쇄의 Cys<sub>7</sub> 및 Cys<sub>20</sub> 사이의 디설피드 연결은 각각 그 사이의 실선에 의해 나타내어지고; 여기서 연결 모이어티는 제시된 리신 잔기의 엡실론 아미노산에 공유 연결되고, 여기서 이량체 1-40, 42-52, 54-86, 및 88-94에 대한

A-쇄 폴리펩티드는 서열식별번호: 1에 제시된 아미노산 서열을 갖고; 이량체 56에 대한 A-쇄 폴리펩티드는 서열식별번호: 11에 제시된 아미노산 서열을 갖고; 이량체 1-17, 21-27, 36, 37, 39-40, 및 42-52, 54-82, 84-86, 및 88-94에 대한 B-쇄 폴리펩티드는 서열식별번호: 2에 제시된 아미노산 서열을 갖고; 이량체 18 및 32-35에 대한 B-쇄 폴리펩티드는 서열식별번호: 6에 제시된 아미노산 서열을 갖고; 이량체 19 및 83에 대한 B-쇄 폴리펩티드는 서열식별번호: 9에 제시된 아미노산 서열을 갖고; 이량체 20, 28-31, 및 38에 대한 B-쇄 폴리펩티드는 서열식별번호: 10에 제시된 아미노산 서열을 갖고; 이량체 53 및 87에 대한 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드는 각각 서열식별번호: 7 및 서열식별번호: 8이다.

**청구항 75**

1종 이상의 제74항의 화합물 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물.

**청구항 76**

제75항의 인슐린 수용체 부분 효능제를 포함하는 조성물의 치료 유효량을 당뇨병을 갖는 개체에 투여하는 것을 포함하는, 당뇨병을 치료하는 방법.

**청구항 77**

제76항에 있어서, 당뇨병이 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병 또는 임신성 당뇨병인 방법.

**청구항 78**

제74항의 화합물을 포함하는 당뇨병의 치료를 위한 조성물.

**청구항 79**

제78항에 있어서, 당뇨병이 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병 또는 임신성 당뇨병인 조성물.

**청구항 80**

당뇨병의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 제74항의 화합물의 용도.

**청구항 81**

제80항에 있어서, 당뇨병이 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병 또는 임신성 당뇨병인 용도.

**청구항 82**

링커 1, 링커 2, 링커 3, 링커 10, 링커 11, 링커 12, 링커 13, 링커 14, 링커 15, 링커 16, 링커 17, 링커 18, 링커 19, 링커 20, 링커 21, 링커 22, 링커 23, 링커 24, 링커 25, 링커 26, 링커 27, 링커 28, 링커 29, 링커 30, 링커 31, 링커 32, 링커 33, 링커 34, 링커 35, 링커 36, 링커 37, 링커 38, 링커 39, 링커 40, 링커 41, 링커 42, 링커 43, 링커 44, 링커 45, 링커 46, 링커 47, 링커 48, 링커 49, 및 링커 50으로 이루어진 군으로부터 선택된 이관능성 링커에 의해 함께 접합된 제1 A-쇄 폴리펩티드 및 제1 B-쇄 폴리펩티드를 갖는 제1 인슐린 이중이량체 분자의 제1 B29 또는 B28 Lys 및 제2 A-쇄 폴리펩티드 및 제2 B-쇄 폴리펩티드를 갖는 제2 인슐린 이중이량체의 제2 B29 또는 B28 Lys를 포함하며, 단 이관능성 링커가 링커 10, 링커 11, 링커 12, 링커 13, 또는 링커 14인 경우, 제1 또는 제2 A-쇄 또는 B-쇄 폴리펩티드 중 적어도 하나는 그의 N-말단 아미노산에서 치환기에 접합되거나 또는 제1 인슐린 이중이량체 분자의 적어도 N-말단 아미노산이 치환기에 접합되거나 또는 제1 인슐린 이중이량체 및 제2 인슐린 이중이량체 둘 다의 N-말단 아미노산이 치환기에 접합되는 것인 인슐린 이량체.

**청구항 83**

제82항에 있어서, 치환기가 화학식 RC(O)-를 갖는 기에 연결된 N-히드록시숙신이미드 에스테르를 포함하고, 여기서 R은 R'CH<sub>2</sub>, R'NH, R'O일 수 있고, R'는 H, 선형 알킬 쇠, 아미노산, 펩티드, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 사카라이드일 수 있는 것인 인슐린 이량체.

**청구항 84**

제82항에 있어서, 치환기가 카르바모일 기, 아세틸 기, 글리신, 메틸 기, 메톡시 기, 디메틸 기, 이소부틸 기, PEG1 기, AEG 기, AEG-C6 알킬 기, 또는 PEG2 기인 인슐린 이량체.

**청구항 85**

링커 5 및 링커 7로 이루어진 군으로부터 선택된 제1 링커에 접합된 제1 A-쇄 폴리펩티드 및 제1 B-쇄 폴리펩티드를 갖는 제1 인슐린 이종이량체 분자의 제1 B29 또는 B28 Lys 및 링커 4, 링커 6, 링커 8, 및 링커 9로 이루어진 군으로부터 선택된 제2 링커에 접합된 제2 A-쇄 폴리펩티드 및 제2 B-쇄 폴리펩티드를 갖는 제2 인슐린 이종이량체의 제2 B29 또는 B28 Lys를 제1 링커 및 제2 링커를 통해 함께 접합된 상태로 포함하는 인슐린 이량체.

**청구항 86**

제82항에 있어서, 치환기가 화학식 RC(O)-를 갖는 기에 연결된 N-히드록시숙신이미드 에스테르를 포함하고, 여기서 R은 R'CH<sub>2</sub>, R'NH, R'O일 수 있고, R'는 H, 선형 알킬 쇠, 아미노산, 펩티드, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 사카라이드일 수 있는 것인 인슐린 이량체.

**청구항 87**

제82항에 있어서, 치환기가 카르바모일 기, 아세틸 기, 글리신, 메틸 기, 메톡시 기, 디메틸 기, 이소부틸 기, PEG1 기, AEG 기, AEG-C6 알킬 기, 또는 PEG2 기인 인슐린 이량체.

**청구항 88**

링커 5 및 링커 7로 이루어진 군으로부터 선택된 제1 링커에 접합된 제1 A-쇄 폴리펩티드 및 제1 B-쇄 폴리펩티드를 갖는 제1 인슐린 이종이량체 분자의 제1 B29 또는 B28 Lys 및 링커 5 및 링커 7로 이루어진 군으로부터 선택된 제2 링커에 접합된 제2 A-쇄 폴리펩티드 및 제2 B-쇄 폴리펩티드를 갖는 제2 인슐린 이종이량체의 제2 B29 또는 B28 Lys를 포함하며, 여기서 제1 및 제2 링커는 하기 구조를 갖는 가교 링커를 통해 함께 접합되는 것인 인슐린 유사체 이량체.



여기서 R은 공유 결합, 탄소 원자, 페닐, 헤테로원자, 또는 아실, 지방족, 헤테로지방족, 아릴, 헤테로아릴, 및 헤테로시클릭으로 이루어진 군으로부터 선택된 임의로 치환된 기이다. 특정한 측면에서 R은 C2, C3, C4, C6, C7, C8, C9 또는 C10 아실 기 또는 PEG2, PEG3, PEG4, PEG5, PEG6, PEG7, PEG8, PEG9, PEG10, PEG11, PEG12, PEG13, 또는 PEG25이다.

**청구항 89**

제82항에 있어서, 치환기가 화학식 RC(O)-를 갖는 기에 연결된 N-히드록시숙신이미드 에스테르를 포함하고, 여기서 R은 R'CH<sub>2</sub>, R'NH, R'O일 수 있고, R'는 H, 선형 알킬 쇠, 아미노산, 펩티드, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 사카라이드일 수 있는 것인 인슐린 이량체.

**청구항 90**

제82항에 있어서, 치환기가 카르바모일 기, 아세틸 기, 글리신, 메틸 기, 메톡시 기, 디메틸 기, 이소부틸 기, PEG1 기, AEG 기, AEG-C6 알킬 기, 또는 PEG2 기인 인슐린 이량체.

**청구항 91**

링커 4, 링커 6, 링커 8, 및 링커 9로 이루어진 군으로부터 선택된 제1 링커에 접합된 제1 A-쇄 폴리펩티드 및 제1 B-쇄 폴리펩티드를 갖는 제1 인슐린 이종이량체 분자의 제1 B29 또는 B28 Lys 및 링커 4, 링커 6, 링커 8, 및 링커 9로 이루어진 군으로부터 선택된 제2 링커에 접합된 제2 A-쇄 폴리펩티드 및 제2 B-쇄 폴리펩티드를 갖는 제2 인슐린 이종이량체의 제2 B29 또는 B28 Lys를 포함하며, 여기서 제1 및 제2 링커는 하기 구조를 갖는 가교 링커를 통해 함께 접합되는 것인 인슐린 유사체 이량체.



여기서 R은 공유 결합, 탄소 원자, 페닐, 헤테로원자, 또는 아실, 지방족, 헤테로지방족, 아릴, 헤테로아릴, 및

헤테로시클릭으로 이루어진 군으로부터 선택된 임의로 치환된 기이다. 특정한 측면에서 R은 C2, C3, C4, C6, C7, C8, C9 또는 C10 아실 기 또는 PEG2, PEG3, PEG4, PEG5, PEG6, PEG7, PEG8, PEG9, PEG10, PEG11, PEG12, PEG13, 또는 PEG25이다.

**청구항 92**

제82항에 있어서, 치환기가 화학식 RC(O)-를 갖는 기에 연결된 N-히드록시숙신이미드 에스테르를 포함하며, 여기서 R은 R'CH<sub>2</sub>, R'NH, R'O일 수 있고, R'는 H, 선형 알킬 쇠, 아미노산, 펩티드, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 사카라이드일 수 있는 것인 인슐린 이량체.

**청구항 93**

제82항에 있어서, 치환기가 카르바모일 기, 아세틸 기, 글리신, 메틸 기, 메톡시 기, 디메틸 기, 이소부틸 기, PEG1 기, AEG 기, AEG-C6 알킬 기, 또는 PEG2 기인 인슐린 이량체.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 발명의 배경

[0003] (1) 발명의 분야

[0004] 본 발명은 인슐린 수용체에서 부분 효능제로서 작용하는 인슐린 이량체 및 인슐린 유사체 이량체에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0005] (2) 관련 기술의 설명

[0006] 인슐린은 제1형 당뇨병 (T1DM) 환자 및 다수의 제2형 당뇨병 (T2DM)을 위한 기본 요법으로, 지난 십년간 모든 항당뇨병제 약물 사용자 중에서 미국 환자의 1/3 가까이에 처방되었다. 인슐린의 전세계적 시장은 2013년에 204억 미국 달러였으며, 모든 다른 항당뇨병제를 합한 것보다 더 빠른 속도로 성장하고 있다. 그러나, 저혈당 및 체중 증가에 대한 좁은 TI를 포함한 현행 인슐린 요법의 도전과제는, 환자가 이상적인 혈당 조절을 달성할 보다 넓은 가능성 및 잠재성을 제한한다.

[0007] 식사에 반응하는 식사 인슐린 분비뿐만 아니라, 췌장이 인슐린을 "기저" 속도로 방출하며, 이는 주로 혈장 글루코스 수준에 의해 적절한 공복 글루코스 조절이 유지되도록 통제된다. 이는 주로 내인성 인슐린의 간-신호 작용을 통해 간 글루코스 방출을 제어함으로써 달성된다. 현재 인슐린 유사체는 신속 작용 및 기저 인슐린 뿐만 아니라 이들 둘의 혼합물을 포함한다. 신속-작용 인슐린 유사체 (RAA)는 식후 고혈당을 제어하기 위해 개발된 반면, 연장된 작용 지속기간을 갖는 인슐린은 기저 글루코스 수준을 조절한다. 장기-작용 인슐린은 모든 T1DM 에서 사용되고 (식사 주입과 조합됨), 대부분의 T2DM 환자는 그의 인슐린 요법을 기저 생성물로부터 시작한다. 기저 인슐린 소비는 전세계적으로 당뇨병 인구 (특히 T2DM)가 급증함에 따라 빠르게 성장하고 있다.

[0008] 지난 수십년에 걸친 지속적인 개발 노력에도 불구하고, 이용가능한 장기-작용 인슐린은 생리학적 기저 인슐린에 비해 아직 최적화되지 않았다. 이는 부분적으로 주요 초점이 이들 유사체의 PK 편평도를 개선시키는데에 맞춰져 있으나, 말초 조직의 상대적 과다-인슐린요법의 고정에는 맞춰져 있지 않아 증가된 저혈당 위험을 유발하기 때문이다. 그 결과로서, 저혈당은 환자에게 큰 부담을 주는 중요한 의학적 위험으로 남아있으며, 유의한 이환율 및 사망률을 초래한다.

**발명의 내용**

[0009] 본 발명은 공유 연결되어, 정규 인슐린-유사 효력을 갖지만 감소된 최대 활성을 갖는 인슐린 수용체를 활성화시킬 수 있는 인슐린 분자 이량체를 형성하는 2개의 인슐린 분자를 포함하는 화합물을 제공한다. 이들 화합물은 인슐린 수용체 부분 효능제 (IPRA)이다: 이들은 다른 인슐린 유사체와 같이 글루코스가 효과적으로 저하되도록 행동하지만 보다 낮은 저혈당 위험을 갖는다.

- [0010] 현행 표준 관리 (SOC) 기저 인슐린에 비해 개선된 치료 지수 (TI)를 나타내는 신규하고 혁신적인 기저 인슐린 (1일 1회 투여)으로 제제화되는 인슐린 수용체 부분 효능제 공유 인슐린 이량체가 제공된다. 한 실시양태에서, 본 발명의 IPRA는 당뇨병 미니피그에서 저혈당 위험은 감소시키면서 글루코스를 효과적으로 저하시킬 수 있으며, 1일 1회 (QD) 기저 인슐린의 특성을 갖는다. 개선된 TI는 실시자가 공복 글루코스의 제어를 위한 목표를 달성하기 위해 본 발명의 IRPA를 보다 적극적으로 투여하도록 할 수 있다. IRPA는 공복 글루코스 및 HbA1c를 엄격하게 제어함으로써 1) T2DM에서 증진된 효능 및 안전성 프로파일을 갖는 독립적 장기-작용 인슐린 및 2) 추가의 식사 신속-작용 인슐린 유사체 (RAA) 투여와 함께 사용하기 위한 T1DM (및 일부 T2DM)에서의 개선된 기초적 기저 인슐린으로서 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 하기 실시양태를 제공한다.
- [0011] 본 발명은 제1 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체를 포함하며, 각각의 이중이량체는 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드를 포함하는 것인 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체를 제공하고, 여기서 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드는 쇠간 디설피드 결합을 통해 함께 연결되고; 여기서 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체는 2개의 각각의 B-쇄 폴리펩티드의 카르복시 말단에 또는 그 근처에 있는 아미노산의 측쇄를 연결하는 연결 모이어티를 통해 함께 공유 연결되고; 여기서 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드의 적어도 1개의 아미노 말단은 치환기에 공유 연결되며, 단 연결 모이어티는 디설피드 결합을 포함하지 않는다. 특정한 측면에서, 제1 인슐린 또는 인슐린 유사체의 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드의 적어도 아미노 말단이 치환기에 공유 연결된다.
- [0012] 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체의 특정한 측면에서, 각각의 A-쇄 폴리펩티드 및 각각의 B-쇄 폴리펩티드의 아미노 말단은 치환기에 공유 연결된다. 특정한 측면에서, 제1 인슐린 또는 인슐린 유사체의 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드의 아미노 말단 및 A-쇄 폴리펩티드 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체의 B-쇄 폴리펩티드의 아미노 말단은 각각 치환기에 공유 연결된다. 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체의 아미노 말단이 치환기에 공유 연결된 실시양태에서, 제1 인슐린 또는 인슐린 유사체의 A-쇄 및 B-쇄 폴리펩티드의 아미노 말단 상의 치환기는 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체의 A-쇄 및 B-쇄 폴리펩티드의 아미노 말단 상의 치환기와 동일할 수 있다. 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체의 아미노 말단이 치환기에 공유 연결된 실시양태에서, 제1 인슐린 또는 인슐린 유사체의 A-쇄 및 B-쇄 폴리펩티드의 아미노 말단 상의 치환기는 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체의 A-쇄 및 B-쇄 폴리펩티드의 아미노 말단 상의 치환기와 상이할 수 있다.
- [0013] 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체의 추가 측면에서, 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체는 동일하거나 또는 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체는 상이하다.
- [0014] 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체의 다른 추가 측면에서, 연결 모이어티는 제1 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체를 그의 각각의 B-쇄 폴리펩티드의 카르복시 말단에 또는 그 근처에 있는 리신 잔기의 엡실론 아미노기를 통해 공유 연결한다.
- [0015] 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체의 다른 추가 측면에서, 치환기는 화학식 RC(O)-를 갖고, 여기서 R은 R'CH<sub>2</sub>, R'NH, R'O일 수 있고, R'는 H, 선형 알킬 쇠, 아미노산, 펩티드, PEG, 사카라이드일 수 있고, 특정한 측면에서 RC(O)-는 아세틸, 페닐아세틸, 카르바모일, N-알킬 카르바모일, 또는 알콕시카르보닐일 수 있다. 특정한 측면에서, 치환기는 아세틸, 페닐아세틸, 카르바모일, N-알킬 카르바모일, 이소부틸, 메톡시 아세틸, 글리신, 아미노에틸글루코스 (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, N-디메틸, 및 알콕시카르보닐로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0016] 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체의 특정한 측면에서, 각각의 A-쇄 폴리펩티드는 독립적으로 아미노산 서열 GX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>EQCCX<sub>8</sub>SICSLYQLX<sub>17</sub>NX<sub>19</sub>CX<sub>23</sub> (서열식별번호: 3)을 포함하고, 각각의 B-쇄 폴리펩티드는 독립적으로 아미노산 서열 X<sub>25</sub>LCGX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>LVEALYLVCGERGFX<sub>27</sub>YTX<sub>31</sub>X<sub>32</sub> (서열식별번호: 4) 또는 X<sub>22</sub>VNQX<sub>25</sub>X<sub>26</sub>CGX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>LVEALYLVCGERGFX<sub>27</sub>YTX<sub>31</sub>X<sub>32</sub>X<sub>33</sub>X<sub>34</sub>X<sub>35</sub> (서열식별번호: 5)를 포함하며, 여기서 X<sub>2</sub>는 이소류신 또는 트레오닌이고; X<sub>3</sub>는 발린, 글리신, 또는 류신이고; X<sub>8</sub>은 트레오닌 또는 히스티딘이고; X<sub>17</sub>은 글루탐산 또는 글루타민이고; X<sub>19</sub>는 티로신, 4-메톡시-페닐알라닌, 알라닌, 또는 4-아미노 페닐알라닌이고; X<sub>23</sub>은 아스파라긴 또는 글리신이고; X<sub>25</sub>는 페닐알라닌 또는 데스아미노-페닐알라닌이고; X<sub>26</sub>은 히스티딘 또는 트레오닌이고; X<sub>27</sub>은 류신 또는 글리신이고; X<sub>29</sub>은 페닐알라닌 또는 아스파르트산이고; X<sub>29</sub>은 알라닌, 글리신, 또는 세린이고; X<sub>30</sub>은 히스티딘, 아스파르트산, 글루탐산, 호모시스테인, 또는 시스테인이고; X<sub>31</sub>은 아스파르트산, 프롤린, 또는 리신이고; X<sub>32</sub>는 리신 또는 프롤린이고; X<sub>33</sub>은 트레오닌, 알라닌이거나, 또는 부재하고; X<sub>34</sub>는 아르기닌이거나 또는 부재하

고;  $X_{35}$ 는 아르기닌이거나 또는 부재하고; 단  $X_{31}$  또는  $X_{32}$  중 적어도 하나는 리신이다.

- [0017] 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체의 특정한 측면에서, 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체는 독립적으로 천연 인간 인슐린, 인슐린 리스프로, 인슐린 아스파르트, desB30 인슐린, 또는 인슐린 글라진이다.
- [0018] 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체의 특정한 측면에서, 연결 모이어티는 아실, 지방족, 헤테로지방족, 아릴, 헤테로아릴, 및 헤테로시클릭으로 이루어진 군으로부터 선택된 임의로 치환된 기일 수 있다. 연결 모이어티는 2가, 직쇄형 또는 분지형, 포화 또는 불포화, 임의로 치환된 C1-C20 탄화수소 쇠일 수 있고, 여기서 1개 이상의 메틸렌 단위는 -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -N(R)SO<sub>2</sub>-, SO<sub>2</sub>N(R)-, 헤테로시클릭 기, 아릴 기, 또는 헤테로아릴 기에 의해 임의로 및 독립적으로 대체되고, 여기서 각 경우의 R은 독립적으로 수소, 적합한 보호 기, 아실 모이어티, 아릴알킬 모이어티, 지방족 모이어티, 아릴 모이어티, 헤테로아릴 모이어티, 또는 헤테로지방족 모이어티이다.
- [0019] 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체의 다른 추가 측면에서, 연결 모이어티는 아실 모이어티, -C(O)RC(O)-이고, 여기서 R은 알킬 쇠, 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 쇠, 아마이드-함유 쇠, 트리아졸(들)-함유 쇠, 시클로옥탄-함유 모이어티, 치환된 아실 쇠, 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 쇠이다.
- [0020] 추가 측면에서, 연결 모이어티는 알킬디오일, -C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(O)- (n = 0-45)이며, 이는 옥살릴 (C2) 모이어티, 숙시닐 (C4) 모이어티, 아디포일 (C6) 모이어티, 수베리올 (C8) 모이어티, 데칸디오일 (C10) 모이어티, 도데칸디오일 (C12) 모이어티, 테트라데칸디오일 (C14) 모이어티, 또는 헥사데칸디오일 (C16) 모이어티를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0021] 본 발명은 추가로 하기 화학식을 포함하는 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체를 제공한다:
- [0022]  $D^1-L-D^2$
- [0023] 여기서  $D^1$  및  $D^2$ 는 각각 독립적으로 인슐린 또는 인슐린 유사체 폴리펩티드이고, 여기서 각각의 인슐린 폴리펩티드는 쇠간 디설피드 결합을 통해 함께 연결된 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드를 포함하는 이중이량체이고; L은 연결 모이어티이며, 여기서 링커 모이어티의 하나의 말단은  $D^1$ 의 카르복실 기에 또는 그 근처에 있는 아미노산 잔기에 부착되고, 링커 모이어티의 다른 말단은  $D^2$ 의 카르복실 말단에 또는 그 근처에 있는 아미노산 잔기에 부착되고, 단 L은 디설피드 연결을 포함하지 않고; 여기서 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 폴리펩티드는 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드의 아미노 말단에 부착된 치환기를 포함한다.
- [0024] 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체의 추가 측면에서,  $D^1$  및  $D^2$ 는 동일하거나 또는  $D^1$  및  $D^2$ 는 상이하다.
- [0025] 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체의 추가 측면에서, 연결 모이어티는  $D^1$  및  $D^2$ 의 카르복시 말단에 또는 그 근처에 있는 리신 잔기의 엡실론 아미노 기를 통해  $D^1$  및  $D^2$ 를 공유 연결한다.
- [0026] 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체의 다른 추가 측면에서, 치환기는 화학식 RC(O)-를 갖고, 여기서 R은 R'CH<sub>2</sub>, R'NH, R'O일 수 있고, R'는 H, 선형 알킬 쇠, 아미노산, 펩티드, PEG, 사카라이드일 수 있으며, 특정한 측면에서 RC(O)-는 아세틸, 페닐아세틸, 카르바모일, N-알킬 카르바모일, 또는 알콕시카르보닐일 수 있다. 특정한 측면에서, 치환기는 아세틸, 페닐아세틸, 카르바모일, N-알킬 카르바모일, 이소부틸, 메톡시 아세틸, 글리신, 아미노에틸글루코스 (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, N-디메틸, 및 알콕시카르보닐로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0027] 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체의 특정한 측면에서, 각각의 A-쇄 폴리펩티드는 독립적으로 아미노산 서열  $GX_2X_3EQCCX_8SICSLYQLX_{17}NX_{19}CX_{23}$  (서열식별번호: 3)을 포함하고, 각각의 B-쇄 폴리펩티드는 독립적으로 아미노산 서열  $X_{25}LCGX_{29}X_{30}LVEALYLVCGERGFX_{27}YTX_{31}X_{32}$  (서열식별번호: 4) 또는  $X_{22}VNQX_{25}X_{26}CGX_{29}X_{30}LVEALYLVCGERGFX_{27}YTX_{31}X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}$  (서열식별번호: 5)를 포함하며, 여기서  $X_2$ 는 이소류신 또는 트레오닌이고;  $X_3$ 는 발린, 글리신, 또는 류신이고;  $X_8$ 은 트레오닌 또는 히스티딘이고;  $X_{17}$ 은 글루탐산 또는 글루타민이고;  $X_{19}$ 는 티로신, 4-메톡시-페닐알라닌, 알라닌, 또는 4-아미노 페닐알라닌이고;  $X_{23}$ 은 아스파라긴 또는

글리신이고;  $X_{22}$ 는 페닐알라닌 또는 데스아미노-페닐알라닌이고;  $X_{25}$ 는 히스티딘 또는 트레오닌이고;  $X_{26}$ 은 류신 또는 글리신이고;  $X_{27}$ 은 페닐알라닌 또는 아스파르트산이고;  $X_{29}$ 는 알라닌, 글리신, 또는 세린이고;  $X_{30}$ 은 히스티딘, 아스파르트산, 글루탐산, 호모시스테인, 또는 시스테인이고;  $X_{31}$ 은 아스파르트산, 프롤린, 또는 리신이고;  $X_{32}$ 는 리신 또는 프롤린이고;  $X_{33}$ 은 트레오닌, 알라닌이거나, 또는 부재하고;  $X_{34}$ 는 아르기닌이거나 또는 부재하고;  $X_{35}$ 는 아르기닌이거나 또는 부재하고; 단  $X_{31}$  또는  $X_{32}$  중 적어도 하나는 리신이다.

[0028] 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체의 추가 측면에서,  $D^1$  및  $D^2$ 는 독립적으로 천연 인간 인슐린, 인슐린 리스프로, 인슐린 아스파르트, desB30 인슐린, 또는 인슐린 글라진이다.

[0029] 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체의 특정한 측면에서, 연결 모이어티는 아실, 지방족, 헤테로지방족, 아릴, 헤테로아릴, 및 헤테로시클릭으로 이루어진 군으로부터 선택된 임의로 치환된 기일 수 있다. 연결 모이어티는 2가, 직쇄형 또는 분지형, 포화 또는 불포화, 임의로 치환된 C1-C20 탄화수소 쇠일 수 있고, 여기서 1개 이상의 메틸렌 단위는  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-N(R)-$ ,  $-C(O)-$ ,  $C(O)O-$ ,  $OC(O)-$ ,  $-N(R)C(O)-$ ,  $-C(O)N(R)-$ ,  $-S(O)-$ ,  $-S(O)_2-$ ,  $-N(R)SO_2-$ ,  $SO_2N(R)-$ , 헤테로시클릭 기, 아릴 기, 또는 헤테로아릴 기에 의해 임의로 및 독립적으로 대체되고, 여기서 각 경우의 R은 독립적으로 수소, 적합한 보호 기, 아실 모이어티, 아릴알킬 모이어티, 지방족 모이어티, 아릴 모이어티, 헤테로아릴 모이어티, 또는 헤테로지방족 모이어티이다.

[0030] 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체의 다른 추가 측면에서, 연결 모이어티는 아실 모이어티,  $-C(O)RC(O)-$ 이고, 여기서 R은 알킬 쇠, 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 쇠, 아마이드-함유 쇠, 트리아졸(들)-함유 쇠, 시클로옥탄-함유 모이어티, 치환된 아실 쇠, 또는 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 쇠이다.

[0031] 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체의 추가 측면에서, 연결 모이어티는 알킬디오일,  $-C(O)(CH_2)_nC(O)-$  (여기서  $n = 0-45$ )이며, 이는 옥살릴 (C2) 모이어티, 숙시닐 (C4) 모이어티, 아디포일 (C6) 모이어티, 수베리올 (C8) 모이어티, 데칸디오일 (C10) 모이어티, 도데칸디오일 (C12) 모이어티, 테트라데칸디오일 (C14) 모이어티, 또는 헥사데칸디오일 (C16) 모이어티를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0032] 상기 언급된 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체 중 어느 하나 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물이 추가로 제공된다.

[0033] 본 발명은 추가로 제1 인슐린 또는 인슐린 유사체 이종이량체 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이종이량체를 포함하며, 각각의 이종이량체는 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드를 포함하는 것인 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체를 제공하며, 여기서 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드는 쇠간 디설피드 결합을 통해 함께 연결되고; 여기서 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이종이량체는 2개의 각각의 B-쇄 폴리펩티드의 카르복시 말단에 또는 그 근처에 있는 아미노산의 측쇄를 연결하는 연결 모이어티를 통해 함께 공유 연결되고; 임의로 제1 인슐린 폴리펩티드 또는 제2 인슐린 폴리펩티드의 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드 중 적어도 하나의 아미노 말단은 치환기에 공유 연결되고, 단 (1) 연결 모이어티는 디설피드 결합을 포함하지 않고, (2) 인슐린 또는 인슐린 유사체가 인간 인슐린 또는 인슐린 유사체가 아니고 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드의 아미노 말단이 치환기를 포함하지 않는 경우, 연결 모이어티는 옥살릴 (C2) 모이어티, 수베리올 (C8) 모이어티, 또는 도데칸디오일 (C12) 모이어티가 아니다.

[0034] 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체의 추가 측면에서, 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이종이량체는 동일하거나 또는 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이종이량체는 상이하다.

[0035] 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체의 추가 측면에서, 연결 모이어티는 제1 인슐린 또는 인슐린 유사체 이종이량체 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이종이량체를 그의 각각의 B-쇄 폴리펩티드의 카르복시 말단에 또는 그 근처에 있는 리신 잔기의 엡실론 아미노 기를 통해 공유 연결한다.

[0036] 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체의 다른 추가 측면에서, 치환기는 화학식  $RC(O)-$ 를 갖고, 여기서 R은  $R'CH_2$ ,  $R'NH$ ,  $R'O$ 일 수 있고, R'는 H, 선형 알킬 쇠, 아미노산, 펩티드, PEG, 사카라이드일 수 있으며, 특정한 측면에서, 치환기는 아세틸, 페닐아세틸, 카르바모일, N-알킬 카르바모일, 또는 알콕시카르보닐일 수 있다. 특정한 측면에서, 치환기는 아세틸, 페닐아세틸, 카르바모일, N-알킬 카르바모일, 이소부틸, 메톡시 아세틸, 글리신, 아미노에틸글루코스 (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, N-디메틸, 및 알콕시카르보닐로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0037] 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체의 추가 측면에서, 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체는 독립적으로 천연 인간 인슐린, 인슐린 리스프로, 인슐린 아스파르트, desB30 인슐린, 또는 인슐린 글라진이다.
- [0038] 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체의 특정한 측면에서, 각각의 A-쇄 폴리펩티드는 독립적으로 아미노산 서열  $GX_2X_3EQCCX_8SICSLYQLX_{17}NX_{19}CX_{23}$  (서열식별번호: 3)을 포함하고, 각각의 B-쇄 폴리펩티드는 독립적으로 아미노산 서열  $X_{25}LCGX_{29}X_{30}LVEALYLVCGERGFX_{27}YTX_{31}X_{32}$  (서열식별번호: 4) 또는  $X_{22}VNQX_{25}X_{26}CGX_{29}X_{30}LVEALYLVCGERGFX_{27}YTX_{31}X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}$  (서열식별번호: 5)를 포함하며, 여기서  $X_2$ 는 이소류신 또는 트레오닌이고;  $X_3$ 은 발린, 글리신, 또는 류신이고;  $X_8$ 은 트레오닌 또는 히스티딘이고;  $X_{17}$ 은 글루탐산 또는 글루타민이고;  $X_{19}$ 는 티로신, 4-메톡시-페닐알라닌, 알라닌, 또는 4-아미노 페닐알라닌이고;  $X_{23}$ 은 아스파라긴 또는 글리신이고;  $X_{22}$ 는 페닐알라닌 또는 데스아미노-페닐알라닌이고;  $X_{25}$ 는 히스티딘 또는 트레오닌이고;  $X_{26}$ 은 류신 또는 글리신이고;  $X_{27}$ 은 페닐알라닌 또는 아스파르트산이고;  $X_{29}$ 는 알라닌, 글리신, 또는 세린이고;  $X_{30}$ 은 히스티딘, 아스파르트산, 글루탐산, 호모시스테인, 또는 시스테인이고;  $X_{31}$ 은 아스파르트산, 프롤린, 또는 리신이고;  $X_{32}$ 는 리신 또는 프롤린이고;  $X_{33}$ 은 트레오닌, 알라닌이거나, 또는 부재하고;  $X_{34}$ 는 아르기닌이거나 또는 부재하고;  $X_{35}$ 는 아르기닌이거나 또는 부재하고; 단  $X_{31}$  또는  $X_{32}$  중 적어도 하나는 리신이다.
- [0039] 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체의 특정한 측면에서, 연결 모이어티는 아실, 지방족, 헤테로지방족, 아릴, 헤테로아릴, 및 헤테로시클릭으로 이루어진 군으로부터 선택된 임의로 치환된 기일 수 있다. 연결 모이어티는 2가, 직쇄형 또는 분지형, 포화 또는 불포화, 임의로 치환된 C1-C20 탄화수소쇄일 수 있으며, 여기서 1개 이상의 메틸렌 단위는 -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -N(R)SO<sub>2</sub>-, SO<sub>2</sub>N(R)-, 헤테로시클릭 기, 아릴 기, 또는 헤테로아릴 기에 의해 임의로 및 독립적으로 대체되고, 여기서 각 경우의 R은 독립적으로 수소, 적합한 보호 기, 아실 모이어티, 아릴알킬 모이어티, 지방족 모이어티, 아릴 모이어티, 헤테로아릴 모이어티, 또는 헤테로지방족 모이어티이다.
- [0040] 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체의 다른 추가 측면에서, 연결 모이어티는 아실 모이어티, -C(O)RC(O)-이고, 여기서 R은 알킬쇄, 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG)쇄, 아마이드-함유쇄, 트리아졸(들)-함유쇄, 시클로옥탄-함유 모이어티, 치환된 아실쇄, 또는 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG)쇄이다.
- [0041] 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체의 추가 측면에서, 연결 모이어티는 C2-C20 아실 모이어티이다.
- [0042] 특정한 측면에서, 연결 모이어티는 알킬디오일, -C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(O)- (여기서 n = 0-45)이며, 이는 옥살릴 (C2) 모이어티, 숙시닐 (C4) 모이어티, 아디포일 (C6) 모이어티, 수베리올 (C8) 모이어티, 테칸디오일 (C10) 모이어티, 도데칸디오일 (C12) 모이어티, 테트라데칸디오일 (C14) 모이어티, 또는 헥사데칸디오일 (C16) 모이어티를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0043] 상기 언급된 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체 중 어느 하나 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물이 추가로 제공된다.
- [0044] 본 발명은 추가로 하기 화학식을 포함하는 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체를 제공한다:
- [0045]  $D^1-L-D^2$
- [0046] 여기서  $D^1$  및  $D^2$ 는 각각 독립적으로 인슐린 또는 인슐린 유사체 폴리펩티드이고, 여기서 각각의 인슐린 폴리펩티드는쇄간 디설피드 결합을 통해 함께 연결된 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드를 포함하는 이중이량체이고; L은 연결 모이어티이며, 여기서 링커 모이어티의 하나의 말단은  $D^1$ 의 카르복실기에 또는 그 근처에 있는 아미노산 잔기에 부착되고, 링커 모이어티의 다른 말단은  $D^2$ 의 카르복실 말단에 또는 그 근처에 있는 아미노산 잔기에 부착되고, 단 L은 디설피드 연결을 포함하지 않고; 임의로 여기서  $D^1$  또는  $D^2$  중 적어도 하나는  $D^1$  또는  $D^2$ 의 A-쇄 폴리펩티드 또는 B-쇄 폴리펩티드의 아미노 말단에 부착된 치환기를 포함하고; 단 (1) 연결 모이어티는 디설피드 결합을 포함하지 않고, (2) A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드의 아미노 말단이 치환기를 포함하지 않는 경우, 연결 모이어티는 옥살릴 (C2) 모이어티, 수베리올 (C8) 모이어티, 또는 도데칸디오일 (C12) 모이어티가 아니다.

- [0047] 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체의 추가 측면에서,  $D^1$  및  $D^2$ 는 동일하거나 또는  $D^1$  및  $D^2$ 는 상이하다.
- [0048] 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체의 추가 측면에서, 연결 모이어티는  $D^1$  및  $D^2$ 의 카르복시 말단에 또는 그 근처에 있는 리신 잔기의 엡실론 아미노기를 통해  $D^1$  및  $D^2$ 를 공유 연결한다.
- [0049] 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체의 다른 추가 측면에서, 치환기는 화학식 RC(O)-를 갖고, 여기서 R은 R'CH<sub>2</sub>, R'NH, R'O일 수 있고, R'는 H, 선형 알킬 쇠, 아미노산, 펩티드, PEG, 사카라이드일 수 있으며, 특정한 측면에서 RC(O)-는 아세틸, 페닐아세틸, 카르바모일, N-알킬 카르바모일, 또는 알콕시카르보닐일 수 있다. 특정한 측면에서, 치환기는 아세틸, 페닐아세틸, 카르바모일, N-알킬 카르바모일, 이소부틸, 메톡시 아세틸, 글리신, 아미노에틸글루코스 (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, N-디메틸, 및 알콕시카르보닐로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0050] 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체의 추가 측면에서,  $D^1$  및  $D^2$ 는 독립적으로 천연 인간 인슐린, 인슐린 리스프로, 인슐린 아스파르트, desB30 인슐린, 또는 인슐린 글라진이다.
- [0051] 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체의 특정한 측면에서, 각각의 A-쇄 폴리펩티드는 독립적으로 아미노산 서열 GX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>EQCCX<sub>8</sub>SICSLYQLX<sub>17</sub>NX<sub>19</sub>CX<sub>23</sub> (서열식별번호: 3)을 포함하고, 각각의 B-쇄 폴리펩티드는 독립적으로 아미노산 서열 X<sub>25</sub>LCGX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>LVEALYLVCGERGFX<sub>27</sub>YTX<sub>31</sub>X<sub>32</sub> (서열식별번호: 4) 또는 X<sub>22</sub>VNQX<sub>25</sub>X<sub>26</sub>CGX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>LVEALYLVCGERGFX<sub>27</sub>YTX<sub>31</sub>X<sub>32</sub>X<sub>33</sub>X<sub>34</sub>X<sub>35</sub> (서열식별번호: 5)를 포함하며, 여기서 X<sub>2</sub>는 이소류신 또는 트레오닌이고; X<sub>3</sub>은 발린, 글리신, 또는 류신이고; X<sub>8</sub>은 트레오닌 또는 히스티딘이고; X<sub>17</sub>은 글루탐산 또는 글루타민이고; X<sub>19</sub>는 티로신, 4-메톡시-페닐알라닌, 알라닌, 또는 4-아미노 페닐알라닌이고; X<sub>23</sub>은 아스파라긴 또는 글리신이고; X<sub>25</sub>는 페닐알라닌 또는 데스아미노-페닐알라닌이고; X<sub>26</sub>는 히스티딘 또는 트레오닌이고; X<sub>27</sub>은 류신 또는 글리신이고; X<sub>29</sub>는 페닐알라닌 또는 아스파르트산이고; X<sub>29</sub>는 알라닌, 글리신, 또는 세린이고; X<sub>30</sub>는 히스티딘, 아스파르트산, 글루탐산, 호모시스테인, 또는 시스테인이고; X<sub>31</sub>은 아스파르트산, 프롤린, 또는 리신이고; X<sub>32</sub>는 리신 또는 프롤린이고; X<sub>33</sub>은 트레오닌, 알라닌이거나, 또는 부재하고; X<sub>34</sub>는 아르기닌이거나 또는 부재하고; X<sub>35</sub>는 아르기닌이거나 또는 부재하고; 단 X<sub>31</sub> 또는 X<sub>32</sub> 중 적어도 하나는 리신이다.
- [0052] 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체의 특정한 측면에서, 연결 모이어티는 아실, 지방족, 헤테로지방족, 아릴, 헤테로아릴, 및 헤테로시클릭으로 이루어진 군으로부터 선택된 임의로 치환된 기일 수 있다. 연결 모이어티는 2가, 직쇄형 또는 분지형, 포화 또는 불포화, 임의로 치환된 C1-C20 탄화수소 쇠일 수 있고, 여기서 1개 이상의 메틸렌 단위는 -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -N(R)SO<sub>2</sub>-, SO<sub>2</sub>N(R)-, 헤테로시클릭 기, 아릴 기, 또는 헤테로아릴 기에 의해 임의로 및 독립적으로 대체되고, 여기서 각 경우의 R은 독립적으로 수소, 적합한 보호 기, 아실 모이어티, 아릴알킬 모이어티, 지방족 모이어티, 아릴 모이어티, 헤테로아릴 모이어티, 또는 헤테로지방족 모이어티이다.
- [0053] 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체의 다른 추가 측면에서, 연결 모이어티는 아실 모이어티, -C(O)RC(O)-이고, 여기서 R은 알킬 쇠, 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 쇠, 아미드-함유 쇠, 트리아졸(들)-함유 쇠, 시클로옥탄-함유 모이어티, 치환된 아실 쇠, 또는 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 쇠이다.
- [0054] 인슐린 수용체 부분 효능제 또는 인슐린 이량체의 추가 측면에서, 연결 모이어티는 C2-C20 아실 모이어티이다.
- [0055] 특정한 측면에서, 연결 모이어티는 알킬디오일, -C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(O)- (여기서 n = 0-45)이며, 이는 옥살릴 (C2) 모이어티, 숙시닐 (C4) 모이어티, 아디포일 (C6) 모이어티, 수베리올 (C8) 모이어티, 데칸디오일 (C10) 모이어티, 도데칸디오일 (C12) 모이어티, 테트라데칸디오일 (C14) 모이어티, 또는 헥사데칸디오일 (C16) 모이어티를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0056] 본 발명은 추가로 제1 인슐린 유사체 이중이량체 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체를 포함하며, 각각의 이중이량체는 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드를 포함하는 것인 인슐린 유사체 이량체를 제공하며, 여기서 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드는 쇠간 디설피드 결합을 통해 함께 연결되고; 여기서 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체는 2개의 각각의 B-쇄 폴리펩티드의 카르복시 말단에 또는 그 근처에 있는

아미노산의 측쇄를 연결하는 연결 모이어티를 통해 함께 공유 연결되고; 여기서 인슐린 유사체는 인슐린 리스프로, 인슐린 아스파르트 및 인슐린 글라진으로부터 선택되고; 임의로 여기서 제1 인슐린 폴리펩티드 또는 제2 인슐린 폴리펩티드의 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드 중 적어도 하나의 아미노 말단은 치환기에 공유 연결되고, 단 연결 모이어티는 디설피드 결합을 포함하지 않는다.

[0057] 인슐린 수용체 부분 효능제의 추가 측면에서, 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이종이량체는 동일하거나 또는 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이종이량체는 상이하다.

[0058] 인슐린 수용체 부분 효능제의 추가 측면에서, 연결 모이어티는 제1 인슐린 또는 인슐린 유사체 이종이량체 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이종이량체를 그의 각각의 B-쇄 폴리펩티드의 카르복시 말단에 또는 그 근처에 있는 리신 잔기의 엡실론 아미노기를 통해 공유 연결한다.

[0059] 인슐린 수용체 부분 효능제의 다른 추가 측면에서, 치환기는 화학식 RC(O)-를 갖고, 여기서 R은 R'CH<sub>2</sub>, R'NH, R'O일 수 있고, R'는 H, 선형 알킬 쇠, 아미노산, 펩티드, PEG, 사카라이드일 수 있으며, 특정한 측면에서 RC(O)-는 아세틸, 페닐아세틸, 카르바모일, N-알킬 카르바모일, 또는 알콕시카르보닐일 수 있다. 특정한 측면에서, 치환기는 아세틸, 페닐아세틸, 카르바모일, N-알킬 카르바모일, 이소부틸, 메톡시 아세틸, 글리신, 아미노에틸글루코스 (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, N-디메틸, 및 알콕시카르보닐로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0060] 인슐린 수용체 부분 효능제의 추가 측면에서, 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 중 적어도 하나는 추가로 폴리에틸렌 글리콜, 당 모이어티, 또는 헤테로사이클에 접합된다.

[0061] 인슐린 수용체 부분 효능제의 특정한 측면에서, 연결 모이어티는 아실, 지방족, 헤테로지방족, 아릴, 헤테로아릴, 및 헤테로시클릭으로 이루어진 군으로부터 선택된 임의로 치환된 기일 수 있다. 연결 모이어티는 2가, 직쇄형 또는 분지형, 포화 또는 불포화, 임의로 치환된 C1-C20 탄화수소 쇠일 수 있으며, 여기서 1개 이상의 메틸렌 단위는 -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -N(R)SO<sub>2</sub>-, SO<sub>2</sub>N(R)-, 헤테로시클릭 기, 아릴 기, 또는 헤테로아릴 기에 의해 임의로 및 독립적으로 대체되고, 여기서 각 경우의 R은 독립적으로 수소, 적합한 보호 기, 아실 모이어티, 아릴알킬 모이어티, 지방족 모이어티, 아릴 모이어티, 헤테로아릴 모이어티, 또는 헤테로지방족 모이어티이다.

[0062] 인슐린 수용체 부분 효능제의 다른 추가 측면에서, 연결 모이어티는 아실 모이어티, -C(O)RC(O)-이고, 여기서 R은 알킬 쇠, 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 쇠, 아미드-함유 쇠, 트리아졸(들)-함유 쇠, 시클로옥틴-함유 모이어티, 치환된 아실 쇠, 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 쇠이다.

[0063] 인슐린 수용체 부분 효능제의 추가 측면에서, 연결 모이어티는 C2-C20 아실 모이어티이다.

[0064] 특정한 측면에서, 연결 모이어티는 알킬디오일, -C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(O)- (여기서 n = 0-45)이며, 이는 옥살릴 (C2) 모이어티, 숙시닐 (C4) 모이어티, 아디포일 (C6) 모이어티, 수베리올 (C8) 모이어티, 데칸디오일 (C10) 모이어티, 도데칸디오일 (C12) 모이어티, 테트라데칸디오일 (C14) 모이어티, 또는 헥사데칸디오일 (C16) 모이어티를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0065] 본 발명은 추가로 하기 화학식을 포함하는 인슐린 유사체 이량체를 제공한다:



[0067] 여기서 D<sup>1</sup> 및 D<sup>2</sup>는 각각 독립적으로 인슐린 또는 인슐린 유사체 폴리펩티드이고, 여기서 각각의 인슐린 폴리펩티드는 쇠간 디설피드 결합을 통해 함께 연결된 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드를 포함하는 이종이량체이고; L은 연결 모이어티이며, 여기서 링커 모이어티의 하나의 말단은 D<sup>1</sup>의 카르복실 기에 또는 그 근처에 있는 아미노산 잔기에 부착되고, 링커 모이어티의 다른 말단은 D<sup>2</sup>의 카르복실 말단에 또는 그 근처에 있는 아미노산 잔기에 부착되고, 단 L은 디설피드 연결을 포함하지 않고; 여기서 인슐린 유사체는 인슐린 리스프로, 인슐린 아스파르트 및 인슐린 글라진으로부터 선택되고; 임의로 여기서 D<sup>1</sup> 또는 D<sup>2</sup> 중 적어도 하나는 D<sup>1</sup> 또는 D<sup>2</sup>의 A-쇄 폴리펩티드 또는 B-쇄 폴리펩티드의 아미노 말단에 부착된 치환기를 포함하고; 단 연결 모이어티는 디설피드 결합을 포함하지 않는다.

[0068] 인슐린 수용체 부분 효능제의 추가 측면에서, D<sup>1</sup> 및 D<sup>2</sup>는 동일하거나 또는 D<sup>1</sup> 및 D<sup>2</sup>는 상이하다.

- [0069] 인슐린 수용체 부분 효능제의 추가 측면에서, 연결 모이어티는  $D^1$  및  $D^2$ 의 카르복시 말단에 또는 그 근처에 있는 리신 잔기의 엡실론 아미노 기를 통해  $D^1$  및  $D^2$ 를 공유 연결한다.
- [0070] 인슐린 수용체 부분 효능제의 다른 추가 측면에서, 치환기는 화학식  $RC(O)-$ 를 갖고, 여기서 R은  $R'CH_2$ ,  $R'NH$ ,  $R'O$ 일 수 있고, R'는 H, 선형 알킬 쇠, 아미노산, 펩티드, PEG, 사카라이드일 수 있으며, 특정한 측면에서  $RC(O)-$ 는 아세틸, 페닐아세틸, 카르바모일, N-알킬 카르바모일, 또는 알콕시카르보닐일 수 있다. 특정한 측면에서, 치환기는 아세틸, 페닐아세틸, 카르바모일, N-알킬 카르바모일, 이소부틸, 메톡시 아세틸, 글리신, 아미노에틸글루코스 (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, N-디메틸, 및 알콕시카르보닐로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0071] 인슐린 수용체 부분 효능제의 특정한 측면에서, 연결 모이어티는 아실, 지방족, 헤테로지방족, 아릴, 헤테로아릴, 및 헤테로시클릭으로 이루어진 군으로부터 선택된 임의로 치환된 기일 수 있다. 연결 모이어티는 2가, 직쇄형 또는 분지형, 포화 또는 불포화, 임의로 치환된 C1-C20 탄화수소 쇠일 수 있으며, 여기서 1개 이상의 메틸렌 단위는  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-N(R)-$ ,  $-C(O)-$ ,  $C(O)O-$ ,  $OC(O)-$ ,  $-N(R)C(O)-$ ,  $-C(O)N(R)-$ ,  $-S(O)-$ ,  $-S(O)_2-$ ,  $-N(R)SO_2-$ ,  $SO_2N(R)-$ , 헤테로시클릭 기, 아릴 기, 또는 헤테로아릴 기에 의해 임의로 및 독립적으로 대체되고, 여기서 각 경우의 R은 독립적으로 수소, 적합한 보호 기, 아실 모이어티, 아릴알킬 모이어티, 지방족 모이어티, 아릴 모이어티, 헤테로아릴 모이어티, 또는 헤테로지방족 모이어티이다.
- [0072] 인슐린 수용체 부분 효능제의 다른 추가 측면에서, 연결 모이어티는 아실 모이어티,  $-C(O)RC(O)-$ 이고, 여기서 R은 알킬 쇠, 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 쇠, 아마이드-함유 쇠, 트리아졸(들)-함유 쇠, 시클로옥탄-함유 모이어티, 치환된 아실 쇠, 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 쇠이다.
- [0073] 인슐린 수용체 부분 효능제의 추가 측면에서, 연결 모이어티는 C2-C20 아실 모이어티이다.
- [0074] 특정한 측면에서, 연결 모이어티는 알킬디오일,  $-C(O)(CH_2)_nC(O)-$  (여기서  $n = 0-45$ )이며, 이는 옥살릴 (C2) 모이어티, 숙시닐 (C4) 모이어티, 아디포일 (C6) 모이어티, 수베리올 (C8) 모이어티, 테칸디오일 (C10) 모이어티, 도데칸디오일 (C12) 모이어티, 테트라데칸디오일 (C14) 모이어티, 또는 헥사데칸디오일 (C16) 모이어티를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0075] 본 발명은 제1 인슐린 또는 인슐린 유사체 이종이량체 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이종이량체를 포함하며, 각각의 이종이량체는 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드를 포함하는 것인 인슐린 수용체 부분 효능제를 제공하며, 여기서 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드는 쇠간 디설피드 결합을 통해 함께 연결되고; 여기서 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이종이량체는 2개의 각각의 B-쇄 폴리펩티드의 카르복시 말단에 또는 그 근처에 있는 아미노산의 측쇄를 연결하는 연결 모이어티를 통해 함께 공유 연결되고; 임의로 여기서 제1 인슐린 폴리펩티드 또는 제2 인슐린 폴리펩티드의 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드 중 적어도 하나의 아미노 말단은 치환기에 공유 연결되고; 여기서 인슐린 수용체 부분 효능제의 인간 인슐린 수용체 (IR)를 향한 최대 반응은 기능적 인산화 검정에 의해 결정시 IR을 향한 천연 인간 인슐린의 최대 반응의 약 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 또는 70%이거나; 또는
- [0076] 제1 인슐린 또는 인슐린 유사체 이종이량체 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이종이량체를 포함하며, 각각의 이종이량체는 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드를 포함하는 것인 인슐린 수용체 부분 효능제를 제공하며, 여기서 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드는 쇠간 디설피드 결합을 통해 함께 연결되고; 여기서 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이종이량체는 2개의 각각의 B-쇄 폴리펩티드의 카르복시 말단에 또는 그 근처에 있는 아미노산의 측쇄를 연결하는 연결 모이어티를 통해 함께 공유 연결되고; 임의로 여기서 제1 인슐린 폴리펩티드 또는 제2 인슐린 폴리펩티드의 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드 중 적어도 하나의 아미노 말단은 치환기에 공유 연결되고; 여기서 인슐린 수용체 부분 효능제의 인간 인슐린 수용체 (IR)를 향한 최대 반응은 기능적 인산화 검정에 의해 결정시 IR을 향한 천연 인간 인슐린의 최대 반응의 20% 내지 70%, 40% 내지 70%, 50% 내지 70%, 40% 내지 60%, 또는 20% 내지 40%이거나; 또는
- [0077] 제1 인슐린 또는 인슐린 유사체 이종이량체 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이종이량체를 포함하며, 각각의 이종이량체는 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드를 포함하는 것인 인슐린 수용체 부분 효능제를 제공하며, 여기서 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드는 쇠간 디설피드 결합을 통해 함께 연결되고; 여기서 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이종이량체는 2개의 각각의 B-쇄 폴리펩티드의 카르복시 말단에 또는 그 근처에 있는 아미노산의 측쇄를 연결하는 연결 모이어티를 통해 함께 공유 연결되고; 임의로 여기서 제1 인슐린 폴리펩티드 또는 제2 인슐린 폴리펩티드의 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드 중 적어도 하나의 아미노 말단은 치환기에

공유 연결되고; 여기서 인슐린 수용체 부분 효능제의 인간 인슐린 수용체 (IR)를 향한 최대 반응은 기능적 인산화 검정에 의해 결정시에 IR을 향한 천연 인간 인슐린의 최대 반응의 적어도 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 또는 70%이거나; 또는

[0078] 제1 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체를 포함하며, 각각의 이중이량체는 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드를 포함하는 인슐린 수용체 부분 효능제를 제공하며, 여기서 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드는 쇠간 디설피드 결합을 통해 함께 연결되고; 여기서 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체는 2개의 각각의 B-쇄 폴리펩티드의 카르복시 말단에 또는 그 근처에 있는 아미노산의 측쇄를 연결하는 연결 모이어티를 통해 함께 공유 연결되고; 임의로 여기서 제1 인슐린 폴리펩티드 또는 제2 인슐린 폴리펩티드의 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드 중 적어도 하나의 아미노 말단은 치환기에 공유 연결되고; 여기서 인슐린 수용체 부분 효능제의 인간 인슐린 수용체 (IR)를 향한 최대 반응은 기능적 인산화 검정에 의해 결정시에 IR을 향한 천연 인간 인슐린의 최대 반응의 70% 미만이거나; 또는

[0079] 제1 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체를 포함하며, 각각의 이중이량체는 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드를 포함하는 것인 인슐린 수용체 부분 효능제를 제공하며, 여기서 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드는 쇠간 디설피드 결합을 통해 함께 연결되고; 여기서 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체는 2개의 각각의 B-쇄 폴리펩티드의 카르복시 말단에 또는 그 근처에 있는 아미노산의 측쇄를 연결하는 연결 모이어티를 통해 함께 공유 연결되고; 임의로 여기서 제1 인슐린 폴리펩티드 또는 제2 인슐린 폴리펩티드의 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드 중 적어도 하나의 아미노 말단은 치환기에 공유 연결되고; 여기서 인슐린 수용체 부분 효능제의 인간 인슐린 수용체 (IR)를 향한 최대 반응은 기능적 인산화 검정에 의해 결정시에 IR을 향한 천연 인간 인슐린의 최대 반응의 약 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 또는 70%이다.

[0080] 상기 실시양태에서, 기능적 인산화 검정은 인슐린 수용체 (IR) AKT-인산화 검정일 수 있다.

[0081] 인슐린 수용체 부분 효능제의 추가 측면에서, 연결 모이어티는 디설피드 결합을 포함하지 않고, A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드의 아미노 말단이 치환기를 포함하지 않는 경우, 연결 모이어티는 옥살릴 (C2) 모이어티, 수베리올 (C8) 모이어티, 또는 도데칸디오일 (C12) 모이어티가 아니다.

[0082] 인슐린 수용체 부분 효능제의 추가 측면에서, 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체는 동일하거나 또는 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체는 상이하다.

[0083] 인슐린 수용체 부분 효능제의 추가 측면에서, 연결 모이어티는 제1 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체 이중이량체를 그의 각각의 B-쇄 폴리펩티드의 카르복시 말단에 또는 그 근처에 있는 리신 잔기의 엡실론 아미노기를 통해 공유 연결한다.

[0084] 인슐린 수용체 부분 효능제의 다른 추가 측면에서, 치환기는 화학식 RC(O)-를 갖고, 여기서 R은 R'CH<sub>2</sub>, R'NH, R'O일 수 있고, R'는 H, 선형 알킬 쇠, 아미노산, 펩티드, PEG, 사카라이드일 수 있으며, 특정한 측면에서 RC(O)-는 아세틸, 페닐아세틸, 카르바모일, N-알킬 카르바모일, 또는 알콕시카르보닐일 수 있다. 특정한 측면에서, 치환기는 아세틸, 페닐아세틸, 카르바모일, N-알킬 카르바모일, 이소부틸, 메톡시 아세틸, 글리신, 아미노에틸글루코스 (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, N-디메틸, 및 알콕시카르보닐로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0085] 인슐린 수용체 부분 효능제의 추가 측면에서, 제1 및 제2 인슐린 또는 인슐린 유사체는 독립적으로 천연 인간 인슐린, 인슐린 리스프로, 인슐린 아스파르트, desB30 인슐린, 또는 인슐린 글라진이다.

[0086] 인슐린 수용체 부분 효능제의 특정한 측면에서, 각각의 A-쇄 폴리펩티드는 독립적으로 아미노산 서열 GX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>EQCCX<sub>8</sub>SICSLYQLX<sub>17</sub>NX<sub>19</sub>CX<sub>23</sub> (서열식별번호: 3)을 포함하고, 각각의 B-쇄 폴리펩티드는 독립적으로 아미노산 서열 X<sub>25</sub>LCGX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>LVEALYLVCGERGFX<sub>27</sub>YTX<sub>31</sub>X<sub>32</sub> (서열식별번호: 4) 또는 X<sub>22</sub>VNQX<sub>25</sub>X<sub>26</sub>CGX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>LVEALYLVCGERGFX<sub>27</sub>YTX<sub>31</sub>X<sub>32</sub>X<sub>33</sub>X<sub>34</sub>X<sub>35</sub> (서열식별번호: 5)를 포함하며, 여기서 X<sub>2</sub>는 이소류신 또는 트레오닌이고; X<sub>3</sub>는 발린, 글리신, 또는 류신이고; X<sub>8</sub>은 트레오닌 또는 히스티딘이고; X<sub>17</sub>은 글루탐산 또는 글루타민이고; X<sub>19</sub>는 티로신, 4-메톡시-페닐알라닌, 알라닌, 또는 4-아미노 페닐알라닌이고; X<sub>23</sub>은 아스파라긴 또는 글리신이고; X<sub>25</sub>는 페닐알라닌 또는 데스아미노-페닐알라닌이고; X<sub>26</sub>는 히스티딘 또는 트레오닌이고; X<sub>27</sub>은 류신 또는 글리신이고; X<sub>29</sub>는 페닐알라닌 또는 아스파르트산이고; X<sub>29</sub>는 알라닌, 글리신, 또는 세린이고; X<sub>30</sub>는 히스티딘, 아스파르트산, 글루탐산, 호모시스테인, 또는 시스테인이고; X<sub>31</sub>은 아스파르트산, 프롤린, 또는 리신이고;

$X_{32}$ 는 리신 또는 프롤린이고;  $X_{33}$ 은 트레오닌, 알라닌이거나, 또는 부재하고;  $X_{34}$ 는 아르기닌이거나 또는 부재하고;  $X_{35}$ 는 아르기닌이거나 또는 부재하고; 단  $X_{31}$  또는  $X_{32}$  중 적어도 하나는 리신이다.

[0087] 인슐린 수용체 부분 효능제의 특정한 측면에서, 연결 모이어티는 아실, 지방족, 헤테로지방족, 아릴, 헤테로아릴, 및 헤테로시클릭으로 이루어진 군으로부터 선택된 임의로 치환된 기일 수 있다. 연결 모이어티는 2가, 직쇄형 또는 분지형, 포화 또는 불포화, 임의로 치환된 C1-20 탄화수소 쇠일 수 있으며, 여기서 1개 이상의 메틸렌 단위는 -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -N(R)SO<sub>2</sub>-, SO<sub>2</sub>N(R)-, 헤테로시클릭 기, 아릴 기, 또는 헤테로아릴 기에 의해 임의로 및 독립적으로 대체되고, 여기서 각 경우의 R은 독립적으로 수소, 적합한 보호 기, 아실 모이어티, 아릴알킬 모이어티, 지방족 모이어티, 아릴 모이어티, 헤테로아릴 모이어티, 또는 헤테로지방족 모이어티이다.

[0088] 인슐린 수용체 부분 효능제의 다른 추가 측면에서, 연결 모이어티는 아실 모이어티, -C(O)RC(O)-이고, R은 알킬 쇠, 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 쇠, 아마이드-함유 쇠, 트리아졸(들)-함유 쇠, 시클로옥탄-함유 모이어티, 치환된 아실 쇠, 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 쇠이다.

[0089] 인슐린 수용체 부분 효능제의 추가 측면에서, 연결 모이어티는 C2-C20 아실 모이어티이다.

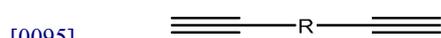
[0090] 특정한 측면에서, 연결 모이어티는 알킬디오일, -C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(O)- (여기서 n = 0-45)이며, 이는 옥살릴 (C2) 모이어티, 숙시닐 (C4) 모이어티, 아디포일 (C6) 모이어티, 수베리올 (C8) 모이어티, 데칸디오일 (C10) 모이어티, 도데칸디오일 (C12) 모이어티, 테트라데칸디오일 (C14) 모이어티, 또는 헥사데칸디오일 (C16) 모이어티를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0091] 본 발명은 추가로 링커 1, 링커 2, 링커 3, 링커 10, 링커 11, 링커 12, 링커 13, 링커 14, 링커 15, 링커 16, 링커 17, 링커 18, 링커 19, 링커 20, 링커 21, 링커 22, 링커 23, 링커 24, 링커 25, 링커 26, 링커 27, 링커 28, 링커 29, 링커 30, 링커 31, 링커 32, 링커 33, 링커 34, 링커 35, 링커 36, 링커 37, 링커 38, 링커 39, 링커 40, 링커 41, 링커 42, 링커 43, 링커 44, 링커 45, 링커 46, 링커 47, 링커 48, 링커 49, 및 링커 50으로 이루어진 군으로부터 선택된 이관능성 링커에 의해 함께 접합된 제1 A-쇄 폴리펩티드 및 제1 B-쇄 폴리펩티드를 갖는 제1 인슐린 이중이량체 분자의 제1 B29 또는 B28 Lys 및 제2 A-쇄 폴리펩티드 및 제2 B-쇄 폴리펩티드를 갖는 제2 인슐린 이중이량체의 제2 B29 또는 B28 Lys를 포함하는 인슐린 이량체를 제공하며, 단 이관능성 링커가 링커 10, 링커 11, 링커 12, 링커 13, 또는 링커 14인 경우, 제1 또는 제2 A-쇄 또는 B-쇄 폴리펩티드 중 적어도 하나가 그의 N-말단 아미노산에서 치환기에 접합되거나 또는 제1 인슐린 이중이량체 분자의 적어도 N-말단 아미노산이 치환기에 접합되거나 또는 제1 인슐린 이중이량체 및 제2 인슐린 이중이량체 둘 다의 N-말단 아미노산이 치환기에 접합된다.

[0092] 특정한 실시양태에서, 치환기는 화학식 RC(O)-를 갖는 기에 연결된 N-히드록시숙신이미드 에스테르를 포함하고, 여기서 R은 R'CH<sub>2</sub>, R'NH, R'O일 수 있고, R'는 H, 선형 알킬 쇠, 아미노산, 펩티드, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 사카라이드일 수 있다. 특정한 실시양태에서, 치환기는 카르바모일 기, 아세틸 기, 글리신, 메틸 기, 메톡시 기, 디메틸 기, 이소부틸 기, PEG1 기, AEG 기, AEG-C6 알킬 기, 또는 PEG2 기이다.

[0093] 본 발명은 추가로 링커 5 및 링커 7로 이루어진 군으로부터 선택된 제1 링커에 접합된 제1 A-쇄 폴리펩티드 및 제1 B-쇄 폴리펩티드를 갖는 제1 인슐린 이중이량체 분자의 제1 B29 또는 B28 Lys 및 링커 4, 링커 6, 링커 8, 및 링커 9로 이루어진 군으로부터 선택된 제2 링커에 접합된 제2 A-쇄 폴리펩티드 및 제2 B-쇄 폴리펩티드를 갖는 제2 인슐린 이중이량체의 제2 B29 또는 B28 Lys를 제1 링커 및 제2 링커를 통해 함께 접합된 상태로 포함하는 인슐린 이량체를 제공한다.

[0094] 추가 실시양태에서, 본 발명은 링커 5 및 링커 7로 이루어진 군으로부터 선택된 제1 링커에 접합된 제1 A-쇄 폴리펩티드 및 제1 B-쇄 폴리펩티드를 갖는 제1 인슐린 이중이량체 분자의 제1 B29 또는 B28 Lys 및 링커 5 및 링커 7로 이루어진 군으로부터 선택된 제2 링커에 접합된 제2 A-쇄 폴리펩티드 및 제2 B-쇄 폴리펩티드를 갖는 제2 인슐린 이중이량체의 제2 B29 또는 B28 Lys를 포함하는 인슐린 유사체 이량체를 제공하며, 여기서 제1 및 제2 링커는 하기 구조를 갖는 가교 링커를 통해 함께 접합된다:

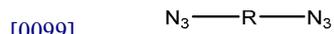


[0096] 여기서 R은 공유 결합, 탄소 원자, 페닐, 헤테로원자, 또는 아실, 지방족, 헤테로지방족, 아릴, 헤테로아릴, 및 헤테로시클릭으로 이루어진 군으로부터 선택된 임의로 치환된 기이다. 특정한 측면에서 R은 C2, C3, C4, C6,

C7, C8, C9 또는 C10 아실 기 또는 PEG2, PEG3, PEG4, PEG5, PEG6, PEG7, PEG8, PEG9, PEG10, PEG11, PEG12, PEG13, 또는 PEG25이다.

[0097] 특정한 실시양태에서, 치환기는 화학식 RC(O)-를 갖는 기에 연결된 N-히드록시숙신이미드 에스테르를 포함하고, 여기서 R은 R'CH<sub>2</sub>, R'NH, R'O일 수 있고, R'는 H, 선형 알킬 쇠, 아미노산, 펩티드, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 사카라이드일 수 있다. 특정한 실시양태에서, 치환기는 카르바모일 기, 아세틸 기, 글리신, 메틸 기, 메톡시 기, 디메틸 기, 이소부틸 기, PEG1 기, AEG 기, AEG-C6 알킬 기, 또는 PEG2 기이다.

[0098] 추가 실시양태에서, 본 발명은 링커 4, 링커 6, 링커 8, 및 링커 9로 이루어진 군으로부터 선택된 제1 링커에 접합된 제1 A-쇄 폴리펩티드 및 제1 B-쇄 폴리펩티드를 갖는 제1 인슐린 이중이량체 분자의 제1 B29 또는 B28 Lys 및 링커 4, 링커 6, 링커 8, 및 링커 9로 이루어진 군으로부터 선택된 제2 링커에 접합된 제2 A-쇄 폴리펩티드 및 제2 B-쇄 폴리펩티드를 갖는 제2 인슐린 이중이량체의 제2 B29 또는 B28 Lys를 포함하는 인슐린 유사체 이량체를 제공하며, 여기서 제1 및 제2 링커는 하기 구조를 갖는 가교 링커를 통해 함께 접합된다:



[0100] 여기서 R은 공유 결합, 탄소 원자, 페닐, 헤테로원자, 또는 아실, 지방족, 헤테로지방족, 아릴, 헤테로아릴, 및 헤테로시클릭으로 이루어진 군으로부터 선택된 임의로 치환된 기이다. 특정한 측면에서 R은 C2, C3, C4, C6, C7, C8, C9 또는 C10 아실 기 또는 PEG2, PEG3, PEG4, PEG5, PEG6, PEG7, PEG8, PEG9, PEG10, PEG11, PEG12, PEG13, 또는 PEG25이다.

[0101] 특정한 실시양태에서, 치환기는 화학식 RC(O)-를 갖는 기에 연결된 N-히드록시숙신이미드 에스테르를 포함하며, 여기서 R은 R'CH<sub>2</sub>, R'NH, R'O일 수 있고, R'는 H, 선형 알킬 쇠, 아미노산, 펩티드, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 사카라이드일 수 있다. 특정한 실시양태에서, 치환기는 카르바모일 기, 아세틸 기, 글리신, 메틸 기, 메톡시 기, 디메틸 기, 이소부틸 기, PEG1 기, AEG 기, AEG-C6 알킬 기, 또는 PEG2 기이다.

[0102] 본 발명은 추가로 본원에 개시된 인슐린 수용체 부분 효능제 중 어느 하나 및 제약상 허용되는 염을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0103] 본 발명은 상기 언급된 인슐린 수용체 부분 효능제 중 어느 하나를 포함하는 조성물의 치료 유효량을 당뇨병을 갖는 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 당뇨병을 치료하는 방법을 제공한다. 특정한 측면에서 당뇨병은 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병 또는 임신성 당뇨병이다.

[0104] 본 발명은 상기 언급된 인슐린 수용체 부분 효능제 중 어느 하나를 포함하는 당뇨병의 치료를 위한 조성물의 용도를 제공한다. 특정한 측면에서 당뇨병은 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병 또는 임신성 당뇨병이다.

[0105] 본 발명은 당뇨병의 치료를 위한 의약의 제조에 있어서의 본원에 개시된 인슐린 수용체 부분 효능제 중 어느 하나의 용도를 제공한다. 특정한 측면에서 당뇨병은 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병 또는 임신성 당뇨병이다.

[0106] 정의

[0107] 인슐린 - 본원에 사용된 이 용어는 동물 신체에서의 탄수화물의 대사에 영향을 미치며 당뇨병 치료에 유용한 핵장의 활성 성분을 의미한다. 이 용어는 자연 발생 인슐린과 구조, 용도, 및 의도되는 효과가 동일하거나 또는 유사하며 당뇨병 치료에 유용한 합성 및 생체공학적으로 유래된 생성물을 포함한다. 이 용어는 서열식별번호: 1에 제시된 아미노산 서열을 갖는 A-쇄 펩티드 및 서열식별번호: 2에 제시된 아미노산 서열을 갖는 B-쇄 펩티드를 포함하는 51개 아미노산 이중이량체를 지칭하는 일반적 용어이며, 여기서 A 쇠의 위치 6 및 11에 있는 시스테인 잔기가 디설피드 결합으로 연결되고, A 쇠의 위치 7 및 B 쇠의 위치 7에 있는 시스테인 잔기가 디설피드 결합으로 연결되고, A 쇠의 위치 20 및 B 쇠의 위치 19에 있는 시스테인 잔기가 디설피드 결합으로 연결된다.

[0108] 인슐린 유사체 또는 유사체들 - 본원에 사용된 이 용어는 천연 A-쇄 펩티드 및/또는 B-쇄 펩티드의 1개 이상의 변형(들)을 포함하는 임의의 이중이량체 유사체 또는 단일-쇄 유사체를 포함한다. 변형은 A4, A5, A8, A9, A10, A12, A13, A14, A15, A16, A17, A18, A19, A21, B1, B2, B3, B4, B5, B9, B10, B13, B14, B15, B16, B17, B18, B20, B21, B22, B23, B26, B27, B28, B29, 및 B30으로부터 선택된 위치에 있는 천연 아미노산에 대한 아미노산 치환; 임의의 또는 모든 위치 B1-4 및 B26-30의 결실; 또는 직접적인 또는 중합체성 또는 비-중합체성 링커에 의한 1개 이상의 아실, 폴리에틸글리신 (PEG), 또는 사카라이드 모이어티 (모이어티들)의 접합; 또는 그의 임의의 조합을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본원에 개시된 N-연결된 글리코실화 인슐린 유사체에 의해 예시되는 바와 같이, 이 용어는 추가로 적어도 1개의 N-연결된 글리코실화 부위를 갖도록 변형된 임의

의 인슐린 이중이량체 및 단일-쇄 유사체를 포함하고, 특히 N-연결된 글리코실화 부위가 N-글리칸에 연결되거나 또는 이에 의해 점유된 실시양태를 포함한다. 인슐린 유사체의 예는 공개된 국제 출원 W020100080606, W02009/099763, 및 W02010080609 (그의 개시내용은 본원에 참조로 포함됨)에 개시된 이중이량체 및 단일-쇄 유사체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 단일-쇄 인슐린 유사체의 예는 또한 공개된 국제 출원 W09634882, W095516708, W02005054291, W02006097521, W02007104734, W02007104736, W02007104737, W02007104738, W02007096332, W02009132129; 미국 특허 번호 5,304,473 및 6,630,348; 및 문헌 [Kristensen et al., Biochem. J. 305: 981-986 (1995)] (그의 각각의 개시내용은 본원에 참조로 포함됨)에 개시된 것을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0109] 이 용어는 인슐린 수용체에서 검출가능한 활성을 거의 또는 전혀 갖지 않으나, 천연 인슐린에 비해 인슐린 수용체에서 활성의 적어도 1%, 10%, 50%, 75%, 또는 90%를 갖는 인슐린 수용체에서의 활성을 갖도록 하는 1개 이상의 아미노산 변형 또는 치환을 포함하도록 변형되었으며 적어도 1개의 N-연결된 글리코실화 부위를 추가로 포함하는 단일-쇄 및 이중이량체 폴리펩티드 분자를 추가로 포함한다. 특정한 측면에서, 인슐린 유사체는 천연 인슐린에 비해 인슐린 수용체에서 80% (또는 70%) 미만의 활성을 갖는 부분 효능제이다. 인슐린 성장 호르몬 수용체에서 감소된 활성을 갖고 인슐린 수용체에서 증진된 활성을 갖는 이들 인슐린 유사체는 이중이량체 및 단일-쇄 유사체를 둘 다 포함한다.

[0110] 단일-쇄 인슐린 또는 단일-쇄 인슐린 유사체 - 본원에 사용된 이 용어는 A-쇄 펩티드 또는 기능적 유사체 및 B-쇄 펩티드 또는 기능적 유사체가 2 내지 35개 아미노산의 펩티드 또는 폴리펩티드 또는 비-펩티드 중합체성 또는 비-중합체성 링커에 의해 공유 연결되고, 천연 인슐린에 비해 인슐린 수용체에서 인슐린의 활성의 적어도 1%, 10%, 50%, 75%, 또는 90%를 갖는 구조적으로-관련된 단백질의 군을 포괄한다. 단일-쇄 인슐린 또는 인슐린 유사체는 3개의 디설피드 결합을 추가로 포함한다: 제1 디설피드 결합은 A-쇄 또는 그의 기능적 유사체의 위치 6 및 11에 있는 시스테인 잔기 사이에 있고, 제2 디설피드 결합은 A-쇄 또는 그의 기능적 유사체의 위치 7 및 B-쇄 또는 그의 기능적 유사체의 위치 7에 있는 시스테인 잔기 사이에 있고, 제3 디설피드 결합은 A-쇄 또는 그의 기능적 유사체의 위치 20 및 B-쇄 또는 그의 기능적 유사체의 위치 19에 있는 시스테인 잔기 사이에 있다.

[0111] 펩티드 또는 C-펩티드 연결 - 본원에 사용된 이 용어는 단일-쇄 프리프로인슐린-유사 분자의 B-C-A 폴리펩티드 서열의 모이어티 "C"의 연결을 지칭한다. 특히, 천연 인슐린 쇠에서, C-펩티드는 B-쇄의 위치 30에 있는 아미노산과 A-쇄의 위치 1에 있는 아미노산을 연결한다. 이 용어는 두 천연 인슐린 C-펩티드, 원숭이 C-펩티드, 및 B-쇄를 A-쇄에 연결하는 3 내지 35개 아미노산의 임의의 다른 펩티드를 지칭할 수 있으며, 이에 따라 단일-쇄 인슐린 유사체 (예를 들어, 미국 공개 출원 번호 20090170750 및 20080057004 및 W09634882 참조) 및 W09516708 및 미국 특허 번호 7,105,314에 개시된 바와 같은 인슐린 전구체 분자에서 A-쇄 펩티드에 대한 B-쇄 펩티드의 임의의 펩티드 연결을 포괄하도록 의도된다.

[0112] 아미노산 변형 - 본원에 사용된 이 용어는 아미노산의 치환, 또는 아미노산에의/으로부터의 화학적 기의 부가 및/또는 제거에 의한 아미노산의 유도체화를 지칭하고, 인간 단백질에서 통상적으로 발견되는 20개의 아미노산, 뿐만 아니라 비정형 또는 비-자연 발생 아미노산 중 임의의 것으로의 치환을 포함한다. 비정형 아미노산의 상업적 공급원은 시그마-알드리치 (위스콘신주 밀워키), 캠프 인크. (플로리다주 마이애미) 및 겐자임 파마슈티칼스 (매사추세츠주 캄브리지)를 포함한다. 비정형 아미노산은 상업적 공급업체로부터 구입하거나, 신생 합성하거나, 또는 자연 발생 아미노산으로부터 화학적으로 변형시키거나 또는 유도체화시킬 수 있다.

[0113] 아미노산 치환 - 본원에 사용된 바와 같이, 하나의 아미노산 잔기의 상이한 아미노산 잔기에 의한 대체를 지칭한다.

[0114] 보존적 아미노산 치환 - 본원에 사용된 이 용어는 하기 5개의 군 중 하나 내의 교환으로서 본원에 정의된다:

[0115] I. 작은 지방족, 비극성 또는 다소 극성의 잔기:

[0116] Ala, Ser, Thr, Pro, Gly;

[0117] II. 극성, 음으로 하전된 잔기 및 그의 아미드:

[0118] Asp, Asn, Glu, Gln, 시스테인 및 호모시스테인;

[0119] III. 극성, 양으로 하전된 잔기:

[0120] His, Arg, Lys; 오르니틴 (Orn)

- [0121] IV. 큰, 지방족, 비극성 잔기:
- [0122] Met, Leu, Ile, Val, Cys, 노르류신 (Nle), 호모시스테인
- [0123] V. 큰, 방향족 잔기:
- [0124] Phe, Tyr, Trp, 아세틸 페닐알라닌
- [0125] 치료하다 - 본원에 사용된 용어 "치료하다" (또는 "치료하는", "치료된", "치료" 등)는 그를 필요로 하는 대상체에게 본 개시내용의 IRPA를, 상태 (예를 들어, 당뇨병), 상태의 증상 또는 증상들 (예를 들어, 고혈당), 또는 상태에 대한 소인을 완화, 경감, 변경, 호전, 개선시키거나, 또는 그에 효과를 미치기 위한 목적으로 투여하는 것을 지칭한다. 예를 들어, 본원에 사용된 용어 "당뇨병 치료"는 일반적으로 글루코스 혈액 수준을 정상 수준 근처에서 유지하는 것을 지칭할 것이고, 주어진 상황에 따라 혈액 글루코스 수준을 증가시키거나 감소시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0126] 제약상 허용되는 담체 - 본원에 사용된 이 용어는 그를 필요로 하는 개체에의 또는 그에 의한 투여에 적합한 임의의 표준 제약 담체, 예컨대 포스페이트 완충 염수 용액, 물, 에멀전, 예컨대 유/수 또는 수/유 에멀전, 및 다양한 유형의 흡입제를 포함한다. 또한 이 용어는 US 연방 정부의 규제 기관에 의해 승인되거나 인간을 포함하는 동물에 사용하기 위한 것으로 미국 약전에 열거된 임의의 물질을 포괄한다.
- [0127] 제약상 허용되는 염 - 본원에 사용된 이 용어는 부모 화합물의 생물학적 활성을 유지하며, 생물학적으로 또는 달리 바람직하지 않은 것이 아닌 화합물의 염을 지칭한다. 다수의 본원에 개시된 화합물은 아미노 및/또는 카복실기 또는 그와 유사한 기의 존재에 의해 산 및/또는 염기 염을 형성할 수 있다.
- [0128] 제약상 허용되는 염기 부가염은 무기 및 유기 염기로부터 제조될 수 있다. 무기 염기로부터 유래된 염은 단지 예로서 나트륨, 칼륨, 리튬, 암모늄, 칼슘 및 마그네슘 염을 포함한다. 유기 염기로부터 유래된 염은 1급, 2급 및 3급 아민의 염을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0129] 제약상 허용되는 산 부가염은 무기 및 유기 산으로부터 제조될 수 있다. 무기 산으로부터 유래된 염은 염산, 브로민화수소산, 황산, 질산, 인산 등을 포함한다. 유기 산으로부터 유래된 염은 아세트산, 프로피온산, 글리콜산, 피루브산, 옥살산, 말산, 말론산, 숙신산, 말레산, 푸마르산, 타르타르산, 시트르산, 벤조산, 신남산, 만델산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, p-톨루엔-술폰산, 살리실산 등을 포함한다.
- [0130] 유효량 또는 치료 유효량 - 본원에 사용된 바와 같이 비독성이지만, 목적 효과를 제공하기에 충분한 인슐린 유사체의 양을 지칭한다. 예를 들어 하나의 목적 효과는 고혈당의 예방 또는 치료일 것이다. "유효한" 양은 개체의 연령 및 일반적 상태, 투여 방식 등에 따라 대상체마다 달라질 것이다. 따라서, 정확한 "유효량"을 특정하는 것이 항상 가능하지는 않다. 그를 필요로 하는 개체에의 또는 이들에 의한 투여 전에 최적 유효량을 결정하는 것이 항상 가능하지는 않다. 그러나, 임의의 개체에서 적절한 "유효"량은 상용 실험을 사용하여 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 결정될 수 있다.
- [0131] 비경구 - 본원에 사용된 이 용어는 소화관을 통하지 않고, 일부 다른 경로, 예컨대 비강내, 흡입, 피하, 근육내, 척수내 또는 정맥내를 통하는 것을 의미한다.

**도면의 간단한 설명**

- [0132] 도 1은 당뇨병 미니피그에게 0.69 nmol/kg으로 투여된 경우에 RHI와 비교하여 이량체 24, 18 및 40의 글루코스 저하 효과를 보여준다.
- 도 2a는 마우스에서의 인슐린 내성 검사 (ITT)의 결과를 화합물 A를 RHI (휴물린)와 비교하여 보여준다. 화합물 A는 72U/kg의 용량 및 300 U/kg의 용량으로 투여되고, 휴물린은 18 U/kg의 용량 및 72 U/kg의 용량으로 투여되었다.
- 도 2b는 마우스에서의 인슐린 내성 검사 (ITT)의 결과를 화합물 B를 RHI (휴물린)와 비교하여 보여준다. 화합물 B는 72U/kg의 용량 및 300 U/kg의 용량으로 투여되고, 휴물린은 18 U/kg의 용량 및 72 U/kg의 용량으로 투여되었다.
- 도 2c는 마우스에서의 인슐린 내성 검사 (ITT)의 결과를 이량체 24를 RHI (휴물린)와 비교하여 보여준다. 이량체 24는 72U/kg의 용량 및 300 U/kg의 용량으로 투여되고, 휴물린은 18 U/kg의 용량 및 72 U/kg의 용량으로 투여되었다.

도 2d는 마우스에서의 인슐린 내성 검사 (ITT)에서의 이량체 55의 결과를 보여준다. 이량체 55는 120 nmol/kg의 용량 및 300 nmol/kg의 용량으로 투여되었다.

도 2e는 마우스에서의 인슐린 내성 검사 (ITT)에서의 이량체 58의 결과를 보여준다. 이량체 58은 60 nmol/kg의 용량 및 300 nmol/kg의 용량으로 투여되었다.

도 2f는 마우스에서의 인슐린 내성 검사 (ITT)에서의 이량체 60의 결과를 보여준다. 이량체 60은 72 nmol/kg의 용량 및 300 nmol/kg의 용량으로 투여되었다.

도 2g는 마우스에서의 인슐린 내성 검사 (ITT)에서의 이량체 67의 결과를 보여준다. 이량체 67은 120 nmol/kg의 용량 및 300 nmol/kg의 용량으로 투여되었다.

도 3은 화합물 A 인슐린 이량체가 글루타티온 (GSH)의 부재 하에 래트 신장 세포 막 (RKCM)과의 2시간 인큐베이션에 의해 인슐린 단량체로 분해되고 있다는 것을 보여준다. 부모 값의 %는 이온화 효율에서의 잠재적 차이로 인해 단지 반-정량적이다.

도 4는 화합물 A 인슐린 이량체가 글루타티온 (GSH)의 존재 하에 래트 신장 세포 막 (RKCM)과의 2시간 인큐베이션에 의해 인슐린 단량체로 분해되고 있다는 것을 보여준다. 부모 값의 %는 이온화 효율에서의 잠재적 차이로 인해 단지 반-정량적이다.

도 5는 이량체 24가 글루타티온 (GSH)의 부재 하에 래트 신장 세포 막 (RKCM)과의 2시간 인큐베이션에 의해 일부 A-쇄 폴리펩티드는 상실하였으나 단량체로 분해되지는 않았다는 것을 보여준다. 부모 값의 %는 이온화 효율에서의 잠재적 차이로 인해 단지 반-정량적이다.

도 6은 이량체 24가 글루타티온 (GSH)의 존재 하에 래트 신장 세포 막 (RKCM)과의 2시간 인큐베이션에 의해 일부 A-쇄 폴리펩티드는 상실하였으나 단량체로 분해되지는 않았다는 것을 보여준다. 부모 값의 %는 이온화 효율에서의 잠재적 차이로 인해 단지 반-정량적이다.

도 7a는 당뇨병 미니피그에게 0.69 nmol/kg으로 투여된 경우에 RHI와 비교하여 이량체 4, 5, 7, 8 및 9의 글루코스 저하 효과를 보여준다.

도 7b는 당뇨병 미니피그에게 0.69 nmol/kg으로 투여된 경우에 RHI와 비교하여 이량체 18, 19, 20, 21 및 22의 글루코스 저하 효과를 보여준다.

도 7c는 당뇨병 미니피그에게 0.69 nmol/kg으로 투여된 경우에 RHI와 비교하여 이량체 23, 24, 26, 27 및 28의 글루코스 저하 효과를 보여준다.

도 7d는 당뇨병 미니피그에게 0.69 nmol/kg으로 투여된 경우에 RHI와 비교하여 이량체 29, 32, 37, 38 및 39의 글루코스 저하 효과를 보여준다.

도 7e는 당뇨병 미니피그에게 0.69 nmol/kg으로 투여된 경우에 RHI와 비교하여 이량체 40, 41, 43, 44 및 48의 글루코스 저하 효과를 보여준다.

도 7f는 당뇨병 미니피그에게 0.69 nmol/kg으로 투여된 경우에 RHI와 비교하여 이량체 55, 57, 58, 60 및 61의 글루코스 저하 효과를 보여준다.

도 7g는 당뇨병 미니피그에게 0.69 nmol/kg으로 투여된 경우에 RHI와 비교하여 이량체 62, 64, 67, 69 및 71의 글루코스 저하 효과를 보여준다.

도 7h는 당뇨병 미니피그에게 0.69 nmol/kg으로 투여된 경우에 RHI와 비교하여 이량체 72, 77 및 78의 글루코스 저하 효과를 보여준다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0133] 본 발명은 공유 연결되어, 정규 인슐린-유사 효력을 갖지만 감소된 최대 활성을 갖는 인슐린 수용체를 활성화시킬 수 있는 공유-연결된 인슐린 이량체를 형성하는 2개의 인슐린 분자를 포함하는 화합물을 제공한다. 이들 화합물은 인슐린 수용체 부분 효능제 (IRPA)이다: 이들은 다른 인슐린 유사체와 같이 글루코스가 효과적으로 저하되도록 거동하지만 보다 낮은 저혈당 위험을 갖는다.

[0134] 인슐린 이량체는 하기 문헌에 개시되어 있다: 미국 특허 번호 3,907,763 (1973) (Brandenburg et al.); [Tatnell et al., Biochem J. 216: 687-694 (1983)]; [Shuettler and Brandenburg, Hoppe-Seyler's Z.

Physiol. Chem, 363, 317-330, 1982]; [Weiland et al., Proc Natl. Acad. Sci. (USA) 87: 1154-1158 (1990)]; [Deppe et al., Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (1994) 350:213-217]; 미국 특허 번호 6,908,897(B2) (2005) (Brandenburg and Havenith); [Knudsen et al., PLOS ONE 7: e51972 (2012)]; WO2011/159895 (DiMarchi et al.); WO 2014/052451 (DiMarchi et al.); 및 WO2014141165 (Herrera et al.). 보다 최근에, 인슐린 이량체는 문헌 [Brant- Synthesis and Characterization of Insulin Receptor Partial Agonists as a Route to Improved Diabetes Therapy, Ph.D. Dissertation, Indiana University (April 2015) 및 Zaykov and DiMarchi, Poster P212-Exploration of the structural and mechanistic basis for partial agonism of insulin dimers, American Peptide Symposium, Orlando FL (June 20-25 (2015))]에 기재된 바 있다. 그러나, 본 발명의 발명자들은 이량체의 인슐린 활성 및 부분 효능제 활성의 수준이 이량체 구조, 인슐린 유사체의 서열, 이량체화 링커의 길이, 및 2개의 인슐린 폴리펩티드를 연결하는 이량체화 부위와 관련됨을 발견하였다. 본 발명자들은 본 발명의 인슐린 이량체가 고용량으로 투여된 경우의 인슐린 또는 다른 인슐린 유사체보다 고용량으로 투여된 경우에 저혈당을 촉진시킬 위험을 감소시킨다는 것을 발견하였다.

[0135] 본 발명은 현행 표준 관리 (SOC) 기저 인슐린에 비해 개선된 치료 지수 (TI)를 나타내는 신규하고 혁신적인 기저 인슐린 (1일 1회 투여)으로 제제화되는 부분 효능제 공유-연결된 인슐린 이량체를 제공한다. 이들 분자는 당뇨병 미니피그에서 저혈당 위험은 감소시키면서 글루코스를 효과적으로 저하시킬 수 있으며, 1일 1회 (QD) 기저 인슐린의 특성을 갖는다. 개선된 TI는 실시자가 공복 글루코스의 제어를 위한 목표를 달성하기 위해 IRPA 이량체를 보다 적극적으로 투여하도록 할 수 있다. 이들 분자는 공복 글루코스 및 HbA1c를 엄격하게 제어함으로써 1) 제2형 당뇨병 (T2DM)에서 증진된 효능 및 안전성 프로파일을 갖는 독립적 장기-작용 인슐린 및 2) 추가의 식사 신속-작용 인슐린 유사체 (RAA) 투여와 함께 사용하기 위한 제1형 당뇨병 (T1DM) (및 일부 T2DM)에서의 개선된 기초적 기저 인슐린으로서 사용될 수 있다.

[0136] 이상적인 장기-작용 인슐린은 당뇨병성에서의 공복 글루코스의 지속적인 제어를 매우 안정하고 재현가능한 PK / PD와 함께 제공한다. 그러나, 현재 이용가능한 기저 인슐린, 심지어는 PK/PD의 안정성 및 재현성이 개선된 것도 계속 좁은 치료 지수를 가지며, 글루코스 수준이 정상혈당 목표에 접근할수록 저혈당 발생률이 증가한다. 이는 종종 저혈당을 회피하기 위해 과소투여로 이어질 수 있다. 본 발명의 IRPA를 사용하는 치료는 투여가 증가됨에 따라 글루코스 저하의 변화율을 감소시킴으로써 이러한 효능 : 저혈당 관계를 변경시킬 것으로 예상된다.

[0137] 인슐린 A 및 B 쇠

[0138] 인슐린 수용체 효능제 활성을 갖는 인슐린 또는 인슐린 유사체 이량체가 본원에 개시된다. 이량체의 인슐린 활성의 수준은 이량체 구조, 인슐린 유사체의 서열, 이량체화 링커의 길이, 및 2개의 인슐린 폴리펩티드를 연결하는 이량체화 부위와 관련이 있다. 본 발명의 인슐린 폴리펩티드는 인간 인슐린의 천연 B 및 A 쇠 서열 (각각 서열식별번호: 1 및 2) 또는 서로에게 헤테로듀플렉스로 연결된 경우에 인슐린 효능제 활성을 나타내는 임의의 공지된 유사체 또는 유도체를 포함할 수 있다. 이러한 유사체는 예를 들어 인슐린 유사체의 인슐린 활성을 파괴하지 않는 1개 이상의 아미노산 결실, 1개 이상의 아미노산 치환, 및/또는 1개 이상의 아미노산 삽입을 가짐으로써 인간 인슐린의 A-쇠 및 B-쇠와 상이한 A-쇠 및 B-쇠를 갖는 단백질을 포함한다.

[0139] 인슐린 유사체의 하나의 유형인 "단량체 인슐린 유사체"는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 이들은 예를 들어 하기와 같은 인슐린 유사체를 포함한, 인간 인슐린의 신속-작용 유사체이다:

[0140] (a) 위치 B28에 있는 아미노 아실 잔기가 Asp, Lys, Leu, Val, 또는 Ala로 치환되고, 위치 B29에 있는 아미노 아실 잔기가 Lys 또는 Pro인 인슐린 유사체;

[0141] (b) 위치 B27 및 B30 중 어느 곳에 있는 아미노 아실 잔기가 결실되거나 또는 비천연 아미노산으로 치환된 인슐린 유사체.

[0142] 한 실시양태에서 위치 B28에서 치환된 Asp (예를 들어, 인슐린 아스파르트 (노보로그(NOVOLOG))); 서열식별번호: 9 참조) 또는 위치 28에서 치환된 Lys 및 위치 B29에서 치환된 프롤린 (예를 들어, 인슐린 리스프로 (휴마로그 (HUMALOG))); 서열식별번호: 6 참조)을 포함하는 인슐린 유사체가 제공된다. 추가의 단량체 인슐린 유사체는 미국 특허 번호 5,514,646 (Chance, et al.); 미국 특허 출원 번호 08/255,297 (Chance, et al.); 문헌 [Brems, et al., Protein Engineering, 5:527-533 (1992)]; EPO 공개 번호 214,826 (Brange, et al.) (1987년 3월 18일 공개); 및 문헌 [Brange, et al., Current Opinion in Structural Biology, 1:934-940 (1991)]에 개시되어 있다. 이들 개시내용은 단량체 인슐린 유사체의 설명을 위해 명백하게 본원에 참조로 포함된다.

- [0143] 인슐린 유사체는 또한 아미드화 아미노산이 산성 형태로 대체될 수 있다. 예를 들어, Asn은 Asp 또는 Glu로 대체될 수 있다. 마찬가지로, Gln는 Asp 또는 Glu로 대체될 수 있다. 특히, Asn(A18), Asn(A21), 또는 Asp(B3), 또는 이들 잔기의 임의의 조합은 Asp 또는 Glu로 대체될 수 있다. 또한, Gln(A15) 또는 Gln(B4), 또는 둘 다는 Asp 또는 Glu 중 어느 하나로 대체될 수 있다.
- [0144] 본원에 개시된 바와 같이 인간 인슐린, 그의 또는 유사체 또는 유도체의 B 쇠 및 A 쇠를 포함하는 인슐린 단일 쇠 유사체가 제공되며, 여기서 B 쇠의 카르복시 말단은 A 쇠의 아미노 말단에 연결 모이어티를 통해 연결된다. 한 실시양태에서 A 쇠는 아미노산 서열 GIVEQCCTSICSLYQLENYCN (서열식별번호: 1)이고, B 쇠는 아미노산 서열 FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (서열식별번호: 2) 또는 B30이 결실된 그의 카르복시 단축 서열, 및 이들 서열의 유사체를 포함하고, 여기서 각각의 서열은 A5, A8, A9, A10, A14, A15, A17, A18, A21, B1, B2, B3, B4, B5, B9, B10, B13, B14, B20, B22, B23, B26, B27, B28, B29 및 B30으로부터 선택된 천연 인슐린 위치에 상응하는 위치에서 1 내지 5개의 아미노산 치환을 포함하도록 변형되고, 단 B28 또는 B29 중 적어도 하나는 리신이다. 한 실시양태에서 아미노산 치환은 보존적 아미노산 치환이다. 인슐린의 목적 활성에 유해한 영향을 미치지 않는 이들 위치에서의 적합한 아미노산 치환은, 예를 들어 문헌 [Mayer, et al., Insulin Structure and Function, Biopolymers. 2007;88(5):687-713] (그의 개시내용이 본원에 참조로 포함됨)에서 입증된 바와 같이, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다.
- [0145] 한 실시양태에 따르면 인슐린 유사체 펩티드는 인슐린 A 쇠 및 인슐린 B 쇠 또는 그의 유사체를 포함할 수 있으며, 여기서 A 쇠는 GIVEQCCTSICSLYQLENYCN (서열식별번호: 1)을 갖는 천연 펩티드의 길이에 걸쳐 적어도 70% 서열 동일성 (예를 들어, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%)을 공유하는 아미노산 서열을 포함하고, B 쇠는 FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (서열식별번호: 2) 또는 B30이 결실된 그의 카르복시 단축 서열을 갖는 천연 펩티드의 길이에 걸쳐 적어도 60% 서열 동일성 (예를 들어, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%)을 공유하는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0146] 추가의 아미노산 서열은 본 발명의 인슐린 폴리펩티드의 B 쇠의 아미노 말단 또는 A 쇠의 카르복시 말단에 부가될 수 있다. 예를 들어, 일련의 음으로 하전된 아미노산은 예를 들어 1 내지 12, 1 내지 10, 1 내지 8 또는 1 내지 6개 아미노산 길이의 펩티드를 포함하며, 예를 들어 글루탐산 및 아스파르트산을 포함한 1개 이상의 음으로 하전된 아미노산을 포함하는 B 쇠의 아미노 말단에 부가될 수 있다. 한 실시양태에서 B 쇠 아미노 말단 연장부는 1 내지 6개의 하전된 아미노산을 포함한다. 한 실시양태에 따르면 개시된 인슐린 폴리펩티드는 A 쇠의 C-말단 카르복실레이트 대신에 C-말단 아미드 또는 에스테르를 포함한다.
- [0147] 다양한 실시양태에서, 인슐린 유사체는 인간 인슐린과 비교하여 이동된 등전점을 갖는다. 일부 실시양태에서, 등전점의 이동은 1개 이상의 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 잔기를 인슐린 A-쇠 펩티드의 N-말단 및/또는 인슐린 B-쇠 펩티드의 C-말단에 첨가하여 달성된다. 이러한 인슐린 폴리펩티드의 예는 Arg<sup>A0</sup>-인간 인슐린, Arg<sup>B31</sup> Arg<sup>B32</sup>-인간 인슐린, Gly<sup>A21</sup> Arg<sup>B31</sup> Arg<sup>B32</sup>-인간 인슐린, Arg<sup>A0</sup> Arg<sup>B31</sup> Arg<sup>B32</sup>-인간 인슐린, 및 Arg<sup>A0</sup> Gly<sup>A21</sup> Arg<sup>B31</sup> Arg<sup>B32</sup>-인간 인슐린을 포함한다. 추가의 예로서, 인슐린 글라진 (란투스(LANTUS); 서열식별번호: 7 및 8 참조)은 예시적인 장기-작용 인슐린 유사체이며, 여기서 Asn<sup>A21</sup>은 글리신으로 대체되고, 2개의 아르기닌 잔기는 B-펩티드의 C-말단에 공유 연결되어 있다. 이들 아미노산 변화의 효과는 분자의 등전점을 이동시켜, 산성 pH (예를 들어, pH 4 내지 6.5)에서 가용성이나 생리학적 pH에서는 불용성인 분자를 생성한 것이다. 인슐린 글라진의 용액을 근육에 주사하는 경우, 용액의 pH는 중화되고, 인슐린 글라진은 주사 후에 24시간 기간에 걸쳐 두드러진 인슐린 피크 없이 인슐린 글라진을 서서히 방출하는 미세입자를 형성하며, 이에 따라 저혈당 발생 위험이 감소한다. 이러한 프로파일은 환자의 기저 인슐린을 제공하기 위해 1일-1회 투여를 허용한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 인슐린 유사체는 위치 A21에 있는 아미노산이 글리신인 A-쇠 펩티드 및 위치 B31 및 B32에 있는 아미노산이 아르기닌인 B-쇠 펩티드를 포함한다. 본 개시내용은 이들 돌연변이의 모든 단일 및 다중 조합 및 본원에 기재된 임의의 다른 돌연변이 (예를 들어, Gly<sup>A21</sup>-인간 인슐린, Gly<sup>A21</sup> Arg<sup>B31</sup>-인간 인슐린, Arg<sup>B31</sup> Arg<sup>B32</sup>-인간 인슐린, Arg<sup>B31</sup>-인간 인슐린)를 포괄한다.
- [0148] 인슐린 수용체 부분 효능제의 특정한 측면에서, 인슐린 유사체의 1개 이상의 아미드화 아미노산은 산성 아미노산, 또는 또 다른 아미노산으로 대체된다. 예를 들어, 아스파라긴은 아스파르트산 또는 글루탐산, 또는 또 다른 잔기로 대체될 수 있다. 마찬가지로, 글루타민은 아스파르트산 또는 글루탐산, 또는 또 다른 잔기로 대체될 수 있다. 특히, Asn<sup>A18</sup>, Asn<sup>A21</sup>, 또는 Asn<sup>B3</sup>, 또는 이들 잔기의 임의의 조합은 아스파르트산 또는 글루탐산, 또는

또 다른 잔기로 대체될 수 있다. Gln<sup>A15</sup> 또는 Gln<sup>B4</sup>, 또는 둘 다는 아스파르트산 또는 글루탐산, 또는 또 다른 잔기로 대체될 수 있다. 인슐린 수용체 부분 효능제의 특정한 측면에서, 인슐린 유사체는 위치 A21에서 아스파르트산, 또는 또 다른 잔기, 또는 위치 B3에서 아스파르트산, 또는 또 다른 잔기, 또는 둘 다를 갖는다.

[0149] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 분자의 생물학적 활성을 유지하면서 인슐린 유사체 내의 또 다른 아미노산을 다른 아미노산으로 대체하는 것이 가능하다는 것을 알고 있을 것이다. 예를 들어, 비제한적으로, 하기 변형이 또한 관련 기술분야에서 널리 허용된다: 위치 B10의 히스티딘 잔기의 아스파르트산으로의 대체 (His<sup>B10</sup> → Asp<sup>B10</sup>); 위치 B1에 있는 페닐알라닌 잔기의 아스파르트산으로의 대체 (PheB1 → AspB1); 위치 B30에 있는 트레오닌 잔기의 알라닌으로의 대체 (ThrB30 → AlaB30); 위치 B26에 있는 티로신 잔기의 알라닌으로의 대체 (TyrB26 → AlaB26); 및 위치 B9에 있는 세린 잔기의 아스파르트산으로의 대체 (SerB9 → AspB9).

[0150] 다양한 실시양태에서, 인슐린 유사체는 연장된 작용 프로파일을 갖는다. 따라서, 특정 실시양태에서, 인슐린 유사체는 지방산으로 아실화될 수 있다. 즉, 아미드 결합이 인슐린 유사체 상의 아미노 기 및 지방산의 카르복실산 기 사이에 형성된다. 아미노 기는 인슐린 유사체의 N-말단 아미노산의 알파-아미노 기일 수 있거나, 또는 인슐린 유사체의 리신 잔기의 엡실론-아미노 기일 수 있다. 인슐린 유사체는 야생형 인간 인슐린 서열에 도입된 리신 잔기 상에서 아실화될 수 있는 야생형 인간 인슐린에 존재하는 3개의 아미노 기 중 1개 이상에서 아실화될 수 있다. 인슐린 수용체 부분 효능제의 특정한 측면에서, 인슐린 유사체는 위치 A1, B1, 또는 A1 및 B1 둘 다에서 아실화될 수 있다. 특정 실시양태에서, 지방산은 미리스트산 (C<sub>14</sub>), 펜타데실산 (C<sub>15</sub>), 팔미트산 (C<sub>16</sub>), 헵타데실산 (C<sub>17</sub>) 및 스테아르산 (C<sub>18</sub>)으로부터 선택된다.

[0151] 인슐린 유사체의 예는 예를 들어 공개된 국제 출원 WO9634882, WO95516708; WO20100080606, WO2009/099763, 및 WO2010080609, 미국 특허 번호 6,630,348, 및 문헌 [Kristensen et al., Biochem. J. 305: 981-986 (1995)] (그의 개시내용이 본원에 참조로 포함됨)에서 찾아볼 수 있다. 추가 실시양태에서, 시험관내 글리코실화 또는 생체내 N-글리코실화 인슐린 유사체가 아실화 및/또는 PEG화될 수 있다.

[0152] 한 실시양태에 따르면 인슐린 유사체가 제공되며, 여기서 인슐린 펩티드의 A 쇠는 서열 GIVEQCCX<sub>8</sub>SICSLYQLX<sub>17</sub>NX<sub>19</sub>CX<sub>23</sub> (서열식별번호: 3)을 포함하고, B 쇠는 서열 X<sub>25</sub>LCGX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>LVEALYLVCGERGFFYTX<sub>31</sub>X<sub>32</sub> (서열식별번호: 4)를 포함하며, 여기서

[0153] X<sub>8</sub>은 트레오닌 또는 히스티딘이고;

[0154] X<sub>17</sub>은 글루탐산 또는 글루타민이고;

[0155] X<sub>19</sub>는 티로신, 4-메톡시-페닐알라닌, 또는 4-아미노 페닐알라닌이고;

[0156] X<sub>23</sub>은 아스파라긴 또는 글리신이고;

[0157] X<sub>25</sub>는 히스티딘 또는 트레오닌이고;

[0158] X<sub>29</sub>는 알라닌, 글리신 또는 세린이고;

[0159] X<sub>30</sub>은 히스티딘, 아스파르트산, 글루탐산, 호모시스테인, 또는 시스테인이고;

[0160] X<sub>31</sub>은 프롤린 또는 리신이고;

[0161] X<sub>32</sub>는 프롤린 또는 리신이고, 단 X<sub>31</sub> 또는 X<sub>32</sub> 중 적어도 하나는 리신이다.

[0162] 추가 실시양태에서, B 쇠는 서열 X<sub>22</sub>VNQX<sub>25</sub>LCGX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>LVEALYLVCGERGFFYTX<sub>31</sub>X<sub>32</sub>X<sub>33</sub>X<sub>34</sub>X<sub>35</sub> (서열식별번호: 5)를 포함하며, 여기서

[0163] X<sub>22</sub>는 페닐알라닌 또는 테스아미노-페닐알라닌이고;

[0164] X<sub>25</sub>는 히스티딘 또는 트레오닌이고;

[0165] X<sub>29</sub>는 알라닌, 글리신, 또는 세린이고;

[0166] X<sub>30</sub>은 히스티딘, 아스파르트산, 글루탐산, 호모시스테인, 또는 시스테인이고;

[0167] X<sub>31</sub>은 아스파르트산, 프롤린, 또는 리신이고;

[0168] X<sub>32</sub>는 리신 또는 프롤린이고;

[0169] X<sub>33</sub>은 트레오닌, 알라닌이거나, 또는 부재하고;

[0170] X<sub>34</sub>는 아르기닌이거나 또는 부재하고;

[0171] X<sub>35</sub>는 아르기닌이거나 또는 부재하고;

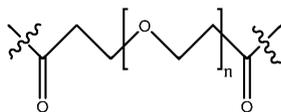
[0172] 단 X<sub>31</sub> 또는 X<sub>32</sub> 중 적어도 하나는 리신이다.

[0173] 연결 모이어티

[0174] 본원에 개시된 인슐린 이량체는 제1 및 제2 인슐린 폴리펩티드 사이에서 형성되며, 여기서 각각의 인슐린 폴리펩티드는 A 쇠 및 B 쇠를 포함한다. 제1 및 제2 인슐린 폴리펩티드는 2개의 쇠 인슐린 유사체일 수 있고 (즉, A 및 B 쇠는 오직 내부 시스테인 잔기 사이의 쇠간 디설피드 결합을 통해 연결됨), 여기서 제1 및 제2 인슐린 폴리펩티드는 각각의 B 쇠 상의 연결 모이어티를 연결하기 위해 공유 결합, 이관능성 링커에 의해, 또는 구리(I) 촉매된 알킨-아지드 고리화첨가 (CuAAC) 클릭 화학 또는 구리-무함유 클릭 화학을 이용하여 서로 연결되어 이량체를 형성한다. 한 실시양태에 따르면 제1 및 제2 인슐린 폴리펩티드는 제1 인슐린 폴리펩티드의 B 쇠의 B28 또는 B29 리신의 측쇄를 제2 인슐린 폴리펩티드의 B 쇠의 B28 또는 B29 아미노산의 측쇄에 연결하는 이관능성 링커에 의해 서로 연결된다.

[0175] 인슐린 수용체 부분 효능제의 특정한 측면에서, 연결 모이어티는 아실, 지방족, 헤테로지방족, 아릴, 헤테로아릴, 및 헤테로시클릭으로 이루어진 군으로부터 선택된 임의로 치환된 기일 수 있다. 연결 모이어티는 2가, 직쇄형 또는 분지형, 포화 또는 불포화, 임의로 치환된 C1-C20 탄화수소 쇠일 수 있으며, 여기서 1개 이상의 메틸렌 단위는 -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -N(R)SO<sub>2</sub>-, SO<sub>2</sub>N(R)-, 헤테로시클릭 기, 아릴 기, 또는 헤테로아릴 기에 의해 임의로 및 독립적으로 대체되고, 여기서 각 경우의 R은 독립적으로 수소, 적합한 보호 기, 아실 모이어티, 아릴알킬 모이어티, 지방족 모이어티, 아릴 모이어티, 헤테로아릴 모이어티, 또는 헤테로지방족 모이어티이다.

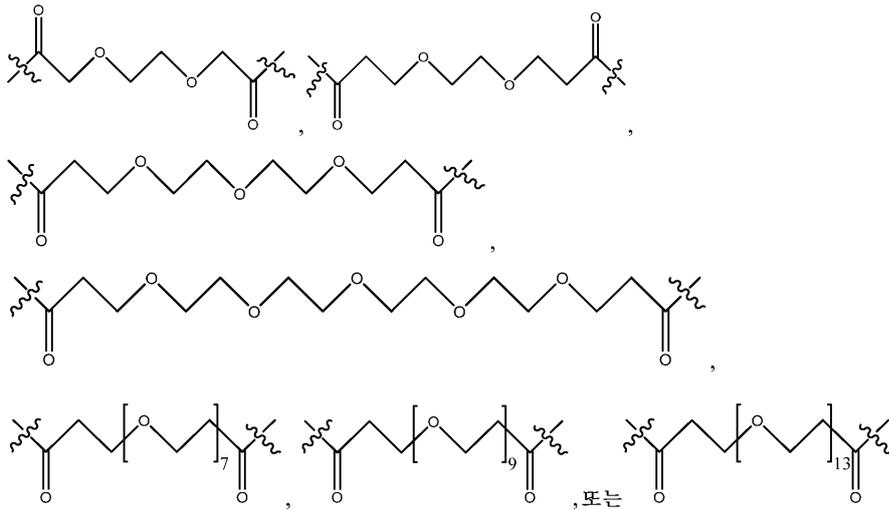
[0176] 한 실시양태에서, 연결 모이어티는 PEG 링커, 약 2-25개 에틸렌 글리콜 단위 또는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 또는 25개 에틸렌 글리콜 단위의 짧은 선형 중합체 및 임의로 1개 이상의 아미노산을 포함한다. 인슐린 수용체 부분 효능제의 특정한 측면에서, PEG 링커는 구조 (PEG)<sub>2</sub>, (PEG)<sub>3</sub>, (PEG)<sub>4</sub>, (PEG)<sub>5</sub>, (PEG)<sub>6</sub>, (PEG)<sub>7</sub>, (PEG)<sub>8</sub>, (PEG)<sub>9</sub>, (PEG)<sub>10</sub>, (PEG)<sub>11</sub>, (PEG)<sub>12</sub>, (PEG)<sub>13</sub>, (PEG)<sub>14</sub>, (PEG)<sub>15</sub>, (PEG)<sub>16</sub>, 또는 (PEG)<sub>25</sub>를 포함한다. PEG 링커는 제1 및 제2 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28 리신 잔기의 엡실론 아미노기에 공유 접합 또는 연결될 수 있는 이관능성 링커일 수 있다. 제1 및 제2 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28의 리신 기의 엡실론 아미노기에 접합된 이관능성 PEG 링커의 구조는 하기 화학식에 의해 나타내어질 수 있다:



[0177]

[0178] 여기서 n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 또는 25이고, 파상선은 링커와 엡실론 아미노기 사이의 결합을 나타낸다. 리신의 엡실론 아미노기에 PEG를 접합시키는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Veronese, Biomaterials 22: 405-417 (2001)]을 참조한다.

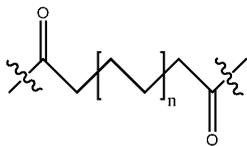
[0179] 인슐린 수용체 부분 효능제의 특정한 측면에서, 제1 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노기를 제2 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노산에 접합시키는 PEG 연결 모이어티는



[0180]

[0181] 이며, 여기서 파상선은 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노 기와 링커 사이의 결합을 나타낸다.

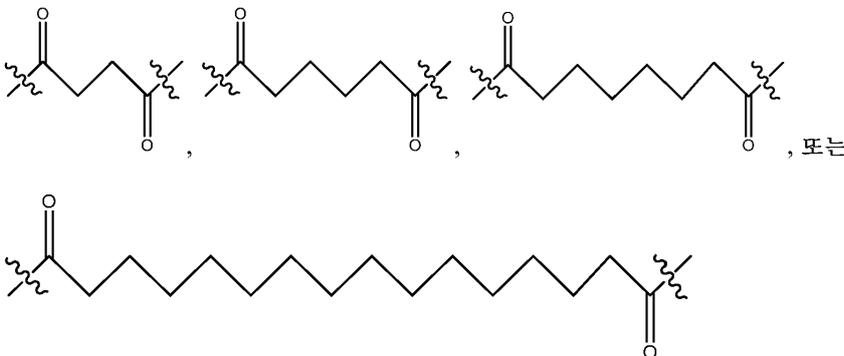
[0182] 또 다른 실시양태에서, 연결 모이어티는 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 15, 또는 16개 탄소를 포함하는 아실 모이어티를 포함한다. 인슐린 수용체 부분 효능제의 특정한 측면에서, 아실 모이어티는 숙시닐 (4), 아디포일 (C6), 수베리올 (C8), 또는 헥사데칸디오일 (C16) 모이어티이다. 아실 모이어티는 제1 및 제2 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28 리신 잔기의 엡실론 아미노 기에 공유 접합 또는 연결될 수 있는 이관능성 링커를 포함할 수 있다. 제1 및 제2 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신 기의 엡실론 아미노 기에 접합된 이관능성 아실 링커의 구조는 하기 화학식에 의해 나타내어질 수 있다:



[0183]

[0184] 여기서 n=0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12이고, 파상선은 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노 기와 링커 사이의 결합을 나타낸다.

[0185] 인슐린 수용체 부분 효능제의 특정한 측면에서, 제1 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노 기를 제2 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노산에 접합시키는 아실 연결 모이어티는



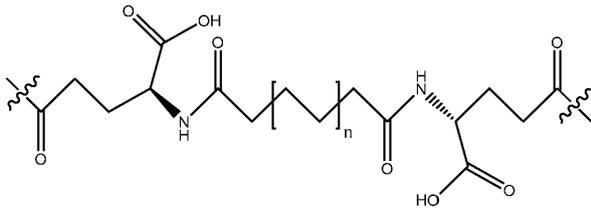
[0186]

이고, 여기서 파상선은 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노 기와 링커 사이의 결합을 나타낸다.

[0187]

인슐린 수용체 부분 효능제의 특정한 측면에서, 이관능성 아실 링커는 아실 링커의 하나 또는 양쪽의 말단에 1 또는 2개의 아미노산을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 인슐린 수용체 부분 효능제의 특정한 측면에서, 링커의 하나 또는 양쪽 말단에 있는 아미노산은 감마 글루탐산 ( $\gamma$ E)이며, 하기 화학식에 의해 나타내어질 수 있

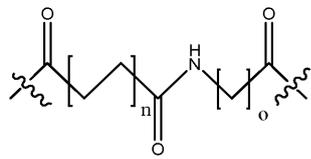
다:



[0188]

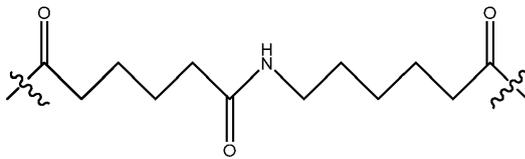
[0189] 여기서  $n=0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11,$  또는  $12$ 이고, 파상선은 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노 기와 링커 사이의 결합을 나타낸다.

[0190] 또 다른 실시양태에서, 연결 모이어티는 제1 및 제2 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28 리신 잔기의 엡실론 아미노 기에 공유 접합 또는 연결될 수 있는 아미드-함유 알킬쇄 이관능성 링커를 포함하며, 하기 화학식에 의해 나타내어질 수 있다:



[0191]

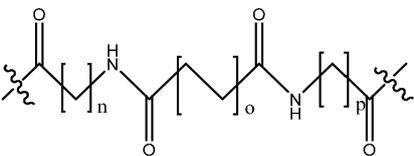
[0192] 여기서  $n=1$  또는  $2$ 이고,  $o=1, 2, 3, 4,$  또는  $5$ 이고, 파상선은 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노 기와 링커 사이의 결합을 나타낸다. 특정한 실시양태에서, 연결 모이어티는 하기 구조를 가질 수 있다:



[0193]

[0194] 여기서 파상선은 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노 기와 링커 사이의 결합을 나타낸다.

[0195] 또 다른 실시양태에서, 연결 모이어티는 제1 및 제2 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28 리신 잔기의 엡실론 아미노 기에 공유 접합 또는 연결될 수 있는 아미드-함유 알킬쇄 이관능성 링커를 포함하며, 하기 화학식에 의해 나타내어질 수 있다:



[0196]

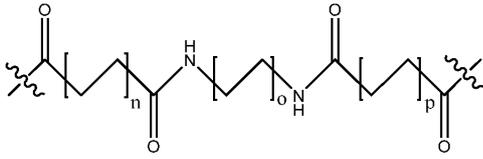
[0197] 여기서  $n=1, 2, 3, 4,$  또는  $5$ 이고,  $o=1$  또는  $2$ 이고,  $p=1, 2, 3, 4,$  또는  $5$ 이고, 파상선은 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노 기와 링커 사이의 결합을 나타낸다. 특정한 실시양태에서, 연결 모이어티는 하기 구조를 가질 수 있다:



[0198]

[0199] 여기서 파상선은 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노 기와 링커 사이의 결합을 나타낸다.

[0200] 또 다른 실시양태에서, 연결 모이어티는 제1 및 제2 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28 리신 잔기의 엡실론 아미노기에 공유 접합 또는 연결될 수 있는 아미드-함유 알킬쇄 이관능성 링커를 포함하며, 하기 화학식에 의해 나타내어질 수 있다:



[0201]

[0202] 여기서 n=1 또는 2이고, o=1, 2, 또는 3이고, p=1 또는 2이고, 파상선은 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노기와 링커 사이의 결합을 나타낸다. 특정한 실시양태에서, 연결 모이어티는 하기 구조를 가질 수 있다:



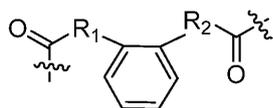
[0203]

[0204] 여기서 파상선은 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노기와 링커 사이의 결합을 나타낸다.

[0205] 특정한 실시양태에서, 연결 모이어티는 연결 모이어티에 강성을 제공하는 고리 구조를 포함한다. 특정한 실시양태에서, 고리 구조는 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 탄소를 갖는 벤질기 또는 포화 또는 불포화 지환족기를 포함한다. 특정한 실시양태에서, 지환족기는 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실, 시클로헥텐일 또는 시클로옥틸을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 불포화 지환족기(시클로알칸)는 시클로프로페닐, 시클로부테닐, 시클로펜테닐, 시클로헥세닐, 시클로헵테닐 또는 시클로옥테닐기를 포함한다. 특정한 실시양태에서, 고리 구조는 추가로 1개 이상의 포화 또는 불포화 지방족 측쇄를 포함할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 고리 구조는 추가로 1개 이상의 헤테로원자를 포함하는 1개 이상의 지방족 측쇄를 포함할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 헤테로원자는 O, S 또는 N이다.

[0206] 특정한 실시양태에서, 고리 구조는 헤테로원자를 포함한다. 특정한 실시양태에서, 헤테로원자는 O, S 또는 N일 수 있다. 특정한 실시양태에서, 고리 구조는 1개 이상의 탄소가 N, O 및 S로부터 선택된 헤테로원자로 치환된 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 탄소를 갖는 벤질기 또는 포화 또는 불포화 지환족기를 포함한다. 헤테로원자를 포함하는 고리 구조의 예는 에틸렌옥시드, 에틸렌이민, 트리메틸옥시드, 푸란, 테트라히드로푸란, 티오펜, 피롤리딘, 피란, 피페리딘, 이미다졸, 티아졸, 디옥산, 모르폴린, 피리미딘, 트리아졸, 티에탄, 1,3-디아제틴, 2,3-디히드로아제트, 1,2-옥사티올란, 이속사졸, 옥사졸, 실롤, 옥세판, 티에핀, 3,4,5,6-테트라히드로-2H-아제핀, 1,4-티아제핀, 아조칸 및 티오칸을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0207] 또 다른 실시양태에서, 연결 모이어티는 제1 및 제2 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28 리신 잔기의 엡실론 아미노기에 공유 접합 또는 연결될 수 있는 이관능성 링커를 포함하며, 하기 화학식을 갖는 벤젠-1,1-디아실에 의해 나타내어질 수 있다:

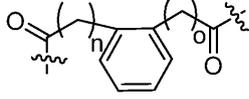


[0208]

[0209] 여기서 R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 동일하거나 또는 상이할 수 있고, 여기서 R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 독립적으로 결합, 포화 또는 비-포화 C1-C20 또는 C1-C6 알킬쇄이고, 여기서 1개 이상의 메틸렌 단위는 -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -N(R)SO<sub>2</sub>-, SO<sub>2</sub>N(R)-, 헤테로시클릭기, 아릴기, 또는 헤테로아릴기에 의해 임의로 및 독립적으로 대체되고, 여기서 각 경우의 R은 독립적으로 수소, 적합한 보호기, 아실 모이어티, 아릴알킬 모이어티, 지방족 모이어티, 아릴 모이어티, 헤테로아릴 모이어티, 또는 헤테로지방족 모이어티, 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG)쇄 (PEG)<sub>2</sub>, (PEG)<sub>3</sub>, (PEG)<sub>4</sub>, (PEG)<sub>5</sub>, (PEG)<sub>6</sub>, (PEG)<sub>7</sub>, (PEG)<sub>8</sub>, (PEG)<sub>9</sub>,

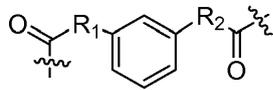
(PEG)<sub>10</sub>, (PEG)<sub>11</sub>, (PEG)<sub>12</sub>, (PEG)<sub>13</sub>, (PEG)<sub>14</sub>, (PEG)<sub>15</sub>, (PEG)<sub>16</sub>, 또는 (PEG)<sub>2</sub>이고, 여기서 파상선은 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노 기와 링커 사이의 결합을 나타낸다.

[0210] 또 다른 실시양태에서, 연결 모이어티는 제1 및 제2 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28 리신 잔기의 엡실론 아미노 기에 공유 접합 또는 연결될 수 있는 이관능성 링커를 포함하며, 하기 화학식을 갖는 벤젠-1,1 디아실에 의해 나타내어질 수 있다:



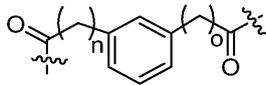
[0211] 여기서 n 및 o는 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5이고, 파상선은 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노 기와 링커 사이의 결합을 나타낸다.

[0213] 또 다른 실시양태에서, 연결 모이어티는 제1 및 제2 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28 리신 잔기의 엡실론 아미노 기에 공유 접합 또는 연결될 수 있는 이관능성 링커를 포함하며, 하기 화학식을 갖는 벤젠-1,3 디아실에 의해 나타내어질 수 있다:



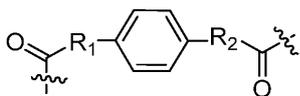
[0214] 여기서 R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 동일하거나 또는 상이할 수 있고, 여기서 R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 독립적으로 결합, 포화 또는 비-포화 C1-C20 또는 C1-C6 알킬 쇠이고, 여기서 1개 이상의 메틸렌 단위는 -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -N(R)SO<sub>2</sub>-, SO<sub>2</sub>N(R)-, 헤테로시클릭 기, 아릴 기, 또는 헤테로아릴 기에 의해 임의로 및 독립적으로 대체되고, 여기서 각 경우의 R은 독립적으로 수소, 적합한 보호 기, 아실 모이어티, 아릴알킬 모이어티, 지방족 모이어티, 아릴 모이어티, 헤테로아릴 모이어티, 또는 헤테로지방족 모이어티, 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 쇠 (PEG)<sub>2</sub>, (PEG)<sub>3</sub>, (PEG)<sub>4</sub>, (PEG)<sub>5</sub>, (PEG)<sub>6</sub>, (PEG)<sub>7</sub>, (PEG)<sub>8</sub>, (PEG)<sub>9</sub>, (PEG)<sub>10</sub>, (PEG)<sub>11</sub>, (PEG)<sub>12</sub>, (PEG)<sub>13</sub>, (PEG)<sub>14</sub>, (PEG)<sub>15</sub>, (PEG)<sub>16</sub>, 또는 (PEG)<sub>2</sub>이고, 여기서 파상선은 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노 기와 링커 사이의 결합을 나타낸다.

[0216] 또 다른 실시양태에서, 연결 모이어티는 제1 및 제2 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28 리신 잔기의 엡실론 아미노 기에 공유 접합 또는 연결될 수 있는 이관능성 링커를 포함하며, 하기 화학식을 갖는 벤젠-1,3 디아실에 의해 나타내어질 수 있다:



[0217] 여기서 n 및 o는 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5이고, 파상선은 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노 기와 링커 사이의 결합을 나타낸다.

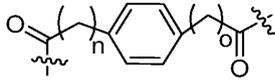
[0219] 또 다른 실시양태에서, 연결 모이어티는 제1 및 제2 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28 리신 잔기의 엡실론 아미노 기에 공유 접합 또는 연결될 수 있는 이관능성 링커를 포함하며, 하기 화학식을 갖는 벤젠-1,4 디아실에 의해 나타내어질 수 있다:



[0220] 여기서 R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 동일하거나 또는 상이할 수 있고, 여기서 R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 독립적으로 결합, 포화 또는 비-포화 C1-C20 또는 C1-C6 알킬 쇠이고, 여기서 1개 이상의 메틸렌 단위는 -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -N(R)SO<sub>2</sub>-, SO<sub>2</sub>N(R)-, 헤테로시클릭 기, 아릴 기, 또는 헤테로아릴 기에 의해 임의로 및 독립적으로 대체되고, 여기서 각 경우의 R은 독립적으로 수소, 적합한 보호 기, 아실

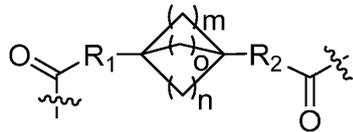
모이어티, 아릴알킬 모이어티, 지방족 모이어티, 아릴 모이어티, 헤테로아릴 모이어티, 또는 헤테로지방족 모이어티, 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 쇠 (PEG)<sub>2</sub>, (PEG)<sub>3</sub>, (PEG)<sub>4</sub>, (PEG)<sub>5</sub>, (PEG)<sub>6</sub>, (PEG)<sub>7</sub>, (PEG)<sub>8</sub>, (PEG)<sub>9</sub>, (PEG)<sub>10</sub>, (PEG)<sub>11</sub>, (PEG)<sub>12</sub>, (PEG)<sub>13</sub>, (PEG)<sub>14</sub>, (PEG)<sub>15</sub>, (PEG)<sub>16</sub>, 또는 (PEG)<sub>2</sub>이고, 여기서 파상선은 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노 기와 링커 사이의 결합을 나타낸다.

[0222] 또 다른 실시양태에서, 연결 모이어티는 제1 및 제2 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28 리신 잔기의 엡실론 아미노 기에 공유 접합 또는 연결될 수 있는 이관능성 링커를 포함하며, 하기 화학식을 갖는 벤젠-1,4 디아실에 의해 나타내어질 수 있다:



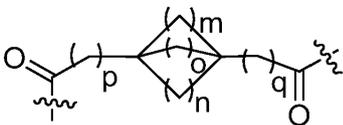
[0223] 여기서 n 및 o는 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5이고, 여기서 파상선은 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노 기와 링커 사이의 결합을 나타낸다.

[0225] 또 다른 실시양태에서, 연결 모이어티는 제1 및 제2 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28 리신 잔기의 엡실론 아미노 기에 공유 접합 또는 연결될 수 있는 이관능성 링커를 포함하며, 하기 화학식을 갖는 벤젠-1,3 디아실에 의해 나타내어질 수 있다:



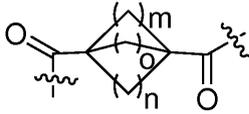
[0226] 여기서 m, n, 및 o는 각각 독립적으로 1 또는 2이고; R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 동일하거나 또는 상이할 수 있고, 여기서 R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 독립적으로 결합, 포화 또는 비-포화 C1-C20 또는 C1-C6 알킬 쇠이고, 1개 이상의 메틸렌 단위는 -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -N(R)SO<sub>2</sub>-, SO<sub>2</sub>N(R)-, 헤테로시클릭 기, 아릴 기, 또는 헤테로아릴 기에 의해 임의로 및 독립적으로 대체되고, 여기서 각 경우의 R은 독립적으로 수소, 적합한 보호 기, 아실 모이어티, 아릴알킬 모이어티, 지방족 모이어티, 아릴 모이어티, 헤테로아릴 모이어티, 또는 헤테로지방족 모이어티, 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 쇠 (PEG)<sub>2</sub>, (PEG)<sub>3</sub>, (PEG)<sub>4</sub>, (PEG)<sub>5</sub>, (PEG)<sub>6</sub>, (PEG)<sub>7</sub>, (PEG)<sub>8</sub>, (PEG)<sub>9</sub>, (PEG)<sub>10</sub>, (PEG)<sub>11</sub>, (PEG)<sub>12</sub>, (PEG)<sub>13</sub>, (PEG)<sub>14</sub>, (PEG)<sub>15</sub>, (PEG)<sub>16</sub>, 또는 (PEG)<sub>2</sub>이고, 여기서 파상선은 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노 기와 링커 사이의 결합을 나타낸다.

[0228] 또 다른 실시양태에서, 연결 모이어티는 제1 및 제2 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28 리신 잔기의 엡실론 아미노 기에 공유 접합 또는 연결될 수 있는 이관능성 링커를 포함하며, 하기 화학식을 갖는 벤젠-1,3 디아실에 의해 나타내어질 수 있다:



[0229] 여기서 m, n, 및 o는 각각 독립적으로 1 또는 2이고; p 및 q는 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5이고, 파상선은 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노 기와 링커 사이의 결합을 나타낸다.

[0231] 또 다른 실시양태에서, 연결 모이어티는 제1 및 제2 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28 리신 잔기의 엡실론 아미노 기에 공유 접합 또는 연결될 수 있는 이관능성 링커를 포함하며, 하기 화학식을 갖는 벤젠-1,3 디아실에 의해 나타내어질 수 있다:



[0232]

[0233] 여기서 m, n, 및 o는 각각 독립적으로 1 또는 2이고; 파상선은 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노 기와 링커 사이의 결합을 나타낸다.

[0234] 또 다른 실시양태에서, 연결 모이어티는 제1 및 제2 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28 리신 잔기의 엡실론 아미노 기에 공유 접합 또는 연결될 수 있는 이관능성 링커를 포함하며, 하기 화학식을 갖는 시클로헥산-1,4 디아실에 의해 나타내어질 수 있다:



[0235]

[0236] 여기서 파상선은 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노 기와 링커 사이의 결합을 나타낸다.

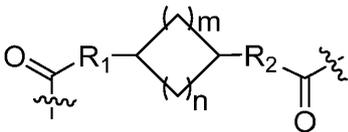
[0237] 또 다른 실시양태에서, 연결 모이어티는 제1 및 제2 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28 리신 잔기의 엡실론 아미노 기에 공유 접합 또는 연결될 수 있는 이관능성 링커를 포함하며, 하기 화학식을 갖는 시클로헥산-1,4 디아실에 의해 나타내어질 수 있다:



[0238]

[0239] 여기서 파상선은 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노 기와 링커 사이의 결합을 나타낸다.

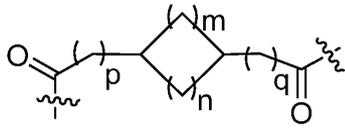
[0240] 또 다른 실시양태에서, 연결 모이어티는 제1 및 제2 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28 리신 잔기의 엡실론 아미노 기에 공유 접합 또는 연결될 수 있는 이관능성 링커를 포함하며, 하기 화학식을 갖는 벤젠-1,3 디아실에 의해 나타내어질 수 있다:



[0241]

[0242] 여기서 m 및 n은 각각 독립적으로 0, 1, 또는 2이고, 단 m 및 n 둘 다 0은 아니고; R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 동일하거나 또는 상이할 수 있고, 여기서 R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 독립적으로 결합, 포화 또는 비-포화 C1-C20 또는 C1-C6 알킬 쇠이고, 여기서 1개 이상의 메틸렌 단위는 -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -N(R)SO<sub>2</sub>-, SO<sub>2</sub>N(R)-, 헤테로시클릭 기, 아릴 기, 또는 헤테로아릴 기에 의해 임의로 및 독립적으로 대체되고, 여기서 각 경우의 R은 독립적으로 수소, 적합한 보호 기, 아실 모이어티, 아릴알킬 모이어티, 지방족 모이어티, 아릴 모이어티, 헤테로아릴 모이어티, 또는 헤테로지방족 모이어티, 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 쇠 (PEG)<sub>2</sub>, (PEG)<sub>3</sub>, (PEG)<sub>4</sub>, (PEG)<sub>5</sub>, (PEG)<sub>6</sub>, (PEG)<sub>7</sub>, (PEG)<sub>8</sub>, (PEG)<sub>9</sub>, (PEG)<sub>10</sub>, (PEG)<sub>11</sub>, (PEG)<sub>12</sub>, (PEG)<sub>13</sub>, (PEG)<sub>14</sub>, (PEG)<sub>15</sub>, (PEG)<sub>16</sub>, 또는 (PEG)<sub>2</sub>이고, 여기서 파상선은 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노 기와 링커 사이의 결합을 나타낸다.

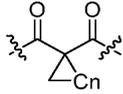
[0243] 또 다른 실시양태에서, 연결 모이어티는 제1 및 제2 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28 리신 잔기의 엡실론 아미노 기에 공유 접합 또는 연결될 수 있는 이관능성 링커를 포함하며, 하기 화학식을 갖는 벤젠-1,3 디아실에 의해 나타내어질 수 있다:



[0244]

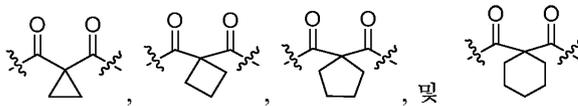
[0245] 여기서 m 및 n은 각각 독립적으로 1 또는 2이고; p 및 q는 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5이고, 파상선은 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노 기와 링커 사이의 결합을 나타낸다.

[0246] 또 다른 실시양태에서, 연결 모이어티는 제1 및 제2 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28 리신 잔기의 엡실론 아미노 기에 공유 접합 또는 연결될 수 있는 이관능성 링커를 포함하며, 하기 화학식을 갖는 1,1-디아실에 의해 나타내어질 수 있다:



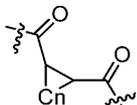
[0247]

[0248] 여기서 n은 1, 2, 3, 또는 4이고, 파상선은 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노 기와 링커 사이의 결합을 나타낸다. 구체적 실시양태에서, 1,1-디아실은 하기로부터 선택된 구조를 가질 수



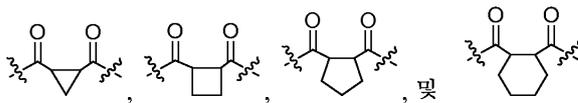
있고: (각각 1,1-디아실-C3; 1,2-디아실-C4; 1,1-디아실-C5; 및 1,1-디아실-C6), 여기서 파상선은 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노 기와 링커 사이의 결합을 나타낸다.

[0249] 또 다른 실시양태에서, 연결 모이어티는 제1 및 제2 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28 리신 잔기의 엡실론 아미노 기에 공유 접합 또는 연결될 수 있는 이관능성 링커를 포함하며, 하기 화학식을 갖는 1,2-디아실에 의해 나타내어질 수 있다:



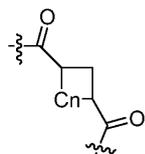
[0250]

[0251] 여기서 n은 1, 2, 3, 또는 4이고, 파상선은 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노 기와 링커 사이의 결합을 나타낸다. 구체적 실시양태에서, 1,2-디아실은 하기로부터 선택된 구조를 가질 수



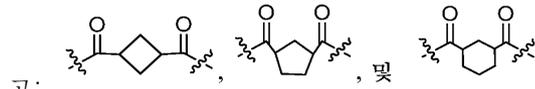
있고: (각각 1,2-디아실-C3; 1,2-디아실-C4; 1,2-디아실-C5; 및 1,2-디아실-C6), 여기서 파상선은 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노 기와 링커 사이의 결합을 나타낸다.

[0252] 또 다른 실시양태에서, 연결 모이어티는 제1 및 제2 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28 리신 잔기의 엡실론 아미노 기에 공유 접합 또는 연결될 수 있는 이관능성 링커를 포함하며, 하기 화학식을 갖는 1,3-디아실에 의해 나타내어질 수 있다:



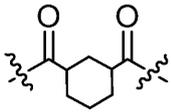
[0253]

[0254] 여기서 n은 1, 2, 또는 3이고, 파상선은 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노 기와 링커 사이의 결합을 나타낸다. 구체적 실시양태에서, 1,3-디아실은 하기로부터 선택된 구조를 가질 수 있



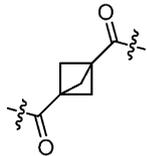
고: (각각 1,3-디아실-C4; 1,3-디아실-C5; 및 1,3-디아실-C6), 여기서 파상선은 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노 기와 링커 사이의 결합을 나타낸다.

[0255] 또 다른 실시양태에서, 연결 모이어티는 제1 및 제2 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28 리신 잔기의 엡실론 아미노 기에 공유 접합 또는 연결될 수 있는 이관능성 링커를 포함하며, 하기 화학식을 갖는 1,4-디아실에 의해 나타내어질 수 있다:



[0256] (1,4-디아실-C6), 여기서 파상선은 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노 기와 링커 사이의 결합을 나타낸다.

[0257] 또 다른 실시양태에서, 연결 모이어티는 제1 및 제2 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28 리신 잔기의 엡실론 아미노 기에 공유 접합 또는 연결될 수 있는 이관능성 링커를 포함하며, 하기 화학식을 갖는 시클로부틸-1,3-디아실에 의해 나타내어질 수 있다:



[0258] 여기서 파상선은 인슐린 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신의 엡실론 아미노 기와 링커 사이의 결합을 나타낸다.

[0260] 본 발명의 추가 측면에서, 제1 및 제2 인슐린 폴리펩티드는 구리-축매된 아지드-알킨 휘스겐 고리화첨가(CuAAC), 특히 CuAAC 클릭 화학을 사용하여 함께 접합될 수 있다. 이러한 측면에서, 제1 인슐린 폴리펩티드의 B29 또는 B28 리신의 엡실론 아미노 기는 근위 말단 및 원위 말단을 갖는 링커 모이어티에 접합되며, 여기서 링커 모이어티의 근위 말단은 엡실론 아미노 기에 접합되고, 원위 말단은 아지드 기를 포함한다. 이러한 측면에서, 제2 인슐린 폴리펩티드의 B29 또는 B28 리신의 엡실론 아미노 기는 근위 말단 및 원위 말단을 갖는 링커 모이어티에 접합되며, 여기서 링커 모이어티의 근위 말단은 엡실론 아미노 기에 접합되고, 원위 말단은 알킨 기를 포함한다. Cu<sup>2+</sup> 및 환원제의 존재 하에, 아지드 및 알킨 기는 트리아졸 모이어티를 포함하는 인접 연결 모이어티를 형성할 것이다. CuAAC 클릭 화학의 설명을 위해 그의 전체내용이 본원에 포함된 미국 특허 번호 8,129,542를 참조한다.

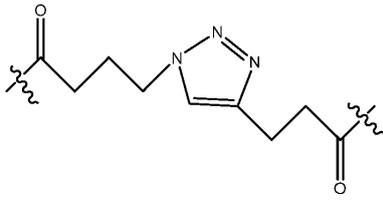
[0261] 인슐린 수용체 부분 효능제의 특정한 측면에서, 제1 인슐린 폴리펩티드는 B29 또는 B28 리신의 엡실론 아미노 기에 접합될 수 있으며, 링커는 하기 화학식을 갖고:



[0262] 제2 인슐린 폴리펩티드는 B29 또는 B28 리신의 엡실론 아미노 기에 접합될 수 있으며, 링커는 하기 화학식을 갖는다:

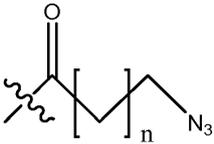


[0264] Cu<sup>2+</sup> 및 환원제의 존재 하에, 링커는 조합되어 하기 구조를 갖는 연결 모이어티를 제공한다:



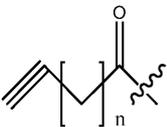
[0265]

[0266] 인슐린 수용체 부분 효능제의 특정한 측면에서, 제1 인슐린 폴리펩티드는 B29 또는 B28 리신의 엡실론 아미노기에 접합될 수 있으며, 링커는 하기 화학식을 갖고:



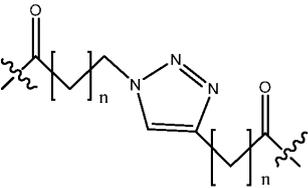
[0267]

[0268] (여기서 n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10임), 제2 인슐린 폴리펩티드는 B29 또는 B28 리신의 엡실론 아미노기에 접합될 수 있으며, 링커는 하기 화학식을 갖는다:



[0269]

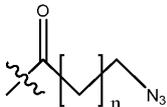
[0270] (여기서 n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10임). Cu<sup>2+</sup> 및 환원제의 존재 하에, 링커는 조합되어 하기 구조를 갖는 연결 모이어터를 제공한다:



[0271]

[0272] 여기서 각각의 n은 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10이다.

[0273] 추가 측면에서, 제1 인슐린 폴리펩티드 및 제2 인슐린 폴리펩티드는 둘 다 B29 또는 B28 리신의 그의 각각의 엡실론 아미노기에 접합될 수 있으며, 링커는 하기 화학식을 갖는다:



[0274]

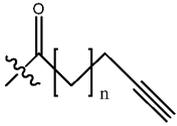
[0275] 여기서 각각의 n은 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10이다. 연결 모이어터를 형성하는 링커의 접합은 하기 구조를 갖는 분자 (중간 또는 가교 링커)를 제공함으로써 달성될 수 있다:



[0276]

[0277] 여기서 R은 공유 결합, 탄소 원자, 페닐, 헤테로원자, 또는 아실, 지방족, 헤테로지방족, 아릴, 헤테로아릴, 및 헤테로시클릭으로 이루어진 군으로부터 선택된 임의로 치환된 기이다. 특정한 측면에서 R은 C2, C3, C4, C6, C7, C8, C9 또는 C10 아실 기 또는 PEG2, PEG3, PEG4, PEG5, PEG6, PEG7, PEG8, PEG9, PEG10, PEG11, PEG12, PEG13, 또는 PEG25이다.

[0278] 추가 측면에서, 제1 인슐린 폴리펩티드 및 제2 인슐린 폴리펩티드는 둘 다 B29 또는 B28 리신의 그의 각각의 엡실론 아미노기에 접합될 수 있으며, 링커는 하기 화학식을 갖는다:



[0279]

[0280]

여기서 각각의 n은 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10이다. 연결 모이어티를 형성하는 링커의 접합은 하기 구조를 갖는 분자 (중간 또는 가교 링커)를 제공함으로써 달성될 수 있다:

[0281]



[0282]

여기서 R은 공유 결합, 탄소 원자, 페닐, 헤테로원자, 또는 아실, 지방족, 헤테로지방족, 아릴, 헤테로아릴, 및 헤테로시클릭으로 이루어진 군으로부터 선택된 임의로 치환된 기이다. 특정한 측면에서 R은 C2, C3, C4, C6, C7, C8, C9 또는 C10 아실 기 또는 PEG2, PEG3, PEG4, PEG5, PEG6, PEG7, PEG8, PEG9, PEG10, PEG11, PEG12, PEG13, 또는 PEG25이다.

[0283]

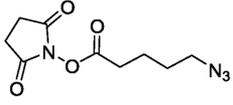
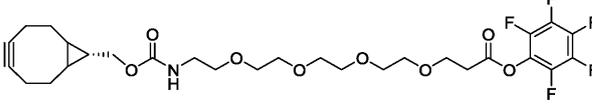
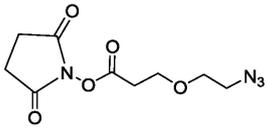
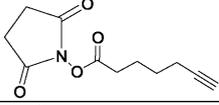
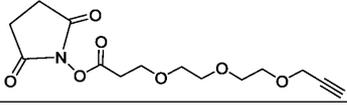
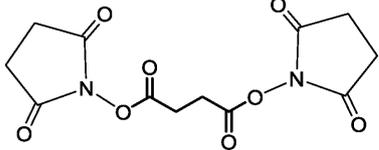
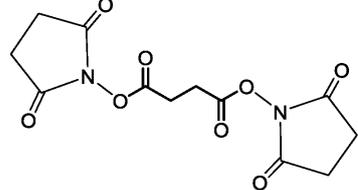
특정한 측면에서, 제1 인슐린 중합체는 상기와 같이 B29 또는 B28 리신의 엡실론 아미노 기에서 아지드 종결 링커에 접합되고, 제2 인슐린 폴리펩티드는 B29 또는 B28 리신의 엡실론 아미노 기에서 시클로옥탄 모이어티로 종결되는 링커에 접합되고, 링커는 구리-무함유 고리화첨가 클릭 화학을 사용하여 접합되어 링커 모이어티를 형성한다. 예를 들어, 그의 전체내용이 본원에 포함된 미국 특허 번호 7,807,619를 참조한다.

[0284]

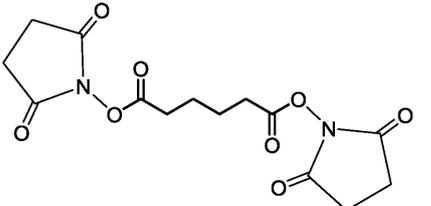
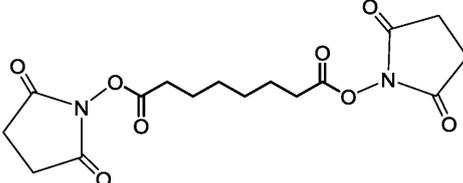
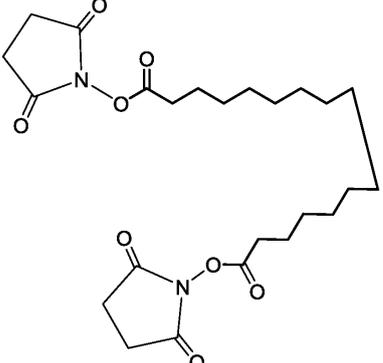
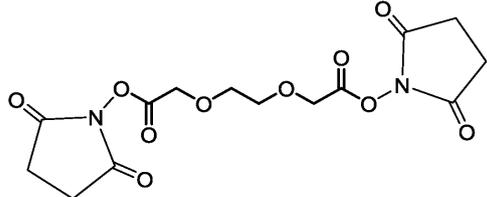
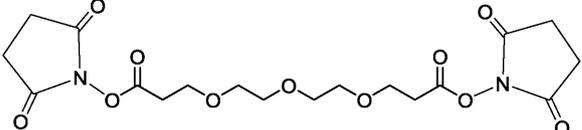
하기 표는 본 발명의 이량체를 구축하는데 사용될 수 있는 예시적인 링커를 보여준다. 제시된 이량체는 B29 또는 B29 리신의 엡실론 아미노 기에 접합시키기 위한 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 기를 포함한다.

링커 표		
	링커	명칭
1		C6+Nc6
2		C6N+C6+NC6
3		γE-C8-γE
4		Click-1

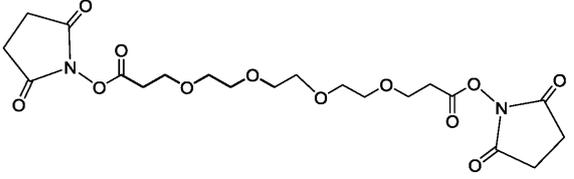
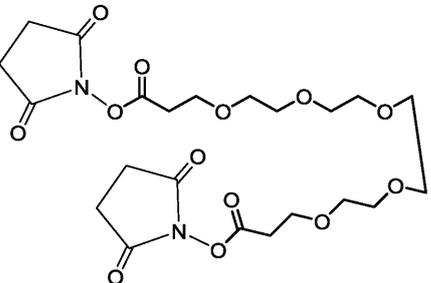
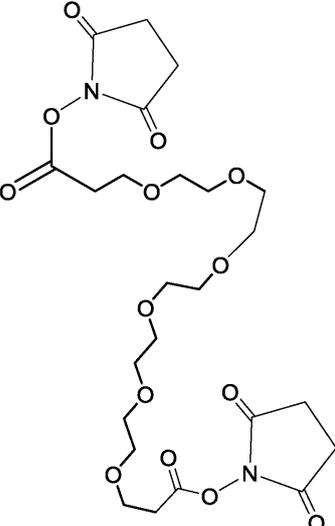
[0285]

5		Click-2
6		Click-3
7		Click-4
8		Click-5
9		Click-6
10		C2
11		C4

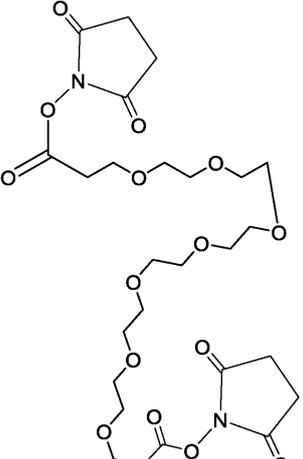
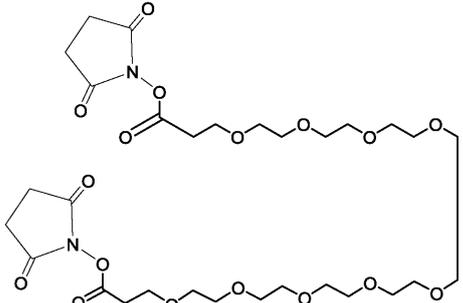
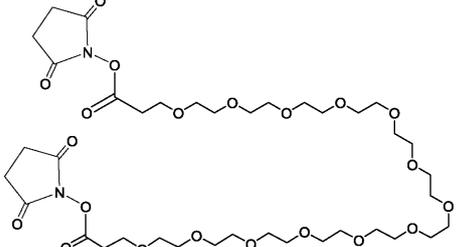
[0286]

12		C6
13		C8
14		C16
15		PEG2
16		PEG3

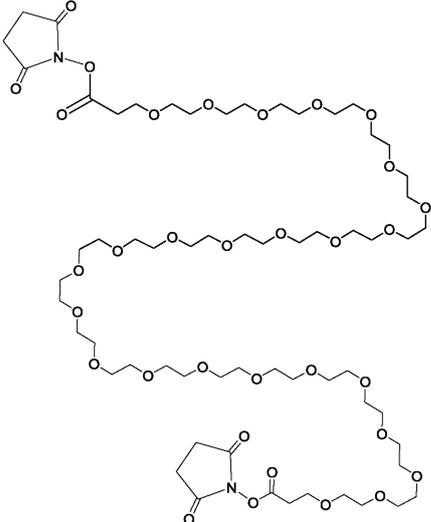
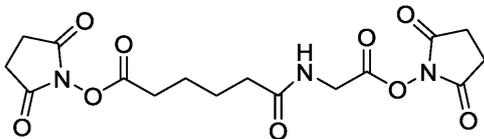
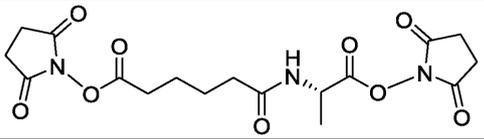
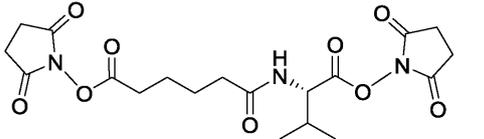
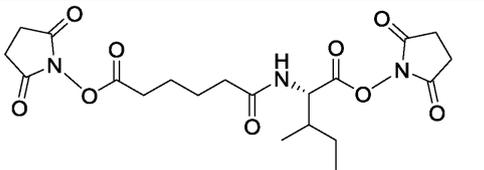
[0287]

17		PEG4
18		PEG5
19		PEG6

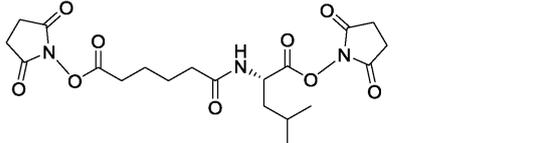
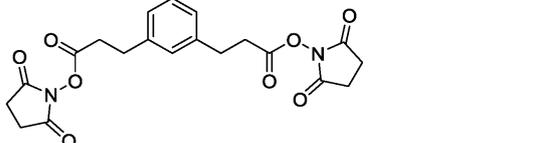
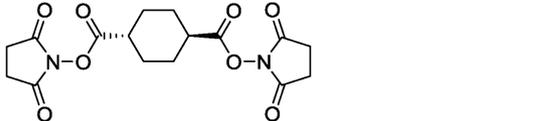
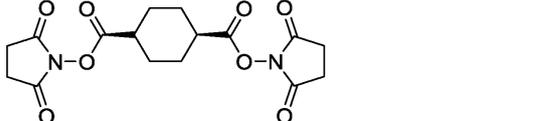
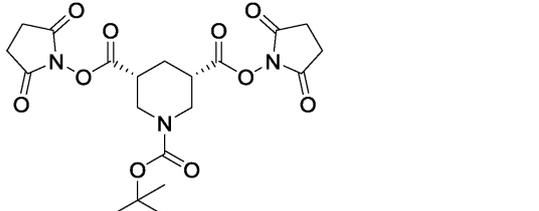
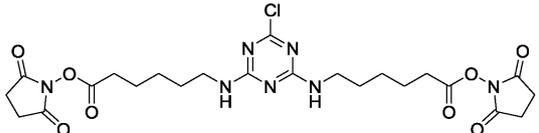
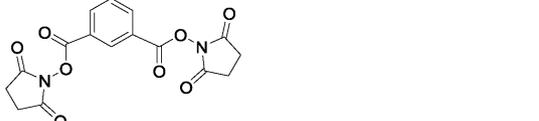
[0288]

20		PEG7
21		PEG9
22		PEG13

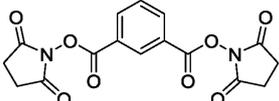
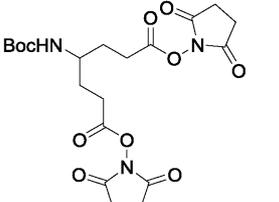
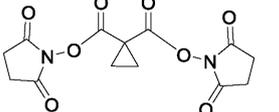
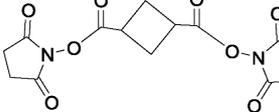
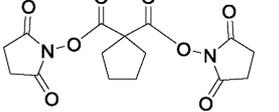
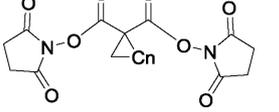
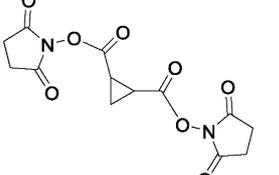
[0289]

<p>23</p>		<p>PEG25</p>
<p>24</p>		<p>C6-글리신</p>
<p>25</p>		<p>C6-알라닌</p>
<p>26</p>		<p>C6-이소류신</p>
<p>27</p>		<p>C6-류신</p>

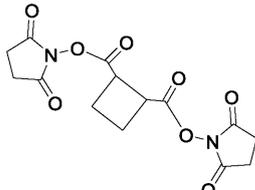
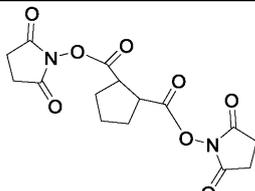
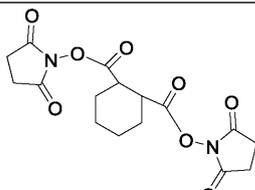
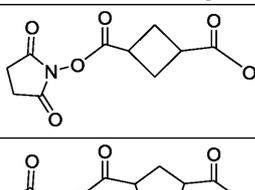
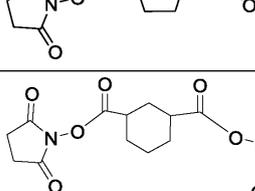
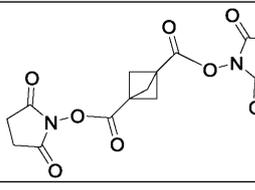
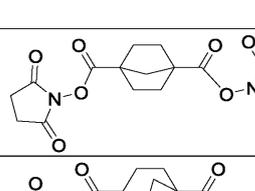
[0290]

28		C6-발린
29		디프로필 페놀
30		트랜스- 시클로헥산 1,4-이산
31		시스- 시클로헥산 1,4-이산
32		Tert-부틸- 피페리딘- 트리카르브
33		C6N-클로로- 1,3,5- 트리아진- NC6
34		테레프탈레 이트

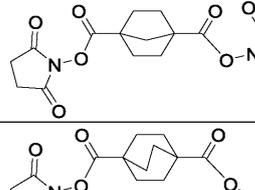
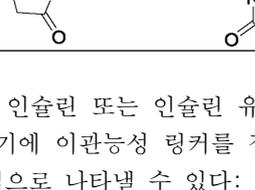
[0291]

35		이소프탈레이트
36		헵탄디오에이트
37		1,1-디아실-C3
38		1,1-디아실-C4
39		1,1-디아실-C5
40	 <p>n=1,2,3, 또는 4</p>	1,1-디아실-C6
41		1,2-디아실-C3

[0292]

42		1,2-디아실- C4
43		1,2-디아실- C5
44		1,2-디아실- C6
45		1,3-디아실- C4
46		1,3-디아실- C5
47		1,3-디아실- C6
48		1,4-디아실- 시클로부틸- C1

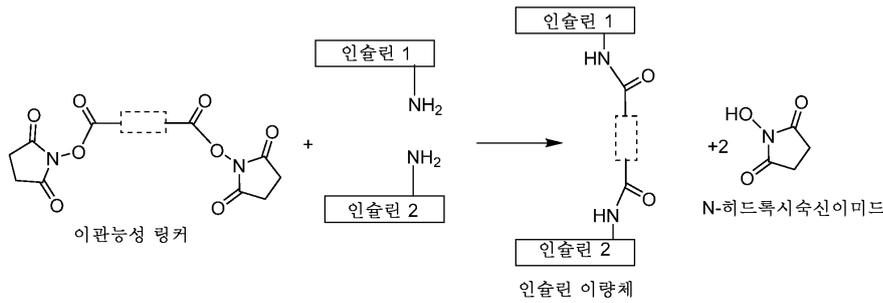
[0293]

49		1,4- 시클로헥실- C1
50		1,4- 시클로헥실- C2

[0294]

[0295]

2개의 인슐린 또는 인슐린 유사체 분자의 B-쇄 폴리펩티드의 위치 B29 또는 B28에 있는 리신 잔기의 엡실론 아미노기에 이관능성 링커를 접합시켜 연결 모이어티에 의해 연결된 인슐린 이량체를 형성하는 것은 하기와 같이 개략적으로 나타낼 수 있다:



[0296]

[0297]

여기서 인슐린 1 및 인슐린 2 분자는 동일하거나 또는 상이할 수 있고, 이관능성 링커 및 접합 후에 생성된 연결 모이어티는 본원에 개시된 임의의 링커 및 생성된 연결 모이어티의 구조를 가질 수 있다.

[0298]

인슐린 폴리펩티드의 변형

[0299]

일부 실시양태에서, 인슐린 수용체 부분 효능제의 A-쇄 폴리펩티드 또는 B-쇄 폴리펩티드 중 적어도 하나는 아실 기를 포함하도록 변형된다. 아실 기는 인슐린 폴리펩티드의 아미노산에 직접적으로, 또는 인슐린 폴리펩티드의 아미노산에 스페이서를 통해 간접적으로 공유 연결될 수 있으며, 여기서 스페이서는 인슐린 폴리펩티드의 아미노산과 아실 기 사이에 위치한다. 인슐린 폴리펩티드 친수성 모이어티가 연결되는 동일한 아미노산 위치에서, 또는 상이한 아미노산 위치에서 아실화될 수 있다. 예를 들어, 아실화는 A- 또는 B-쇄 폴리펩티드의 임의의 아미노산을 포함한 임의의 위치 뿐만 아니라 연결 모이어티 내의 위치에서 일어날 수 있으며, 단 비-아실화 인슐린 폴리펩티드에 의해 나타나는 활성은 아실화시에 유지된다. 비제한적 예는 A-쇄의 위치 A1 및 B-쇄의 위치 B1에서의 아실화를 포함한다.

[0300]

본 발명의 하나의 구체적 측면에서, 제1 및/또는 제2 인슐린 폴리펩티드 (또는 그의 유도체 또는 접합체)는 인슐린 폴리펩티드의 아미노산의 측쇄의 아민, 히드록실, 또는 티올의 직접 아실화에 의해 아실 기를 포함하도록 변형된다. 일부 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 인슐린 폴리펩티드는 아미노산의 측쇄 아민, 히드록실, 또는 티올을 통해 직접 아실화된다. 이와 관련하여, A- 또는 B-쇄 폴리펩티드 서열 내 (예를 들어 위치 A1, A14, A15, B1, B10, 또는 B22 또는 연결 모이어티의 임의의 위치 포함)에서의 측쇄 아민, 히드록실, 또는 티올을 포함하는 아미노산으로의 1개 이상의 아미노산 치환에 의해 변형된 인슐린 폴리펩티드가 제공될 수 있다.

[0301]

일부 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 인슐린 폴리펩티드와 아실 기 사이의 스페이서는 측쇄 아민, 히드록실, 또는 티올을 포함하는 아미노산 (또는 측쇄 아민, 히드록실, 또는 티올을 포함하는 아미노산을 포함하는 디펩티드 또는 트리펩티드)이다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 친수성 이관능성 스페이서를 포함한다. 구체적 실시양태에서, 스페이서는 아미노 폴리(알킬옥시)카르복실레이트를 포함한다. 이와 관련하여, 스페이서는, 예를 들어  $NH_2(CH_2CH_2O)_n(CH_2)_mCOOH$ 를 포함할 수 있고, 여기서 m은 1 내지 6의 임의의 정수이고, n은 2 내지 12의 임의의 정수이고, 예컨대 예를 들어 8-아미노-3,6-디옥사옥탄산이며, 이는 펩티드스 인터내셔널, 인크. (켄터키주 루이스빌)로부터 상업적으로 입수가능하다. 한 실시양태에서, 친수성 이관능성 스페이서는 2개 이상의 반응성 기, 예를 들어 아민, 히드록실, 티올, 및 카르복실 기 또는 그의 임의의 조합을 포함한다. 특정 실시양태에서, 친수성 이관능성 스페이서는 히드록실 기 및 카르복실레이트를 포함한다. 다른 실시양태에서, 친수성 이관능성 스페이서는 아민 기 및 카르복실레이트를 포함한다. 다른 실시양태에서, 친수성 이관능성 스페이서는 티올 기 및 카르복실레이트를 포함한다.

[0302]

일부 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 인슐린 폴리펩티드와 아실 기 사이의 스페이서는 소수성 이관능성 스페이서이다. 소수성 이관능성 스페이서는 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 그의 전체내용이 참조로 포함된 문헌 [Bioconjugate Techniques, G. T. Hermanson (Academic Press, San Diego, CA, 1996)]을 참조한다. 특정 실시양태에서, 소수성 이관능성 스페이서는 2개 이상의 반응성 기, 예를 들어 아민, 히드록실, 티올, 및 카르복실 기 또는 그의 임의의 조합을 포함한다. 특정 실시양태에서, 소수성 이관능성 스페이서는 히드록실 기 및 카르복실레이트를 포함한다. 다른 실시양태에서, 소수성 이관능성 스페이서는 아민 기 및 카르복실레이트를 포함한다. 다른 실시양태에서, 소수성 이관능성 스페이서는 티올 기 및 카르복실레이트를 포함한다. 카르복실레이트 및 히드록실 기 또는 티올 기를 포함하는 적합한 소수성 이관능성 스페이서는 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들어, 8-히드록시옥탄산 및 8-메르캅토옥탄산을 포함한다.

[0303]

특정 실시양태에 따르면 이관능성 스페이서는 3 내지 10개 원자 길이의 아미노산 백본을 포함하는 합성 또는 자

연 발생 아미노산일 수 있다 (예를 들어, 6-아미노 헥산산, 5-아미노발레르산, 7-아미노헵탄산, 및 8-아미노옥탄산). 대안적으로, 스페이서는 3 내지 10개 원자 (예를 들어, 6 내지 10개 원자) 길이의 펩티드 백본을 갖는 디펩티드 또는 트리펩티드 스페이서일 수 있다. 인슐린 폴리펩티드에 부착된 디펩티드 또는 트리펩티드 스페이서의 각각의 아미노산은 독립적으로 하기로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다: 자연-발생 및/또는 비-자연 발생 아미노산, 하기 포함: 예를 들어, 자연-발생 아미노산 (Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr)의 임의의 D 또는 L 이성질체, 또는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 비-자연 발생 아미노산의 임의의 D 또는 L 이성질체:  $\beta$ -알라닌 ( $\beta$ -Ala), N- $\alpha$ -메틸-알라닌 (Me-Ala), 아미노부티르산 (Abu),  $\alpha$ -아미노부티르산 ( $\gamma$ -Abu), 아미노헥산산 ( $\epsilon$ -Ahx), 아미노이소부티르산 (Aib), 아미노메틸피롤 카르복실산, 아미노피페리딘카르복실산, 아미노세린 (Ams), 아미노테트라히드로피란-4-카르복실산, 아르기닌 N-메톡시-N-메틸 아마이드,  $\beta$ -아스파르트산 ( $\beta$ -Asp), 아제티딘 카르복실산, 3-(2-벤조티아졸릴)알라닌,  $\alpha$ -tert-부틸글리신, 2-아미노-5-우레이도-n-발레르산 (시트룰린, Cit),  $\beta$ -시클로헥실알라닌 (Cha), 아세트아미도메틸-시스테인, 디아미노부탄산 (Dab), 디아미노프로피온산 (Dpr), 디히드록시페닐알라닌 (DOPA), 디메틸티아졸리딘 (DMTA),  $\gamma$ -글루탐산 ( $\gamma$ -Glu), 호모세린 (Hse), 히드록시프롤린 (Hyp), 이소류신 N-메톡시-N-메틸 아마이드, 메틸-이소류신 (MeIle), 이소니페코트산 (Isn), 메틸-류신 (MeLeu), 메틸-리신, 디메틸-리신, 트리메틸-리신, 메타노프롤린, 메티오닌-술포사이드 (Met(O)), 메티오닌-술포 (Met(O2)), 노르류신 (Nle), 메틸-노르류신 (Me-Nle), 노르발린 (Nva), 오르니틴 (Orn), 파라-아미노벤조산 (PABA), 페니실라민 (Pen), 메틸페닐알라닌 (MePhe), 4-클로로페닐알라닌 (Phe(4-Cl)), 4-플루오로페닐알라닌 (Phe(4-F)), 4-니트로페닐알라닌 (Phe(4-NO2)), 4-시아노페닐알라닌 ((Phe(4-CN))), 페닐글리신 (Phg), 피페리디닐알라닌, 피페리디닐글리신, 3,4-데히드로프롤린, 피롤리디닐알라닌, 사르코신 (Sar), 셀레노시스테인 (Sec), U-벤질-포스포세린, 4-아미노-3-히드록시-6-메틸헵탄산 (Sta), 4-아미노-5-시클로헥실-3-히드록시헵탄산 (ACHPA), 4-아미노-3-히드록시-5-페닐헵탄산 (AHPPA), 1,2,3,4-테트라히드로-이소퀴놀린-3-카르복실산 (Tic), 테트라히드로피란글리신, 티에닐알라닌 (Thi), U-벤질-포스포티로신, O-포스포티로신, 메톡시티로신, 에톡시티로신, O-(비스-디메틸아미노-포스포노)-티로신, 티로신 술페이트 테트라부틸아민, 메틸-발린 (MeVal), 1-아미노-1-시클로헥산 카르복실산 (Acx), 아미노발레르산, 베타-시클로프로필-알라닌 (Cpa), 프로파르길글리신 (Prg), 알릴글리신 (Alg), 2-아미노-2-시클로헥실-프로판산 (2-Cha), tert부틸글리신 (Tbg), 비닐글리신 (Vg), 1-아미노-1-시클로프로판 카르복실산 (Acp), 1-아미노-1-시클로펜탄 카르복실산 (Acpe), 알킬화 3-메르캅토 프로피온산, 1-아미노-1-시클로부탄 카르복실산 (Acb). 일부 실시양태에서 디펩티드 스페이서는 Ala-Ala,  $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala, Leu-Leu, Pro-Pro,  $\gamma$ -아미노부티르산- $\gamma$ -아미노부티르산, 및  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu로 이루어진 군으로부터 선택된다.

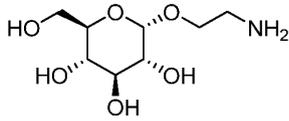
[0304] 제1 및/또는 제2 인슐린 폴리펩티드는 장쇄 알칸의 아실화에 의해 아실 기를 포함하도록 변형될 수 있다. 구체적 측면에서, 장쇄 알칸은 인슐린 폴리펩티드의 카르복실 기, 또는 그의 활성화 형태와 반응하는 아민, 히드록실, 또는 티올 기 (예를 들어 옥타데실아민, 테트라데칸올, 및 헥사데칸티올)를 포함한다. 인슐린 폴리펩티드의 카르복실 기, 또는 그의 활성화 형태는 인슐린 폴리펩티드의 아미노산 (예를 들어, 글루탐산, 아스파르트산)의 측쇄의 부분일 수 있거나 또는 펩티드 백본의 부분일 수 있다.

[0305] 특정 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 인슐린 폴리펩티드는 인슐린 폴리펩티드에 부착되는 스페이서에 의한 장쇄 알칸의 아실화에 의해 아실 기를 포함하도록 변형된다. 구체적 측면에서, 장쇄 알칸은 스페이서의 카르복실 기, 또는 그의 활성화 형태와 반응하는 아민, 히드록실, 또는 티올 기를 포함한다. 카르복실 기, 또는 그의 활성화 형태를 포함하는 적합한 스페이서는 본원에 기재되어 있으며, 예를 들어 이관능성 스페이서, 예를 들어 아미노산, 디펩티드, 트리펩티드, 친수성 이관능성 스페이서 및 소수성 이관능성 스페이서를 포함한다. 본원에 사용된 용어 "카르복실 기의 활성화 형태"는 화학식 R(C=O)X를 갖는 카르복실 기를 지칭하며, 여기서 X는 이탈기이고, R은 인슐린 폴리펩티드 또는 스페이서이다. 예를 들어, 카르복실 기의 활성화 형태는 아실 클로라이드, 무수물, 및 에스테르를 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 활성화 카르복실 기는 N-히드록시숙신이미드 (NHS) 이탈기를 갖는 에스테르이다.

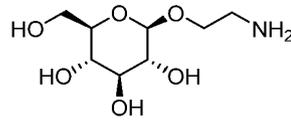
[0306] 장쇄 알칸이 펩티드, 인슐린 폴리펩티드 또는 스페이서에 의해 아실화된 것인 본 발명의 이러한 측면과 관련하여, 장쇄 알칸은 임의의 크기일 수 있고, 임의의 길이의 탄소 체를 포함할 수 있다. 장쇄 알칸은 선형 또는 분지형일 수 있다. 특정 측면에서, 장쇄 알칸은 C<sub>4</sub> 내지 C<sub>30</sub> 알칸이다. 예를 들어, 장쇄 알칸은 임의의 C<sub>4</sub> 알칸, C<sub>6</sub> 알칸, C<sub>8</sub> 알칸, C<sub>10</sub> 알칸, C<sub>12</sub> 알칸, C<sub>14</sub> 알칸, C<sub>16</sub> 알칸, C<sub>18</sub> 알칸, C<sub>20</sub> 알칸, C<sub>22</sub> 알칸, C<sub>24</sub> 알칸, C<sub>26</sub> 알칸, C<sub>28</sub> 알칸, 또는 C<sub>30</sub> 알칸일 수 있다. 일부 실시양태에서, 장쇄 알칸은 C<sub>8</sub> 내지 C<sub>20</sub> 알칸, 예를 들어 C<sub>14</sub> 알칸, C<sub>16</sub> 알칸, 또는 C<sub>18</sub> 알칸을 포함한다.

- [0307] 일부 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 인슐린 폴리펩티드의 아민, 히드록실, 또는 티올 기는 콜레스테롤 산으로 아실화된다. 구체적 실시양태에서, 펩티드는 콜레스테롤 산에 알킬화 데스-아미노 Cys 스페이서, 즉 알킬화 3-메르캅토프로피온산 스페이서를 통해 연결된다. 아민, 히드록실, 및 티올을 통한 펩티드 아실화의 적합한 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Miller, Biochem Biophys Res Commun 218: 377-382 (1996); Shimohigashi and Stammer, Int J Pept Protein Res 19: 54-62 (1982); 및 Previero et al., Biochim Biophys Acta 263: 7-13 (1972)] (히드록실을 통한 아실화 방법에 대한 것임); 및 [San and Silvius, J Pept Res 66: 169-180 (2005)] (티올을 통한 아실화 방법에 대한 것임); [Bioconjugate Chem. "Chemical Modifications of Proteins: History and Applications" pages 1, 2-12 (1990); Hashimoto et al., Pharmaceutical Res. "Synthesis of Palmitoyl Derivatives of Insulin and their Biological Activity" Vol. 6, No: 2 pp.171-176 (1989)]을 참조한다.
- [0308] 아실화 펩티드 제1 및/또는 제2 인슐린 폴리펩티드의 아실 기는 임의의 크기, 예를 들어 임의의 길이의 탄소쇄일 수 있으며, 선형 또는 분지형일 수 있다. 본 발명의 일부 구체적 실시양태에서, 아실 기는 C<sub>4</sub> 내지 C<sub>30</sub> 지방산이다. 예를 들어, 아실 기는 임의의 C<sub>4</sub> 지방산, C<sub>6</sub> 지방산, C<sub>8</sub> 지방산, C<sub>10</sub> 지방산, C<sub>12</sub> 지방산, C<sub>14</sub> 지방산, C<sub>16</sub> 지방산, C<sub>18</sub> 지방산, C<sub>20</sub> 지방산, C<sub>22</sub> 지방산, C<sub>24</sub> 지방산, C<sub>26</sub> 지방산, C<sub>28</sub> 지방산, 또는 C<sub>30</sub> 지방산일 수 있다. 일부 실시양태에서, 아실 기는 C<sub>8</sub> 내지 C<sub>20</sub> 지방산, 예를 들어 C<sub>14</sub> 지방산 또는 C<sub>16</sub> 지방산이다. 일부 실시양태에서, 아실 기는 우레아이다.
- [0309] 대안적 실시양태에서, 아실 기는 담즙산이다. 담즙산은 콜산, 케노데옥시콜산, 데옥시콜산, 리토콜산, 타우로콜산, 글리코콜산 및 콜레스테롤 산을 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 적합한 담즙산일 수 있다.
- [0310] 본원에 기재된 아실화 제1 및/또는 제2 인슐린 폴리펩티드는 친수성 모이어티를 포함하도록 추가로 변형될 수 있다. 일부 구체적 실시양태에서 친수성 모이어티는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 쇄를 포함할 수 있다. 친수성 모이어티의 혼입은 임의의 적합한 수단을 통해, 예컨대 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 달성될 수 있다. 일부 실시양태에서 아실화 단일 쇄 유사체는 Cys, Lys, Orn, 호모-Cys, 또는 Ac-Phe로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산을 포함하고, 아미노산의 측쇄는 친수성 모이어티 (예를 들어, PEG)에 공유 결합된다. 한 실시양태에서, 아실 기는 위치 A1, A14, A15, B1, B2, B10, 또는 B22 (천연 인슐린의 A 및 B 쇄의 아미노산 numbering에 따름)에, 임의로 Cys, Lys, Orn, 호모-Cys, 또는 Ac-Phe를 포함하는 스페이서를 통해 부착된다.
- [0311] 대안적으로, 아실화 제1 및/또는 제2 인슐린 폴리펩티드는 스페이서를 포함하며, 여기서 스페이서는 둘 다 친수성 모이어티를 포함하도록 아실화 및 변형된다. 적합한 스페이서의 비제한적 예는 Cys, Lys, Orn, 호모-Cys, 및 Ac-Phe로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산을 포함하는 스페이서를 포함한다.
- [0312] 일부 실시양태에서, 인슐린 수용체 부분 효능제의 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드 중 적어도 하나의 적어도 1개의 N-말단 아미노산의 아미노 말단은 치환기를 포함하도록 변형된다. 치환기는 N-말단 아미노산의 아미노기에 직접적으로 또는 아미노기에 스페이서를 통해 간접적으로 공유 연결될 수 있으며, 여기서 스페이서는 인슐린 폴리펩티드의 N-말단 아미노산의 아미노기와 치환기 사이에 위치한다. 치환기는 상기 논의된 바와 같은 아실 모이어티일 수 있다. 치환기는 화학식 RC(O)-를 가질 수 있고, 여기서 R은 R'CH<sub>2</sub>, R'NH, R'O일 수 있고, R'는 H, 선형 알킬 쇄, 아미노산, 펩티드, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 사카라이드일 수 있고, 특정한 측면에서 RC(O)-는 아세틸, 페닐아세틸, 카르바모일, N-알킬 카르바모일, 또는 알콕시카르보닐일 수 있다. 특정한 측면에서, 치환기는 카르바모일 기, 아세틸 기, 글리신, 메틸 기, 메톡시 기, 디메틸 기, 이소부틸 기, PEG1 기, 또는 PEG2 기이다 (치환기의 구조에 대한 본원의 예시 참조). 인슐린의 카르바모일화는 문헌 [Oimoni et al., Nephron 46: 63-66 (1987)]에 개시되어 있으며, N-말단에서 카르바모일 기를 포함하는 인슐린 이량체는 공개된 PCT 출원 번호 W02014052451에 개시되어 있다 (예를 들어, MIU-90).
- [0313] 특정한 실시양태에서, 적어도 1개의 N-말단 아미노산은 화학식 RC(O)-를 갖는 기에 연결된 N-히드록시숙신이미드 에스테르를 포함하는 치환기에 N2 질소를 통해 접합되고, 여기서 R은 R'CH<sub>2</sub>, R'NH, R'O일 수 있고, R'는 H, 선형 알킬 쇄, 아미노산, 펩티드, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 사카라이드일 수 있고, 특정한 측면에서 RC(O)-는 아세틸, 페닐아세틸, 카르바모일, N-알킬 카르바모일, 또는 알콕시카르보닐일 수 있다. 특정한 측면에서, 치환기는 카르바모일 기, 아세틸 기, 글리신, 메틸 기, 메톡시 기, 디메틸 기, 이소부틸 기, PEG1 기, 또는 PEG2 기이다.
- [0314] 특정한 실시양태에서, 제1 및 제2 인슐린 폴리펩티드의 1개 이상의 아미노 말단에 공유 연결된 사카라이드는 모

노사카라이드일 수 있고, 예를 들면 이량체 51을 참조한다. 일부 실시양태에서, 사카라이드는 1개 이상의 아민기를 포함한다. 특정 실시양태에서, 사카라이드 및 아민 기는 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬 기, 예를 들어 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알킬 기에 의해 분리된다. 일부 실시양태에서, 사카라이드는 아미노에틸글루코스 (AEG)이다. 특정 실시양태에서, 사카라이드 리간드는 "D" 배위로 존재한다. 다른 실시양태에서, 사카라이드 리간드는 "L" 배위로 존재한다. 하기에서 본 발명자들은 이들 예시적인 사카라이드의 구조를 보여준다. 다른 예시적인 사카라이드는 관련 기술분야의 통상의 기술자가 알 것이다.



AEG-알파



AEG-베타

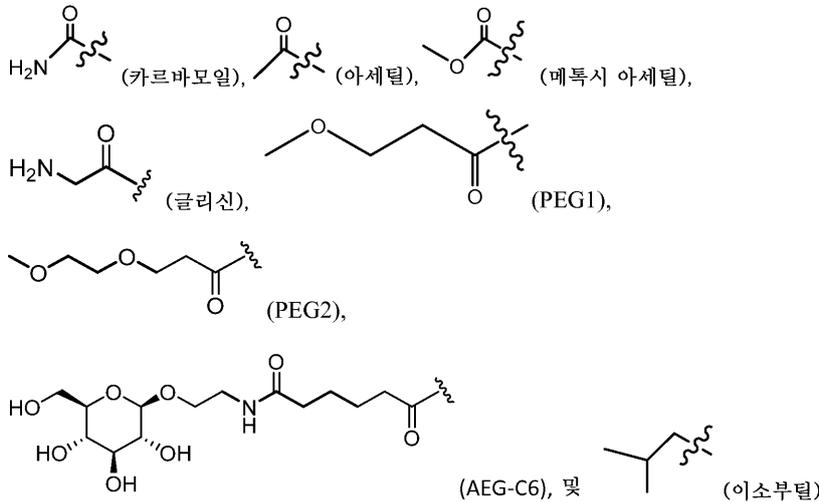
[0315]

[0316]

일반적으로, 사카라이드는 제1 및 제2 인슐린 폴리펩티드 중 1개 이상의 아미노 말단에 직접적으로 또는 링커를 통해 간접적으로 접합될 수 있다. 특정한 측면에서, 링커는 알킬디오일, -C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(O)-이고, 여기서 n = 0-45, 0-20, 0-10, 또는 0-5이다.

[0317]

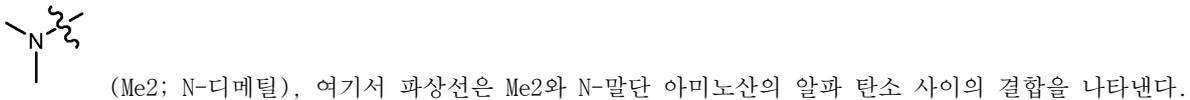
N-말단 아미노 기에 접합된 예시적인 치환기는 하기일 수 있다:



[0318]

[0319]

여기서 파상선은 치환기와 N-말단 아미노 기 사이의 결합을 나타낸다. 치환기는 또한 하기일 수 있다:



[0320]

예시적인 인슐린 이량체

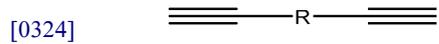
[0321]

특정한 실시양태에서, 본 발명은 인슐린 이량체를 제공하며, 여기서 제1 A-쇄 폴리펩티드 및 제1 B-쇄 폴리펩티드를 갖는 제1 인슐린 이종이량체 분자의 제1 B29 또는 B28 Lys 및 제2 A-쇄 폴리펩티드 및 제2 B-쇄 폴리펩티드를 갖는 제2 인슐린 이종이량체의 제2 B29 또는 B28 Lys는 링커 1, 링커 2, 링커 3, 링커 10, 링커 11, 링커 12, 링커 13, 링커 14, 링커 15, 링커 16, 링커 17, 링커 18, 링커 19, 링커 20, 링커 21, 링커 22, 링커 23, 링커 24, 링커 25, 링커 26, 링커 27, 링커 28, 링커 29, 링커 30, 링커 31, 링커 32, 링커 33, 링커 34, 링커 35, 링커 36, 링커 37, 링커 38, 링커 39, 링커 40, 링커 41, 링커 42, 링커 43, 링커 44, 링커 45, 링커 46, 링커 47, 링커 48, 링커 49, 및 링커 50으로 이루어진 군으로부터 선택된 이관능성 링커에 의해 함께 접합되고, 단 이관능성 링커가 링커 10, 링커 11, 링커 12, 링커 13, 또는 링커 14인 경우, 제1 또는 제2 A-쇄 또는 B-쇄 폴리펩티드는 중 적어도 하나가 본원에 개시된 바와 같이 그의 N-말단 아미노산에서 치환기에 접합되거나 또는 제1 인슐린 이종이량체 분자의 적어도 N-말단 아미노산이 본원에 개시된 바와 같이 치환기에 접합되거나 또는 제1 인슐린 이종이량체 및 제2 인슐린 이종이량체 둘 다의 N-말단 아미노산이 치환기에 접합된다. 특정한 실시양태에서, 치환기는 화학식 RC(O)-를 갖는 기에 연결된 N-히드록시숙시미드 에스테르를 포함하고, 여기서 R은

R'CH<sub>2</sub>, R'NH, R'O일 수 있고, R'는 H, 선형 알킬 쇠, 아미노산, 펩티드, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 사카라이드 일 수 있고, 특정한 측면에서 RC(O)-는 아세틸, 페닐아세틸, 카르바모일, N-알킬 카르바모일, 또는 알콕시카르보닐일 수 있다. 특정한 측면에서, 치환기는 카르바모일 기, 아세틸 기, 글리신, 메틸 기, 메톡시 기, 디메틸 기, 이소부틸 기, PEG1 기, AEG 기, AEG-C6 알킬 기, 또는 PEG2 기이다.

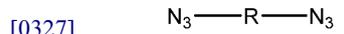
[0322] 특정한 실시양태에서, 본 발명은 인슐린 이량체를 제공하며, 여기서 제1 A-쇄 폴리펩티드 및 제1 B-쇄 폴리펩티드를 갖는 제1 인슐린 이종이량체 분자의 제1 B29 또는 B28 Lys는 링커 5 및 링커 7로 이루어진 군으로부터 선택된 제1 링커에 접합되고, 제2 A-쇄 폴리펩티드 및 제2 B-쇄 폴리펩티드를 갖는 제2 인슐린 이종이량체의 제2 B29 또는 B28 Lys는 링커 4, 링커 6, 링커 8, 및 링커 9로 이루어진 군으로부터 선택된 제2 링커에 접합되고, 이들은 제1 링커 및 제2 링커를 통해 함께 접합된다. 특정한 실시양태에서, 제1 또는 제2 A-쇄 또는 B-쇄 폴리펩티드 중 적어도 하나가 본원에 개시된 바와 같이 그의 N-말단 아미노산에서 치환기에 접합되거나 또는 제1 인슐린 이종이량체 분자의 적어도 N-말단 아미노산이 본원에 개시된 바와 같이 치환기에 접합되거나 또는 제1 인슐린 이종이량체 및 제2 인슐린 이종이량체 둘 다의 N-말단 아미노산이 치환기에 접합된다. 특정한 실시양태에서, 치환기는 화학식 RC(O)-를 갖는 기에 연결된 N-히드록시숙신이미드 에스테르를 포함하고, 여기서 R은 R'CH<sub>2</sub>, R'NH, R'O일 수 있고, R'는 H, 선형 알킬 쇠, 아미노산, 펩티드, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 사카라이드 일 수 있고, 특정한 측면에서 RC(O)-는 아세틸, 페닐아세틸, 카르바모일, N-알킬 카르바모일, 또는 알콕시카르보닐일 수 있다. 특정한 측면에서, 치환기는 카르바모일 기, 아세틸 기, 글리신, 메틸 기, 메톡시 기, 디메틸 기, 이소부틸 기, PEG1 기, AEG 기, AEG-C6 알킬 기, 또는 PEG2 기이다.

[0323] 특정한 실시양태에서, 본 발명은 인슐린 이량체를 제공하며, 여기서 제1 A-쇄 폴리펩티드 및 제1 B-쇄 폴리펩티드를 갖는 제1 인슐린 이종이량체 분자의 제1 B29 또는 B28 Lys는 링커 5 및 링커 7로 이루어진 군으로부터 선택된 제1 링커에 접합되고, 제2 A-쇄 폴리펩티드 및 제2 B-쇄 폴리펩티드를 갖는 제2 인슐린 이종이량체의 제2 B29 또는 B28 Lys는 링커 5 및 링커 7로 이루어진 군으로부터 선택된 제2 링커에 접합되고, 여기서 제1 및 제2 링커는 하기 구조를 갖는 가교 링커를 통해 함께 접합된다:



[0325] 여기서 R은 공유 결합, 탄소 원자, 페닐, 헤테로원자, 또는 아실, 지방족, 헤테로지방족, 아릴, 헤테로아릴, 및 헤테로시클릭으로 이루어진 군으로부터 선택된 임의로 치환된 기이다. 특정한 측면에서 R은 C2, C3, C4, C6, C7, C8, C9 또는 C10 아실 기 또는 PEG2, PEG3, PEG4, PEG5, PEG6, PEG7, PEG8, PEG9, PEG10, PEG11, PEG12, PEG13, 또는 PEG25이다. 특정한 실시양태에서, 제1 또는 제2 A-쇄 또는 B-쇄 폴리펩티드 중 적어도 하나가 본원에 개시된 바와 같이 그의 N-말단 아미노산에서 치환기에 접합되거나 또는 제1 인슐린 이종이량체 분자의 적어도 N-말단 아미노산이 본원에 개시된 바와 같이 치환기에 접합되거나 또는 제1 인슐린 이종이량체 및 제2 인슐린 이종이량체 둘 다의 N-말단 아미노산이 치환기에 접합된다. 특정한 실시양태에서, 치환기는 화학식 RC(O)-를 갖는 기에 연결된 N-히드록시숙신이미드 에스테르를 포함하고, 여기서 R은 R'CH<sub>2</sub>, R'NH, R'O일 수 있고, R'는 H, 선형 알킬 쇠, 아미노산, 펩티드, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 사카라이드일 수 있고, 특정한 측면에서 RC(O)-는 아세틸, 페닐아세틸, 카르바모일, N-알킬 카르바모일, 또는 알콕시카르보닐일 수 있다. 특정한 측면에서, 치환기는 카르바모일 기, 아세틸 기, 글리신, 메틸 기, 메톡시 기, 디메틸 기, 이소부틸 기, PEG1 기, AEG 기, AEG-C6 알킬 기, 또는 PEG2 기이다.

[0326] 특정한 실시양태에서, 본 발명은 인슐린 이량체를 제공하며, 여기서 제1 A-쇄 폴리펩티드 및 제1 B-쇄 폴리펩티드를 갖는 제1 인슐린 이종이량체 분자의 제1 B29 또는 B28 Lys는 링커 4, 링커 6, 링커 8, 및 링커 9로 이루어진 군으로부터 선택된 제1 링커에 접합되고, 제2 A-쇄 폴리펩티드 및 제2 B-쇄 폴리펩티드를 갖는 제2 인슐린 이종이량체의 제2 B29 또는 B28 Lys는 링커 4, 링커 6, 링커 8, 및 링커 9로 이루어진 군으로부터 선택된 제2 링커에 접합되고, 여기서 제1 및 제2 링커는 하기 구조를 갖는 가교 링커를 통해 함께 접합된다:

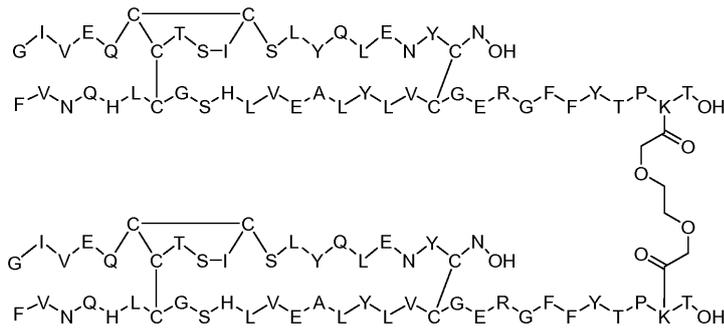


[0328] 여기서 R은 공유 결합, 탄소 원자, 페닐, 헤테로원자, 또는 아실, 지방족, 헤테로지방족, 아릴, 헤테로아릴, 및 헤테로시클릭으로 이루어진 군으로부터 선택된 임의로 치환된 기이다. 특정한 측면에서 R은 C2, C3, C4, C6, C7, C8, C9 또는 C10 아실 기 또는 PEG2, PEG3, PEG4, PEG5, PEG6, PEG7, PEG8, PEG9, PEG10, PEG11, PEG12, PEG13, 또는 PEG25이다. 특정한 실시양태에서, 제1 또는 제2 A-쇄 또는 B-쇄 폴리펩티드 중 적어도 하나가 본원에 개시된 바와 같이 그의 N-말단 아미노산에서 치환기에 접합되거나 또는 제1 인슐린 이종이량체 분자의 적

어도 N-말단 아미노산이 본원에 개시된 바와 같은 치환기에 접합되거나 또는 제1 인슐린 이중이량체 및 제2 인슐린 이중이량체 둘 다의 N-말단 아미노산이 치환기에 접합된다. 특정한 실시양태에서, 치환기는 화학식 RC(O)-를 갖는 기에 연결된 N-히드록시숙신이미드 에스테르를 포함하고, 여기서 R은 R'CH<sub>2</sub>, R'NH, R'O일 수 있고, R'는 H, 선형 알킬 쇠, 아미노산, 펩티드, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 사카라이드일 수 있고, 특정한 측면에서 RC(O)-는 아세틸, 페닐아세틸, 카르바모일, N-알킬 카르바모일, 또는 알콕시카르보닐일 수 있다. 특정한 측면에서, 치환기는 카르바모일 기, 아세틸 기, 글리신, 메틸 기, 메톡시 기, 디메틸 기, 이소부틸 기, PEG1 기, AEG 기, AEG-C6 알킬 기, 또는 PEG2 기이다.

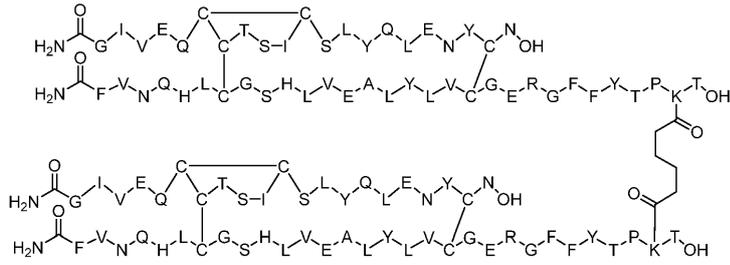
[0329] 추가 실시양태에서 제1 및 제2 인슐린 이중이량체는 본원에 개시된 임의의 인슐린 또는 인슐린 유사체 분자를 포함할 수 있다.

[0330] 본 발명은 또한 하기로부터 선택된 인슐린 이량체를 제공한다:

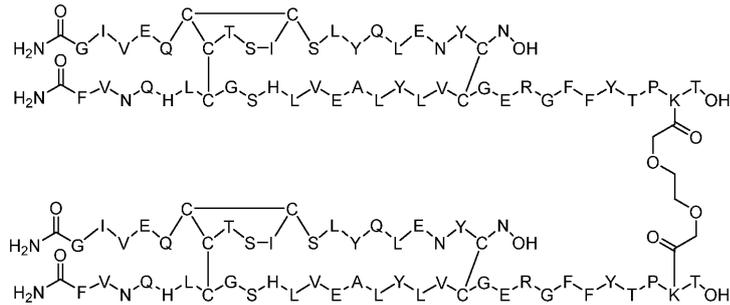


이량체 1;

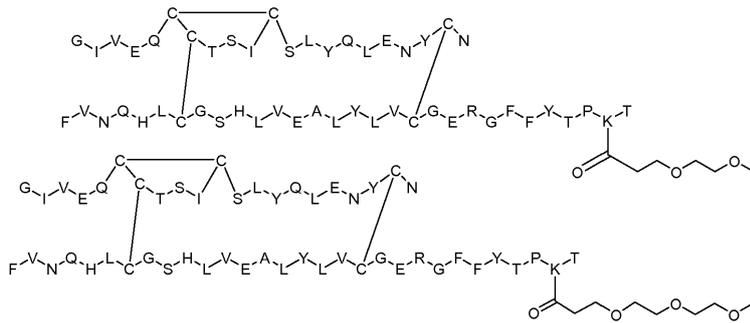
[0331]



이량체 2;

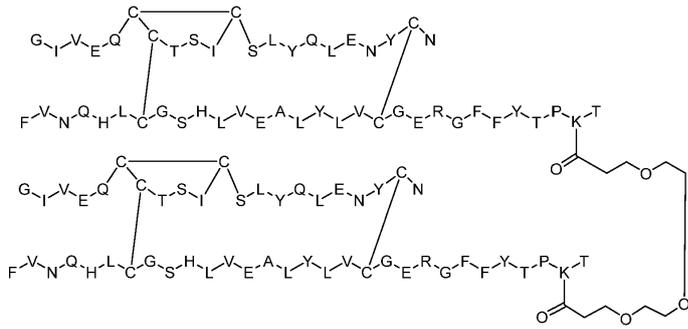


이량체 3;

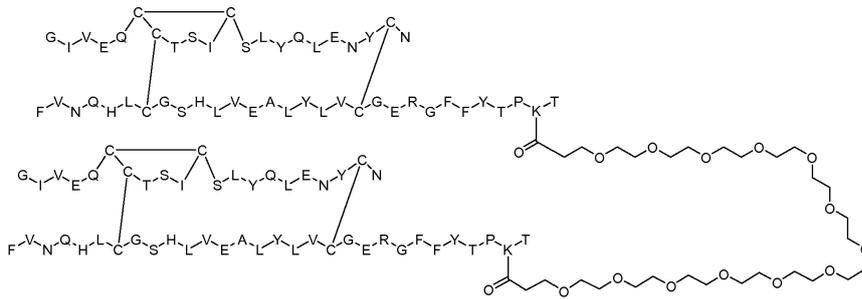


이량체 4;

[0332]

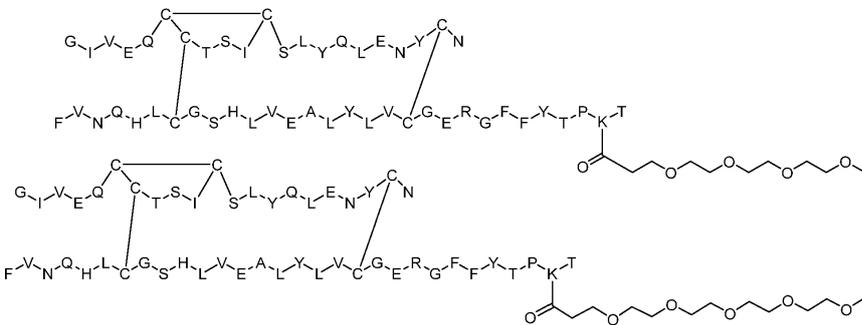


이량체 5;

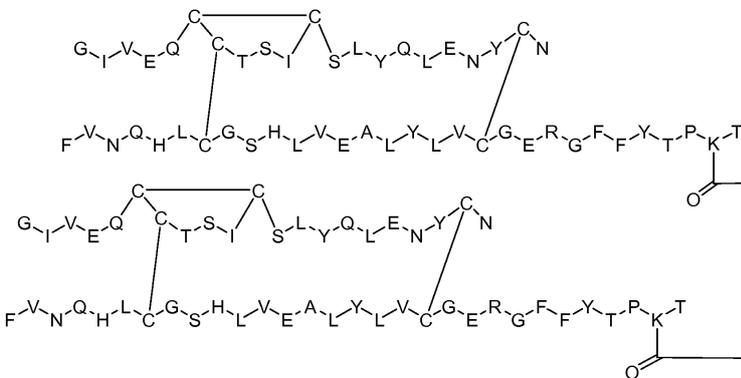


이량체 6;

[0333]

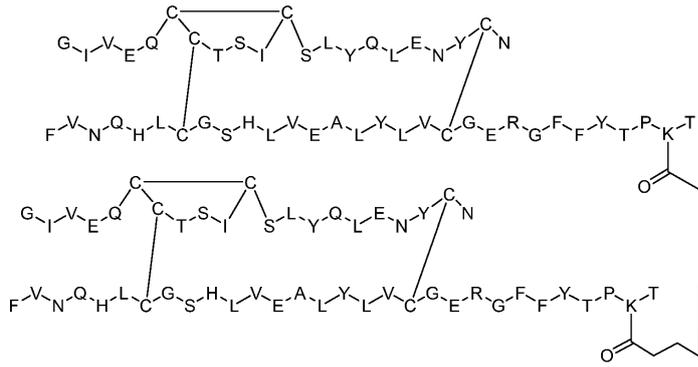


이량체 7;

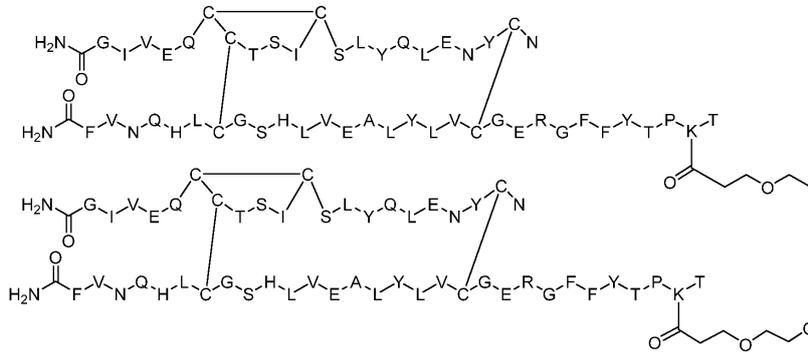


이량체 8;

[0334]

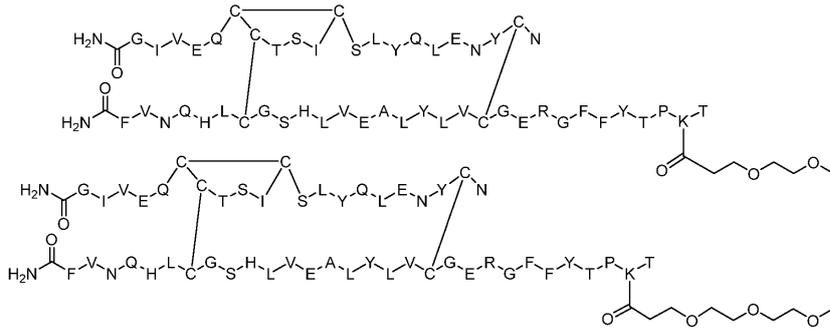


이량체 9;

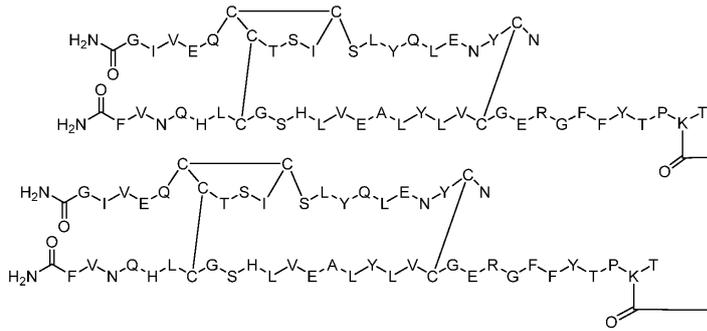


이량체 10;

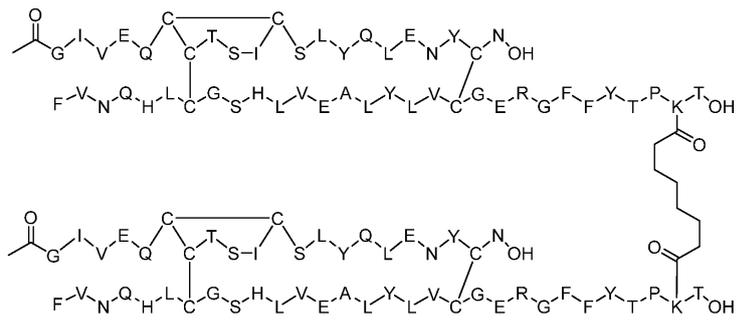
[0335]



이량체 11;

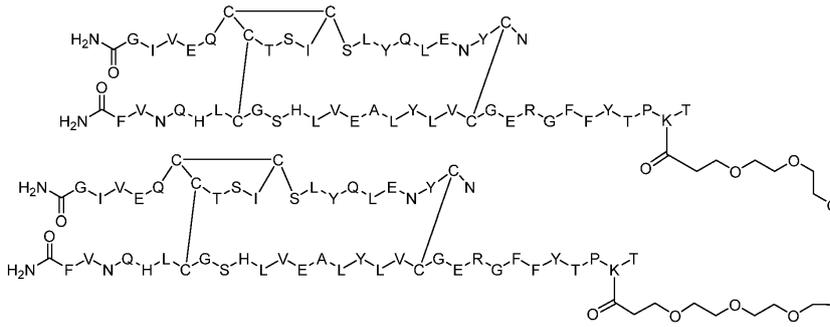


이량체 12;

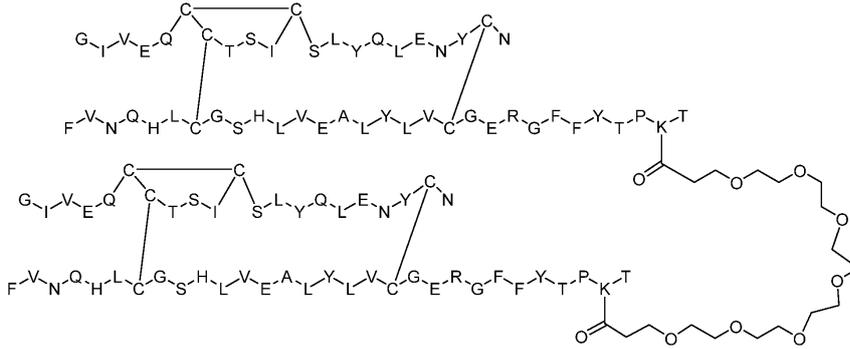


이량체 13;

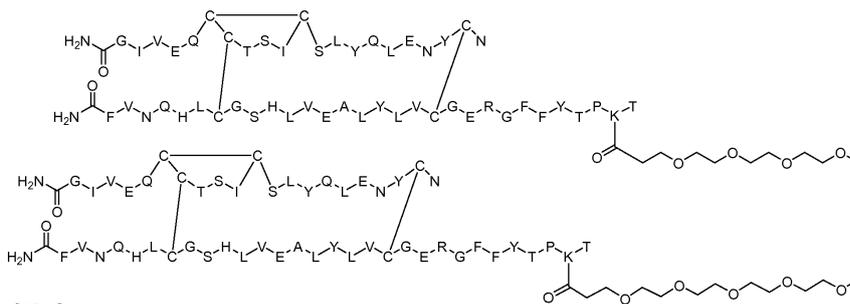
[0336]



이량체 14;

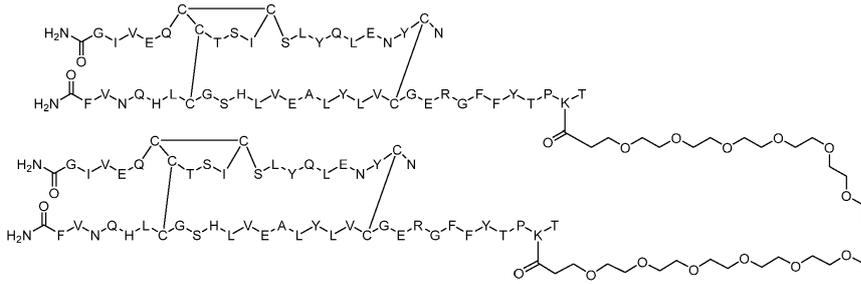


이량체 15;

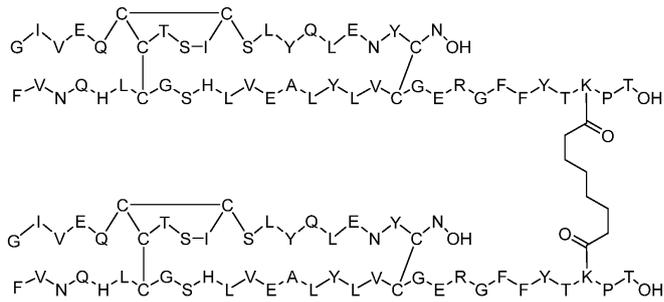


이량체 16;

[0337]

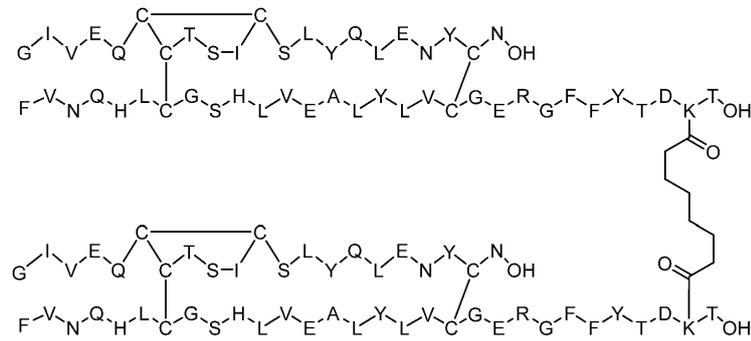


이량체 17;

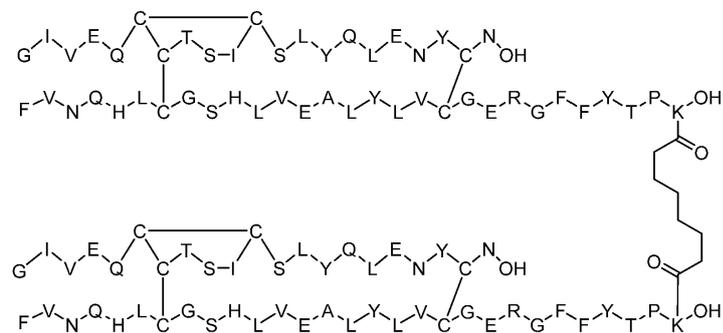


이량체 18;

[0338]



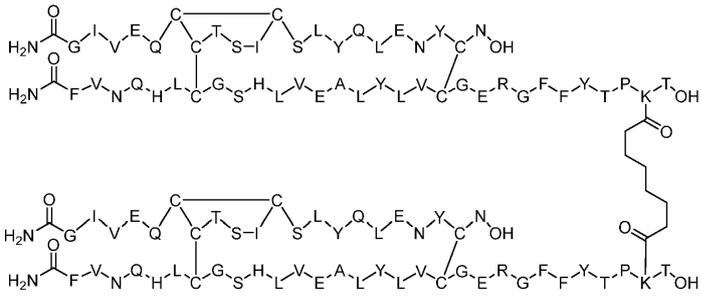
이량체 19;



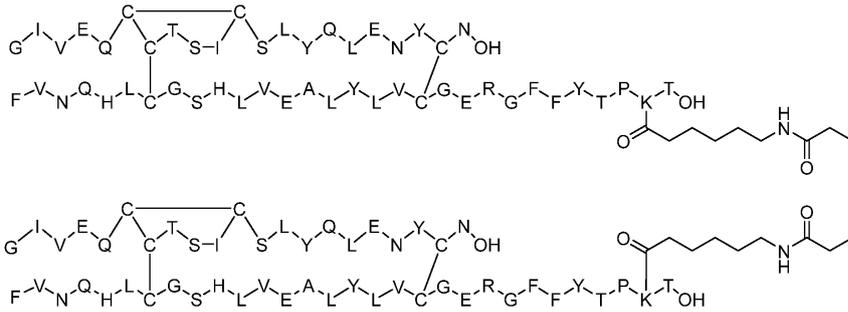
이량체 20;

[0339]

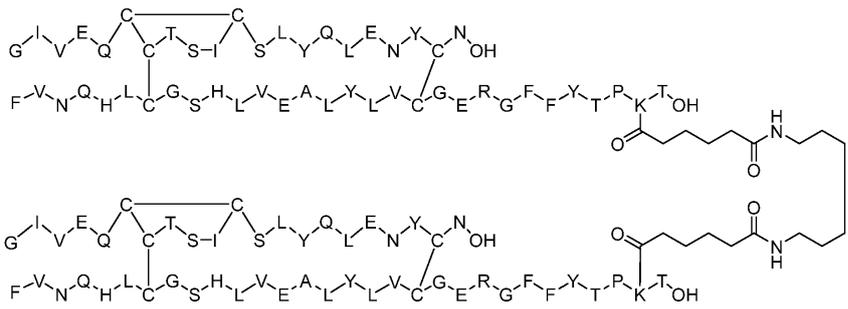




이량체 24;

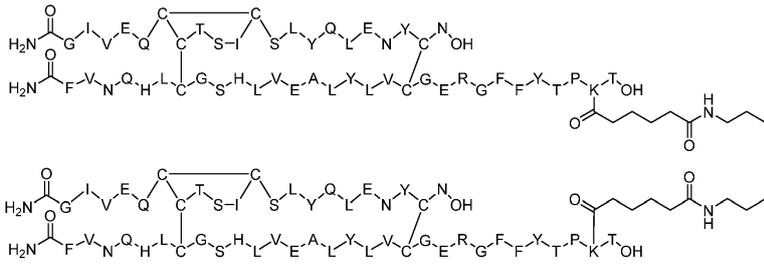


이량체 25;

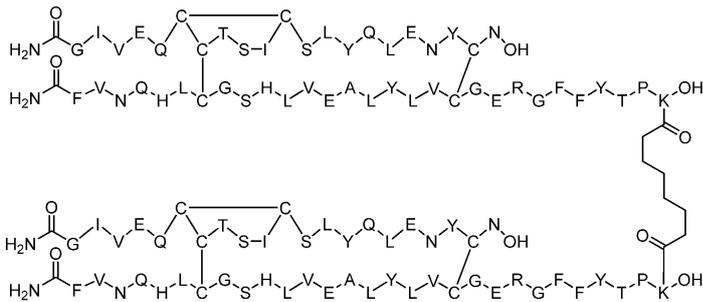


이량체 26;

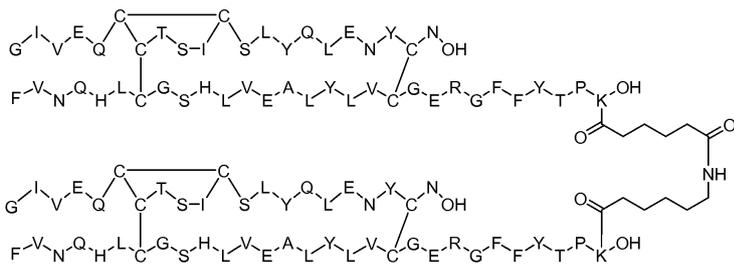
[0341]



이량체 27;

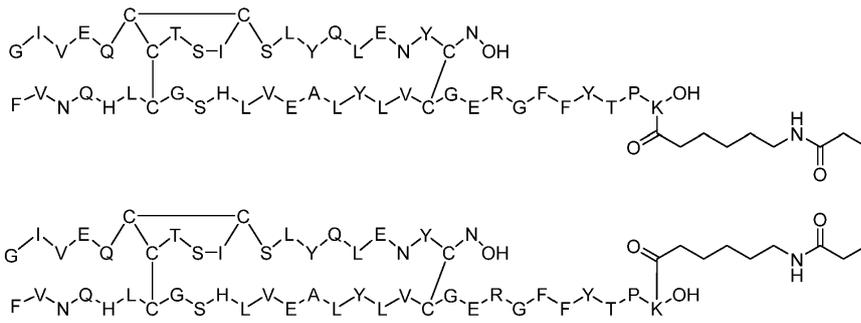


이량체 28;

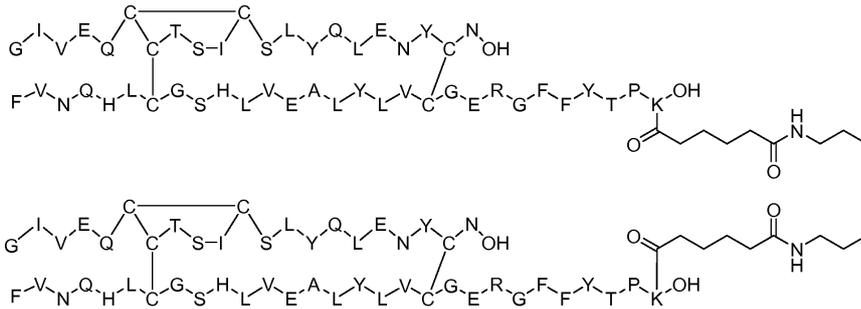


이량체 29;

[0342]

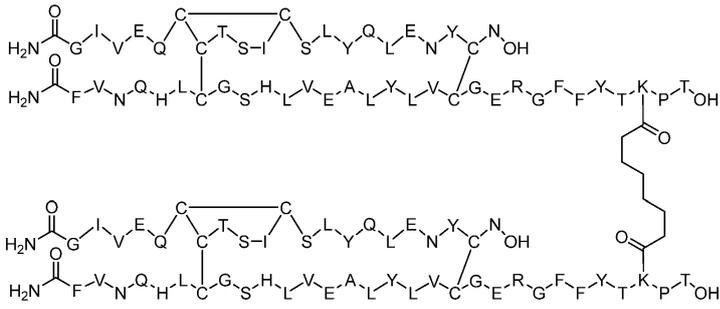


이량체 30;

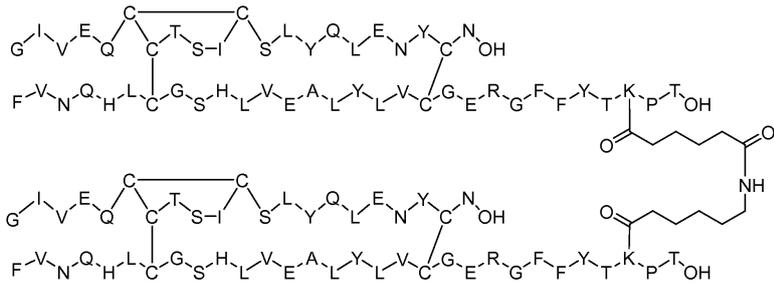


이량체 31;

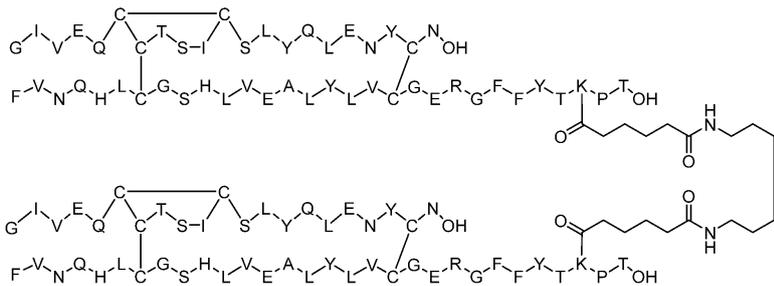
[0343]



이량체 32;

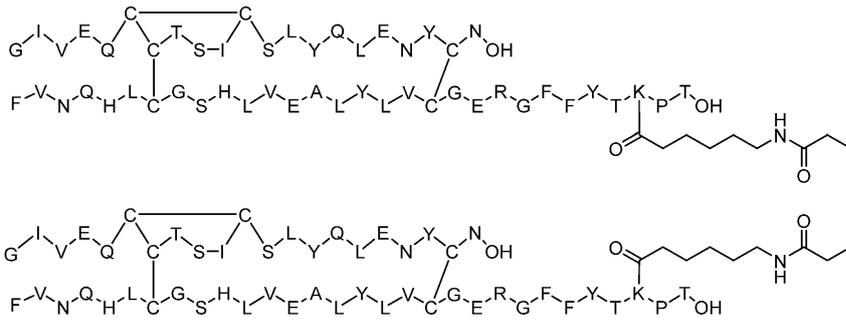


이량체 33;

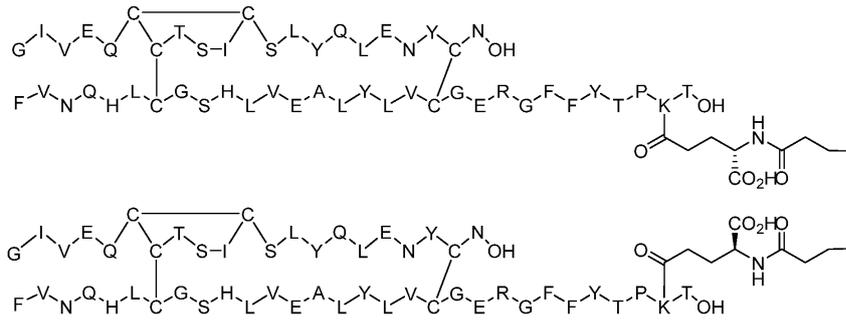


이량체 34;

[0344]

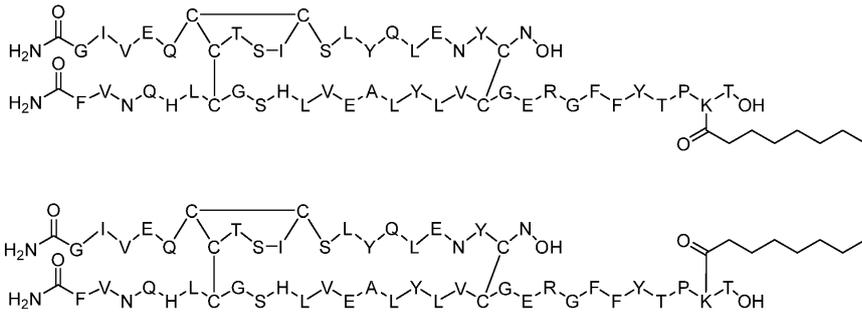


이량체 35;

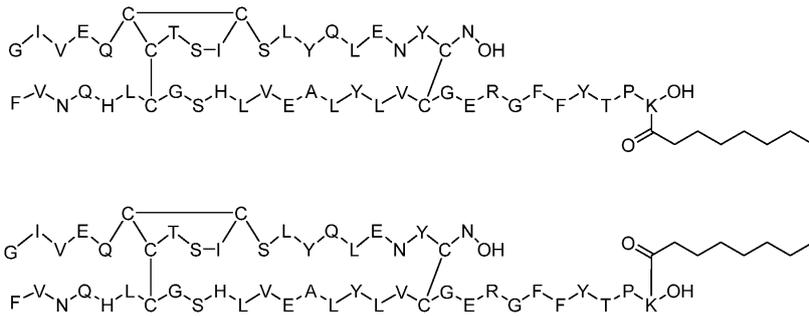


이량체 36;

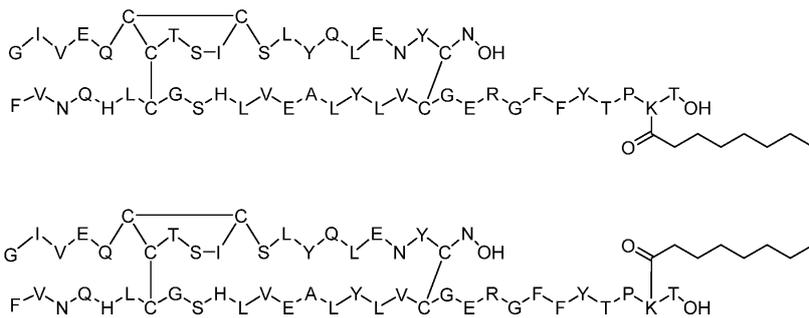
[0345]



이량체 37;

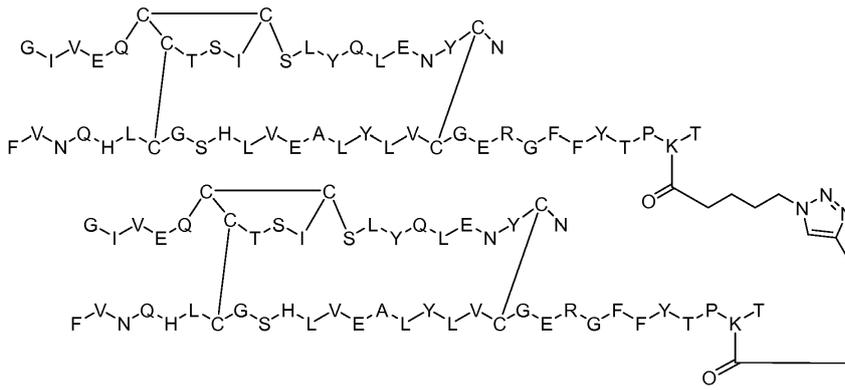


이량체 38;

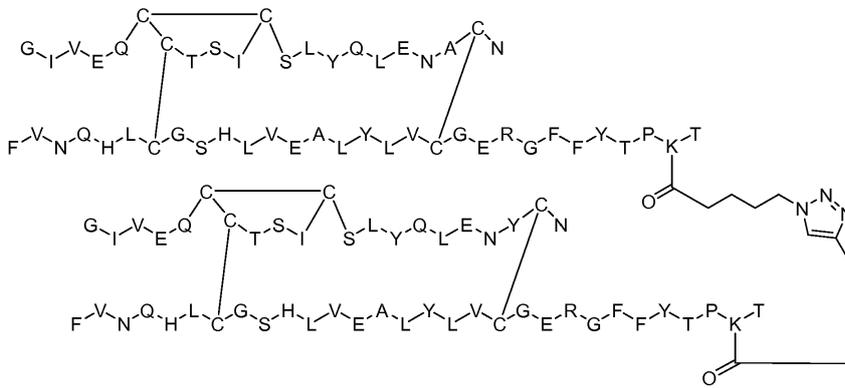


이량체 39;

[0346]

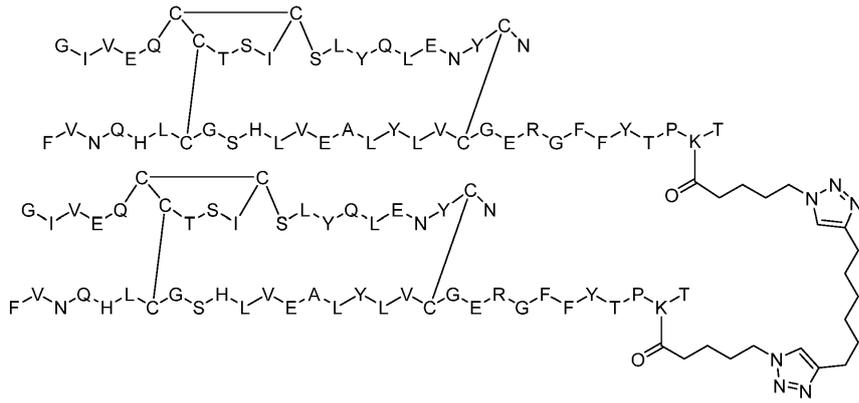


이량체 40;

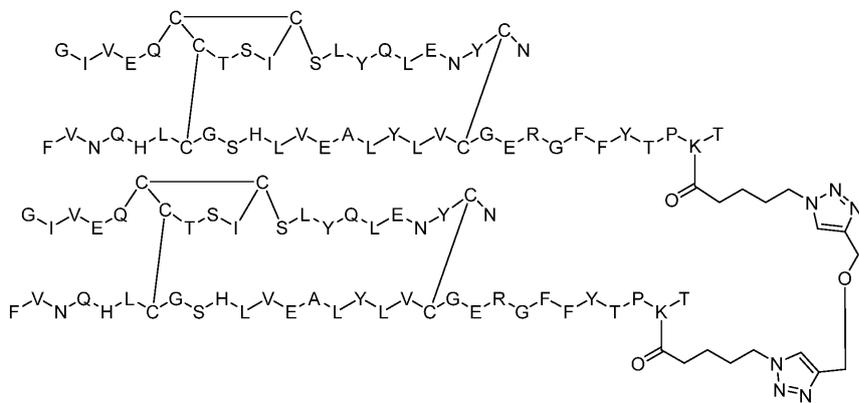


이량체 41;

[0347]

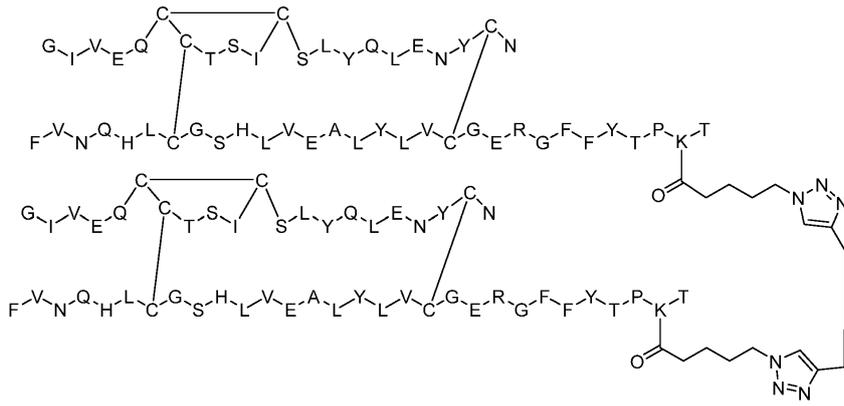


이량체 42;

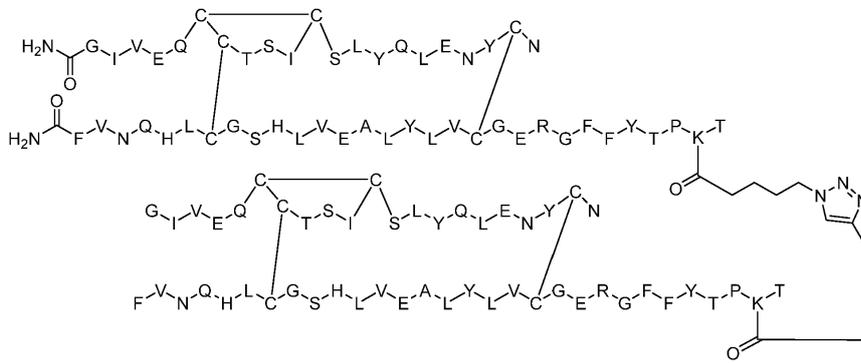


이량체 43;

[0348]

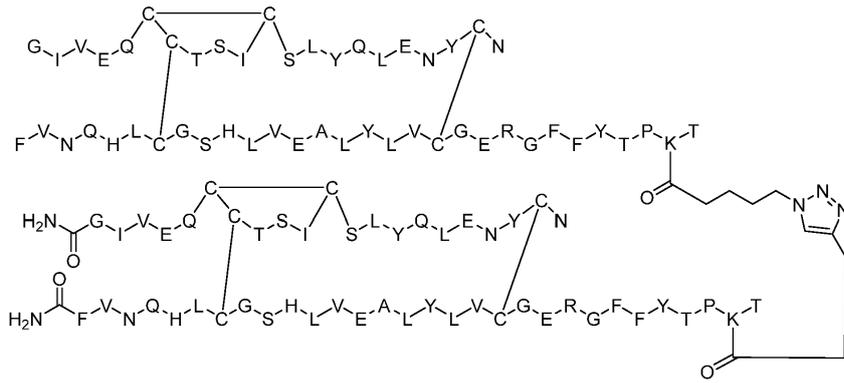


이량체 44;

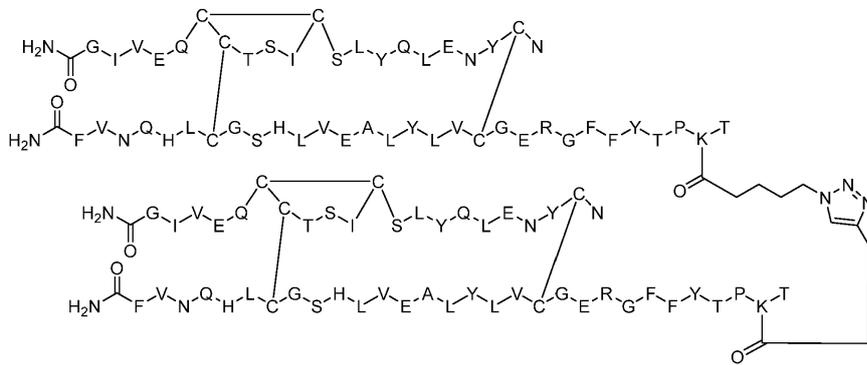


이량체 45;

[0349]

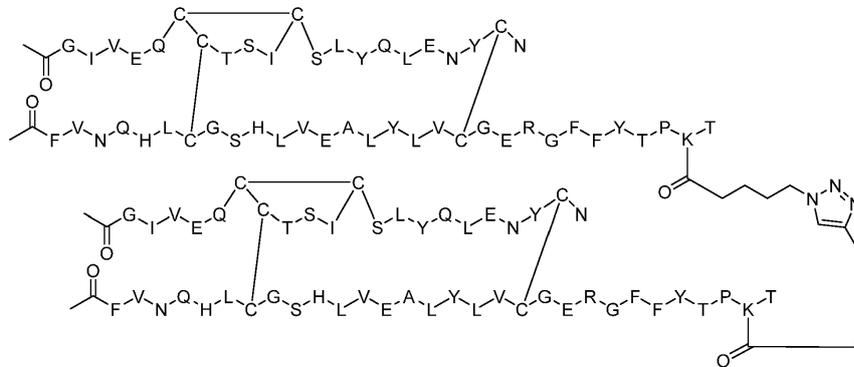


이량체 46;

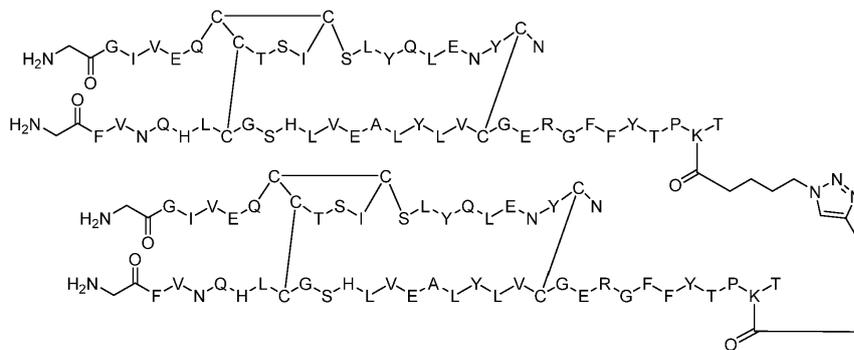


이량체 47;

[0350]

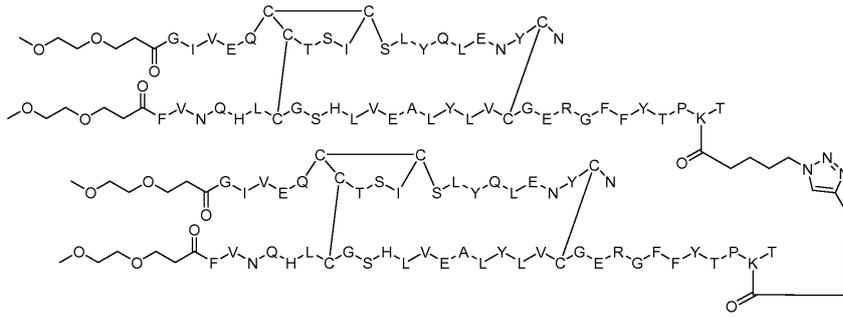


이량체 48;

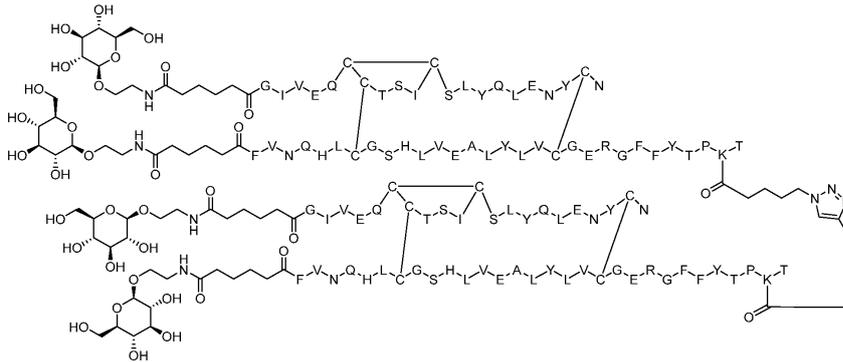


이량체 49;

[0351]

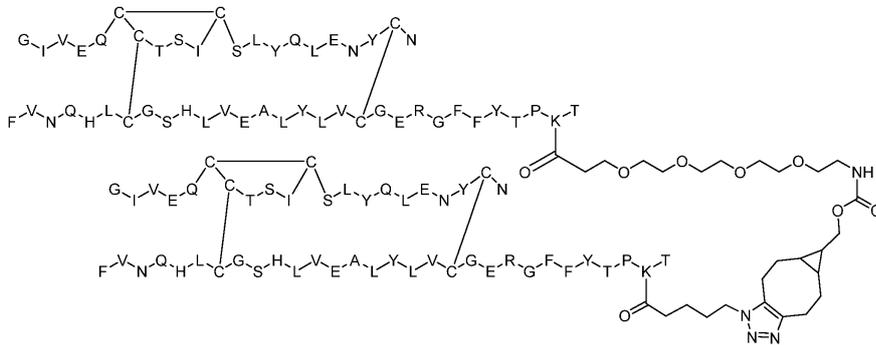


이량체 50;

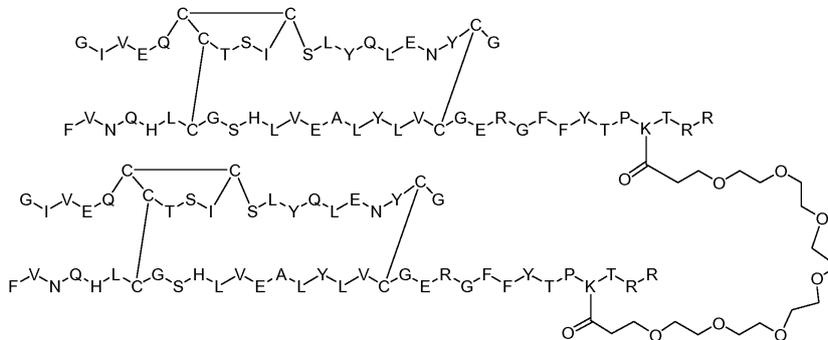


이량체 51;

[0352]

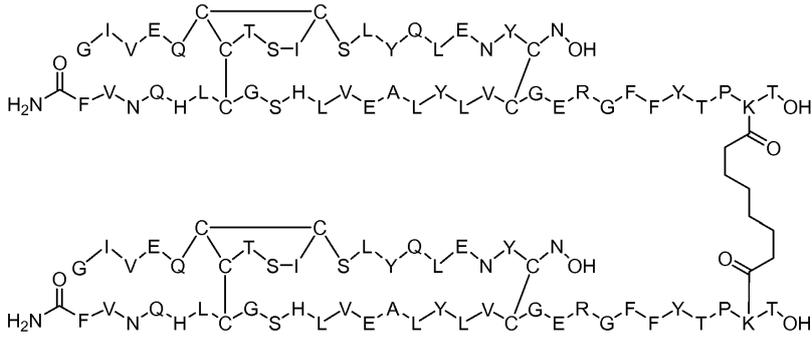


이량체 52;

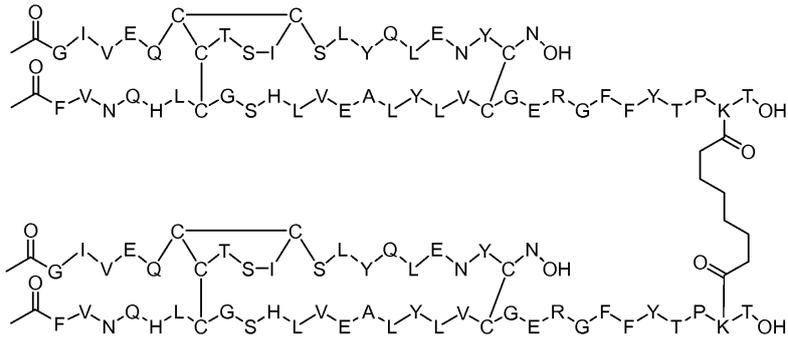


이량체 53;

[0353]

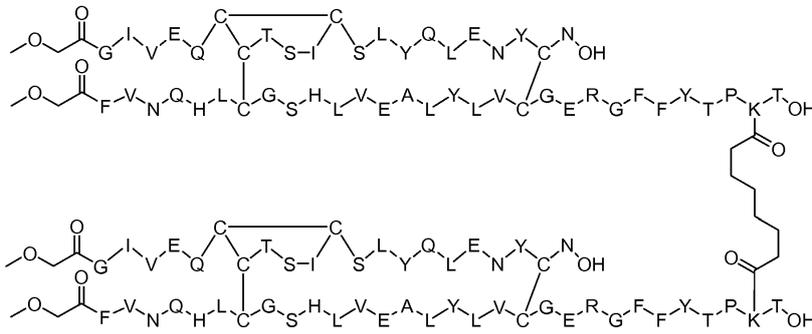


이량체 54;

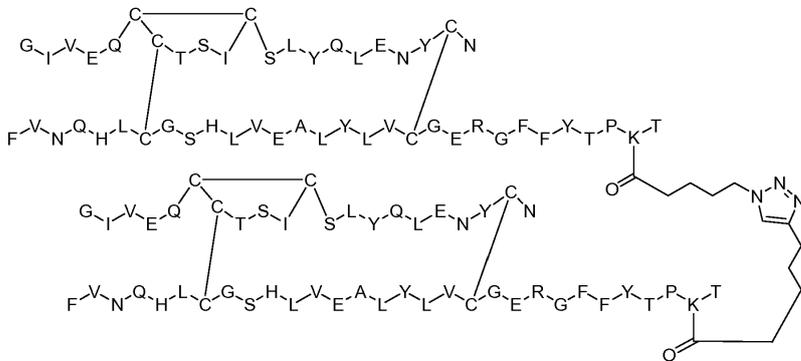


이량체 55;

[0354]

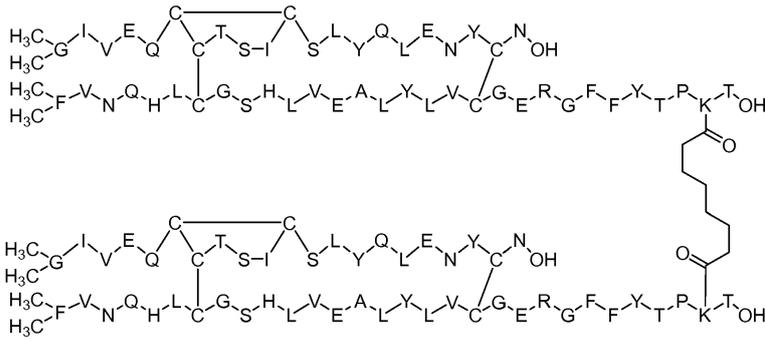


이량체 56;

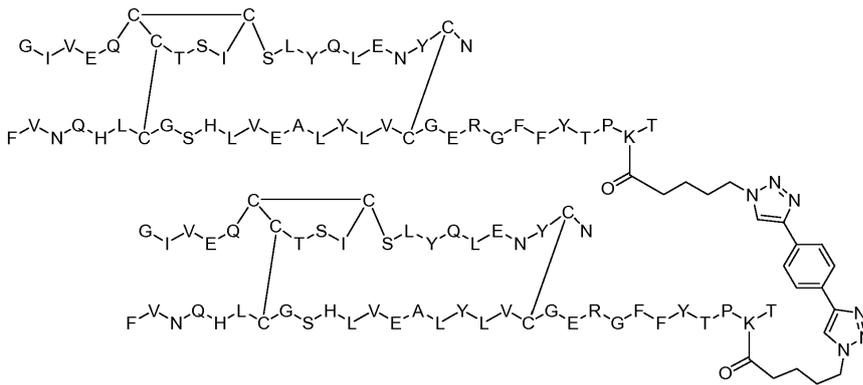


이량체 57;

[0355]

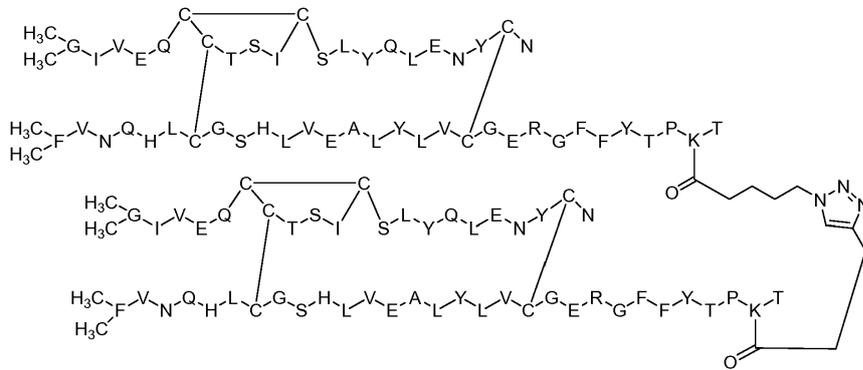


이량체 58;

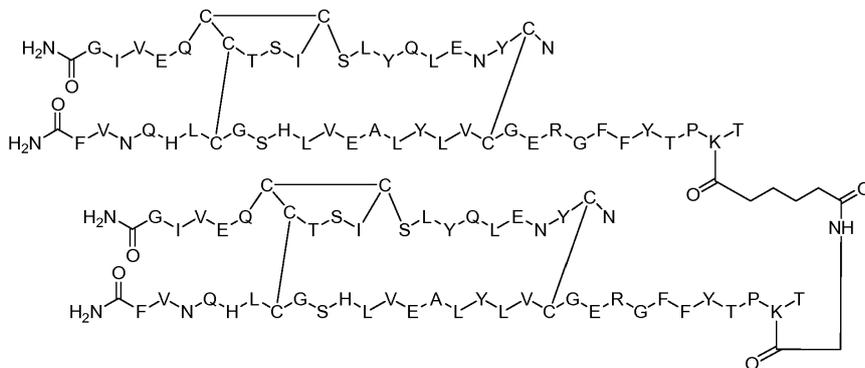


이량체 59;

[0356]

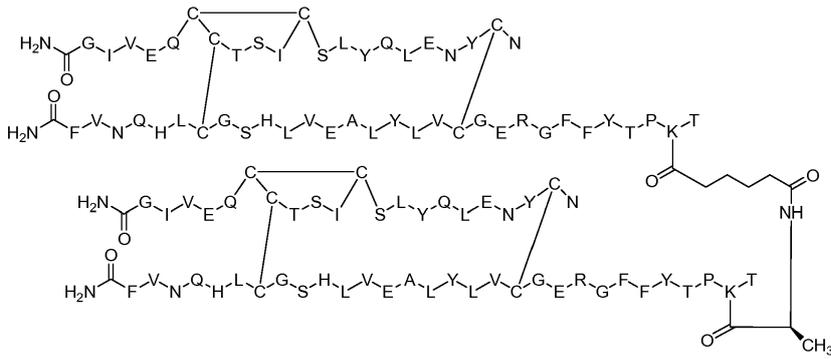


이량체 60;

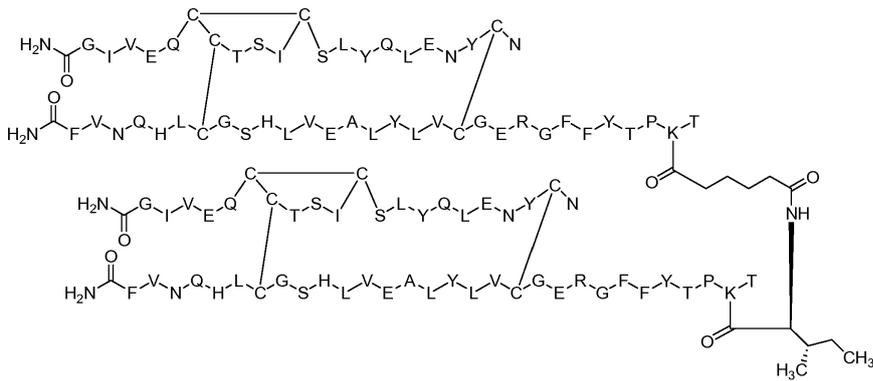


이량체 61;

[0357]

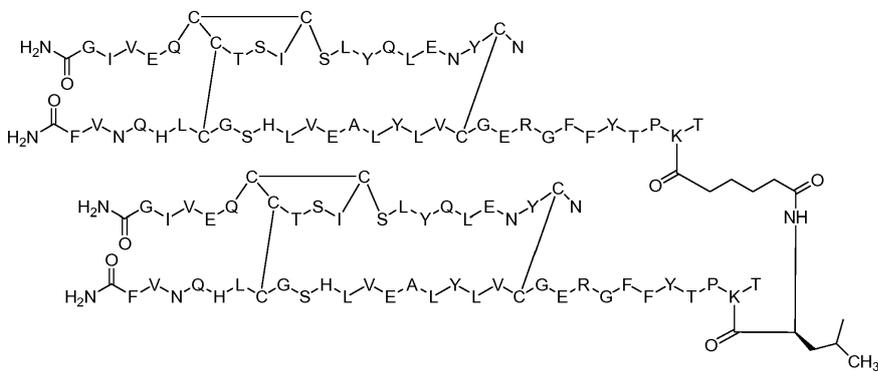


이량체 62;

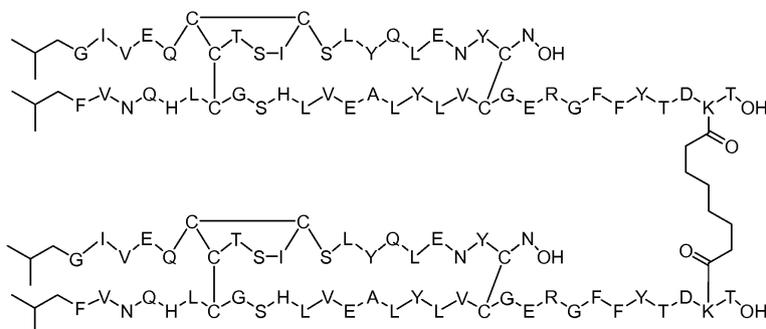


이량체 63;

[0358]

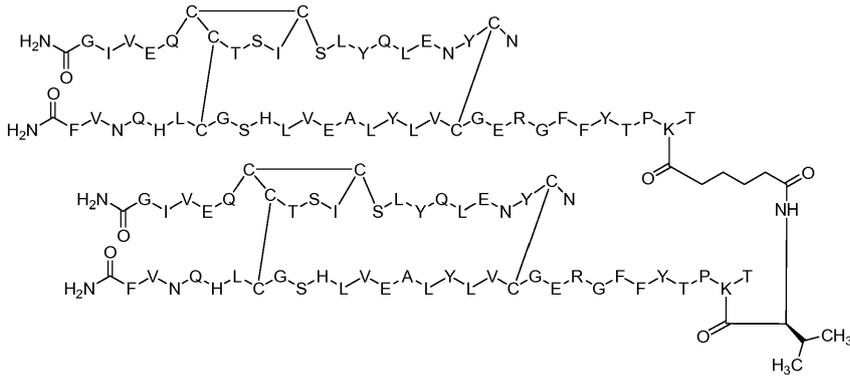


이량체 64;

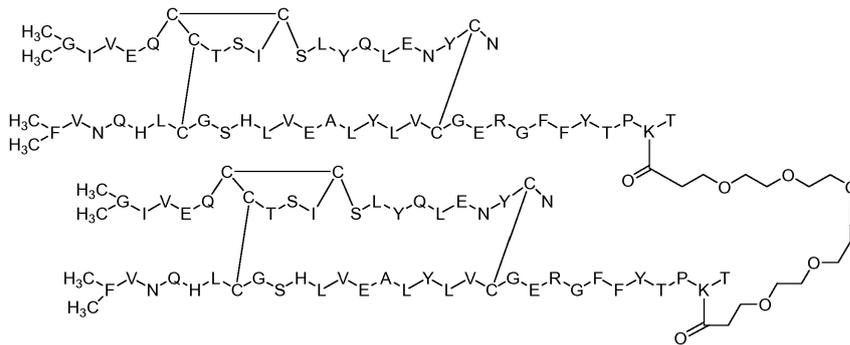


이량체 65;

[0359]

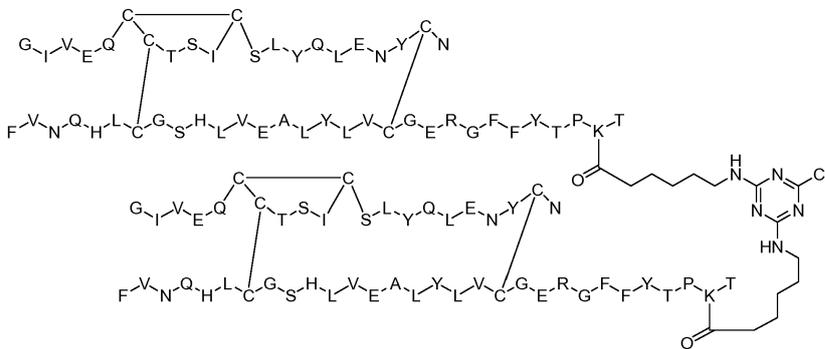


이량체 66;

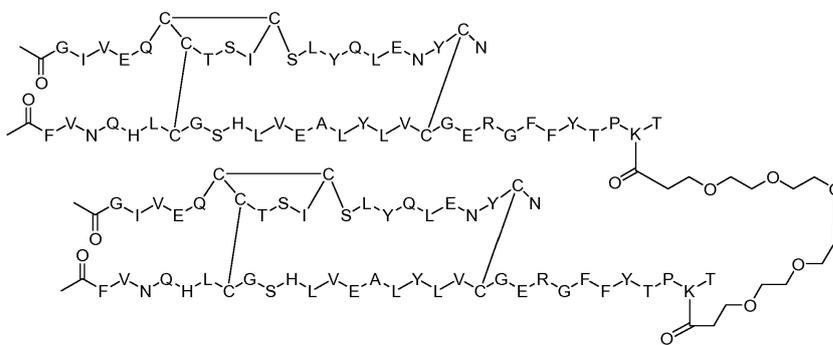


이량체 67;

[0360]

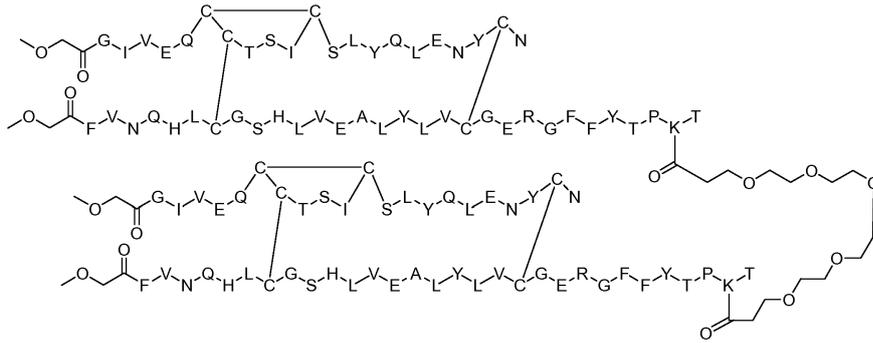


이량체 68;

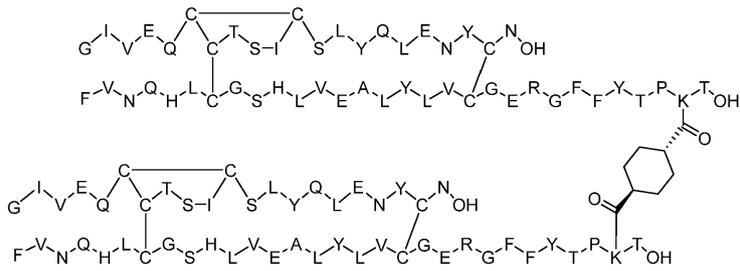


이량체 69;

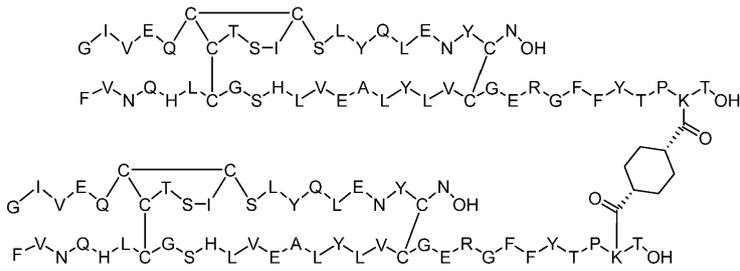
[0361]



이량체 70;

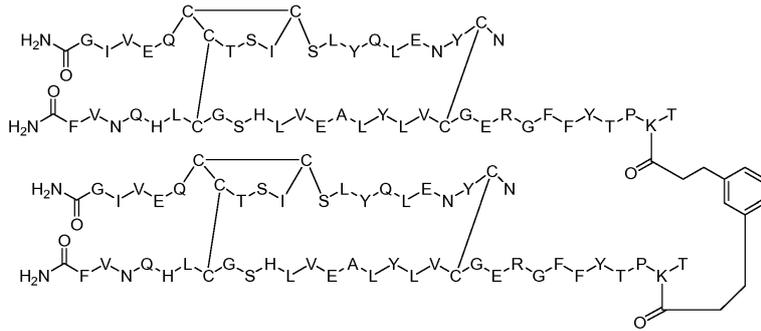


이량체 71;

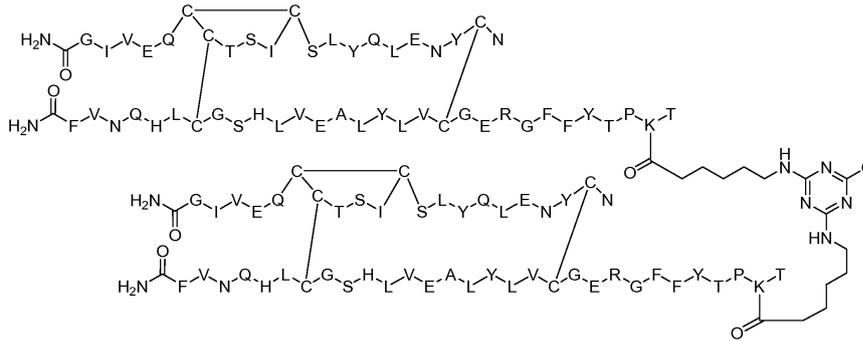


이량체 72;

[0362]

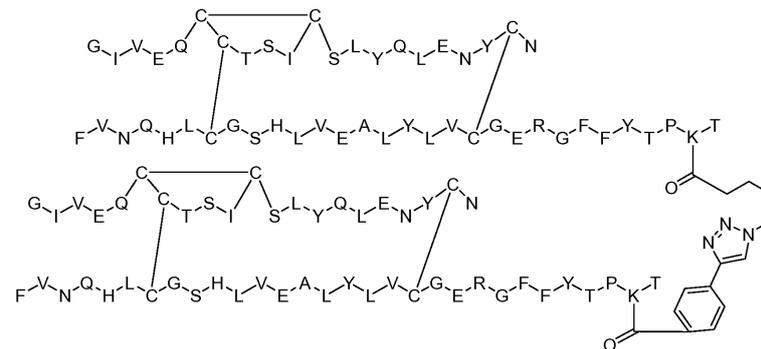


이량체 73;

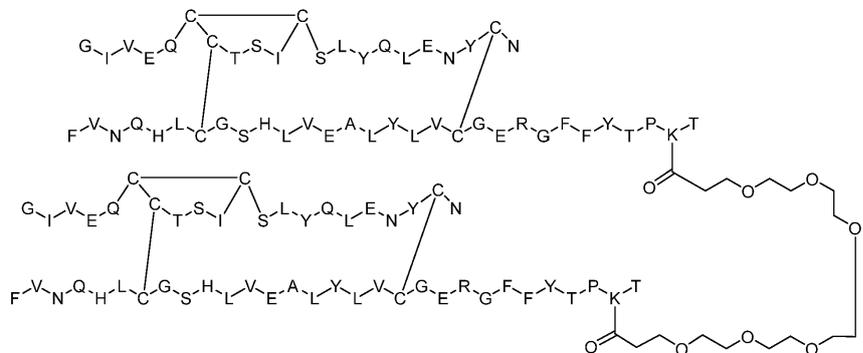


이량체 74;

[0363]

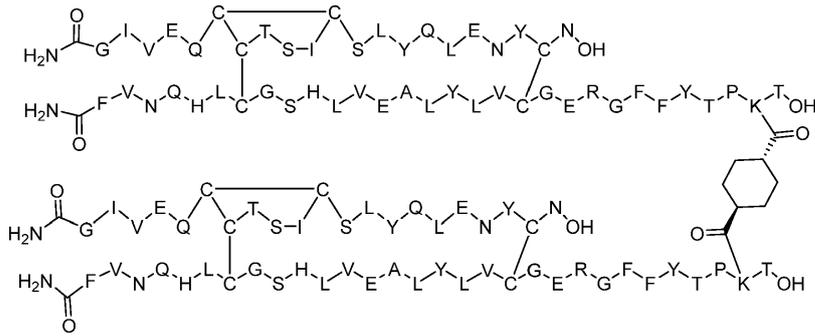


이량체 75;

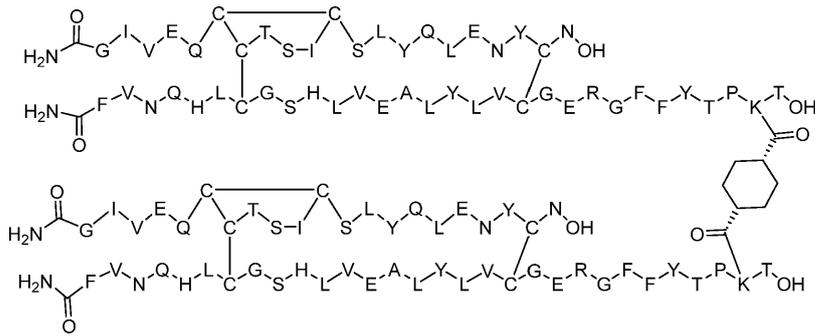


이량체 76;

[0364]

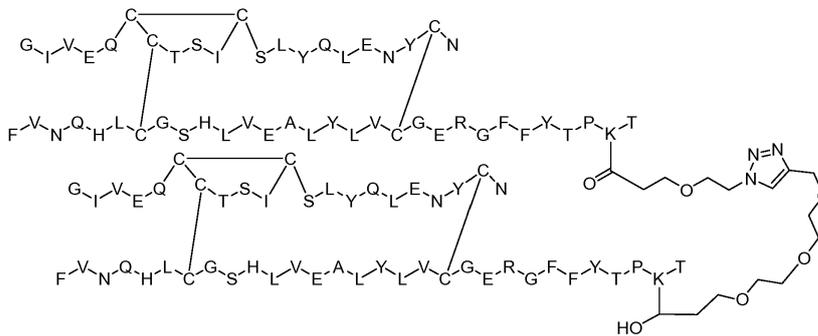


이량체 77;

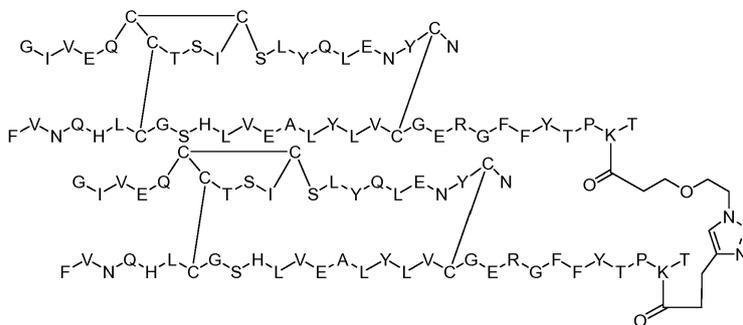


이량체 78;

[0365]

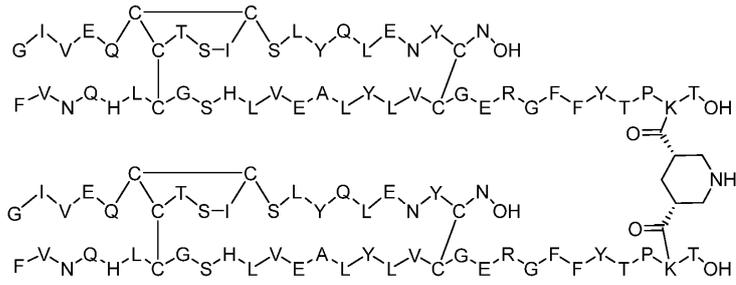


이량체 79;

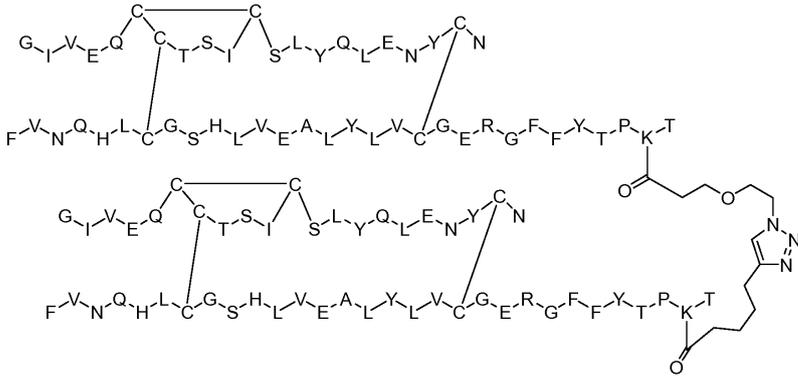


이량체 80;

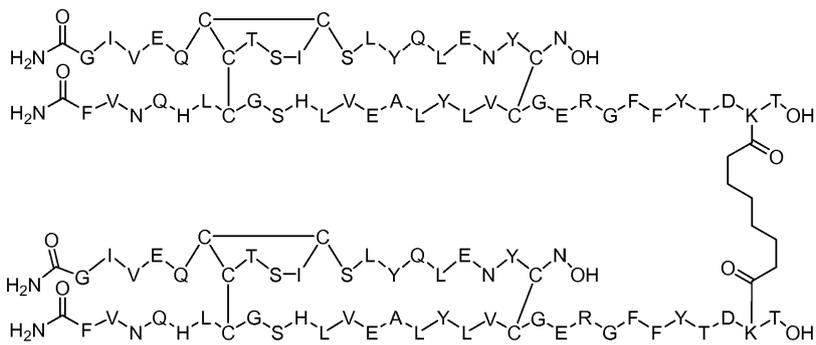
[0366]



이량체 81;

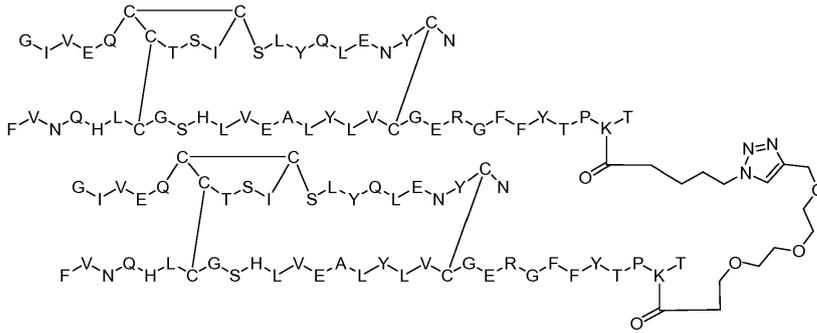


이량체 82;

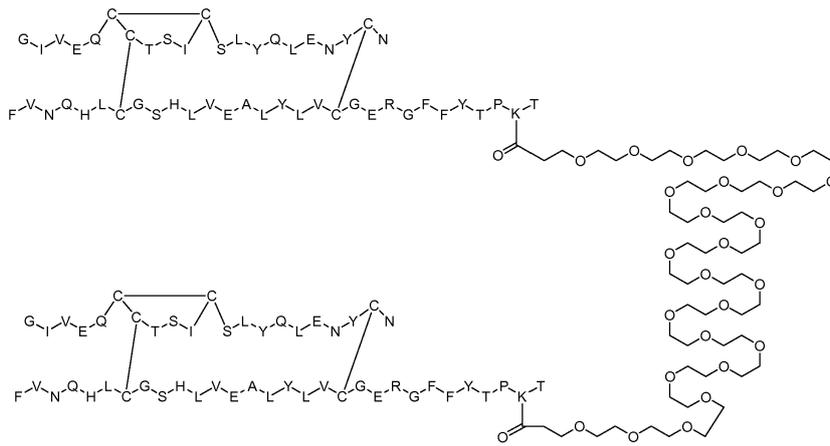


이량체 83;

[0367]

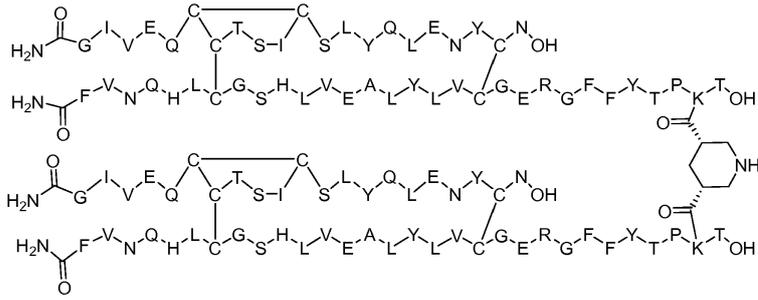


이량체 84;

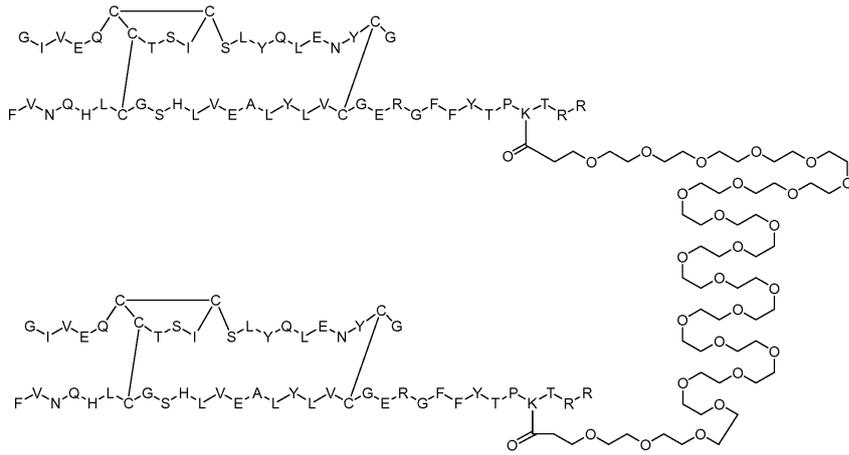


이량체 85;

[0368]

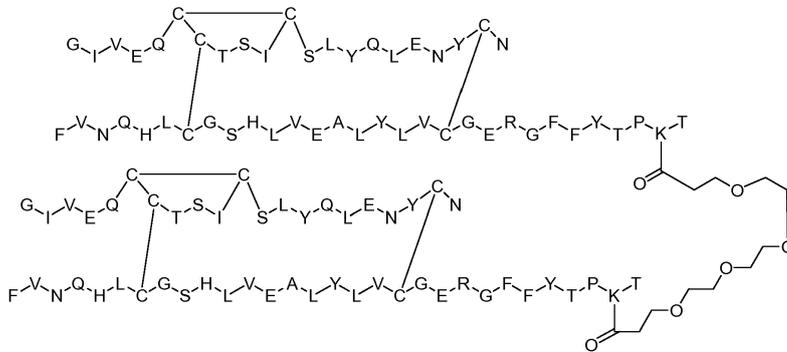


이량체 86;

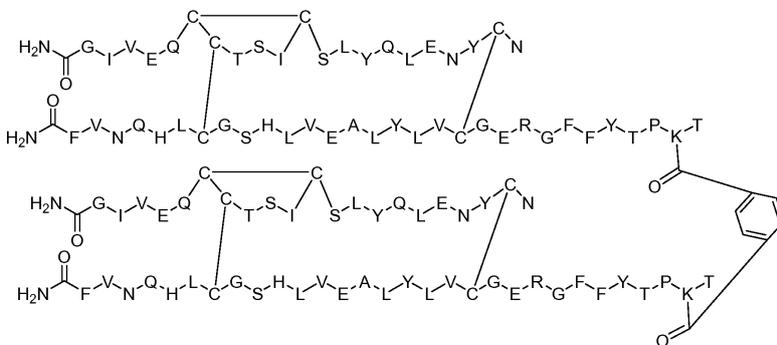


이량체 87;

[0369]

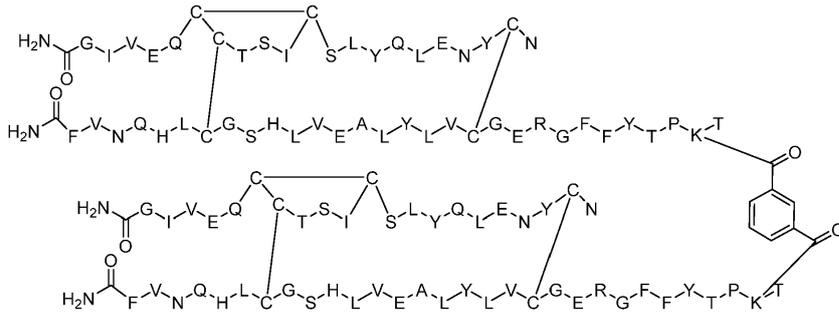


이량체 88;

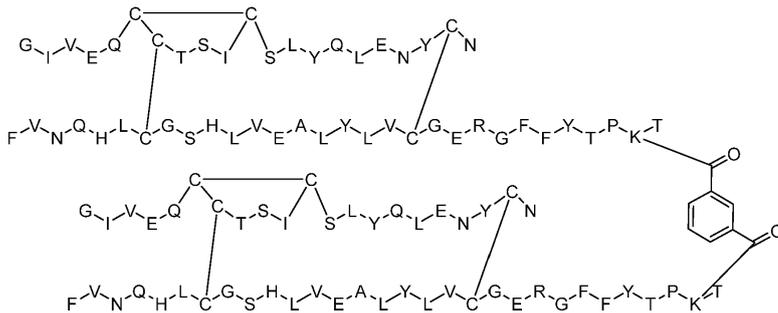


이량체 89;

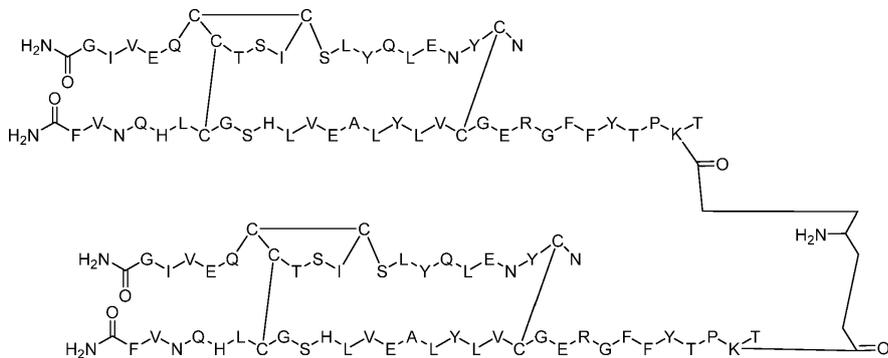
[0370]



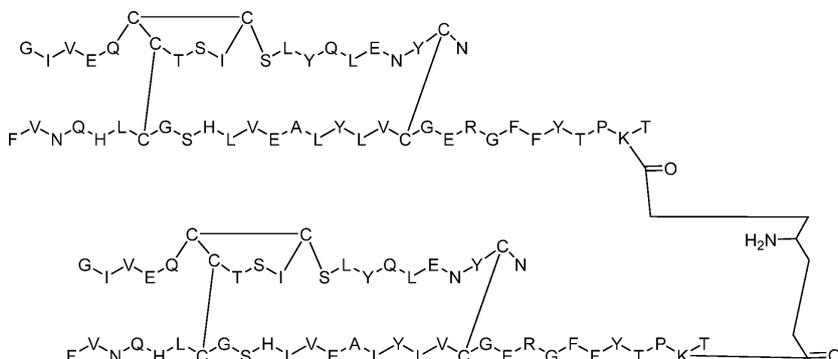
이량체 90;



이량체 91;



이량체 93; 및



이량체 94

여기서 B-쇄 폴리펩티드의 Cys<sub>7</sub> 및 Cys<sub>19</sub>에 대한 A-쇄 폴리펩티드의 Cys<sub>6</sub> 및 Cys<sub>11</sub> 잔기 사이의 디설피드 연결 및 A-쇄의 Cys<sub>7</sub> 및 Cys<sub>20</sub> 사이의 디설피드 연결은 각각 그 사이의 실선에 의해 나타내어지고; 여기서 연결 모이어티는 제시된 리신 잔기의 엡실론 아미노산에 공유 연결되고, 여기서 이량체 1-40, 42-52, 54-86, 및 88-94에 대한 A-쇄 폴리펩티드는 서열식별번호: 1에 제시된 아미노산 서열을 갖고; 이량체 56에 대한 A-쇄 폴리펩티드는 서열

식별번호: 11에 제시된 아미노산 서열을 갖고; 이량체 1-17, 21-27, 36, 37, 39-40, 및 42-52, 54-82, 84-86, 및 88-94에 대한 B-쇄 폴리펩티드는 서열식별번호: 2에 제시된 아미노산 서열을 갖고; 이량체 18 및 32-35에 대한 B-쇄 폴리펩티드는 서열식별번호: 6에 제시된 아미노산 서열을 갖고; 이량체 19 및 83에 대한 B-쇄 폴리펩티드는 서열식별번호: 9에 제시된 아미노산 서열을 갖고; 이량체 20, 28-31, 및 38에 대한 B-쇄 폴리펩티드는 서열식별번호: 10에 제시된 아미노산 서열을 갖고; 이량체 53 및 87에 대한 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드는 각각 서열식별번호: 7 및 서열식별번호: 8이다.

[0374] 제약 조성물

[0375] 한 실시양태에 따르면 본원에 개시된 임의의 신규 인슐린 이량체, 바람직하게는 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 순도 수준에서의 상기 인슐린 이량체, 및 제약상 허용되는 희석제, 담체 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물이 제공된다. 이러한 조성물은 본원에 개시된 바와 같은 인슐린 이량체를 적어도 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 11 mg/ml, 12 mg/ml, 13 mg/ml, 14 mg/ml, 15 mg/ml, 16 mg/ml, 17 mg/ml, 18 mg/ml, 19 mg/ml, 20 mg/ml, 21 mg/ml, 22 mg/ml, 23 mg/ml, 24 mg/ml, 25 mg/ml 또는 그 초과 농도로 함유할 수 있다. 한 실시양태에서 제약 조성물은 멸균되고 임의로는 다양한 패키징 용기 내에 함유되어 저장되는 수용액을 포함한다. 다른 실시양태에서 제약 조성물은 동결건조 분말을 포함한다. 제약 조성물은 추가로 조성물을 환자에게 투여하기 위한 일회용 장치를 포함한 키트의 부분으로서 패키징될 수 있다. 용기 또는 키트는 주위 실온에서 또는 냉각된 온도에서 저장을 위해 라벨링될 수 있다.

[0376] 개시된 인슐린 이량체는 인슐린 펩티드에 대해 이전에 기재된 임의의 용도에 적합할 것으로 여겨진다. 따라서, 본원에 개시된 인슐린 이량체는 고혈당 치료, 또는 높은 혈액 글루코스 수준으로 인해 발생하는 다른 대사 질환 치료에 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 높은 혈액 글루코스 수준으로 인해 고통을 받고 있는 환자를 치료하는데 사용하기 위한 본원에 개시된 바와 같은 인슐린 이량체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 포괄한다. 한 실시양태에 따르면 본원에 개시된 인슐린 이량체를 사용하여 치료될 환자는 가축이고, 또 다른 실시양태에서 치료될 환자는 인간이다.

[0377] 본 개시내용에 따른 하나의 고혈당 치료 방법은 본원에 개시된 인슐린 이량체를 환자에게 비경구로, 예컨대 정맥내로, 복강내로, 피하로 또는 근육내로, 척수강내로, 경피로, 직장으로, 경구로, 비강으로 또는 흡입에 의한 것을 포함한 임의의 표준 투여 방식을 사용하여 투여하는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서 조성물은 피하로 또는 근육내로 투여된다. 한 실시양태에서, 조성물은 비경구로 투여되고, 인슐린 폴리펩티드 또는 그의 전구약물 유도체는 시린지에 미리 패키징된다.

[0378] 본원에 개시된 인슐린 이량체는 단독으로 또는 다른 항당뇨병제와 조합되어 투여될 수 있다. 관련 기술분야에 공지된 또는 연구 중인 항당뇨병제는 천연 인슐린, 천연 글루카곤 및 그의 기능적 유사체, 술폰닐우레아, 예컨대 톨부타미드 (오리나제), 아세토핵사미드 (디멜로르), 톨라자미드 (톨리나제), 클로로프로파미드 (다이아비네스), 글리피지드 (글루코트론), 글리부리드 (디아베타, 마이크로나제, 글리나제), 글리메피리드 (아마릴) 또는 글리클라지드 (디아미크론); 메글리티니드, 예컨대 레파글리니드 (프란딘) 또는 나테글리니드 (스타릭스); 비구아니드, 예컨대 메트포르민 (글루코파지) 또는 펜포르민; 티아졸리딘디온, 예컨대 로시글리타존 (아반디아), 피오글리타존 (악토스) 또는 트로글리타존 (레줄린) 또는 다른 PPAR $\gamma$  억제제; 탄수화물 소화를 억제하는 알파 글루코시다제 억제제, 예컨대 미글리톨 (글리세트), 아카르보스 (프레코스/글루코베이); 액세나티드 (바이에타) 또는 프람린티드; 디펩티딜 펩티다제-4 (DPP-4) 억제제, 예컨대 빌다글립틴 또는 시타글립틴; SGLT (나트륨-의존성 글루코스 수송체 1) 억제제; 또는 FBPase (프룩토스 1,6-비스포스파타제) 억제제를 포함한다.

[0379] 본원에 개시된 인슐린 이량체를 포함하는 제약 조성물은 관련 기술분야의 통상의 기술자로 공지된 표준 제약상 허용되는 담체 및 투여 경로를 사용하여 제제화되고 환자에게 투여될 수 있다. 따라서, 본 개시내용은 또한 본원에 개시된 인슐린 이량체 또는 그의 제약상 허용되는 염 중 1종 이상을 제약상 허용되는 담체와 조합하여 포함하는 제약 조성물을 포괄한다. 예를 들어, 본원에 개시된 인슐린 이량체를 포함하는 제약 조성물은 임의로 아연 이온, 보존제 (예를 들어, 페놀, 크레졸, 파라벤), 등장화제 (예를 들어, 만니톨, 소르비톨, 락토스, 텍스트로스, 트레할로스, 염화나트륨, 글리세롤), 완충제 물질, 염, 산, 및 알칼리, 또한 추가의 부형제를 함유할 수 있다. 이들 물질은 각각의 경우에 개별적으로 또는 대안적으로 혼합물로서 존재할 수 있다. 글리세롤, 텍스트로스, 락토스, 소르비톨 및 만니톨은 관례상 제약 제제 중에 100-250 mM의 농도로 존재하고, NaCl은 최대 150 mM의 농도로 존재한다. 완충제 물질, 예컨대, 예를 들어, 포스페이트, 아세테이트, 시트레이트, 아르기닌, 글리실글리신 또는 트리스 (즉, 2-아미노-2-히드록시메틸-1,3-프로판디올) 완충제 및 상응하는 염은 5-250 mM,

통상적으로 약 10-100 mM의 농도 존재한다. 추가의 부형제는, 특히, 염 또는 아르기닌일 수 있다.

- [0380] 한 실시양태에서 제약 조성물은 포스페이트 완충제 시스템 중에 약 4.0 내지 약 7.0의 pH에서 1mg/mL 농도의 인슐린 이량체를 포함한다. 제약 조성물은 유일한 제약 활성 성분으로서 인슐린 이량체를 포함할 수 있거나, 또는 인슐린 이량체는 하나 이상의 추가의 활성제와 조합될 수 있다.
- [0381] 본원에 기재된 모든 치료 방법, 제약 조성물, 키트 및 다른 유사한 실시양태는 인슐린 이량체가 그의 모든 제약 상 허용되는 염을 포함한다는 것을 고려한다.
- [0382] 한 실시양태에서 인슐린 이량체 조성물을 환자에게 투여하기 위한 장치를 갖는 키트가 제공된다. 키트는 추가로 다양한 용기, 예를 들어 바이알, 튜브, 병 등을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 키트는 또한 사용 지침서를 포함할 것이다. 한 실시양태에 따르면 키트의 장치는 에어로졸 분배 장치이며, 여기서 조성물은 에어로졸 장치 내에 미리 패키징된다. 또 다른 실시양태에서 키트는 시린지 및 바늘을 포함하고, 한 실시양태에서 인슐린 이량체 조성물은 시린지 내에 미리 패키징된다.
- [0383] 본 발명의 화합물은 표준 합성 방법, 재조합 DNA 기술 또는 펩티드 및 융합 단백질을 제조하는 임의의 다른 방법에 의해 제조될 수 있다. 특정 비-천연 아미노산이 표준 재조합 DNA 기술에 의해 발현될 수 없을지라도, 그의 제조를 위한 기술은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 비-펩티드 부분을 포괄하는 본 발명의 화합물은 적용 가능한 경우 표준 펩티드 화학 반응 뿐만 아니라 표준 유기 화학 반응에 의해 합성될 수 있다.
- [0384] 하기 실시예는 본 발명의 추가적인 이해를 촉진하도록 의도된다.
- [0385] 실시예
- [0386] 일반적 절차
- [0387] 모든 화학물질은 달리 나타내지 않는 한 상업적 공급원으로부터 구입하였다. 반응은 통상적으로 달리 나타내지 않는 한 주위 온도에서 또는 실온에서 수행하였다. 습기 또는 공기에 민감한 반응은 질소 또는 아르곤 하에 무수 용매 및 시약을 사용하여 수행하였다. 반응의 진행은 분석용 박층 크로마토그래피 (TLC) 및 초고성능 액체 크로마토그래피-질량 분광측정법 (UPLC-MS)에 의해 모니터링하였다. TLC는 층 두께 0.25 mm로 실리카 겔 60F-254로 사전코팅된 이. 머크 TLC 플레이트 상에서 수행하였다. 플레이트를 254 nm UV의 사용 및/또는 세륨 몰리브데넘산암모늄 (CAM) 또는 p-아니스알데히드 염색 용액에의 노출에 이어 탄화에 의해 시각화하였다. 초고성능 액체 크로마토그래피 (UPLC)는 워터스 액쿼티™ UPLC® 시스템 상에서 수행하였다.
- [0388] UPLC-MS 방법 A: 워터스 액쿼티™ UPLC® BEH C18 1.7 μm 1.0x50 mm 칼럼: 구배 10:90-95:5 v/v CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O + v 0.05% TFA, 2.0 min 동안; 유량 0.3 mL/min, UV 파장 215 nm; UPLC-MS;
- [0389] 방법 B: 워터스 액쿼티™ UPLC® BEH C18 1.7 μm 2.1x100 mm 칼럼: 구배 60:40-100:0 v/v CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O + v 0.05% TFA, 4.0 min 동안, 및 100:0-95:5 v/v CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O + v 0.05% TFA, 40 sec 동안; 유량 0.3 mL/min, UV 파장 200-300 nm; UPLC-MS;
- [0390] 방법 C: 워터스 액쿼티™ UPLC® BEH C18 1.7 μm 2.1x100 mm 칼럼: 구배 20:80-90:10 v/v CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O + v 0.05% TFA, 4.0 min 동안, 및 90:10-95:5 v/v CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O + v 0.05% TFA, 0.5 min 동안; 유량 0.3 mL/min, UV 파장 200-300 nm; UPLC-MS;
- [0391] 방법 D: 워터스 액쿼티™ UPLC® BEH C8 1.7 μm 2.1x100 mm 칼럼: 구배 10:90-55:45 v/v CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O + v 0.05% TFA, 4.0 min 동안, 및 55:45-95:5 v/v CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O + v 0.05% TFA, 40 sec 동안; 유량 0.3 mL/min, UV 파장 200-300 nm; UPLC-MS;
- [0392] 방법 E: 워터스 액쿼티™ UPLC® BEH300 C4 1.7 μm 2.1x100 mm 칼럼: 구배 10:90-50:50 v/v CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O + v 0.05% TFA, 4.3 min 동안, 및 50:50-70:30 v/v CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O + v 0.05% TFA, 0.5 min 동안; 유량 0.3 mL/min, UV 파장 200-300 nm; UPLC-MS;
- [0393] 방법 F: 워터스 액쿼티™ UPLC® BEH C8 1.7 μm 2.1x100 mm 칼럼: 구배 20:80-72.5:27.5 v/v CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O + v 0.05% TFA, 4.3 min 동안, 및 72.5:27.5-95:5 v/v CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O + v 0.05% TFA, 0.5 min 동안; 유량 0.3 mL/min, UV 파장 200-300 nm, 및 UPLC-MS;

[0394] 방법 G: 워터스 액쿼티™ UPLC® BEH C8 1.7 μm 2.1x100 mm 칼럼: 구배 20:80-90:10 v/v CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O + v 0.1% TFA, 4.0 min 동안, 및 90:10-95:5 v/v CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O + v 0.1% TFA, 0.4 min 동안; 유량 0.3 mL/min, UV 파장 200-300 nm.

[0395] 질량 분석은 양이온 검출 모드에서 전기분무 이온화를 사용하여 워터스 SQ 검출기 상에서 수행하였고 질량-대전하 비의 스캔 범위는 170-900이었던가, 또는 양이온 검출 모드에서 전기분무 이온화를 사용하여 워터스 마이크로메스® LCT 프리미어™ XE 상에서 수행하였고 질량-대전하 비의 스캔 범위는 300-2000이었다. 생산된 인슐린 접합체 또는 IRPA의 확인은 이론적 분자량과 UPLC-MS를 사용하여 측정된 실험값을 비교하여 확인하였다. 연결 위치를 결정하기 위해, 특히 인슐린 이량체를 DTT 처리 (a/b 쇄의 경우) 또는 Glu-C 소화 (환원 및 알킬화의 존재 하에 또는 부재 하에)에 적용하고, 이어서 생성된 펩티드를 LC-MS에 의해 분석하였다. 측정된 질량에 기초하여, 연결 위치를 추정하였다.

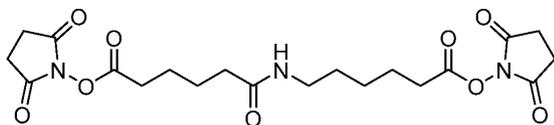
[0396] 플래쉬 크로마토그래피는 바이오타지 플래쉬 크로마토그래피 장치 (다이엑스 코포레이션) 또는 콤비플래쉬® Rf 기기 (텔레다인 이스코)를 사용하여 수행하였다. 정상-상 크로마토그래피는 공지된 크기의 사전-패킹된 카트리지에서 실리카 겔 (20-70 μm, 60 Å 포어 크기) 상에서 수행하였다. 이온 교환 크로마토그래피는 친수성 음이온성 폴리(2-술포에틸 아스파르트아미드) (폴리술포에틸 A 칼럼, 폴리엘씨 인크., 250x21 mm, 5 μm, 1000 Å 포어 크기)가 접착 코팅된 실리카-기재 물질 상에서 수행하였다. 역상 크로마토그래피는 공지된 크기의 사전-패킹된 카트리지에서 C18-결합된 실리카 겔 (20-60 μm, 60-100 Å 포어 크기) 상에서 수행하였다. 정제용 스케일 HPLC는 워터스 델타 팩 C4 15 μm, 300 Å, 50x250 mm 칼럼 또는 크로마실® C8 10 μm, 100 Å, 50x250 mm 칼럼, 유량 85 mL/min, 공지된 구배를 사용하여 길슨 333-334 이원 시스템 상에서 수행하였다. 용액의 농축은 감압 하에 회전 증발기 상에서 수행하거나 또는 비르티스 프리즈모바일 동결 건조기 (에스피 사이언티픽) 상에서 동결-건조시켰다.

[0397] 약어: 아세트니트릴 (AcCN), 수성 (aq), N,N-디이소프로필에틸아민 또는 휘니그 염기 (DIPEA), N,N-디메틸포름아미드 (DMF), 디메틸 술포사이드 (DMSO), 에틸 아세테이트 (EtOAc), N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 히드록로라이드 (EDC), 그램(들) (g), 1-히드록시벤조트리아졸 수화물 (HOBt), 시간(들) (h 또는 hr), 질량 스펙트럼 (ms 또는 MS), 마이크로그램(들) (μg), 마이크로리터(들) (μL), 마이크로몰 (μmol), 밀리그램(들) (mg), 밀리리터(들) (mL), 밀리몰 (mmol), 분(들) (min), 체류 시간 (R<sub>t</sub>), 실온 (rt), 포화 (sat. 또는 sat'd), 포화 aq 염화나트륨 용액 (염수), 트리에틸아민 (TEA), 트리플루오로아세트산 (TFA), 및 N,N,N',N'-테트라메틸-O-(N-숙신이미딜)우로늄 테트라플루오로보레이트 (TSTU).

[0398] 용어 "RHI"는 재조합 인간 인슐린을 지칭하고, 인슐린이 천연 야생형 인간 인슐린의 아미노산 서열 특징을 갖는다는 것을 나타내는데 사용된다. 본원의 표에서 사용된 용어는 이량체를 포함하는 인슐린의 아미노산 서열이 천연 야생형 인간 인슐린의 것임을 나타낸다.

[0399] 실시예 1

[0400] 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 6-((6-((2,5-디옥소피롤리딘-1-일)옥시)-6-옥소헥실)아미노)-6-옥소헥사노에이트 (링커 1; C6+NC6)의 합성이 기재된다.



[0401] 단계 1 벤질 6-((6-(벤질옥시)-6-옥소헥실)아미노)-6-옥소헥사노에이트

[0403] DMF (12.71 mL) 중 아디프산 모노벤질 에스테르 (600 mg, 2.54 mmol) 및 6-(벤질옥시)-6-옥소헥산-1-아미늄 4-메틸벤젠술포네이트 (1.0 g, 2.54 mmol)의 혼합물에 HOBt (584 mg, 3.81 mmol), 휘니그 염기 (888 μL, 5.08 mmol), 및 EDC (731 mg, 3.81 mmol)를 첨가하였다. 밤새 교반한 후에, 반응 혼합물을 sat. NaHCO<sub>3</sub> 및 EtOAc 사이에 분배하였다. 유기 상을 분리하고, 1.0 M HCl 및 염수로 세척하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 상에서 건조시키고, 농축시켜 표제 화합물을 반-고체로서 수득하고, 추가로 정제하지 않고 다음 단계에 사용하였다. UPLC-MS 방법 A: Rt = 1.26 min, m/z = 440.3 [M+1]

[0404] 단계 2 6-((5-카르복시펜틸)아미노)-6-옥소헥산산

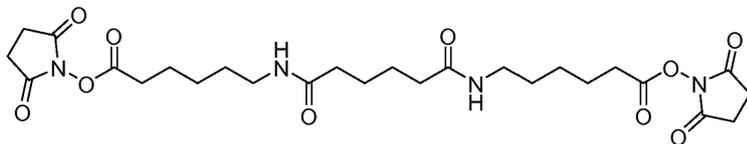
[0405] MeOH (50 mL) 중 단계 1의 생성물 (1.08 g, 2.457 mmol) 및 펄맨 촉매 (탄소상 20 wt%, 173 mg, 0.246 mmol)의 현탁액을 50 psi H<sub>2</sub> 하에 밤새 교반하였다. 촉매를 여과하고, 여과물을 C8 상에서의 역상 크로마토그래피에 적용하였다 (크로마실, C8 10 μm 100 Å, 250 x 50mm; 용매 A = 물/0.05%TFA, 용매 B = AcCN/0.05%TFA), 유량 = 85 mL/min, 구배 B / A 5-30%, 30 min. UPLC-MS 방법 A: Rt = 0.40 min, m/z = 260.15 [M+1].

[0406] 단계 3 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 6-((6-((2,5-디옥소피롤리딘-1-일)옥시)-6-옥소헥실)아미노)-6-옥소헥사노에이트

[0407] DMF (964 μL) 중 단계 2의 생성물 (50 mg, 0.193 mmol)의 용액에 TSTU (116 mg, 0.386 mmol)를 첨가하였다. 0°C로 냉각시킨 후에, 혼합물에 트리에틸아민 (53.8 μL, 0.386 mmol)을 첨가하였다. 45분 동안 교반한 후에, 목적 화합물의 형성이 관찰되었다: UPLC-MS 방법 A: Rt = 0.71 min, m/z = 453.4 [M+1]. 생성된 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 6-((6-((2,5-디옥소피롤리딘-1-일)옥시)-6-옥소헥실)아미노)-6-옥소헥사노에이트를 정제하지 않고 DMF 중 0.2 M 용액으로 사용하였다.

[0408] 실시예 2

[0409] 비스(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 6,6'-((아디포일비스(아잔디일))디헥사노에이트 (링커 2; C6N+C6+NC6)의 합성이 기재된다.



[0410]

[0411] 단계 1 디벤질 6,6'-((아디포일비스(아잔디일))디헥사노에이트

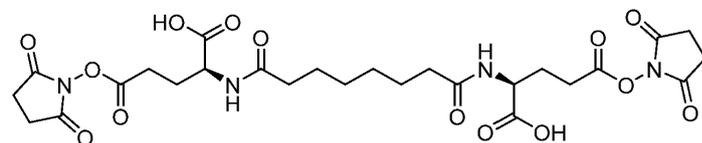
[0412] DMF (17.1 mL) 중 6-(벤질옥시)-6-옥소헥산-1-아미늄 4-메틸벤젠술포네이트 (2.693 g, 6.84 mmol) 및 아디프산 (500 mg, 3.42 mmol)의 용액에 휘니그 염기 (1.793 mL, 10.26 mmol), HOBt (1.572 g, 10.26 mmol), 및 EDC (1.968 g, 10.26 mmol)를 첨가하였다. 밤새 교반한 후에, 반응 혼합물을 물 (500 mL)에 붓고, 30분 동안 교반하였다. 표제 화합물을 여과를 통해 고체로서 수집하고, 공기 흡입에 의해 건조시켰다. UPLC-MS 방법 A: Rt = 1.23 min, m/z = 553.5 [M+1].

[0413] 단계 2 비스(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 6,6'-((아디포일비스(아잔디일))디헥사노에이트

[0414] 단계 2에서 벤질 6-((6-(벤질옥시)-6-옥소헥실)아미노)-6-옥소헥사노에이트를 디벤질 6,6'-((아디포일비스(아잔디일))디헥사노에이트로 대체하여 실시예 1에 기재된 것과 유사한 절차를 사용하여 표제 화합물을 제조하였다. UPLC-MS 방법 A: Rt = 0.74 min, m/z = 567.4 [M+1].

[0415] 실시예 3

[0416] (2S,2'S)-2,2'-((옥탄디오일비스(아잔디일))비스(5-((2,5-디옥소피롤리딘-1-일)옥시)-5-옥소펜탄산) (링커 3; 감마-Glu-수베르산-감마-Glu)의 합성이 기재된다.



[0417]

[0418] 단계 1 (S)-5-(벤질옥시)-4-(8-(((S)-1-(벤질옥시)-4-카르복시-1-옥소부탄-2-일)아미노)-8-옥소옥탄아미도)-5-옥소펜탄산

[0419] DMF (10.5 mL) 중 H-GLU-OBZL (1.00 g, 4.21 mmol)의 용액에 트리에틸아민 (5.875 mL, 42.1 mmol)에 이어 디숙신이미딜 수베레이트 (776 mg, 2.107 mmol)를 첨가하였다. 1시간 동안 교반한 후에, 반응 혼합물을 농축시키고, 생성된 잔류물을 C18 칼럼 (ISCO 44 g), 유량 = 37 mL/min; 구배 AcCN / 물 + 0.05%TFA: 2%-20%, 20 min에서 정제한 후에 유지시켰다. 동결건조 후에, 중간체 비스-카르복실산을 수득하였다. UPLC-MS 방법 B: Rt = 2.66 min, m/z = 613.3 [M+1].

[0420] 단계 2 (S)-5-(벤질옥시)-4-(8-(((S)-1-(벤질옥시)-4-카르복시-1-옥소부탄-2-일)아미노)-8-옥소옥탄아미도)-5-

옥소펜탄산의 비스-N-히드록시숙신이미드 에스테르

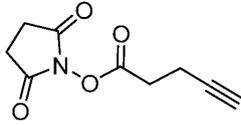
- [0421] 아세트니트릴 (7.4 mL) 중 단계 1의 생성물 (455 mg, 0.743 mmol)의 현탁액에 TSTU (492 mg, 1.634 mmol)를 고체로서 첨가한 후에 트리에틸아민 (228  $\mu$ L, 1.634 mmol)을 첨가하고, 이 시점에 현탁액이 용해되었다. 반응 혼합물을 1.5시간 동안 교반하고, 회전증발기 상에서 실온에서 농축시켰다. 생성물을 C-8 상에서의 역상 크로마토그래피에 의해 정제하였다 (칼럼 크로마실, C8 10  $\mu$ m 100A, 크기 250 x 50mm; 용매 A=물/0.05%TFA, 용매 B=AcCN/0.05%TFA), 유량=85 mL/min, 구배 B / A 10-80%, 30 min. 분획물을 동결건조시킨 후에, 비스-NHS 에스테르를 수득하였다. UPLC-MS 방법 B: Rt = 2.77 min, m/z = 807 [M+1].
- [0422] 단계 3. (2S,2'S)-2,2'-(옥탄디오일비스(아잔디일))비스(5-((2,5-디옥소피롤리딘-1-일)옥시)-5-옥소펜탄산)
- [0423] 단계 2의 생성물 (250 mg, 0.310 mmol)을 촉매로서의 탄소 상 팔라듐 (66.0 mg, 0.031 mmol), 및 용매로서의 0.1% TFA를 함유하는 아세톤 (6.2 mL)을 사용하여 1 atm의 수소에서 밤새 수소화하였다. 촉매를 여과하고, 여과물을 농축시켜 표제 화합물을 수득하였다. 고진공에서 밤새 펌핑하였다. UPLC-MS 방법 C: Rt = 3.61 min, m/z = 627.3 [M+1].
- [0424] 실시예 4
- [0425] 일반적 방법 A: N<sup>6,B29</sup> 인슐린 접합체 (유사체)의 합성
- [0426] 적절한 크기의 용기에서, 인슐린 또는 인슐린 유사체를 혼합 용매: 2:3 v/v 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:AcCN 중에 부드럽게 교반하면서 실온에서 용해시켰다. 혼합물이 맑아진 후에, pH를 알칼리성 용액, 예를 들어 0.1 N NaOH를 사용하여 10.5-10.8의 값으로 조정하였다. 별개의 바이알에서, 활성화된 에스테르 중간체 (연결 모이어티)를 유기 용매, 예를 들어 DMSO 중에 실온에서 용해시켰다. 활성화된 에스테르 (링커)의 용액의 분취액을 UPLC 크로마토그램이 대부분의 비변형 인슐린이 반응하였고 반응 혼합물의 상당 부분이 B29-접합된 인슐린으로 전환되었음을 보여줄 때까지 인슐린을 함유하는 용액에 소정 기간에 걸쳐 첨가하였다. 반응물을 아민 친핵체, 예를 들어 2-아미노에탄올을 첨가하여 쉐칭하였다. 반응 용액을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 생성된 용액을 차가운 H<sub>2</sub>O (20x)로 0°C에서 조심스럽게 희석하고, 그의 pH를 1 N HCl (및 필요한 경우 0.1 N NaOH)을 사용하여 2.5의 최종 pH로 조정하였다. 용액을 우선 접선 흐름 여과 (TFF) 시스템을 통해 또는 1K, 3K 또는 10K MWCO 막을 사용하는 아미콘 울트라-15 원심분리 유닛을 사용하여 한외여과에 의해 농축시켰다. 농축된 용액을 통상적으로 우선 이온 교환 크로마토그래피에 적용하였다 (폴리술포에틸 A 칼럼, 폴리엘씨 인크., 250x21 mm, 5  $\mu$ m, 1000 Å; 완충제 A: 0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN; 완충제 B: 0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN/0.5 M NaCl). 목적 순도를 갖는 B29-접합체를 함유하는 분획을 합하고, TFF 시스템 또는 아미콘 울트라-15를 사용하여 농축시켰다. 이어서 생성된 용액을 역상 HPLC에 의해 추가로 정제하였다 (워터스 C4 250x50 mm 칼럼, 10  $\mu$ m, 1000 Å 칼럼 또는 크로마실 C8 250x50 mm, 10  $\mu$ m, 100 Å 칼럼; 완충제 A: 0.05-0.1% TFA / 물; 완충제 B: 0.05-0.1% TFA / AcCN). 표제 접합체를 함유하는 분획을 합하고, 동결-건조시키거나 또는 TFF 시스템 및/또는 아미콘 울트라-15를 사용하여 완충제 교환하여 표제 생성물을 수득하였다.
- [0427] 실시예 5
- [0428] N<sup>6,29B</sup>-5-아지도-펜타노일 desB30 인슐린 (A:Y19A) (유사체 1)의 합성이 기재된다.
- [0429] 20 mL 설팅 바이알에서, desB30 A:Y19A 인슐린 (112 mg, 0.020 mmol)을 혼합 용매 (2 mL, 2:3 v/v 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:AcCN) 중에 부드럽게 교반하면서 실온에서 용해시켰다. 혼합물이 맑아진 후에, pH를 알칼리성 용액, 예를 들어 0.1 N NaOH를 사용하여 10.5-10.8의 값으로 조정하였다. 별개의 8 mL 설팅 바이알에서, 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 5-아지도펜타노에이트 (링커 5; 실시예 6 참조) (4.79 mg, 0.020 mmol)를 DMSO (500  $\mu$ L) 중에 실온에서 용해시켰다. 활성화된 에스테르의 용액의 분취물을 UPLC 크로마토그램이 대부분의 비변형 인슐린이 반응하였고 반응 혼합물의 상당 부분이 B29-접합된 인슐린으로 전환되었음을 보여줄 때까지 인슐린을 함유하는 용액에 소정 기간에 걸쳐 첨가하였다. 반응물을 아민 친핵체, 예를 들어 2-아미노에탄올의 첨가에 의해 쉐칭하였다. 반응 용액을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 생성된 용액을 차가운 H<sub>2</sub>O (20x)로 0°C에서 조심스럽게 희석하고, 그의 pH를 1.0 N HCl (및 필요한 경우 0.1 N NaOH)을 사용하여 2.5의 최종 pH로 조정하였다. 용액을 우선 3K 또는 10K MWCO 막을 사용하는 아미콘 울트라-15 원심분리 유닛을 사용하여 한외여과에 의해 농축시켰다. 농축된 용액을 역상 HPLC에 적용하였다 (크로마실 C8 250x50 mm, 10  $\mu$ m, 100 Å 칼럼, 25-35% 완충제 B / 완충제 A, 20 min 동안; 완충제 A: 0.05% TFA / 물; 완충제 B: 0.05% TFA / AcCN). 유사체 1을 함유하는 분획을

합하고, 이어서 동결-건조시켰다. UPLC-MS 방법 D: Rt = 3.91 min, m/z = 1435.86 [(M+4)/4].

[0430] 실시예 6

[0431] N<sup>6,29B</sup>-아실화 RHI 유사체 2, 유사체 3, 및 유사체 4를 이량체 구축에 사용하기 위해 "클릭" 화학을 사용하여 제조하고, 일반적 방법 A, 또는 재조합 인간 인슐린 및 각각 유사체 2, 유사체 3, 또는 유사체 4를 제조하기 위해

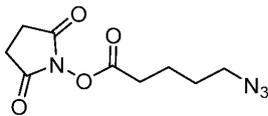
[0432]



[0433]

(2,5-디옥소피롤리딘-1-일 펜트-4-이노에이트; 링커 4);

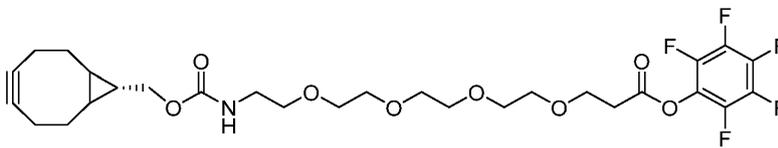
[0434]



[0435]

(2,5-디옥소피롤리딘-1-일-아지도펜타노에이트; 링커 5); 또는

[0436]



[0437]

(피플루오로페닐 1-(비시클로[6.1.0]논-4-인-9-일)-3-옥소-2,7,10,13,16-펜타옥사-4-아자노나테칸-19-오에이트) (링커 6)를 대체한 실시예 4에 기재된 것과 유사한 절차를 사용하여 제조하였다. 유사체를 UPLC-MS 방법 D를 사용하여 특징화하였으며, 예외적으로 유사체 5는 UPLC-MS 방법 F를 사용하여 특징화하였다.

[0438]

[0439] 실시예 7

[0440] N<sup>2,1A</sup>,N<sup>2,1B</sup>-비스(카르바모일) 인간 인슐린 (유사체 5)의 합성이 기재된다.

[0441] 물 (50 mL) 중 RHI (1g, 0.172 mmol)의 현탁액에 물 (5.0 mL) 중 이염기성 인산칼륨 (0.249 g, 1.429 mmol)의 용액을 첨가하였다. 실온에서 30분 동안 교반한 후에, 생성된 혼합물에 시안산칼륨 (0.279 g, 3.44 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 16시간 동안 교반하였다. 반응을 중지시키기 위해, 미반응 시안산칼륨을 MWCO 3K 투석여과 장치를 사용하여 TFF에 의해 제거하고, 생성물을 동결건조에 의해 고체로서 분리하였다. 생성물은 약 10-35%의 A1/B1/B29-트리스-우레아-RHI를 함유하였으며, 이는 임의로 C8 상에서의 역상 크로마토그래피에 의해 제거할 수 있었다 (칼럼 크로마실, C8 10 μm 100Å, 250 x 50 mm; 용매 A = 물/0.05%TFA, 용매 B=AcCN/0.05%TFA), 유량 = 85 mL/min, 구배 B / A 26-34%, 30 min 동안). UPLC-MS 방법 D: Rt = 4.29 min, m/z = 1474.6 (z = 4). N-말단 치환기는 하기 구조를 갖는다:

표 1			
유사체	연결 모이어티	Rt (분)	(M+4)/4
2		4.08	1472.56
3		4.10	1483.89
4		3.94	1558.58

파상선은 인슐린 분자의 B29 Lys의 엡실론 아미노기 사이의 결합을 나타낸다.

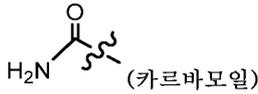


[0442] , 여기서 파상선은 치환기와 N-말단 아미노산의 N2 질소 사이의 결합을 나타낸다.

[0443] 실시예 8

[0444] N<sup>2,1A</sup>,N<sup>2,1B</sup>-비스(카르바모일) desB30 인간 인슐린 (유사체 6)의 합성이 기재된다.

[0445] 표제 화합물을 RHI를 desB30 인슐린으로 대체하여 실시예 7에 기재된 것과 유사한 절차를 사용하여 제조하였다. UPLC-MS 방법 D: Rt = 4.10 min, m/z = 1448.9 (z = 4). N-말단 치환기는 하기 구조를 갖는다:

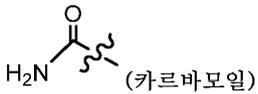


[0446] , 여기서 파상선은 치환기와 N-말단 아미노산의 N2 질소 사이의 결합을 나타낸다.

[0447] 실시예 9

[0448] N<sup>2,1A</sup>,N<sup>2,1B</sup>-비스(카르바모일) 인슐린 리스프로 (유사체 7)의 합성이 기재된다.

[0449] 표제 화합물을 RHI를 인슐린 리스프로로 대체하여 실시예 7에 기재된 것과 유사한 절차를 사용하여 제조하였다. UPLC-MS 방법 D: Rt = 4.07 min, m/z = 1473.6 (z = 4). N-말단 치환기는 하기 구조를 갖는다:

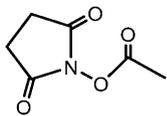


[0450] , 여기서 파상선은 치환기와 N-말단 아미노산의 N2 질소 사이의 결합을 나타낸다.

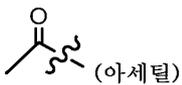
[0451] 실시예 10

[0452] N<sup>2,1A</sup>-아세틸 인간 인슐린 (유사체 8)의 합성이 기재된다.

[0453] DMSO (4.6 mL) 중 RHI (400 mg, 0.069 mmol)의 용액에 100 μL의 DMSO 중 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 아세테이트



(10.82 mg, 0.069 mmol)의 용액을 적가하였다. 3시간 동안 교반한 후에, 반응 혼합물을 물 (95 mL)로 희석하고, 약 3의 pH까지 산성화하고, 이어서 3 또는 10K MWCO 막을 사용하는 아미콘 울트라-15 원심 분리 유닛을 통해 투석여과하여 대부분의 DMSO를 제거하였다. 생성된 용액을 구배 완충제 B / 완충제 A 10-40%, 24분 동안을 사용하여 우선 이온 교환 크로마토그래피에 적용하였다 (폴리술포에틸 A 칼럼, 폴리엘씨 인크., 250x21 mm, 5 μm, 1000 Å, 유량 15 mL/min; 완충제 A: 0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN; 완충제 B: 0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN/0.5M NaCl). 목적 N<sup>2,1A</sup>-아세틸-RHI를 함유하는 분획을 합하고, 농축시키고, 이어서 역상 크로마토그래피에 적용하였다 (크로마실, C8 10 μm 100 Å, 250 x 50mm; 용매 A = 물/0.05%TFA, 용매 B = AcCN/0.05%TFA, 구배 B / A 26-30%). 변형 위치를 DIT 분석을 사용하여 확인하였다. UPLC-MS 방법 D: Rt = 3.5 min 및 m/z = 1463.5 (z = 4). N-말단 치환기는 하기 구조를 갖는다:



[0454] , 여기서 파상선은 치환기와 N-말단 아미노산의 N2 질소 사이의 결합을 나타낸다.

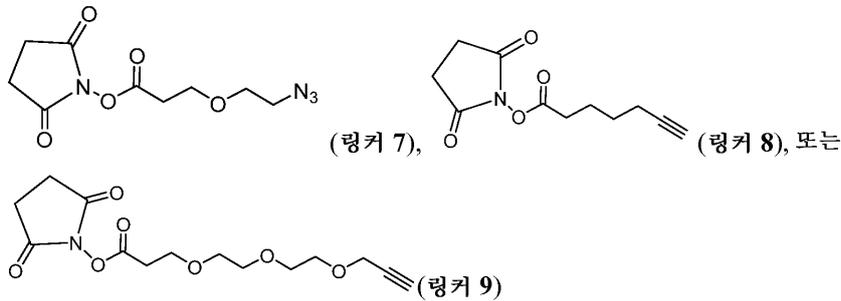
[0455] 실시예 11

[0456] N<sup>2,1A</sup>,N<sup>2,1B</sup>-비스(카르바모일) N<sup>6,29B</sup>-아실화 RHI의 합성이 기재된다.

[0457] 유사체 9를 구축하기 위해 2,5-디옥소피롤리딘-1-일-아지도펜타노에이트 (링커 5)에 또는 유사체 10을 구축하기 위해 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 펜트-4-이노에이트 (링커 4)에 접합된 유사체 5를 일반적 방법 A 또는 실시예 4에 기재된 것과 유사한 절차를 사용하여 제조하였다.

[0458] 실시예 12

[0459] 하기 N<sup>6,29B</sup>-아실화 RHI 유사체 (유사체 11, 유사체 12, 및 유사체 13)를 이량체 구축에 사용하기 위해 "클릭" 화학을 사용하여 제조하였다. 유사체를 일반적 방법 A, 또는 재조합 인간 인슐린 (RHI) 및 각각 유사체 11, 유사체 12, 또는 유사체 13을 제조하기 위해 하기로부터 선택된 적절한 연결 모이어티를 대체하여 실시예 4에 기재된 것과 유사한 절차를 사용하여 제조하였다:



[0460] 유사체를 UPLC-MS 방법 D를 사용하여 특징화하였으며, 예외적으로 유사체 12는 UPLC-MS 방법 F를 사용하여 특징화하였다.

유사체	연결 모이어티	Rt (분)	(M+4)/4
11		3.26	1488.11
12		3.97	1479.30
13		3.27	1502.26

과상선은 인슐린 분자의 B29 Lys의 엡실론 아미노기 사이의 결합을 나타낸다.

[0461] 실시예 13

[0463] 일반적 방법 B: 유기 염기 조건을 사용하는 N<sup>6,29B</sup>, N<sup>6,29B'</sup>-인슐린 이량체의 합성

[0464] 적절한 크기의 용기에서, 인슐린 또는 인슐린 유사체를 유기 용매 또는 혼합 수성 (aq)/유기 용매, 예를 들어 DMSO 중에 염기, 예를 들어 TEA의 존재 하에 실온에서 현탁시켰다. 혼합물을 인슐린이 완전히 용해될 때까지 부드럽게 교반하였다. 생성된 용액에 유기 용매의 용액, 예컨대 DMSO 또는 DMF 중 활성화된 에스테르 중간체 (링커)를 첨가하였다. 이후에 UPLC 크로마토그램이 반응 혼합물의 상당 부분이 N<sup>6,29B</sup>, N<sup>6,29B'</sup>-인슐린 이량체 (또는 N<sup>6,28B</sup>, N<sup>6,28B'</sup>-인슐린 리스프로 이량체)로 전환되었음을 보여주었다. 반응 혼합물을 직접 역상 HPLC 정제에 적용할 수 있거나 (워터스 C4 250x50 mm 칼럼, 10 μm, 1000 Å 칼럼 또는 크로마실 C8 250x50 mm, 10 μm, 100 Å 칼럼; 완충제 A: 0.05-0.1% TFA / 탈이온수; 완충제 B: 0.05-0.1% TFA / AcCN), 또는 반응물을 차가운 산성 H<sub>2</sub>O (20x, pH 약 3.0)로 0°C에서 조심스럽게 희석하여 케칭할 수 있었고, 그의 pH를 1 N HCl (및 필요한 경우 0.1 N NaOH)을 사용하여 2.5의 최종 pH로 조정하였다. 용액을 우선 접선 흐름 여과 (TFF) 시스템을 통해 또는 1K, 3K 또는 10K MWCO 막을 사용하는 아미콘 울트라-15 원심분리 유닛을 사용하여 한외여과에 의해 농축시킬 수 있었다. 농축된 용액을 통상적으로 우선 이온 교환 크로마토그래피에 적용하였다 (폴리술포에틸 A 칼럼, 폴리엘씨 인크., 250x21 mm, 5 μm, 1000 Å; 완충제 A: 0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN; 완충제 B: 0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN/0.5 M NaCl). 목적 순도를 갖는 B29-접합체를 함유하는 분획을 합하고, TFF 시스템 또는 아미콘 울트라-15를 사용하여 농축시켰다. 농축된 용액을 이어서 역상 HPLC 정제에 적용하였다 (워터스 C4 250x50 mm 칼럼, 10 μm, 1000 Å 칼럼 또는 크로마실 C8 250x50 mm, 10 μm, 100 Å 칼럼; 완충제 A: 0.05-0.1% TFA / 탈이온수; 완충제 B: 0.05-0.1% TFA / AcCN). 목적 인슐린 이량체를 함유하는 분획을 합하고, 동결-건조시키거나 또는 TFF 시스템 및/또는 아미콘 울트라-15를 사용하여 완충제 교환하여 N<sup>6,29B</sup>, N<sup>6,29B'</sup>-인슐린 이량체를 수득하였다.

[0465] 실시예 14

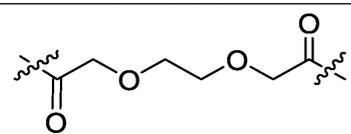
[0466] 일반적 방법 C: 수성 염기 조건을 사용하는 N<sup>6,29B</sup>,N<sup>6,29B'</sup>-인슐린 이량체의 합성.

[0467] 적절한 크기의 용기에서, 인슐린 또는 인슐린 유사체를 혼합 용매: 2:3 v/v 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:AcCN 중에 부드럽게 교반하면서 실온에서 용해시켰다. 혼합물이 맑아진 후에, pH를 알칼리성 용액, 예를 들어 0.1 N NaOH를 사용하여 10.5-10.8의 값으로 조정하였다. 별개의 바이알에서, 활성화된 에스테르 중간체 (링커)를 유기 용매, 예를 들어 DMSO 중에 실온에서 용해시켰다. 활성화된 에스테르의 용액의 분취물을 UPLC 크로마토그램이 대부분의 비반응 인슐린이 반응하였고 반응 혼합물의 상당 부분이 N<sup>6,B29</sup>,N<sup>6,B29'</sup>-인슐린 이량체 (또는 N<sup>6,28B</sup>,N<sup>6,28B'</sup>-인슐린 리스프로 이량체)로 전환되었음을 보여줄 때까지 인슐린을 함유하는 용액에 소정 기간에 걸쳐 첨가하였다. 반응물을 아민 친핵체, 예를 들어 2-아미노에탄올을 첨가하여 쉐킷하였다. 반응 용액을 rt에서 30분 동안 교반하였다. 생성된 용액을 차가운 H<sub>2</sub>O (20x)로 0°C에서 조심스럽게 희석하고, 그의 pH를 1 N HCl (및 필요한 경우 0.1 N NaOH)을 사용하여 2.5의 최종 pH로 조정하였다. 용액을 우선 접선 흐름 여과 (TFF) 시스템을 통해 또는 1K, 3K 또는 10K MWCO 막을 사용하는 아미콘 울트라-15 원심분리 유닛을 사용하여 한외여과에 의해 농축시켰다. 농축된 용액을 통상적으로 우선 이온 교환 크로마토그래피에 적용하였다 (폴리술포에틸 A 칼럼, 폴리엘씨 인크., 250x21 mm, 5 μm, 1000 Å; 완충제 A: 0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN; 완충제 B: 0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN/0.5 M NaCl). 목적 순도를 갖는 B29-접합체를 함유하는 분획을 합하고, TFF 시스템 또는 아미콘 울트라-15를 사용하여 농축시켰다. 생성된 용액을 이어서 역상 HPLC에 의해 추가로 정제하였다 (위터스 C4 250x50 mm 칼럼, 10 μm, 1000 Å 칼럼 또는 크로마실 C8 250x50 mm, 10 μm, 100 Å 칼럼; 완충제 A: 0.05-0.1% TFA / 물; 완충제 B: 0.05-0.1% TFA / AcCN). 표제 인슐린 이량체를 함유하는 분획을 합하고, 및 동결-건조시키거나 또는 TFF 시스템 및/또는 아미콘 울트라-15를 사용하여 완충제 교환하여 N<sup>6,29B</sup>,N<sup>6,29B'</sup>-인슐린 이량체를 수득하였다.

[0468] 실시예 15

[0469] 본 실시예는 N<sup>6,B29</sup>,N<sup>6,B29'</sup>-(2,2'-(에탄-1,2-디일비스(옥시))디아세틸)비스[인슐린 인간] (이량체 1)의 합성을 설명한다.

[0470] RHI (2.6 g, 0.448 mmol)를 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(0.1 M) (15.8 mL) 및 AcCN (10.5 mL)의 혼합물에 용해시키고, 0.895 mL (0.179 mmol)의 비스(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 2,2'-(에탄-1,2-디일비스(옥시))디아세테이트 (링커 8)의 0.2M DMF 용액을 첨가하였다. 반응 혼합물을 30분 동안 교반하고, 비스(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 2,2'-(에탄-1,2-디일비스(옥시))디아세테이트의 0.2M DMF 용액의 0.895 mL (0.179 mmol)의 추가 부분을 첨가하고, 반응 혼합물을 30분 동안 더 교반하였다. 반응 혼합물을 60 mL의 20%AcCN/0.1%TFA/물에 붓고, pH를 2.5로 조정하고, 10K MWCO 막을 사용하는 아미콘 울트라-15를 사용하여 투석여과하여 생성된 부피가 약 10 mL일 때까지 농축시켰다. 생성된 용액을 이온-교환 크로마토그래피에 적용하였다 (폴리술포에틸 A 칼럼, 250x21 mm, 5 μm, 1000 Å, 구배 완충제 B / 완충제 A 10-80%, 30 min 동안; 완충제 A: 0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN; 완충제 B: 0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN/0.5M NaCl). 표제 화합물을 함유하는 분획을 합하고, 농축시켰다. 생성된 용액을 이어서 역상 크로마토그래피에 적용하였다 (크로마실 C8 250x50 mm, 10 μm, 100 Å 칼럼; 구배 AcCN + 0.05% TFA / 물 + 0.05% TFA 27-35%). UPLC-MS 방법 E: Rt = 2.75 min, m/z = 1960.4 (z = 6), 1680.4(z = 7).

이량체 번호	B29 및 B29' 리신 잔기 사이의 연결 모이어터를 보여주는 이량체의 구조	인슐린 유형; 인슐린 N 말단	Rt (분)	(M+6)/6 또는 (M+7)/7
1		RHI; A1,A1', B1,B1' =H	2.75	1960.4
파상선은 각각 B29 Lys 및 B29' Lys의 앵실론 아미노기 사이의 결합을 나타낸다.				

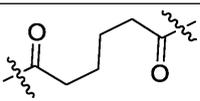
[0471]

[0472] 실시예 16

[0473] 본 실시예는 N<sup>2,1A</sup>,N<sup>2,1A'</sup>,N<sup>2,1B</sup>,N<sup>2,1B'</sup>-테트라키스(카르바모일)-N<sup>6,B29</sup>,N<sup>6,B29'</sup>-(헥산디오일)비스[인슐린 인간] (이량체

2)의 합성을 설명한다.

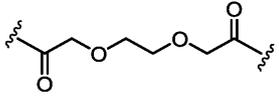
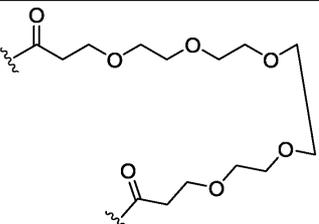
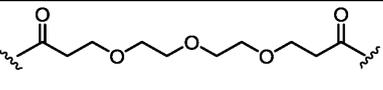
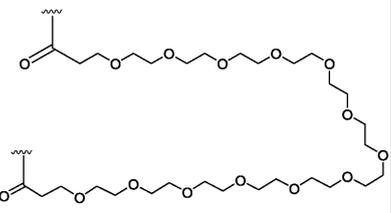
[0474]  $N^{2,1A}, N^{2,1B}$ -비스(카르바모일) RHI (150 mg, 0.025 mmol)를 DMSO (1 mL)에 용해시키고, 트리에틸아민 (0.106 mL, 0.764 mmol)을 첨가한 후에 100  $\mu$ L의 DMSO에 용해시킨 디(N-숙신이미딜) 아디페이트 (링커 12) (4.33 mg, 0.013 mmol)를 적가하였다. 1시간 동안 교반하고, 반응 혼합물을 20 mL의 물에 부었다. pH=2로 산성화하고, 10K 아미콘 울트라 15를 사용하여 투석여과하였다. 생성물을 구배 용매 B / 용매 A 10-40%, 24분을 사용하는 이온-교환 크로마토그래피에 의해 정제하고, 구배 B / A 26-36%, 30분으로의 C-8 상에서의 역상 크로마토그래피에 의해 재정제하였다. UPLC-MS 방법 E:  $R_t = 3.75$  min,  $m/z = 1983.9$ , ( $z = 6$ ).

이량체 번호	B29 및 B29' 리신 잔기 사이의 연결 모이어터를 보여주는 이량체의 구조	인슐린 유형; 인슐린 N 말단	Rt (분)	(M+6)/6 또는 (M+7)/7
2		RHI; A1,A1', B1,B1' = 카르바모일	3.75	1983.9
파상선은 각각 B29 Lys 및 B29' Lys의 엡실론 아미노기 사이의 결합을 나타낸다.				

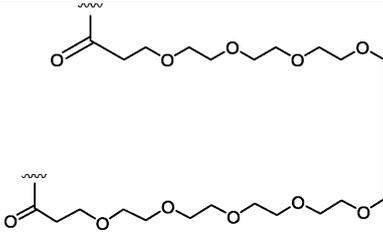
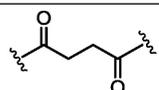
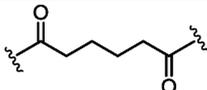
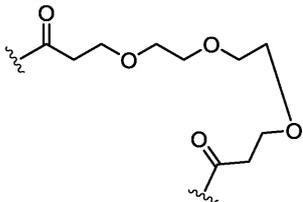
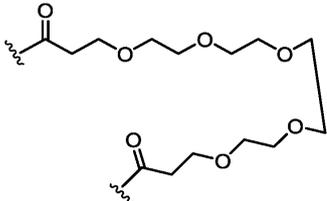
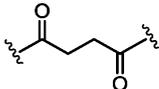
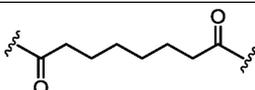
[0475]

[0476] 실시예 17

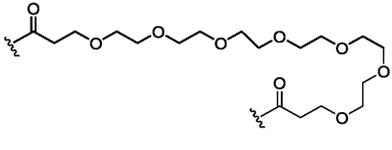
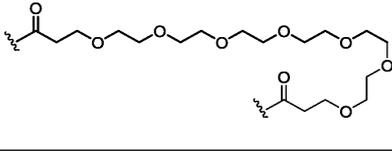
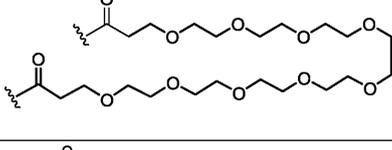
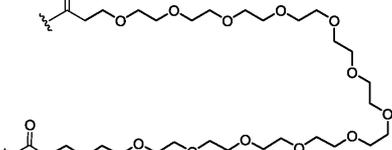
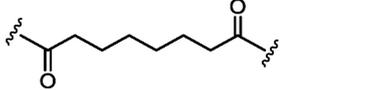
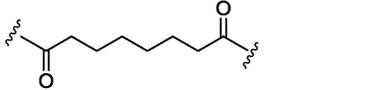
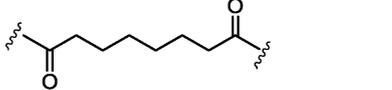
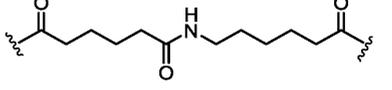
[0477] 표 3은 RHI, DesB30 RHI, 인슐린 리스프로, 인슐린 아스파르트, 인슐린 글라진, 또는 적절한 유사체를 사용하고 언급된 바와 같은 일반적 방법 B 또는 일반적 방법 C에 따라 적절한 중간체 (링커)를 사용하여 제조된 이량체를 보여준다. 예를 들어, 카르바모일화된 N-말단을 갖는 이량체의 경우, 유사체 5 또는 유사체 6 (DesB30)이 사용되었고; 아세틸화된 A1 N-말단을 갖는 이량체의 경우, 유사체 8이 사용되었다. 이량체를 UPLC-MS 방법 D 또는 UPLC-MS 방법 E를 사용하여 특징화하였으며, 특정 체류 시간 ( $R_t$ )에 부모 화합물의 6 하전된, 즉 [(M+6)/6], (또는 7 하전된, 즉 [(M+7)/7]) 종을 나타낸다. 연결 모이어터에 의해 함께 연결된 인슐린 및 인슐린 분자는 표 3에 제시된 각각의 이량체에 대해 동일하다.

표 3					
이량체 번호	B29 및 B29' 리신 잔기 사이의 연결 모이어티를 보여주는 이량체의 구조	인슐린 유형; 인슐린 N 말단	정제 방법	Rt (분)	(M+6)/6 또는 (M+7)/7
3		RHI; A1,B1,A1', B1' = 카르바모일	B	4.41	1988.745
4		RHI; A1,B1,A1', B1' = H	C	3.76	1986.88
5		RHI; A1,B1,A1', B1' = H	C	3.74	1972.6
6		RHI; A1,B1,A1', B1' = H	C	3.80	1754.2
7		RHI; A1,B1,A1', B1' = H	C	3.87	1728.8

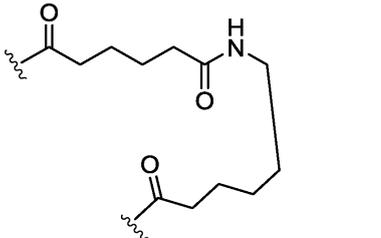
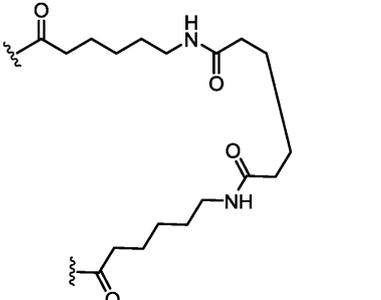
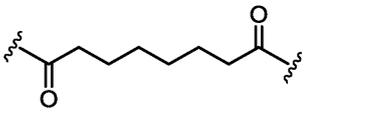
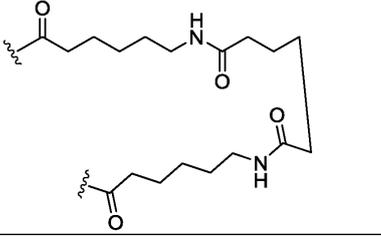
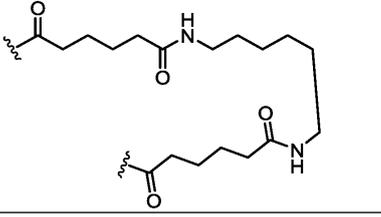
[0478]

					
8		RH1; A1,B1,A1', B1' = H	C	3.70	1950.65
9		RH1; A1,B1,A1', B1' = H	C	3.70	1954.9
10		RH1; A1,B1,A1', B1' = 카르바모 일	B	3.97	1715.3
11		RH1; A1,B1,A1', B1' = 카르바모 일	B	3.98	1727.9
12		RH1; A1,B1,A1', B1' = 카르바모 일	B	3.73	1978.8
13		RH1; A1,A1' = 아세틸, B1,B1' = H	B	3.83	1973.8

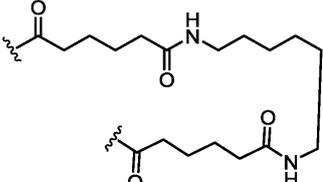
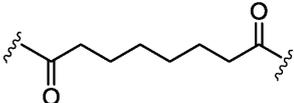
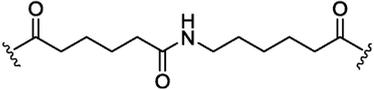
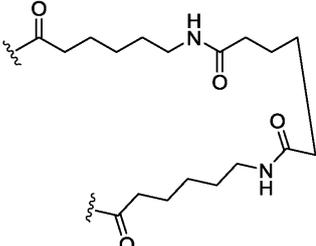
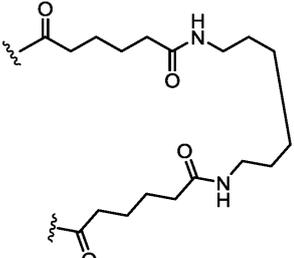
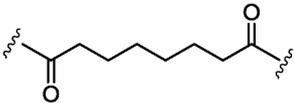
[0479]

14		RHI; A1,B1,A1', B1' = 카르바모 일	B	4.10	1740.5
15		RHI; A1,B1,A1', B1' = H	C	3.97	1716.0
16		RHI; A1,B1,A1', B1' = 카르바모 일	B	3.80	1752.4
17		RHI; A1,B1,A1', B1' = 카르바모 일	B	4.13	1778.7
18		인슐린 리스프로; A1,B1,A1', B1' = H	C	3.74	1960.54
19		인슐린 아스파르 트; A1,B1,A1', B1' = H	C	3.74	1966.13
20		RHI desB30; A1,B1,A1', B1' = H	C	4.57	1926.04
21		RHI; A1,B1,A1', B1' = 카르바모 일	B	4.48	1716.7

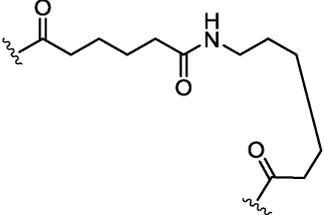
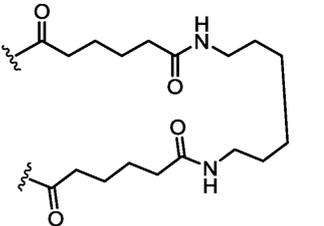
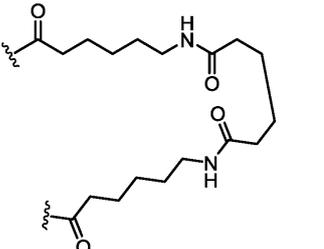
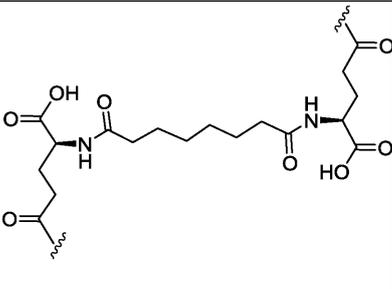
[0480]

22		RHI; A1,B1,A1', B1' = H	C	4.32	1974.06
23		RHI; A1,B1,A1', B1' = 카르바모 일	B	3.38	1733.11
24		RHI; A1,B1,A1', B1' = 카르바모 일	B	3.59	1988.4
25		RHI; A1,B1,A1', B1' = H	C	4.31	1708.35
26		RHI; A1,B1,A1', B1' = H	C	4.08	1993.02

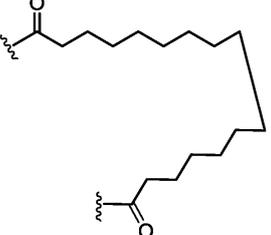
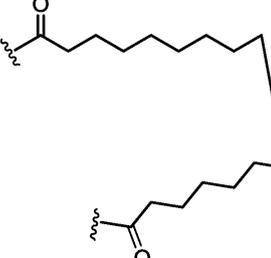
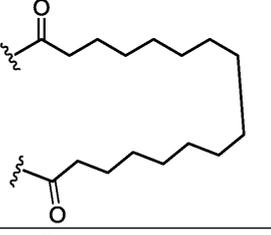
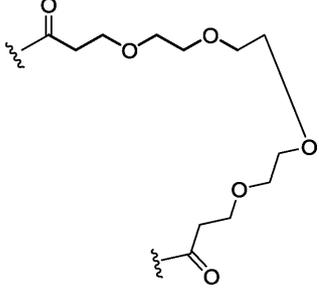
[0481]

27		RHI; A1,B1,A1', B1' = 카르바모 일	B	4.18	1732.48
28		RHI desB30; A1,B1,A1', B1' = 카르바모 일	B	3.86	1954.9
29		RHI desB30; A1,B1,A1', B1' = H	C	3.75	1940.76
30		RHI desB30; A1,B1,A1', B1' = H	C	3.77	1959.02
31		RHI desB30; A1,B1,A1', B1' = H	C	4.00	1959.4
32		인슐린 리스프로; A1,B1,A1', B1' = 카르바모 일	B	3.81	1988.42

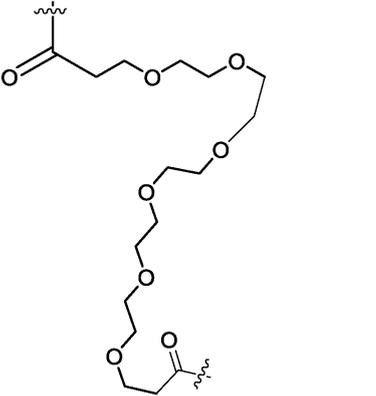
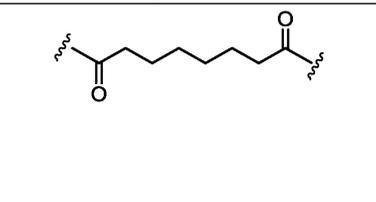
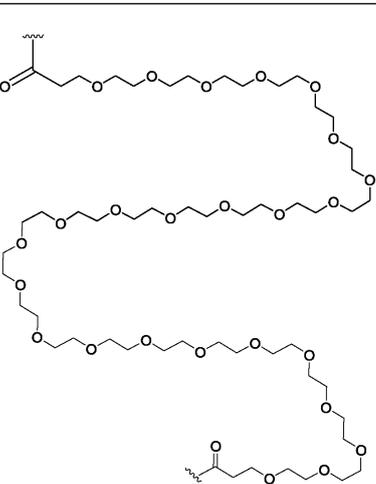
[0482]

33		인슐린 리스프로; A1,B1,A1', B1' = H	C	3.70	1974.04
34		인슐린 리스프로; A1,B1,A1', B1' = H	C	3.80	1992.89
35		인슐린 리스프로; A1,B1,A1', B1' = H	C	3.76	1992.86
36		RHI; A1,B1,A1', B1' = H	C	4.29	1717.28

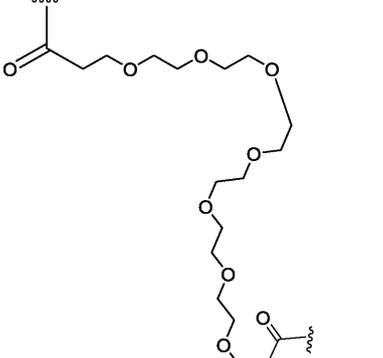
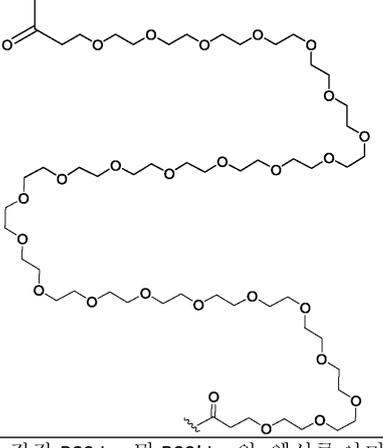
[0483]

37		RHI; A1,B1,A1', B1' = 카르바모 일	B	4.01	1720.6
38		RHI desB30; A1,B1,A1', B1' = H	C	3.88	1944.96
39		RHI; A1,B1,A1', B1' = H	C	3.87	1978.88
88		RHI; A1,B1,A1', B1' = H	D	3.39	1697.36

[0484]

<p>76</p>		<p>RHI; A1,B1,A1', B1' = H</p>	<p>D</p>	<p>3.50</p>	<p>1709.73</p>
<p>83</p>		<p>인슐린 아스파르트; A1,B1,A1', B1' = 카르바모일</p>	<p>B</p>	<p>3.50</p>	<p>1994.39</p>
<p>85</p>		<p>RHI; A1,B1,A1', B1' = H</p>	<p>D</p>	<p>3.46</p>	<p>1829.31</p>

[0485]

53		인슐린 글라진; A1,B1,A1', B1' = H	D	3.37	1788.87
87		인슐린 글라진; A1,B1,A1', B1' = H	D	3.43	1902.16
과상선은 각각 B29 Lys 및 B29' Lys의 엡실론 아미노기 사이의 결합을 나타낸다.					

[0486]

[0487]

실시예 18

[0488]

일반적 방법 D: Cu<sup>2+</sup>-촉매된 클릭 화학을 사용하는 N<sup>6,29B</sup>,N<sup>6,29B'</sup>-인슐린 이량체의 합성.

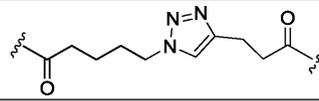
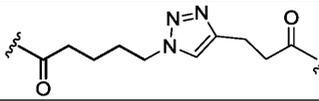
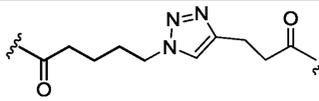
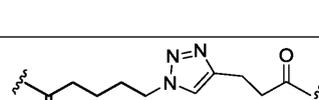
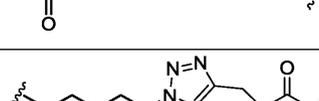
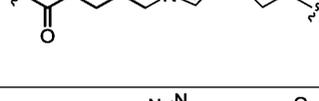
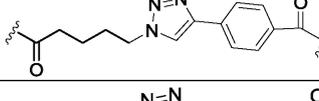
[0489]

적절한 크기의 용기에서, 적절한 아세틸렌 함유 인슐린 중간체 (유사체)를 DMSO 및 aq. 트리에틸암모늄 아세테이트 완충제의 혼합 용매 (pH 7.0, 최종 농도 0.2 mM) 중에 부드럽게 교반하면서 실온에서 용해시켰다. 또 다른 적절한 크기의 용기에서, 적절한 아지도 함유 인슐린 중간체 (유사체)를 DMSO 및 물의 혼합 용매 중에 부드럽게 교반하면서 rt에서 용해시켰다. 두 용액을 합하고, 완전히 혼합하고, 부드럽게 N<sub>2</sub> 버블링하여 탈기시켰다. 생성된 용액에 새로 제조된 아스코르브산나트륨 또는 아스코르브산 용액 (최종 농도는 0.5 mM임)을 첨가하고, 완전히 혼합한 후에 55% DMSO 중 10 mM CuSO<sub>4</sub> 및 트리스[(1-벤질-1H-1,2,3-트리아졸-4-일)메틸]아민 (즉, TBTA 리간드)의 용액을 첨가하였다. 부드럽게 N<sub>2</sub> 버블링하여 탈기시키고 완전히 혼합한 후에, 혼합물을 밤새 가끔씩 혼합하면서 rt에 저장하였다. 반응 혼합물을 혼합 용매 (v/v 7:3 AcCN/물 + 0.05% TFA)로 0°C에서 조심스럽게 희석하고, pH를 0.1, 1.0 N HCl (및 필요한 경우 0.1 N NaOH)을 사용하여 2.50으로 조정하였다. 용액을 우선 집선 흐름 여과 (TFF) 시스템을 통해 또는 1K, 3K, 또는 10K MWC0 막을 사용하는 아미콘 울트라-15 원심분리 유닛을 사용하여 한외여과에 의해 농축시켰다. 농축된 용액을 우선 이온 교환 크로마토그래피에 적용하였다 (폴리술포에틸 A 칼럼, 폴리엘씨 인크., 250x21 mm, 5 μm, 1000 Å; 완충제 A: 0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN; 완충제 B: 0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN/0.5 M NaCl). 목적 순도를 갖는 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, TFF 시스템 또는 아미콘 울트라-15를 사용하여 농축시켰다. 생성된 용액을 이어서 역상 HPLC에 의해 추가로 정제하였다 (워터스 C4 250x50 mm 칼럼, 10 μm, 1000 Å 칼럼 또는 크로마실 C8 250x50 mm, 10 μm, 100Å 칼럼; 완충제 A: 0.05-0.1% TFA / 물; 완충제 B: 0.05-0.1% TFA / AcCN). 목적 순도를 갖는 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 동결-건조시키거나 또는 TFF 시스템 및/또는 아미콘 울트라-15를 사용하여 완충제 교환하여 인슐린 이량체를 수득하였다.

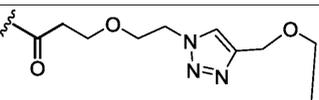
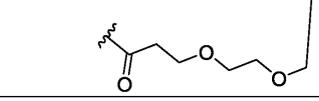
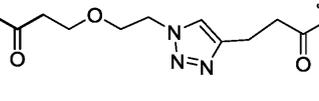
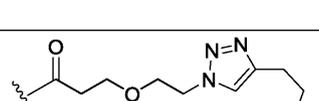
[0490]

표 4는 일반적 방법 D에 따라 적절한 중간체를 사용하여 제조된 이량체 40, 41, 45, 46, 47, 59, 57, 79, 80, 82, 및 84를 열거한다. 이들 이량체는 UPLC-MS 방법 D 또는 UPLC-MS 방법 E 또는 UPLC-MS 방법 G를 사용하여 특정화하였으며, 특정 체류 시간 (Rt)에 부모 화합물의 6 하전된, 즉 [(M+6)/6], (또는 7 하전된, 즉

[(M+7)/7] 중을 나타낸다.

표 4					
이량체 번호	제1 인슐린 백본	제2 인슐린 (') 백본	B29 및 B29' 리신 잔기 사이의 연결 모이어터를 보여주는 이량체의 구조	Rt (분)	(M+6)/6 또는 (M+7)/7
40	유사체 3	유사체 2		3.83	1970.38
41	유사체 1	유사체 2		3.88	1938.84
45	유사체 9	유사체 2		4.28	1985.30
46	유사체 3	유사체 10		4.50	1985.43
47	유사체 9	유사체 10		4.59	1714.34
75	유사체 3	유사체 2		3.40	1696.35
57	유사체 3	유사체 12		3.57	1975.90

[0491]

79	유사체 11	유사체 13		3.38	1993.39
80	유사체 11	유사체 2		3.37	1973.83
82	유사체 11	유사체 12		3.34	1978.33
84	유사체 3	유사체 13		3.40	1990.54

과상선은 각각 B29 Lys 및 B29' Lys의 엡실론 아미노기 사이의 결합을 나타낸다.

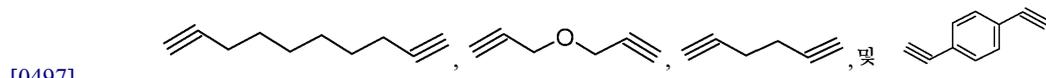
[0492]

[0493] 실시예 19

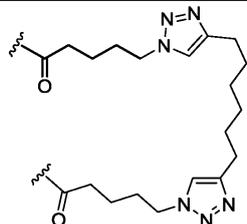
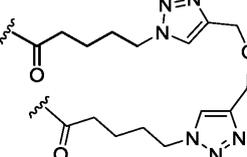
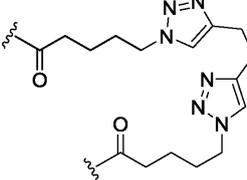
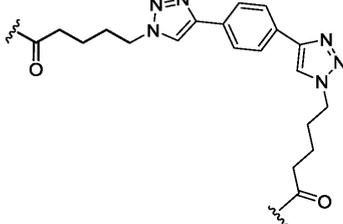
[0494] 일반적 방법 E: Cu<sup>2+</sup>-촉매된 이중 클릭 화학을 사용하는 N<sup>6,29B</sup>, N<sup>6,29B'</sup>-인슐린 이량체의 합성.

[0495] 적절한 크기의 용기에서, 적절한 아지도 함유 인슐린 중간체 (유사체)를 DMSO 및 aq. 트리에틸암모늄 아세테이트 완충제의 혼합 용매 (pH 7.0, 최종 농도 0.2 mM) 중에 부드럽게 교반하면서 실온에서 용해시켰다. 또 다른 적절한 크기의 용기에서, 적절한 비스-아세틸렌 함유 가교 또는 중간체 링커를 DMSO 및 물의 혼합 용매 중에 부드럽게 교반하면서 실온에서 용해시켰다. 두 용액을 합하고, 완전히 혼합하고, 부드럽게 N<sub>2</sub> 버블링하여 탈기시켰다. 생성된 용액에 새로 제조된 아스코르브산나트륨 또는 아스코르브산 용액 (최종 농도는 0.5 mM임)을 첨가하고, 완전히 혼합한 후에 55% DMSO 중 10 mM CuSO<sub>4</sub> 및 트리스[(1-벤질-1H-1,2,3-트리아졸-4-일)메틸]아민 (즉, TBTA 리간드)의 용액을 첨가하였다. 부드럽게 N<sub>2</sub> 버블링하여 탈기시키고 완전히 혼합한 후에, 혼합물을 밤새 가끔씩 혼합하면서 실온에 저장하였다. 반응 혼합물을 혼합 용매 (v/v 7:3 AcCN/물 + 0.05% TFA)로 0°C에서 조심스럽게 희석하고, pH를 0.1, 1.0 N HCl (및 필요한 경우 0.1 N NaOH)을 사용하여 2.50으로 조정하였다. 용액을 우선 접선 흐름 여과 (TFF) 시스템을 통해 또는 1K, 3K, 또는 10K MWCO 막을 사용하는 아미콘 울트라-15 원심분리 유닛을 사용하여 한외여과에 의해 농축시켰다. 농축된 용액을 통상적으로 우선 이온 교환 크로마토그래피에 적용하였다 (폴리술포에틸 A 칼럼, 폴리엘셀 인크., 250x21 mm, 5 μm, 1000 Å; 완충제 A: 0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN; 완충제 B: 0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN/0.5 M NaCl). 목적 순도를 갖는 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, TFF 시스템 또는 아미콘 울트라-15를 사용하여 농축시켰다. 생성된 용액을 이어서 역상 HPLC에 의해 추가로 정제하였다 (워터스 C4 250x50 mm 칼럼, 10 μm, 1000 Å 칼럼 또는 크로마실 C8 250x50 mm, 10 μm, 100Å 칼럼; 완충제 A: 0.05-0.1% TFA / 물; 완충제 B: 0.05-0.1% TFA / AcCN). 목적 순도를 갖는 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 동결-건조시키거나 또는 TFF 시스템 및/또는 아미콘 울트라-15를 사용하여 완충제 교환하여 인슐린 이량체를 수득하였다.

[0496] 표 5는 일반적 방법 E에 따라 적절한 중간체를 사용하여 제조된 이량체 42-44 및 54를 열거한다. 비스-아세틸렌 가교 또는 중간체 링커는 다음과 같다:



[0498] 이들 이량체는 UPLC-MS 방법 D 또는 UPLC-MS 방법 E를 사용하여 특징화하였으며, 특정 체류 시간 (Rt)에 부모 화합물의 6 하전된, 즉 [(M+6)/6], (또는 7 하전된, 즉 [(M+7)/7]) 중을 나타낸다.

표 5					
이량체 번호	제1 인슐린 백본	제2 인슐린 (') 백본	B29 및 B29' 리신 잔기 사이의 연결 모이어티를 보여주는 이량체의 구조	Rt (분)	(M+6)/6 또는 (M+7)/7
42	유사체 3	유사체 3		4.07	1501.00
43	유사체 3	유사체 3		4.47	1993.95
44	유사체 3	유사체 3		4.22	1494.14
59	유사체 3	유사체 3		3.78	1714.17
과상선은 각각 B29 Lys 및 B29' Lys의 앵실론 아미노기 사이의 결합을 나타낸다.					

[0499]

[0500]

실시예 20

[0501]

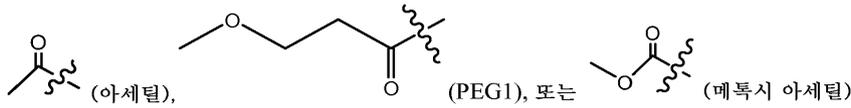
본 실시예는 N<sup>2,1A</sup>, N<sup>2,1A'</sup>, N<sup>2,1B</sup>, N<sup>2,1B'</sup>-테트라키스(아세틸 또는 PEG1 또는 메톡시 아세틸)-이량체 (이량체 48, 55, 56, 69, 및 70)의 합성을 설명한다.

[0502]

DMSO (2 mL) 중 이량체 40, 19, 또는 4 (21 mg, 1.777 μmol)의 용액에 실온에서 TEA (3.96 μL, 0.028 mmol)를 첨가하고, 이어서 DMSO (100 μL) 중 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 아세테이트 (2.23 mg, 0.014 mmol) 또는 DMSO (100 μL) 중 다른 적절한 N-히드록시숙신이미드 활성화된 에스테르 (2,5-디옥소피롤리딘-1-일 메톡시 아세테이트 또는 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 PEG1 아세테이트)의 용액을 첨가하였다. 3시간 후에, 반응 혼합물을 12 mL의 물/AcCN = 7/3 + 0.1%TFA 혼합물로 희석하고, pH를 2.5까지 조정하였다. 생성된 맑은 용액을 10K MWCO 막을 사용하는 아미콘 울트라 15 원심분리 필터에 의해 농축시켰다. 생성된 용액을 우선 이온 교환 크로마토그래피에 적용하였다 (폴리술포에틸 A, 250x21 mm, 5 μm, 1000 Å, 15 mL/min, 구배 5% - 45%, 30 min; 완충제 A: 0.1% (v/v) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%아세트니트릴 / 물; 완충제 B: 0.1% (v/v) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%아세트니트릴/ 0.5 M NaCl / 물). 목적 순도를 갖는 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 10K MWCO 막을 사용하는 아미콘 울트라-15를 사용하여 농축시켰다. 생성된 용액을 이어서 역상 HPLC에 적용하였다 (크로마실 C8 250x50 mm, 10 μm, 100 Å 칼럼; 완충제 A: 0.05%TFA / AcCN/H<sub>2</sub>O; 완충제 B: 0.05% AcCN; 유량 85 mL/min). 목적 분획을 합하고, 동결-건조시켜 표 6에 제시된 바와 같은 이량체 48, 55, 56, 69, 또는 70을 수득하였다. UPLC-MS 방법 F 또는 G를 사용하였다.

[0503]

N-말단 치환기는 하기 구조를 갖는다:



[0504]

[0505]

여기서 파상선은 치환기와 N-말단 아미노산의 N2 질소 사이의 결합을 나타낸다.

표 6				
이량체 번호	B29 및 B29' 리신 잔기 사이의 연결 모이어티를 보여주는 이량체의 구조	인슐린 유형; 인슐린 N 말단	Rt (분)	(M+6)/6 또는 (M+7)/7
48		RHI; A1,B1,A1',B' = 아세틸	4.71	1998.93
55		RHI; A1,B1,A1',B' = 아세틸	3.61	1987.97
56		RHI; A1,B1,A1',B' = PEG1	3.53	1729.22
69		RHI; A1,B1,A1',B' = 아세틸	3.55	1727.31
70		RHI; A1,B1,A1',B' = 메톡시 아세틸	3.67	1744.71

파상선은 각각 B29 Lys 및 B29' Lys의 엡실론 아미노기 사이의 결합을 나타낸다.

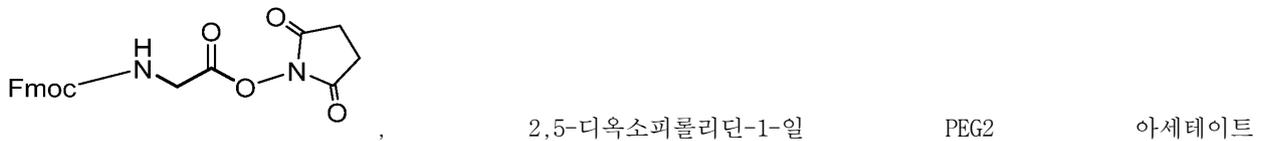
[0506]

[0507]

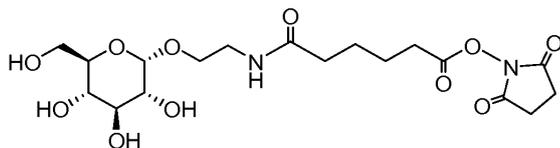
실시예 21

[0508]

표 7은 이량체 49, 50, 및 51을 보여주고, N<sup>2,A1</sup>, N<sup>2,B1</sup>, N<sup>2,A1'</sup> 및 N<sup>2,B1'</sup>의 아미노기에 연결된 아실기를 보여준다. 이들 이량체를 이량체 40로부터 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 아세테이트를 적절한 N-히드록시숙신이미드 활성화된 에스테르로 대체하여 이량체 48을 제조하기 위해 기재된 것과 유사한 절차를 사용하여 제조하여 이량체 49, 50, 및 51을 수득하였다. 활성화된 에스테르는 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 Fmoc-글리신 아세테이트



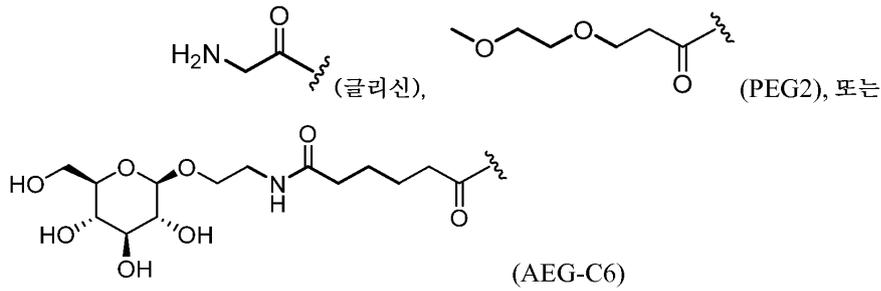
및 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 AEG-C6 아세테이트였고, 여기서 AEG는 아미노



에틸글루코스

이다. 이들 이량체는 UPLC-MS 방법 F (이량체 50 및 51) 또는 UPLC-MS 방법 G (이량체 49)를 사용하여 특정화하였으며, 특정 체류 시간 (Rt)에 부모 화합물의 6 하전된, 즉 [(M+6)/6], (또는 7 하전된, 즉 [(M+7)/7]) 중을 나타낸다. 이량체는 표 7에 제시된다.

[0509] N-말단 치환기는 하기 구조를 갖는다:



[0510]

표 7				
이량체 번호	B29 및 B29' 리신 잔기 사이의 연결 모이어터를 보여주는 이량체의 구조	인슐린 유형; 인슐린 N 말단	Rt (분)	(M+6)/6 또는 (M+7)/7
49		RHI; A1,A1', B1,B1' = 글리신	3.62	1722.06
50		RHI; A1,A1', B1,B1' = PEG2	4.85	1764.16
51		RHI; A1,A1', B1,B1' = AEM-C6	4.06	1880.19

과상선은 각각 B29 Lys 및 B29' Lys의 엡실론 아미노기 사이의 결합을 나타낸다.

[0511]

[0512] 실시예 22

[0513] 본 실시예는 구리-무함유 클릭 화학을 사용하는 이량체 52의 합성을 설명한다.

[0514] 1.0 mL의 3:2 v/v H<sub>2</sub>O/AcCN 중 유사체 3 (10 mg, 1.686 μmol)의 용액에 실온에서 1.0 mL의 3:2 v/v H<sub>2</sub>O/AcCN 중 유사체 4 (10.5 mg, 1.686 μmol)의 용액을 첨가하였다. 실온에서 2시간 동안 교반한 후에, 반응 혼합물을 우선 이온 교환 크로마토그래피에 적용하였다 (폴리술포에틸 A, 250x21 mm, 5 μm, 1000 Å, 15 mL/min, 구배 5% - 45%, 30 min; 완충제 A: 0.1% (v/v) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%아세트니트릴 / 물; 완충제 B: 0.1% (v/v) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%아세트니트릴/ 0.5 M NaCl / 물). 목적 순도를 갖는 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 3K 또는 10K MWCO 막을 사용하는 아미콘 울트라-15를 사용하여 농축시켰다. 생성된 용액을 이어서 역상 HPLC에 적용하였다 (크로마실 C8 250x50 mm, 10 μm, 100 Å 칼럼; 완충제 A: 0.05%TFA / AcCN/H<sub>2</sub>O; 완충제 B: 0.05% AcCN; 유량 85 mL/min). 목적 분획을 합하고, 동결-건조시켜 이량체 52를 수득하였다. UPLC-MS 방법 F: Rt = 3.73 min, m/z = 1738.59 [(M+7)/7 +1]. 결과는 표 8에 제시된다.

표 8				
이량체 번호	B29 및 B29' 리신 잔기 사이의 연결 모이어터를 보여주는 이량체의 구조	인슐린 유형; 인슐린 N 말단	Rt (분)	(M+6)/6 또는 (M+7)/7
52		RHI; A1,A1'=H, B1,B1' = 카르바모일	3.73	1738.59
파상선은 각각 B29 Lys 및 B29' Lys의 엡실론 아미노기 사이의 결합을 나타낸다.				

[0515]

[0516]

실시예 23

[0517]

본 실시예는 N<sup>2,1A</sup>, N<sup>2,1A'</sup>, N<sup>2,1B</sup>, N<sup>2,1B'</sup>-테트라키스(디메틸 또는 이소부틸)-이량체 (이량체 60, 58, 65, 및 67)의 합성을 설명한다.

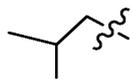
[0518]

이량체 40, 19, 또는 4 (100 mg, 8.46 μmol)를 물 (10 ml) 중에 용해시키고 (현탁액), 아세트산 용액에 의해 pH=4.0으로 조정하고, 이어서 포름알데히드 (0.013 ml, 0.169 mmol) 또는 이소부티르알데히드 (0.025 ml, 0.272 mmol)를 첨가한 후에 물 (500 μL) 중 소듐 시아노보로히드라이드 (10.63 mg, 0.169 mmol)의 새로 제조된 용액을 첨가하였다. 침전물이 형성되었다. 혼합물을 부드럽게 교반하였다. 반응 완료 약 1시간 후에, 혼합물을 1N HCl을 적가하여 pH 2.9로 조심스럽게 산성화시켰다. 현탁액이 맑은 용액이 되었다. 혼합물을 역상 정제용 HPLC에 의해 정제하였다 (C-8 칼럼, 50X250cm, 85ml/min, 구배 29% - 36%, 25 min) (물 + 0.1% TFA 및 MeCN + 0.05%TFA). 목적 분획을 동결건조시켜 이량체 (19.9 mg, 1.506 μmol, 17.80 % 수율)를 수득하였다. UPLC-MS 방법 D: Rt = 3.31 min, m/z = 1989.44 [(M+6)/6 +1].

[0519]

N-말단 치환기는 하기 구조를 갖는다:

[0520]



(이소부틸)

(여기서 파상선은 치환기와 N-말단 아미노산의 N2 질소 사이의 결합을 나타냄), 또는



(N-디메틸; Me2)

(여기서 파상선은 N2 질소와 N-말단 아미노산의 C2 탄소 사이의 결합을 나타냄).

[0521] 이량체는 표 9에 제시된다.

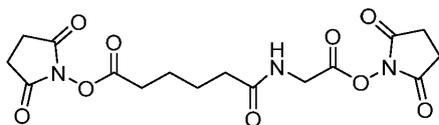
표 9				
이량체 번호	B29 및 B29' 리신 잔기 사이의 연결 모이어티를 보여주는 이량체의 구조	인슐린 유형; 인슐린 N 말단	Rt (분)	(M+6)/6 또는 (M+7)/7
60		RHI; A1,B1,A1', B' = Me2	3.31	1989.44
58		RHI; A1,B1,A1', B' = Me2	3.42	1978.48
65		RHI; A1,B1,A1', B' = 이소부틸	4.13	1997.04
67		RHI; A1,B1,A1', B' = Me2	3.42	1719.39
과상선은 각각 B29 Lys 및 B29' Lys의 엡실론 아미노기 사이의 결합을 나타낸다.				

[0522]

[0523] 실시예 24

[0524] 이량체 61, 62, 63, 64, 및 66의 합성은 하기와 같았다.

[0525] 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 6-((2-((2,5-디옥소피롤리딘-1-일)옥시)-2-옥소에틸)아미노)-6-옥소헥사노에이트 (C6-글리신 링커; 링커 24)의 합성이 기재된다.



[0526]

[0527] 단계 1 벤질(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 아디페이트

[0528] DMF (10 mL) 중 6-(벤질옥시)-6-옥소헥산산 (5g, 21.16 mmol)의 용액에 0°C에서 N-에틸-N-이소프로필프로판-2-아민 (4.44 mL, 25.4 mmol)에 이어 TSTU (7.01g, 23.28 mmol)를 첨가하였다. 반응물을 0°C에서 1시간 동안 및 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 혼합물을 빙수/에틸 에테르 혼합물 (1/1, 100 mL)에 부었다. 혼합물을 에틸 에테르 (3 x 50 mL)로 추출하고, 물 (2x 10 mL) 및 염수 (10 mL)로 세척하였다. 유기 층을 MgSO<sub>4</sub> 상에서 건조시키고, 셀라이트 패드를 통해 여과하고, 농축시켜 표제 화합물을 무색 시럽 (5.2 g, 15.6 mmol, 74%)으로 수득하였다. LC-MS 2min: Rt = 1.05 min, m/z = 334.1 [M+1].

[0529] 단계 2-((카르복시메틸)아미노)-6-옥소헥산산

[0530] DMF (2.5 mL) 중 글리신 (225 mg, 3.0 mmol)의 용액에 DMF (2.5 mL) 중 단계 1의 생성물 (1.0 g, 3.0 mmol)을 적가한 후에 TEA (418 μL, 3.0 mmol)를 첨가하였다. 반응물을 실온에서 18시간 동안 교반하였다. DMF를 감압하에 제거하였다. 조 물질을 C18 역상 크로마토그래피에 의해 정제하였다 (용리 0-40% AcCN/물, 16 칼럼 부피 (CV)). 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 농축시키고, 동결건조시켜 중간체 (6-(벤질옥시)-6-옥소헥사노

일) 글리신을 수득하였다. 물 (3 mL) 중 상기 중간체에 Pd/C (10%, 160 mg, 0.15 mmol)를 첨가하였다. 반응물을 실온에서 수소 풍선 하에 18시간 동안 교반하였다. 혼합물을 셀라이트 패드를 통해 여과하고, MeOH/물 (1/1, 10 ml)로 세척하였다. 여과물을 농축시키고, 동결건조시켜 표제 화합물 (400 mg, 2.2 mmol, 66%)을 수득하였다. LC-MS 2min: Rt = 0.28 min, m/z = 204.03 [M+1].

[0531] 단계 3. 2,5- 디옥소피롤리딘-1-일 6-((2-((2,5-디옥소피롤리딘-1-일)옥시)-2-옥소에틸)아미노)-6-옥소헥사노에이트

[0532] DMF (0.5 mL) 중 단계 2의 생성물 (10 mg, 0.049 mmol)에 0°C에서 TEA (0.015 mL, 0.108 mmol)에 이어 TSTU (31.1 mg, 0.103 mmol)를 첨가하였다. 반응물을 실온으로 가온하고, 그 온도에서 1시간 동안 교반하였다. TLC (EtOAc/MeOH/물/AcCN: 2:1:1:1 (v:v:v:v))는 목적 생성물이 형성되었고 (Rf: 0.25) 출발 물질이 남아있지 않음을 보여주었다. 조 물질을 이량체를 구축하기 위해 정제하지 않고 사용하였다.

[0533] C6-아미노산 링커를 포함하는 아미노산이 각각 알라닌, 이소류신, 류신, 및 발린인 링커 25 (C6-알라닌), 링커 26 (C6-이소류신), 링커 27 (C6-류신), 및 링커 28 (C6-발린)을 상기 제시된 과정과 유사하게 합성하였다. 정제 방법 D를 사용하여 상기 링커를 사용하여 이량체를 구축하였다. 결과는 표 10에 제시된다.

표 10				
이량체 번호	B29 및 B29' 리신 잔기 사이의 연결 모이어티를 보여주는 이량체의 구조	인슐린 유형; 인슐린 N 말단	Rt (분)	(M+6)/6 또는 (M+7)/7
61		RH1; A1,B1,A1', B1' = 카르바모일	3.90	1993.24
62		RH1; A1,B1,A1', B1' = 카르바모일	3.91	1995.62
63		RH1; A1,B1,A1', B1' = 카르바모일	4.02	1714.70
64		RH1; A1,B1,A1', B1' = 카르바모일	3.80	1716.61
66		RH1; A1,B1,A1', B1' = 카르바모일	3.73	1716.93
파상선은 각각 B29 Lys 및 B29' Lys의 엡실론 아미노기 사이의 결합을 나타낸다.				

[0534]

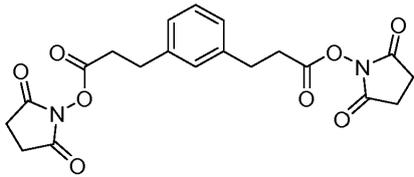
실시예 25

[0535]

[0536] 이량체 73, 89, 90, 91, 92, 및 93의 합성은 하기와 같았다.

[0537]

[0537] 비스 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 3,3'-(1,3-페닐렌)디프로피오네이트 (디프로필 페닐; 링커 29)의 합성이 기재된다.

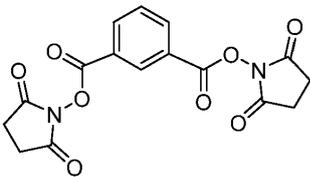


[0538]

[0539] 단계 1. 비스 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 3,3'-(1,3-페닐렌)디프로피오네이트

[0540] DMF (0.6 mL) 중 3,3'-(1,3-페닐렌)디프로피온산 (21.8 mg, 0.098 mmol)의 용액에 0°C에서 TEA (29 mL, 0.206 mmol)에 이어 TSTU (62.0 mg, 0.206 mmol)를 첨가하였다. 반응물을 실온으로 가온하고, 그 온도에서 1시간 동안 교반하였다. TLC (EtOAc/MeOH/물/AcCN: 2/1/1/1)는 목적 생성물이 형성되었고 (Rf: 0.25) 출발 물질이 남아있지 않음을 보여주었다. UPLC-MS 방법 B: Rt = 3.47 min, m/z = 417.19 [M+1]. 생성물을 방법 D를 사용하고 유사체 5를 사용하여 이량체 73을 구축하기 위해 추가로 정제하지 않고 사용하였다.

[0541] 비스(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 벤젠-1,3-디카르복실레이트 (테레프탈레이트; 링커 34)의 합성이 기재된다.

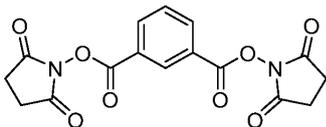


[0542]

[0543] 단계 1. 비스(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 벤젠-1,3-디카르복실레이트

[0544] 0°C에서, THF (2 mL) 중 테레프탈산 (100 mg, 0.602 mmol)의 용액에 2-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸이소우로늄 테트라플루오로보레이트 (371 mg, 1.234 mmol)에 이어 N-에틸-N-이소프로필프로판-2-아민 (0.222 mL, 1.234 mmol)을 첨가하였다. 30분 후에, 빙조를 제거하였다. 용액을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 추가의 25 mL THF를 첨가하고, 반응물을 밤새 실온에서 정치시켰다. 생성물을 약 5 mL로 농축시키고, 방법 D를 사용하고 RHI를 사용하여 이량체 89를 구축하기 위해 일부를 추가로 정제하지 않고 사용하였다. 나머지 물질을 에틸 아세테이트 (200 mL)로 희석하고, 염수 (10 mL)로 세척하고, 유기 층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시키고, 여과하고, 농축시켰다.

[0545] 비스 (2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 이소프탈레이트 (이소프탈레이트; 링커 35)의 합성이 기재된다.

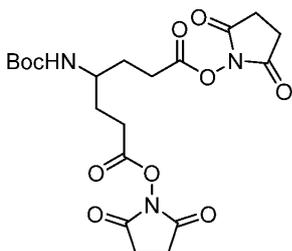


[0546]

[0547] 단계 1. 비스 (2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 이소프탈레이트

[0548] DMSO (1 mL) 중 이소프탈산 (54 mg, 0.325 mmol)에 TSTU (215 mg, 0.715 mmol)에 이어 TEA (0.137 mL, 0.975 mmol)를 첨가하였다. LC-MS 2min: Rt = 0.79 min, m/z = 721.28 [2M+1]. 생성물을 유사체 5 및 이량체 91을 사용하고 방법 E에서의 RHI를 사용하여 이량체 90을 구축하기 위해 정제하지 않고 사용하였다.

[0549] 비스 (2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 4-((tert-부톡시카르보닐)아미노) 헵탄디오에이트 (헵탄디오에이트; 링커 36)의 합성이 기재된다.



[0550]

[0551] 단계 1. 비스 (2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 4-((tert-부톡시카르보닐)아미노) 헵탄디오에이트

[0552] DMSO (0.5 mL) 중 4-((tert-부톡시카르보닐)아미노)헵탄디오산 (16.5 mg, 0.06 mmol)에 TSTU (39.7 mg, 0.132 mmol)에 이어 TEA (0.025 mL, 0.180 mmol)를 첨가하였다. LC-MS 2min: Rt = 0.90 min, m/z = 470.34 [M+1]. 생성물을 유사체 5 및 이량체 93을 사용하고 방법 E에서의 RHI를 사용하여 이량체 92를 구축하기 위해 정제하지 않고 사용하였다.

[0553] 결과는 표 11에 제시된다.

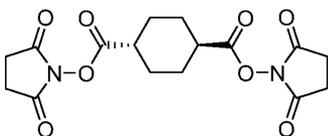
표 11				
이량체 번호	B29 및 B29' 리신 잔기 사이의 연결 모이어티를 보여주는 이량체의 구조	인슐린 유형; 인슐린 N 말단	Rt (분)	(M+6)/6 또는 (M+7)/7
73		RHI; A1,B1,A1', B1' = 카르바모일	3.55	1711.57
89		RHI; A1,B1,A1', B1' = H	3.43	1678.64
90		RHI; A1,B1,A1', B1' = 카르바모일	3.67	1703.20
91		RHI; A1,B1,A1', B1' = H	3.52	1678.69
92		RHI; A1,B1,A1', B1' = 카르바모일	3.56	1704.64
93		RHI; A1,B1,A1', B1' = H	3.33	1680.18

파상선은 각각 B29 Lys 및 B29' Lys의 앵실론 아미노기 사이의 결합을 나타낸다.

[0554]

[0555] 실시예 26

[0556] 이량체 71, 72, 77, 78, 81, 및 87의 합성은 하기와 같았다. 비스(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) (1S,4S)-시클로헥산-1,4-디카르복실레이트 (링커 30; 트랜스-시클로헥산 1,4-이산)의 합성이 기재된다.

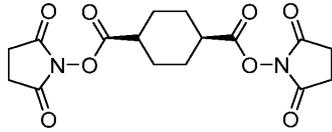


[0557]

[0558] DCM (11mL) 중 (1S,4S)-시클로헥산-1,4-디카르복실산 (200 mg, 1.162 mmol)의 용액에 0°C에서 TSTU (734 mg, 2.439 mmol) 및 DIPEA (0.5mL, 2.86mmol)를 첨가하였다. 생성된 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 생성물을 반응 용액 중에서 백색 고체로서 만들고; 여과하고, DCM (2x5mL)으로 세척하고; 진공에서 건조시켜 표제 화합물을 수득하였다. UPLC-MS 계산치: C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, 366.11, 관찰치 m\`e : 367.16 (M+H)<sup>+</sup>, (Rt:3.20 / 5.00분). UPLC-MS 방법 A. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO): δ 2.81-2.89 (m; 2 H); 2.80 (s; 8 H); 2.02-2.10 (m;

4 H); 1.57-1.63 (m; 4 H).

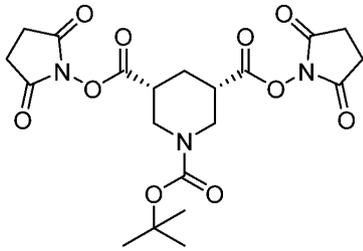
[0559] 비스(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) (1R,4R)-시클로헥산-1,4-디카르복실레이트 (링커 31; 시스-시클로헥산 1,4-이산)의 합성이 기재된다.



[0560]

[0561] DCM (11mL) 중 (1R,4R)-시클로헥산-1,4-디카르복실산 (200 mg, 1.162 mmol)의 용액에 0°C에서 TSTU (734 mg, 2.439 mmol) 및 DIPEA (0.5mL, 2.86mmol)를 첨가하였다. 생성된 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 잔류물을 실리카 겔 크로마토그래피 (0-100% EtOAc/헥산)에 의해 정제하여 표제 화합물을 수득하였다. UPLC-MS 계산치: C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, 366.11, 관찰치 m/z : 367.17 (M+H)<sup>+</sup>, (Rt:3.17 / 5.00분). UPLC-MS 방법 A. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO): δ 3.02-3.08 (m; 2 H); 2.80 (s; 8 H); 1.80-1.90 (m; 8 H).

[0562] 1-(tert-부틸) 3,5-비스(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) (3R,5S)-피페리딘-1,3,5-트리카르복실레이트 (링커 32)의 합성이 기재된다.



[0563]

[0564] DMF (7 mL) 중 (3R,5S)-1-(tert-부톡시카르보닐)피페리딘-3,5-디카르복실산 (200 mg, 0.734 mmol)의 용액에 0°C에서 TSTU (485 mg, 1.611 mmol) 및 DIPEA (0.3 mL, 1.718 mmol)를 첨가하였다. 생성된 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 잔류물을 실리카 크로마토그래피 (0-100% EtOAc/헥산)에 의해 정제하여 표제 화합물을 수득하였다. UPLC-MS 계산치: C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>, 467.15, 관찰치 m/z : 468.30(M+H)<sup>+</sup>, (Rt:0.98 / 2.00분). UPLC-MS 방법 A.

[0565] 일반적 방법 F: 유기 염기 조건을 사용한 N<sup>6,29B</sup>,N<sup>6,29B'</sup>-인슐린 이량체의 합성

[0566] 적절한 크기의 용기에서, 인슐린 또는 인슐린 유사체를 실온에서 유기 용매 또는 혼합 aq/유기 용매, 예를 들어 DMSO 중에 염기, 예를 들어 TEA, 또는 1,1,3,3-테트라메틸기아니딘 (TMG)의 존재 하에 현탁시켰다. 혼합물을 인슐린이 완전히 용해될 때까지 부드럽게 교반하였다. 생성된 용액에 유기 용매의 용액, 예컨대 DMSO 또는 DMF 중 활성화된 에스테르 중간체를 첨가하였다. UPLC, 크로마토그램이 반응 혼합물의 상당 부분이 N<sup>6,29B</sup>,N<sup>6,29B'</sup>-인슐린 이량체 (또는 N<sup>6,28B</sup>,N<sup>6,28B'</sup>-인슐린 리스프로 이량체)로 전환되었음을 보여준 후에, 반응 용액을 자동피펫을 통해 IPAc/MTBE (v/v 4:1) (45mL)를 함유하는 50mL 원심분리 튜브로 전달하였다. 첨가는 적가로 이루어졌다. 생성된 백색 현탁액을 원심분리하여 (3000rpm, 15분, 4°C) 맑은 상청액 및 백색 펠릿이 생성되었다. 상청액을 따라내고, 백색 펠릿을 진공에서 건조시켰다. 조 중간체를 함유하는 백색 펠릿을 이어서 2mL의 TFA에 0°C에서 용해시키고, 10분 동안 동일한 온도에서 교반하였다. de-boc 반응이 완료되면, 반응 용액을 자동피펫을 통해 MTBE (45mL)를 함유하는 50mL 원심분리 튜브로 전달하였다. 첨가는 적가로 이루어졌다. 생성된 백색 현탁액을 원심분리하여 (3000rpm, 15분, 4°C) 맑은 상청액 및 백색 펠릿이 생성되었다. 상청액을 따라내고, 백색 펠릿을 진공에서 건조시키고, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (v/v 1:4) 용액에 재용해시켰다. 반응 혼합물을 역상 HPLC 정제에 직접 적용할 수 있거나 (워터스 C4 250x50 mm 칼럼, 10 μm, 1000 Å 칼럼 또는 크로마실 C8 250x50 mm, 10 μm, 100 Å 칼럼; 완충제 A: 0.05-0.1% TFA / 탈이온수; 완충제 B: 0.05-0.1% TFA / AcCN), 또는 반응물을 차가운 산성 H<sub>2</sub>O (20x, pH ~ 3.0)로 0°C에서 조심스럽게 희석하여 켄칭할 수 있으며, 그의 pH를 1 N HCl (및 필요한 경우 0.1 N NaOH)을 사용하여 2.5의 최종 pH로 조정하였다. 용액을 우선 접선 흐름 여과 (TFF) 시스템을 통해 또는 1K, 3K 또는 10K MWCO 막을 사용하는 아미콘 울트라-15 원심분리 유닛을 사용하여 한외여과에 의해 농축시킬 수

있었다. 농축된 용액을 통상적으로 우선 이온 교환 크로마토그래피에 적용하였다 (폴리술포에틸 A 칼럼, 폴리에셀 인크., 250x21 mm, 5 μm, 1000 Å; 완충제 A: 0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN; 완충제 B: 0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN/0.5 M NaCl). 목적 순도를 갖는 B29-접합체를 함유하는 분획을 합하고, TFF 시스템 또는 아미콘 울트라-15를 사용하여 농축시켰다. 농축된 용액을 이어서 역상 HPLC 정제에 적용하였다 (위터스 C4 250x50 mm 칼럼, 10 μm, 1000 Å 칼럼 또는 크로마실 C8 250x50 mm, 10 μm, 100Å 칼럼; 완충제 A: 0.05-0.1% TFA / 탈이온수; 완충제 B: 0.05-0.1% TFA / AcCN). 목적 인슐린 이량체를 함유하는 분획을 합하고, 동결-건조시키거나 또는 TFF 시스템 및/또는 아미콘 울트라-15를 사용하여 완충제 교환하여 N<sup>6,29B</sup>, N<sup>6,29B'</sup>-인슐린 이량체를 수득하였다.

[0567] 표 12는 일반적 방법 B (이량체 77 및 78), 일반적 방법 C (이량체 71 및 72) 또는 일반적 방법 F (이량체 81 및 87)에 따라 적절한 링커를 사용하여 제조된 이량체 71, 72, 77, 78, 81, 및 87을 열거한다. 이들 이량체는 UPLC-MS 방법 D 또는 UPLC-MS 방법 E를 사용하여 특징화하였으며, 특정 체류 시간 (Rt)에 부모 화합물의 6 하전된, 즉 [(M+6)/6], (또는 7 하전된, 즉 [(M+7)/7]) 중을 나타낸다.

표 12				
이량체 번호	B29 및 B29' 리신 잔기 사이의 연결 모이어티를 보여주는 이량체의 구조	인슐린 유형; 인슐린 N 말단	Rt (분)	(M+6)/6 또는 (M+7)/7
71		RHI; A1,B1,A1',B1' = H	3.05	1959.33 1679.86
72		RHI; A1,B1,A1',B1' = H	3.07	1959.33 1679.86
81		RHI; A1,B1,A1',B1' = H	3.37	1959.48 1679.74
77		RHI; A1,B1,A1',B1' = 카르바모일	3.50	1988.07 1704.29
78		RHI; A1,B1,A1',B1' = 카르바모일	3.52	1988.08 1704.35
86		RHI; A1,B1,A1',B1' = 카르바모일	3.48	1988.18 1704.24

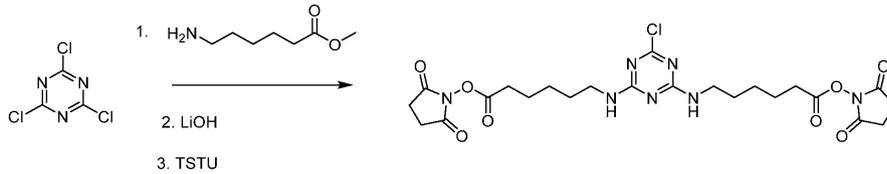
파상선은 각각 B29 Lys 및 B29' Lys의 엡실론 아미노기 사이의 결합을 나타낸다.

[0568]

[0569] 실시예 26

[0570] 이량체 68 및 이량체 74의 합성은 하기와 같았다.

[0571] 비스(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 6,6'-((6-클로로-1,3,5-트리아진-2,4-디일)비스(아잔디일))디헥사노에이트 (링커 33; C6N-클로로-1,3,5-트리아진-NC6)의 합성이 기재된다.



[0572]

[0573]

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL) 중 2,4,6-트리클로로-1,3,5-트리아진 (80 mg, 0.434 mmol) 및 메틸 6-아미노헥사노에이트 (129 mg, 0.889 mmol) HCl 염의 용액을 -30°C로 냉각시켰다. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL) 중 DIPEA (0.379 mL, 2.169 mmol)의 용액을 적가하였다. 혼합물을 -30°C-실온에서 5시간 동안 교반하였다. 이어서 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL)를 첨가하고, 수성 HCl(1 M) (2X10 mL), 수성 NaHCO<sub>3</sub> (10 ml) 및 염수 (10 mL)로 세척하였다. 유기 층을 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공에 의해 농축시켜 디메틸 6,6'-((6-클로로-1,3,5-트리아진-2,4-디일)비스(아잔디일))디헥사노에이트 (135 mg, 0.336 mmol)를 수득하였다.

[0574]

THF (0.5 ml) 및 메탄올 (0.5 mL) 중 디메틸 6,6'-((6-클로로-1,3,5-트리아진-2,4-디일)비스(아잔디일))디헥사노에이트 (135 mg, 0.336 mmol)의 용액에 수성 (2M) LiOH (504 μl, 1.008 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하고, 이어서 진공에서 농축시켜 목적 잔류물을 수득하였다. 잔류물을 물에 용해시키고, aq HCl로 중화시켰다. 침전물을 여과에 의해 수집하고, 이를 물로 세척하였다. 고체를 진공에서 건조시켜 6,6'-((6-클로로-1,3,5-트리아진-2,4-디일)비스(아잔디일))디헥산산을 수득하였다.

[0575]

DMF (2889 μl) 중 6,6'-((6-클로로-1,3,5-트리아진-2,4-디일)비스(아잔디일))디헥산산 (108 mg, 0.289 mmol)의 용액에 TSTU (174 mg, 0.578 mmol)에 이어 트리에틸아민 (81 μl, 0.578 mmol)을 첨가하였다. 반응물을 1시간 동안 교반하였다. UPLC가 목적 물질의 형성을 나타낸다. UPLC-MS 방법 C: Rt = 0.99 min, m/z = 568.2 [M+1]. 이 시약 (0.1M/DMF)을 추가로 정제하지 않고 사용하였다.

[0576]

이량체를 일반적 방법 B (이량체 74) 또는 일반적 방법 C (이량체 68)를 사용하여 제조하였다. 이들 이량체를 UPLC-MS 방법 D 또는 UPLC-MS 방법 E를 사용하여 특징화하였으며, 특정 체류 시간 (Rt)에 부모 화합물의 6 하진된, 즉 [(M+6)/6], (또는 7 하진된, 즉 [(M+7)/7]) 종을 나타낸다. 이량체 68은 링커 33 및 RHI를 사용하여 구축하였다. 이량체 74는 링커 33 및 유사체 5를 사용하여 구축하였다. 결과는 표 13에 제시된다.

표 13			
이량체 번호	B29 및 B29' 리신 잔기 사이의 연결 모이어터를 보여주는 이량체의 구조	인슐린 유형; 인슐린 N 말단	Rt (분) (M+6)/6 또는 (M+7)/7
68		A1,B1,A1',B1' = H	3.48 1993.09
74		A1,B1,A1',B1' = 카르바모일	3.56 1733.20

과상선은 각각 B29 Lys 및 B29' Lys의 앵실론 아미노기 사이의 결합을 나타낸다.

[0577]

실시예 27

[0578]

54의 합성 이량체는 하기와 같았다.

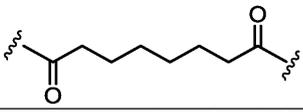
[0579]

[0580]

물 (5mL) 및 이염기성 시안산칼륨 (24.49 mg, 0.141 mmol)을 함유하는 사전-혼합물에 A1-TFA-RHI (D. Liu et al., Journal of Peptide Sci., 2012, 18, 336-341) (100 mg, 0.017 mmol)를 용해시켰다 (생성된 용액의 pH는 약 .4임). 시안산칼륨 (27.5 mg, 0.339 mmol)을 첨가하고, 밤새 교반하였다. 생성물을 C-8 상에서의 역상 크로마토그래피에 의해 정제하였다 (칼럼 크로마실, C8 10uM 100A, 크기 250 x 50mm; 용매 A=물/0.05%TFA, 용매 B=AcCN/0.05%TFA), 유량=85 mL/min, 구배 B / A 26-34%, 30 min. UPLC-MS 방법 F: Rt = 4.48 min, m/z =

1486.9 [(M+4)/4 +1].

[0581] 상기 생성물 (60 mg, 10.09  $\mu\text{mol}$ )을 DMSO (594  $\mu\text{l}$ )에 용해시키고, 트리에틸아민 (28.1  $\mu\text{l}$ , 0.202 mmol)을 첨가한 후에 100  $\mu\text{L}$ 의 DMSO에 용해된 링커 디숙신이미딜 수베레이트 (1.858 mg, 5.04  $\mu\text{mol}$ )의 용액을 첨가하였다. 3시간 동안 교반하였다. UPLC가 반응이 완료되었음을 나타낸다. 전체 반응 혼합물을 수산화암모늄 (2105  $\mu\text{l}$ , 15.13 mmol)에 첨가하였다 (적가, 발열이 예상된다). 2시간 동안 부드럽게 교반하고, TFA 기의 탈보호를 확인하였다. 혼합물을 20 mL의 물로 희석하고, 10K 아미콘 튜브를 사용하여 투석여과에 의해 대부분의 수산화암모늄을 제거하였다. pH를 약 3으로 조정하고, 투석여과에 의해 염을 제거하였다. 생성물을 이온-교환 크로마토그래피에 의해 정제하였다 (폴리술포에틸 A 칼럼, 폴리엘씨 인크., 250x21 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 1000 Å; 완충제 A: 0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN; 완충제 B: 0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN/0.5 M NaCl). 생성물을 C-8 상에서의 역상 크로마토그래피에 의해 재정제하였다 (칼럼 크로마실, C8 10  $\mu\text{M}$  100A, 크기 250 x 50mm; 용매 A=물/0.05%TFA, 용매 B=AcCN/0.05%TFA). 결과는 하기에 제시된다. 결과는 표 14에 제시된다.

표 14				
이량체 번호	B29 및 B29' 리신 잔기 사이의 연결 모이어티를 보여주는 이량체의 구조	인슐린 유형; 인슐린 N 말단	Rt (분)	(M+6)/6 또는 (M+7)/7
54		RHI; A1,A1'=H, B1,B1'=카르바모일	4.57	1974.45
과상선은 각각 B29 Lys 및 B29' Lys의 엡실론 아미노기 사이의 결합을 나타낸다.				

[0582]

실시예 28

[0583]

[0584] 인슐린 수용체 결합 검정을 하기와 같이 수행하였다.

[0585]

IR 결합 검정은 10% FBS 및 항생제 (G418, 페니실린/스트렙타비딘)를 함유하는 F12 배지에서 성장시킨 인간 IR(B)을 과다발현하는 CHO 세포로부터 제조된 세포 막을 사용하여 384-웰 포맷에서 심광 근접 검정 (SPA)으로 실행하였다. 세포 막은 5 mM MgCl<sub>2</sub>를 함유하는 50 mM 트리스 완충제, pH 7.8 중에서 제조하였다. 검정 완충제는 50 mM 트리스 완충제, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% BSA 및 프로테아제 억제제 (کمپ리트-미니-로슈)를 함유하였다. 세포 막을 WGA PVT PEI SPA 비드 (5 mg/mL 최종 농도)에 첨가한 후에 인슐린 이량체 분자를 적절한 농도로 첨가하였다. 실온에서 5-15분 인큐베이션 후에, <sup>125</sup>[I]-인슐린을 50  $\mu\text{L}$ 의 최종 총 부피에 대해 0.015 nM 최종 농도로 첨가하였다. 혼합물을 진탕시키면서 실온에서 1 내지 12시간 동안 인큐베이션한 후에 심광 계수하여 IR에 대한 <sup>125</sup>[I]-인슐린 결합 및 이러한 상호작용에 대한 인슐린 이량체 분자의 적정 효과를 결정하였다.

[0586]

실시예 29

[0587]

인슐린 수용체 (IR) AKT-인산화 검정을 하기와 같이 수행하였다.

[0588]

IR AKT-인산화 검정: 인슐린 수용체 활성화는 인슐린 수용체 신호전달 캐스케이드에서 중요한 단계인 Akt 단백질의 인산화를 측정함으로써 평가할 수 있다. 인간 IR을 과다발현하는 CHO 세포주를 HTRF 샌드위치 ELISA 검정 키트 (시스바이오 "포스포-AKT(Ser473) 및 포스포-AKT(Thr308) 세포 검정 키트")에 사용하였다. 세포를 10% FBS, 400  $\mu\text{g/mL}$  G418 및 10 mM HEPES가 보충된 F12 배지에서 성장시켰다. 검정 전에, 세포를 혈청 무함유 배지에서 2 내지 4시간 동안 인큐베이션하였다. 대안적으로, 세포는 20% DMSO를 함유하는 배지 중에서 미리 동결 및 분취하고, 해동, 스핀 다운 및 재현탁시켜 검정에 사용할 수 있다. 세포를 384-웰 플레이트에 20  $\mu\text{L}$ 의 혈청 무함유 F12 배지 중에 웰당 10,000개 세포로 플레이팅하였다. 휴물린 및 인슐린 글라진 대조군을 시험 화합물의 각각의 플레이트 상에서 실행하였다. 적정된 화합물을 세포에 첨가하고 (웰당 2  $\mu\text{L}$ , 최종 농도 = 1000 nM, 1:5배 희석으로 0.512 pM까지 하향 적정), 37°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 시스바이오 키트에 제공된 제조된 용해 완충제 8  $\mu\text{L}$ 로 용해시키고, 25°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 희석된 항체 시약 (항-AKT-d2 및 항-pAKT-Eu3/크립테이트)을 키트 지침서에 따라 제조하고, 이어서 10  $\mu\text{L}$ 를 세포 용해물의 각각의 웰에 첨가한 후에 25°C에서 3.5 내지 5시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 엔비전 플레이트 판독기 (여기 = 320 nm; 방출 = 665 nm)에 의해 판독하여 각각의 화합물에 대해 효력 및 최대 반응 둘 다에 관하여 IR

pAkt 효능제 활성을 결정하였다. 대안적으로, 화합물을 1.6 nM의 휴물린의 존재 하에 동일한 방식으로 시험하여 각각의 화합물이 어떻게 인슐린의 완전 효능제 활성과 경쟁할 수 있는지를 결정하였다.

[0589] 실시예 30

[0590] 표 15는 인슐린 수용체 (IR)를 향한 인슐린 이량체의 시험관내 생물학적 활성을 보여준다. 활성은 실시예 28에 기재된 바와 같은 리간드 경쟁 검정 또는 실시예 29에 기재된 바와 같은 기능적 Akt-인산화 검정에 의해 측정하였다.

표 15					
이량체 번호	IR 결합 IC50 (nM)	IR pAkt %Max	이량체 번호	IR 결합 IC50 (nM)	IR pAkt %Max
1	1.50	50.5	43	2.02	35
2	3.77	33	44	1.18	33
3	1.38	59.5	45	4.00	38
4	1.62	47.5	46	0.38	25
5	2.42	43	47	4.56	30
6	1.00	83	48	5.09	35
7	3.19	60	49	5.16	58
8	7.15	47.5	50	3.61	39
9	3.29	42	51	0.59	27
10	3.59	34	52	3.93	67
11	1.37	32	54	0.49	26
12	13.1	41	55	2.02	28
13	2.51	36	56	2.94	33
14	4.42	38	57	2.02	26
15	2.53	49	58	0.61	34
16	4.76		59	0.97	53
17	5.27	62	60	1.81	60
18	5.23	36	61	20.3	33
19	1.40	25	62	5.01	32
20	0.62	36	63	26.7	41
21	1.88	41	64	15.7	34
22	1.85	41.5	65	3.05	42
23	2.48	39	66	34.5	33
24	4.29	29.3	67	0.54	24
25	1.82	46	68	4.81	34
26	3.74	44	69	4.99	18
27	3.98	31	70	14.8	21
28	1.96	25	71	2.28	45
29	1.18	30	72	2.35	42
30	1.79	30	73	37.8	35
31	1.36	31	74	73.8	33
32	21.6	33	75	1.85	52
33	2.41	38	76	1.87	35
34	0.57	67	77	42.1	23
35	1.17	66	78	167	22

[0591]

36	0.53	28	79	1.47	42
37	3.52	42	80	5.48	39
38	2.18	45	81	0.3	40
39	3.17	45	82	1.73	50
40	2.03	41	83	558	21
41	0.64	35	84	2.19	50
42	2.97	49			

[0592]

[0593] 실시예 31

[0594] 본 실시예에서, 본 발명의 여러 인슐린 수용체 부분 효능제의 생체내 효과는 성체 수컷, 마른 C57BL/6NTac 마우

스에서 수행된 복강내 인슐린 내성 검사 (IP-ITT) 검정에서 소 인슐린 대신 RHI를 사용하여 화합물 A (공개된 PCT 출원 번호 W02014052451에 개시된 인슐린 이량체 MIU-90) 및 화합물 B (문헌 [Deppe et al., Naun-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 350: 213-217 (1994)]에 개시된 B29,B29'-수베로일-(인슐린)<sub>2</sub>)에 비교하였다.

[0595] 군당 N=6-8 동물의 균을 중량에 의해 무작위화하였다 (평균 약 30 그램). 연구 2일 전에, 마우스를 5 ml/kg 투여 부피로의 0.9% 염화나트륨 용액의 복강내 주사를 사용하는 투여에 적합하게 하였다. 연구 당일 오전에, 연구 전에 2 또는 4시간 동안 음식을 제거하였다. 혈액 글루코스 농도를 혈당측정기를 사용하여 T = 0분 (기준선)에서 결정하였다. 이어서 마우스에게 비히클, 이량체 24, 이량체 55, 이량체 58, 이량체 60, 이량체 67, 화합물 A, 화합물 B, 또는 휴물린 (RHI)을 5ml/kg으로 복강내 주사를 통해 투여하였다 (사용된 용량에 대해 표 16 참조). 혈액 글루코스 수준을 투여 후 30 내지 360분에 꼬리에서 채취한 혈액으로부터 결정하였다.

표 16	
화합물	용량
A	72 nmol/Kg 300 nmol/Kg
B	72 nmol/Kg 300 nmol/Kg
이량체 24	72 nmol/Kg 300 nmol/Kg
이량체 55	120 nmol/Kg 300 nmol/Kg
이량체 58	60 nmol/Kg 300 nmol/Kg
이량체 60	120 nmol/Kg 300 nmol/Kg
이량체 67	60 nmol/Kg 300 nmol/Kg
휴물린	18 nmol/Kg 72 nmol/Kg

[0596]

[0597] 결과는 도 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f 및 2g에 제시된다. 결과는 이량체 24, 이량체 55, 이량체 58, 이량체 60, 및 이량체 67에 대한 글루코스 프로파일이 시험된 두 용량에서 실질적으로 동일한 반면 화합물 A 및 B의 투여량의 증가가 증가된 글루코스 저하 효력을 발생시켰다는 것을 보여주며, 이는 이량체가 RHI 또는 화합물 A 및 B에 비하여 고혈당 위험에 대해 보다 낮은 잠재력을 갖는다는 것을 나타낸다.

[0598] 실시예 32

[0599] 이량체 24, 18, 및 40의 글루코스 저하 효과는 하기와 같이 당뇨병 유카탄 소형 돼지 (D 미니피그)에서 RHI에 비교하였다.

[0600] 유카탄 미니피그를 싱클레어 리서치 센터 (미주리주 옥스배스)에서 개발한 독점 프로토콜에 따른 알록산 주사에 의해 제1형 당뇨병에 걸리게 하였다. 기저 글루코스 수준이 150 mg/dL을 초과하면 유도는 성공적인 것으로 간주된다. 대략 300 mg/dl의 혈장 글루코스 수준을 갖는 D 미니피그를 이들 실험에 사용하였다.

[0601] 2개의 경정맥 혈관 접근 포트 (VAP)가 장착된 수컷 유카탄 미니피그를 이들 연구에 사용하였다. 연구 당일 밤새 금식시킨 후에, 미니피그를 슬링에 넣고, 주입 및 샘플링을 위해 VAP에 접근시켰다. t=0분에서, 및 혈장 글루코스 측정을 위한 2개의 기준선 혈액 샘플을 수집한 후에 (t=-30분 및 t=0분), 미니피그에게 휴물린 (재조합 인간 인슐린, RHI) 또는 IRPA를 단일 볼루스 IV로서 0.69 nmol/kg으로 투여하였다. 휴물린 및 IRPA를 글리세린, 16 mg/mL; 메타크레졸, 1.6 mg/mL; 페놀, 0.65 mg/mL; 이염기성 무수 인산나트륨, 3.8 mg/mL을 함유하는 완충제 (HCl을 사용하여 pH가 7.4로 조정됨) 중에서 69 nmol/ml로 제제화하였다. 투여 후에, 480분 동안 계속 샘플링하였으며; 샘플 수집 시점은 -30분, 0분, 8분, 15분, 30분, 45분, 60분, 90분, 120분, 150분, 180분, 210분, 240분, 270분, 300분, 330분, 360분, 420분, 및 480분이었다. 혈액을 K3-EDTA 튜브에 수집하고, 10 µg/mL 아프로티닌을 보충하고, 처리시까지 얼음 상에 두고, 수집 30분 이내에 처리하였다. 3000 rpm, 4°C에서 8

분 동안 원심분리한 후에, 베크만 쿨터 AU480 화학 분석기를 사용하여 글루코스 측정을 위해 및 화합물 수준 측정을 위해 혈장을 수집하고 분취하였다.

- [0602] 도 1은 0.69 nmol/kg 농도에서, RHI가 혈청 글루코스 수준을 50 mg/dL 미만으로 감소시킨 반면 인슐린 이량체는 그렇지 않았다는 것을 보여준다. 이 결과는 인슐린 이량체가 저혈당을 촉진시킬 위험이 RHI보다 낮다는 것을 보여준다
- [0603] 실시예 33
- [0604] 이량체 4, 5, 7, 8, 9, 18-29, 32, 37-41, 43, 44, 48, 55, 57, 58, 60, 61, 62, 64, 67, 69, 71, 72, 77, 및 78의 글루코스 저하 효과는 하기와 같이 당뇨병 유카탄 소형 돼지 (D 미니피그)에서 RHI에 비교하였다.
- [0605] 유카탄 미니피그를 싱클레어 리서치 센터 (미주리주 옥스배스)에서 개발한 독점 프로토콜에 따른 알록산 주사에 의해 제1형 당뇨병에 걸리게 하였다. 기저 글루코스 수준이 150 mg/dl을 초과하면 유도는 성공적인 것으로 간주된다. 대략 300-400 mg/dl의 혈장 글루코스 수준을 갖고 2개의 경정맥 혈관 접근 포트 (VAP)가 장착된 D 미니피그를 이들 연구에 사용하였다.
- [0606] 연구 당일, 밤새 금식시킨 후에, 미니피그를 슬링에 넣고, 주입 및 샘플링을 위해 VAP에 접근시켰다. t=0분에서, 및 혈장 글루코스 측정을 위한 2개의 기준선 혈액 샘플을 수집한 후에 (t=-30분 및 t=0분), 미니피그에게 휴몰린 (제조합 인간 인슐린, RHI) 또는 다른 이량체를 단일 볼루스 IV로서 0.69 nmol/Kg (화합물#78의 경우 0.35 nmol/kg)으로 투여하였다. 휴몰린 및 이량체를 글리세린, 16 mg/mL; 메타크레졸, 1.6 mg/mL; 페놀, 0.65 mg/mL; 이염기성 무수 인산나트륨, 3.8 mg/mL을 함유하는 완충제 (HCl을 사용하여 pH가 7.4로 조정됨) 중에서 69 nmol/mL로 제제화하였다. 투여 후에, 480분 동안 계속 샘플링하였으며; 샘플 수집 시점은 -30분, 0분, 8분, 15분, 30분, 45분, 60분, 90분, 120분, 150분, 180분, 210분, 240분, 270분, 300분, 330분, 360분, 420분, 및 480분이었다. 혈액을 K3-EDTA 튜브에 수집하고, 10 µg/mL 아프로티닌을 보충하고, 처리시까지 얼음 상에 두고, 수집 30분 이내에 처리하였다. 3000 rpm, 4°C에서 8분 동안 원심분리한 후에, 베크만 쿨터 AU480 화학 분석기를 사용하여 글루코스 측정을 위해 혈장을 수집하고 분취하였다. 결과는 도 7a - 7h에 제시된다. 도면은 0.69 nmol/kg 농도에서, RHI가 혈청 글루코스 수준을 50 mg/dL 미만으로 감소시킨 반면 인슐린 이량체는 그렇지 않았다는 것을 보여준다. 이 결과는 인슐린 이량체가 저혈당을 촉진시킬 위험이 RHI보다 낮다는 것을 보여준다.
- [0607] 실시예 34
- [0608] 본 실험은 화합물 A의 디설피드 연결 모이어티의 안정성을 이량체 24의 수베리올 (C8) 연결 모이어티에 대해 비교하였다.
- [0609] 1 µM 화합물 A 및 이량체 24를 각각 별개로 5mM 글루타티온 (GSH)의 존재 또는 부재 하에 래트 신장 세포 막 (RKCM)에서 인큐베이션하였다. 0 시점 및 2시간 시점 샘플을 수득하고, 반응물을 0.1% 포름산을 포함하는 AcCN 중 10% MeOH의 1 부피로 켄칭하였다. 이어서 켄칭된 샘플을 원심분리하고, 분석 전에 동결시켰다. 이어서 샘플을 해동시키고, 썬모 오르비 벨로스 시스템을 사용하여 분석하였다. 표적화된 Met ID 분석을 10ppm 원도우에서 2가지 하전 상태로부터 3가지 동위원소를 사용하여 추출 이온 크로마토그램 (XIC)으로 수행하였다.
- [0610] 화합물 A 대사물은 GSH의 부재 및 GSH의 존재 둘 다에서 RKCM 중에서 검출되었다. 도 3에 나타난 바와 같이, 단량체는 2시간 인큐베이션시에 부모 (화합물 A의 스톡 용액)의 약 1%였다. 도 4에 나타난 바와 같이, 단량체는 2시간 인큐베이션시에 부모 (화합물 A의 스톡 용액)의 약 6.5%였다. 결과는 디설피드 연결이 시간 경과에 따라 파괴되었음을 보여준다. 화합물 A에 대한 0시간 대조군 또는 스톡 용액에서 대사물은 관찰되지 않았다.
- [0611] 이량체 24는 RKCM에서 검출된 대사물을 생성하였으나, 한편 A-쇄 폴리펩티드 및 B-쇄 폴리펩티드 사이의 디설피드 결합의 파괴로 인한 A-쇄 폴리펩티드의 소실이 관찰되었으며, 단량체는 검출되지 않았다. 도 5는 GSH의 부재 하에, A-쇄 폴리펩티드의 상실이 부모 (이량체 24의 스톡 용액)의 1% 미만이었음을 보여준다. 도 6은 GSH의 존재 하에, A-쇄 폴리펩티드의 상실이 부모 (이량체 24의 스톡 용액)의 1% 미만이었음을 보여준다. 이량체 24에 대한 0시간 대조군 또는 스톡 용액에서 대사물은 관찰되지 않았다. 산성 조건을 사용하는 새로운 켄칭 절차는 디설피드 교환을 적절하게 중단시켰다.

서열 표		
SEQ ID NO:	설명	서열
1	호모 사피엔스 인슐린 A 쇠	GIVEQCCTSICSLYQLENYCN
2	호모 사피엔스 인슐린 B 쇠	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT
3	인공 서열 인슐린 A 쇠 X <sub>2</sub> : 이소류신 또는 트레오닌; X <sub>3</sub> : 발린, 글리신, 또는 류신; X <sub>8</sub> : 트레오닌 또는 히스티딘; X <sub>17</sub> : 글루탐산 또는 글루타민; X <sub>19</sub> : 티로신, 4-메톡시-페닐알라닌, 알라닌, 또는 4-아미노 페닐알라닌; X <sub>23</sub> : 아스파라긴 또는 글리신;	GX <sub>2</sub> X <sub>3</sub> EQCCX <sub>8</sub> SICSLYQLX <sub>17</sub> NX <sub>19</sub> CX <sub>23</sub>
4	인공 서열 인슐린 B 쇠 X <sub>25</sub> : 히스티딘 또는 트레오닌; X <sub>29</sub> : 알라닌, 글리신 또는 세린; X <sub>30</sub> : 히스티딘, 아스파르트산, 글루탐산, 호모시스테인, 또는 시스테인; X <sub>31</sub> : 프롤린 또는 리신; 및 X <sub>32</sub> : 프롤린 또는 리신, 단 X <sub>31</sub> 또는 X <sub>32</sub> 중 적어도 1개: 리신	X <sub>25</sub> LCGX <sub>29</sub> X <sub>30</sub> LVEALYLVCGERGFX <sub>27</sub> YTX <sub>31</sub> X <sub>32</sub>
5	X <sub>22</sub> : 페닐알라닌 또는 테스아미노-페닐알라닌; X <sub>25</sub> : 히스티딘 또는 트레오닌; X <sub>26</sub> : 글리신 또는 류신; X <sub>27</sub> : 페닐알라닌 또는 아스파르트산; X <sub>29</sub> : 알라닌, 글리신, 또는 세린; X <sub>30</sub> : 히스티딘, 아스파르트산, 글루탐산, 호모시스테인, 또는 시스테인;	X <sub>22</sub> VNQX <sub>25</sub> X <sub>26</sub> CGX <sub>29</sub> X <sub>30</sub> LVEALYLVCGERGFX <sub>27</sub> YTX <sub>31</sub> X <sub>32</sub> X <sub>33</sub> X <sub>34</sub> X <sub>35</sub>

[0612]

	X <sub>31</sub> : 아스파르트산, 프롤린, 또는 리신; X <sub>32</sub> : 리신 또는 프롤린; X <sub>33</sub> : 트레오닌, 알라닌, 또는 absent; X <sub>34</sub> : 아르기닌 또는 부재함; 및 X <sub>35</sub> : 아르기닌 또는 부재함; 단 X <sub>31</sub> 또는 X <sub>32</sub> 중 적어도 1개: 리신	
6	인공 서열 인슐린 리스프로 B 쇠	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT
7	인공 서열 인슐린 글라진 A 쇠	GIVEQCCTSICSLYQLENYCG
8	인공 서열 인슐린 글라진 B 쇠	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRR
9	인공 서열 인슐린 아스파르트 B 쇠	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTDKT
10	인공 서열 B:des30	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK
11	인공 서열 A: Y19A	GIVEQCCTSICSLYQLENAACN

[0613]

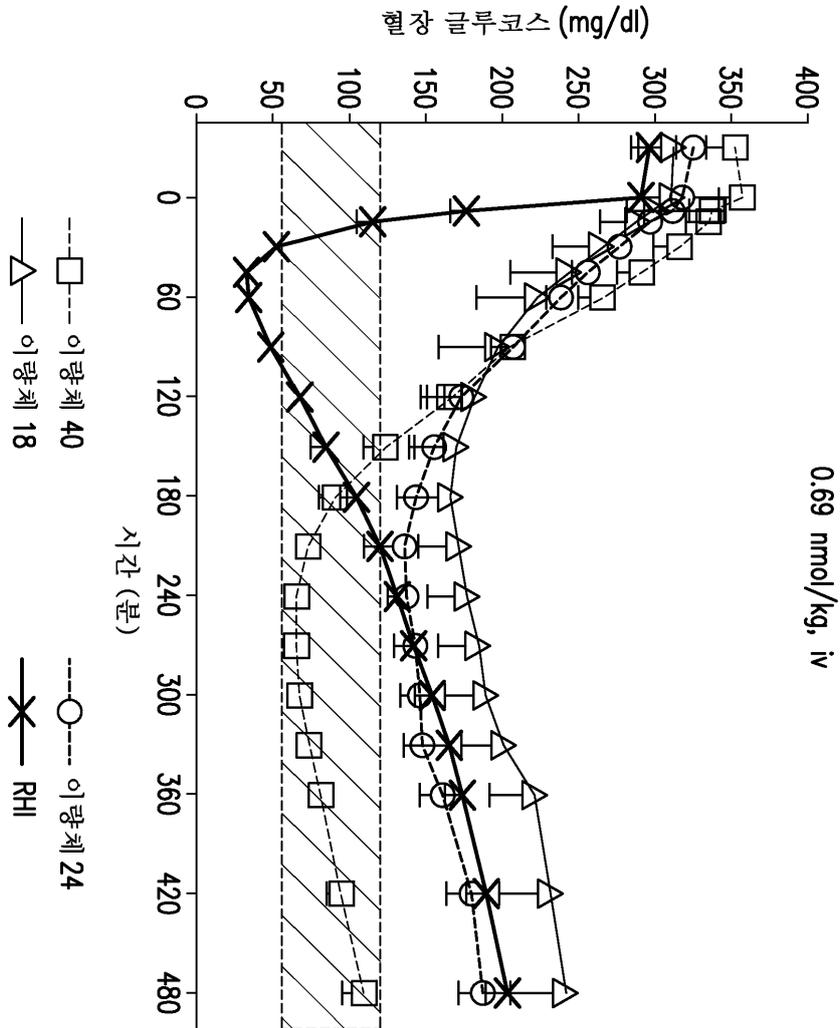
[0614]

본 발명은 예시된 실시양태를 참조하여 본원에 기재되어 있으나, 본 발명이 이에 제한되지 않는 것으로 이해되어야 한다. 관련 기술분야의 통상의 기술을 갖고 본원에 교시에 따를 수 있는 자는 본 발명의 범위 내에서 추

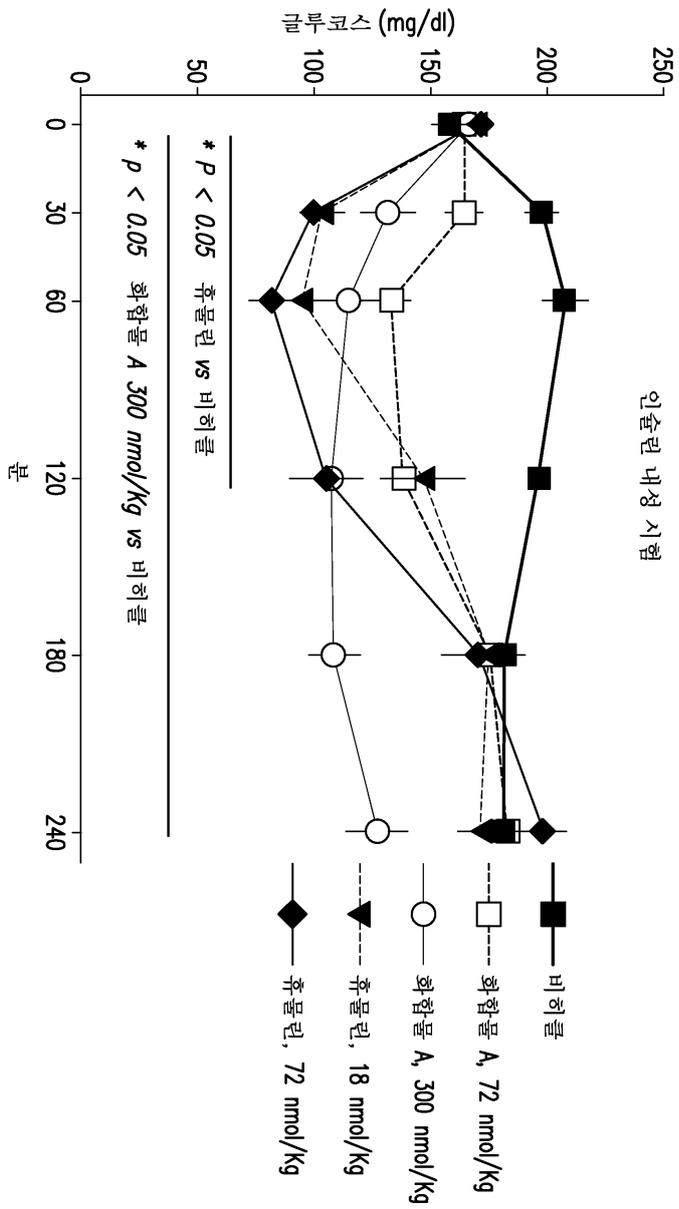
가의 변형 및 실시양태를 인지할 것이다. 따라서, 본 발명은 오직 본원에 첨부된 청구범위에 의해서만 제한된다.

도면

도면1

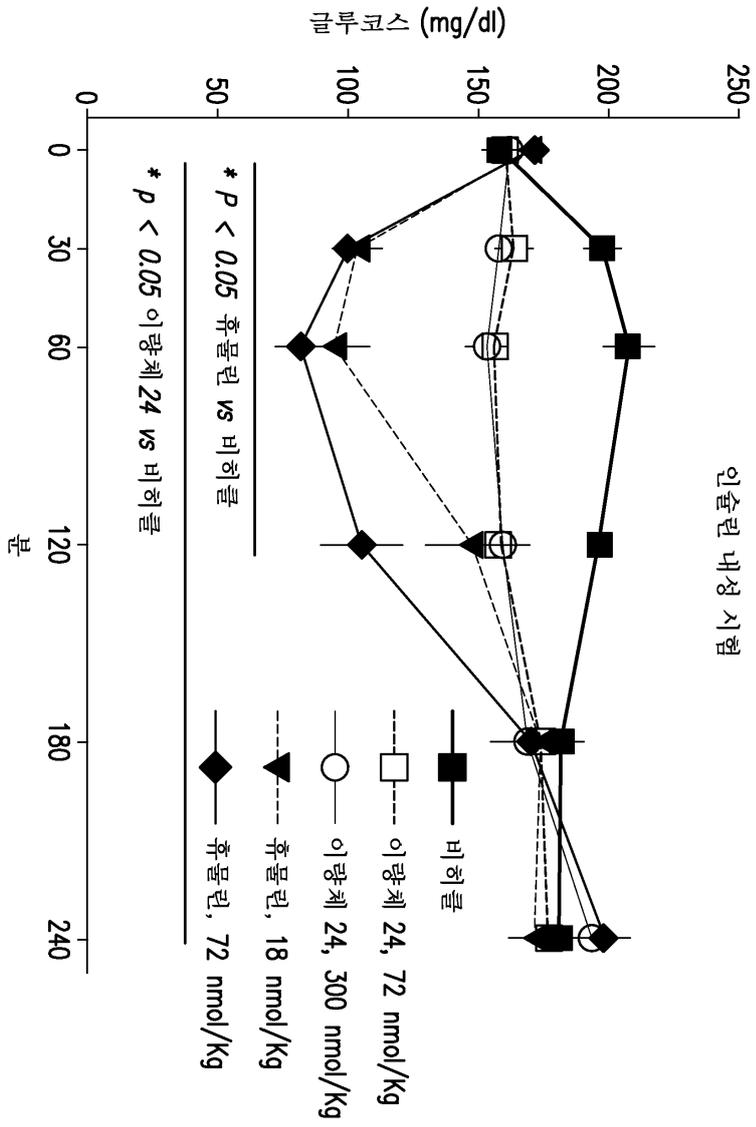


도면2a

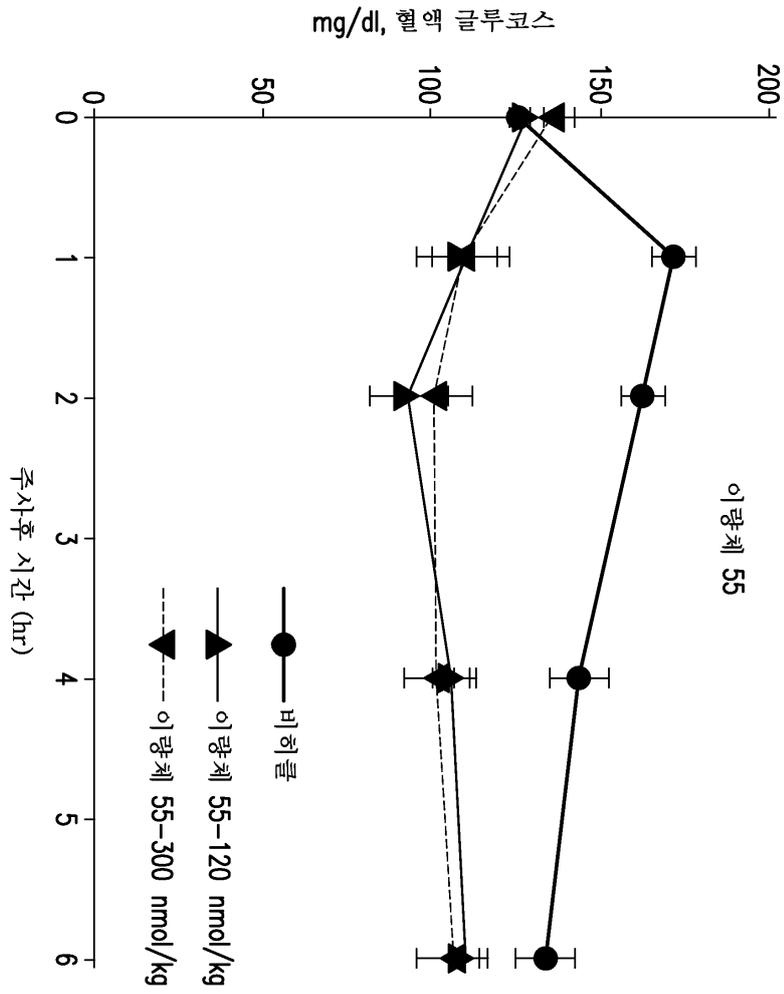




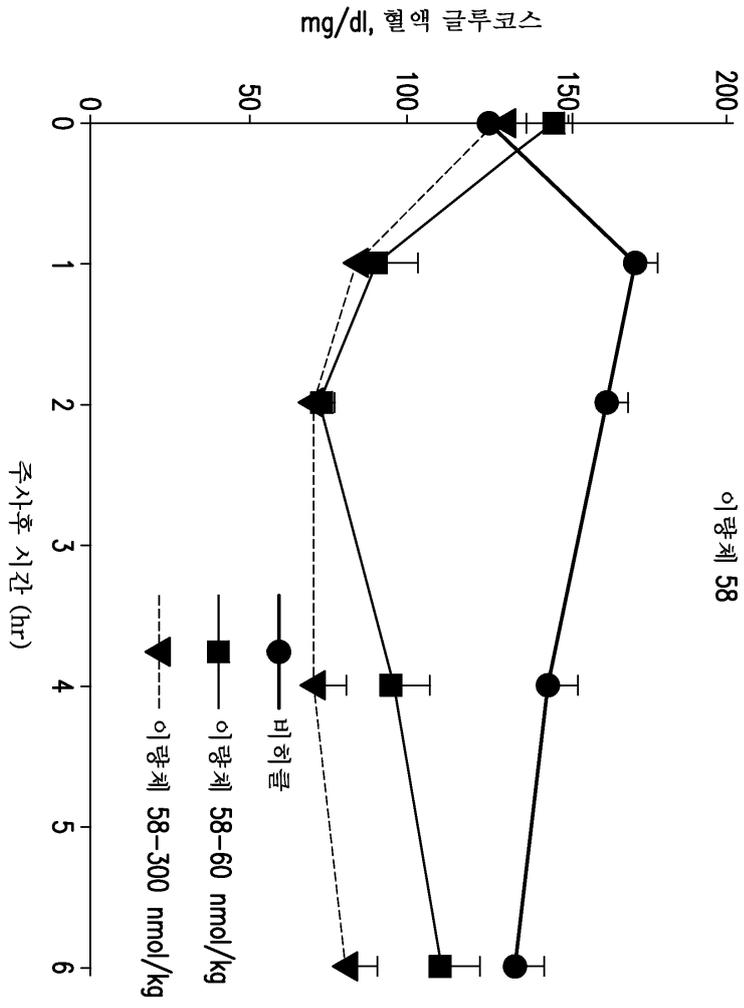
도면2c



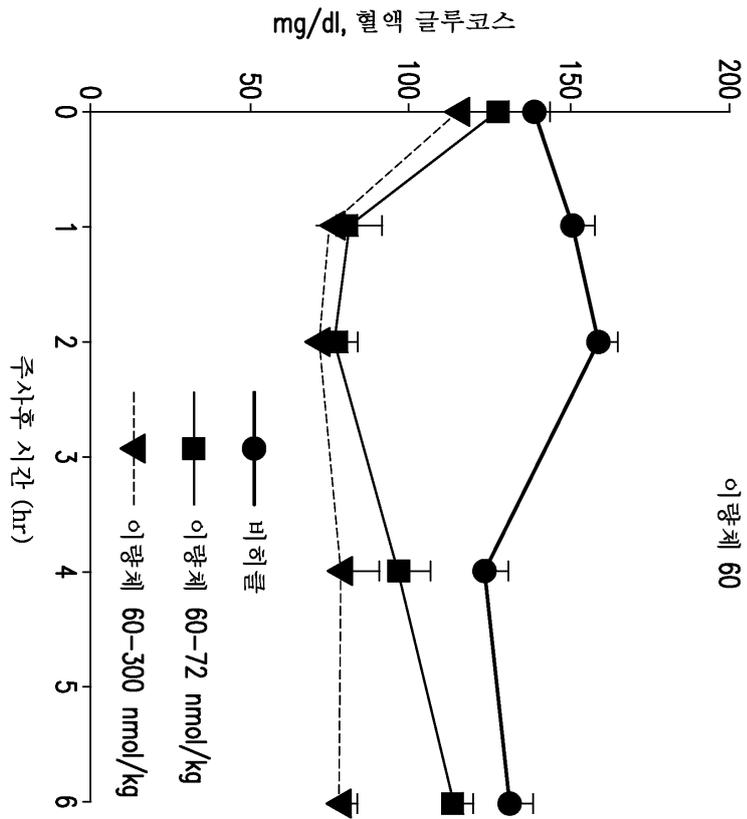
도면2d



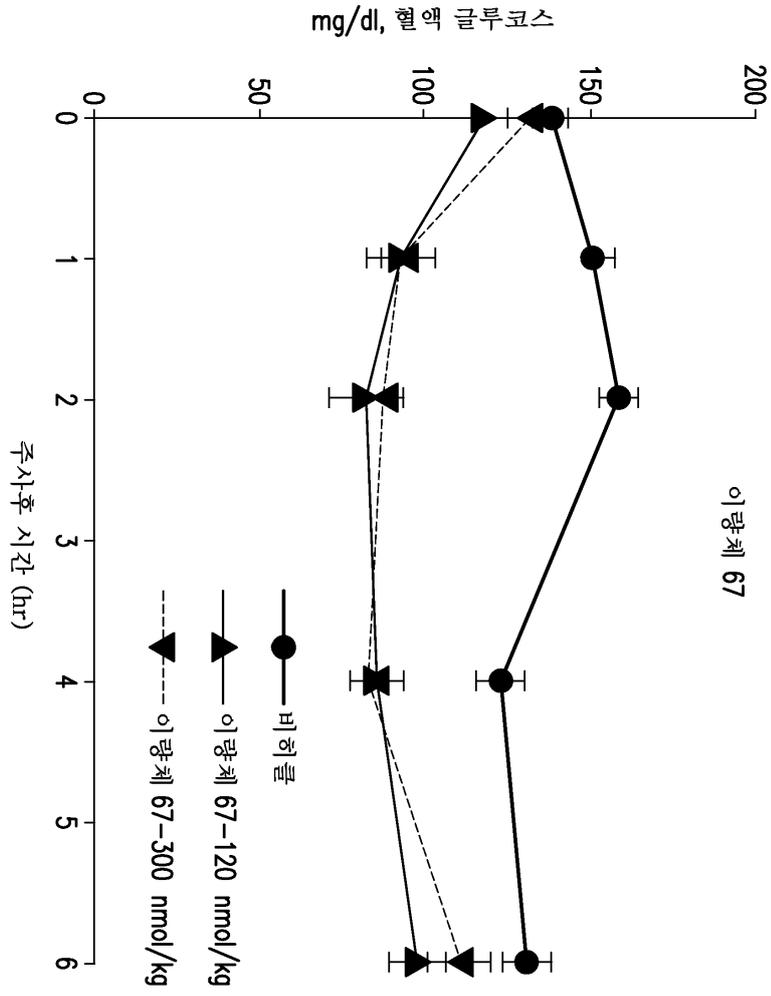
도면2e



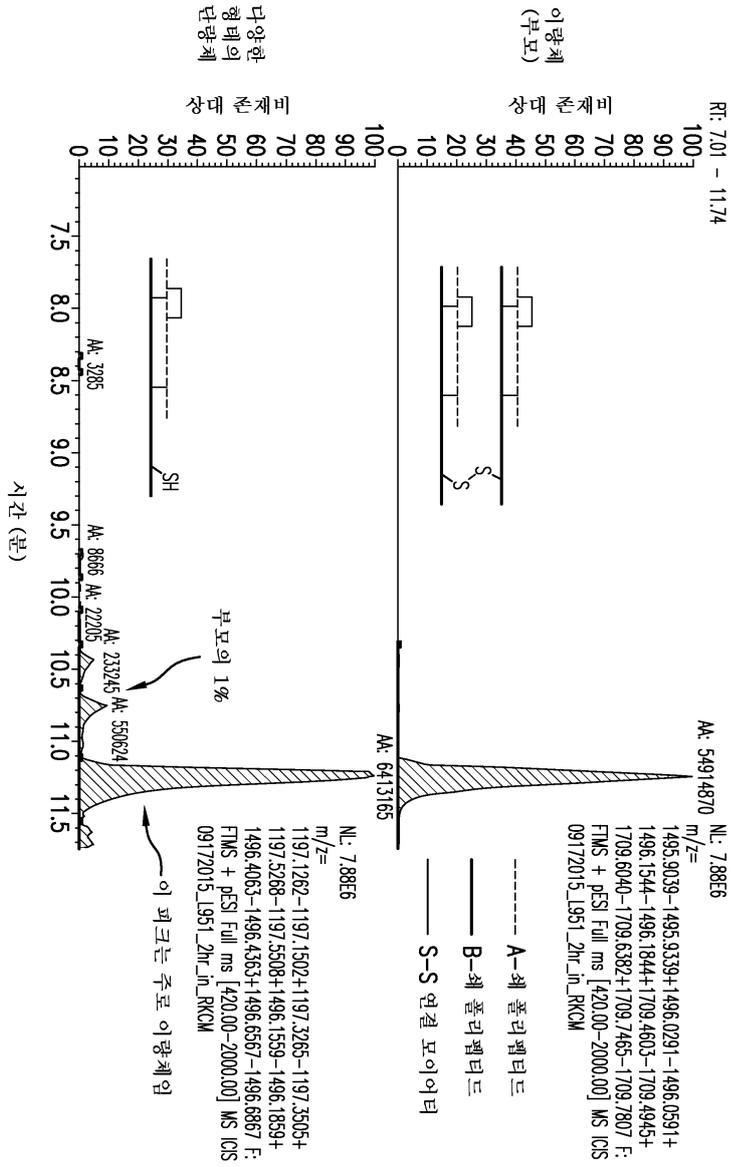
도면2f



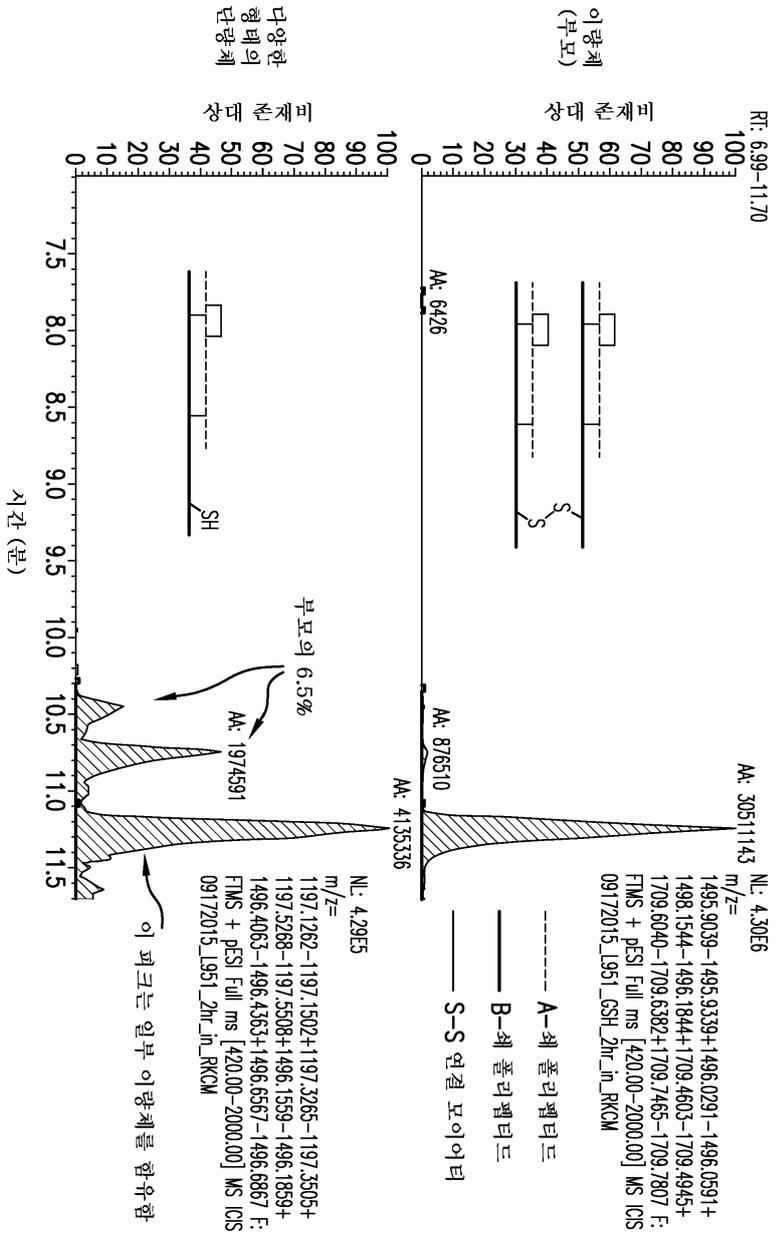
도면2g



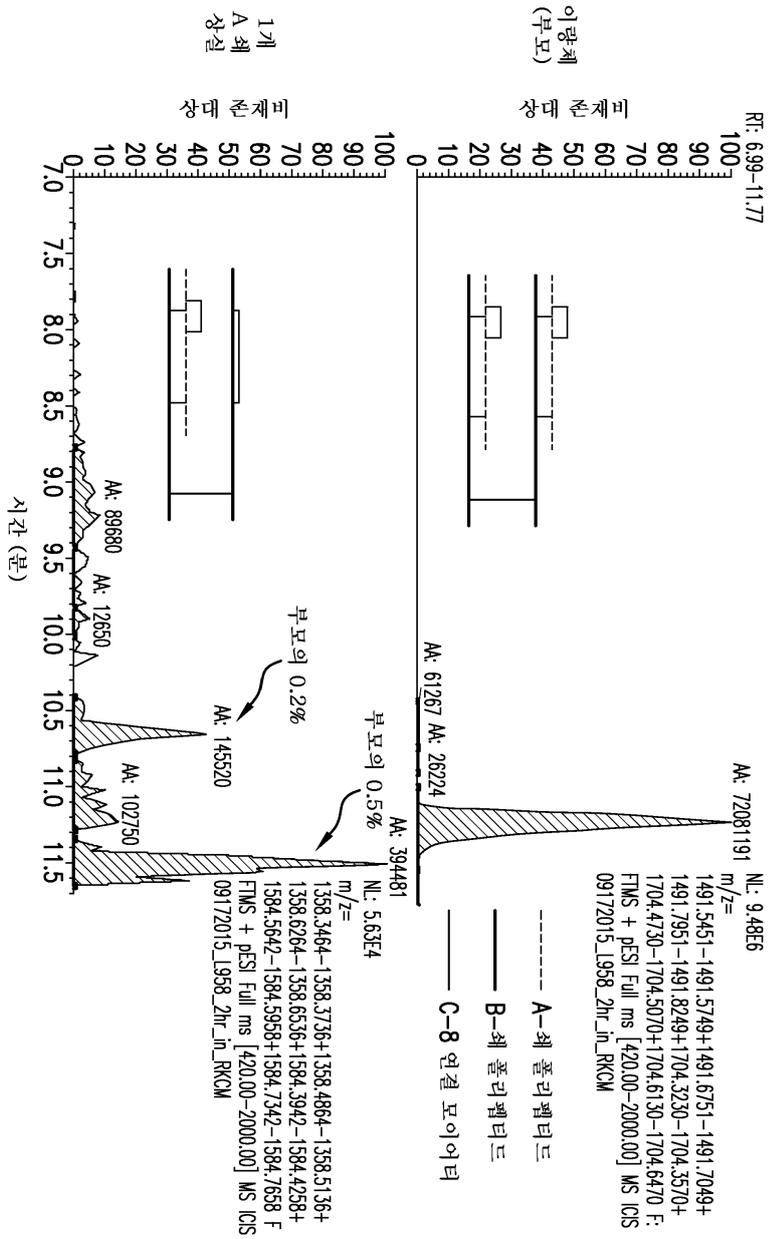
도면3



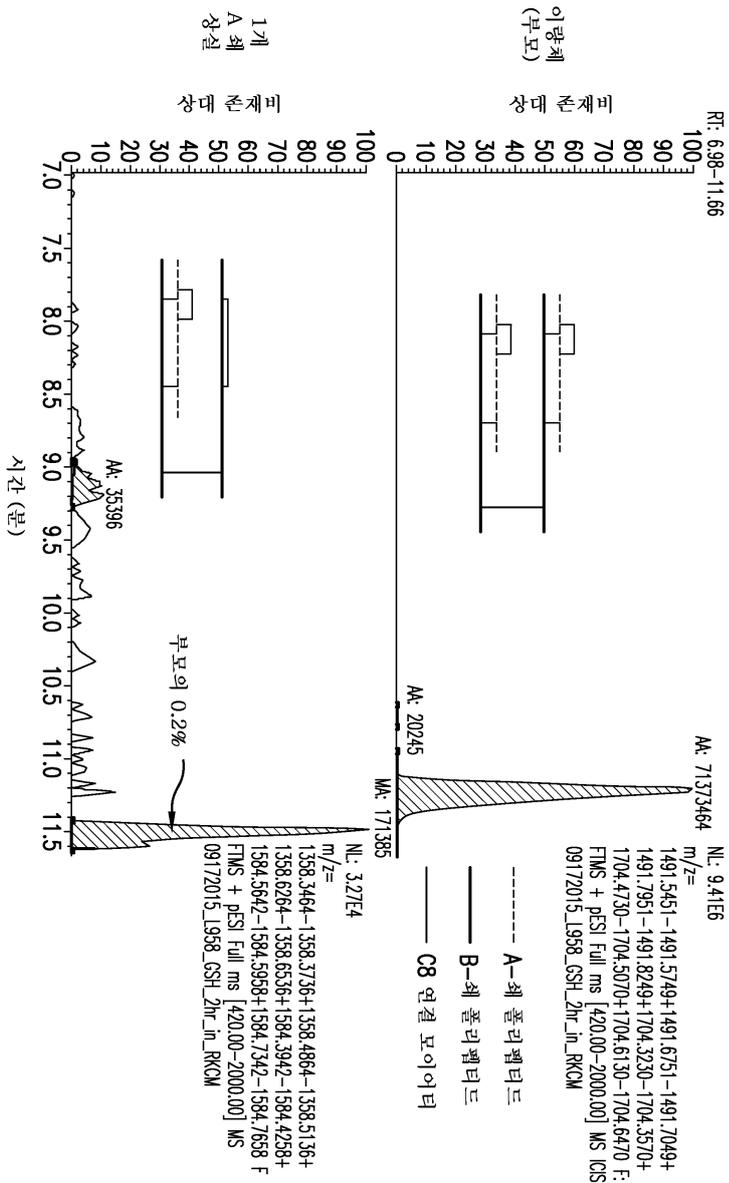
도면4



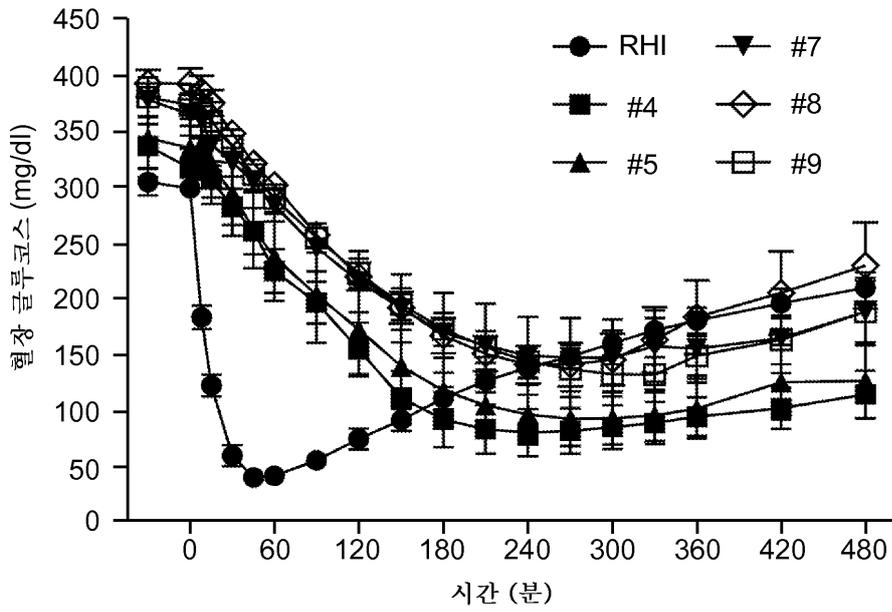
도면5



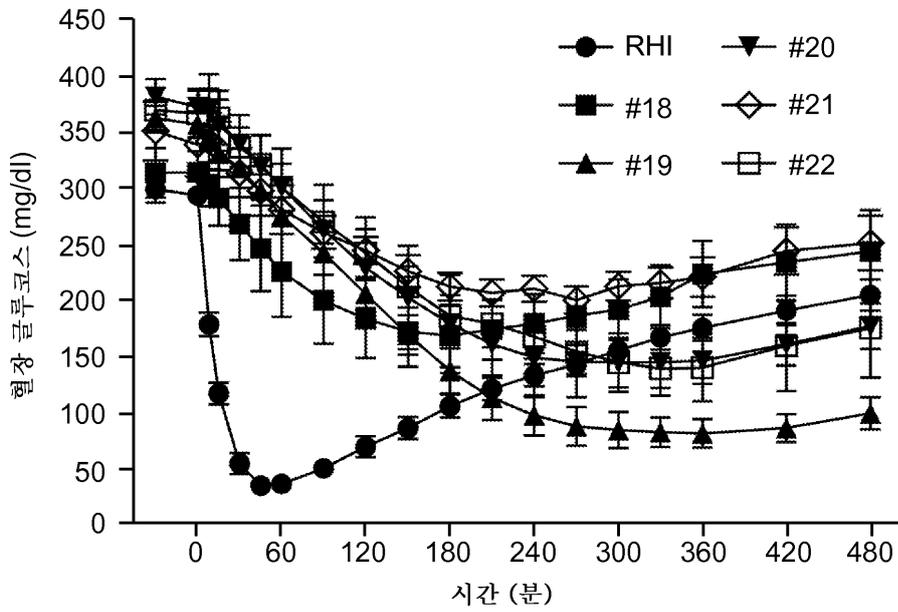
도면6



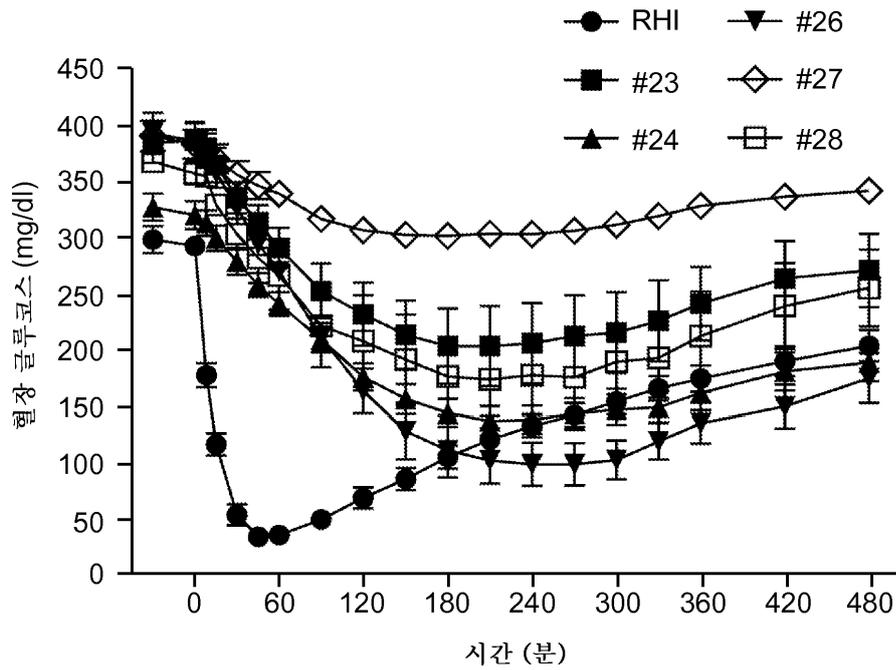
도면7a



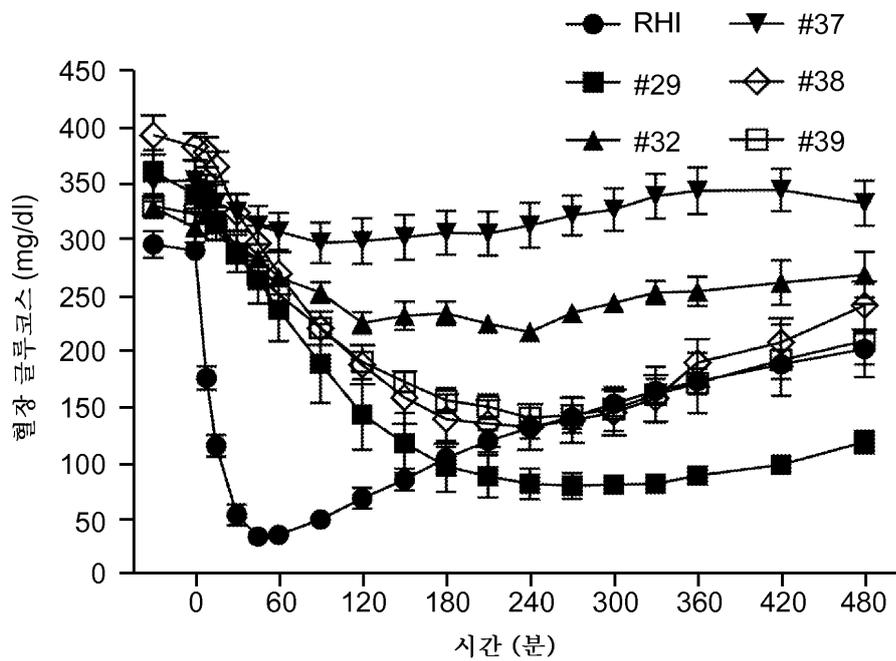
도면7b



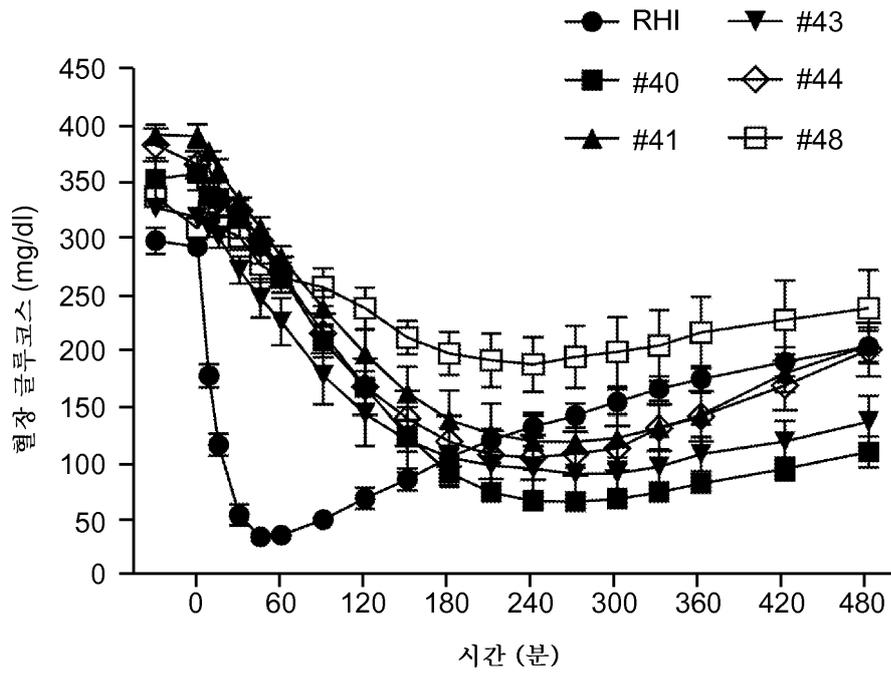
도면7c



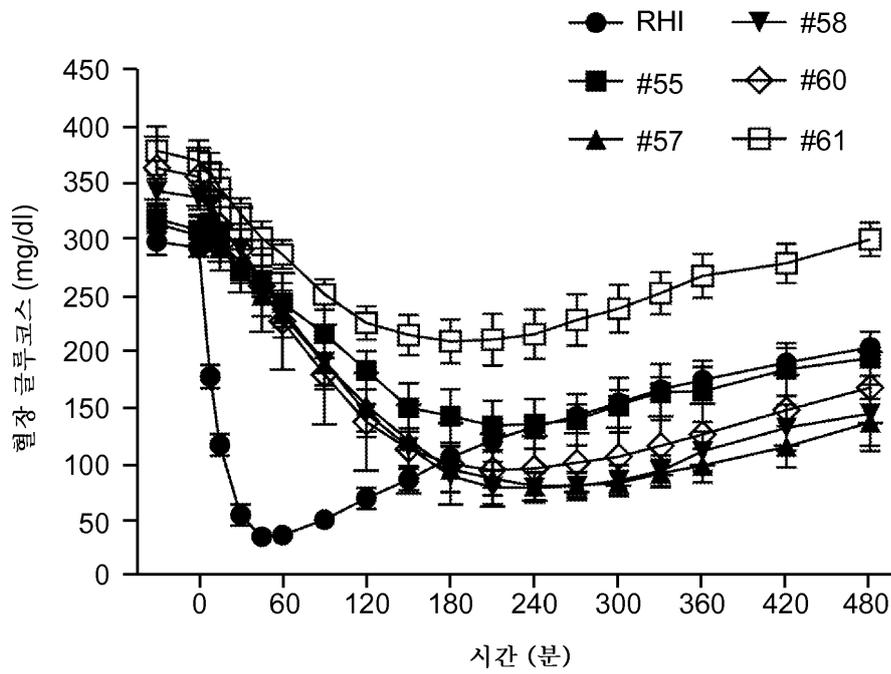
도면7d



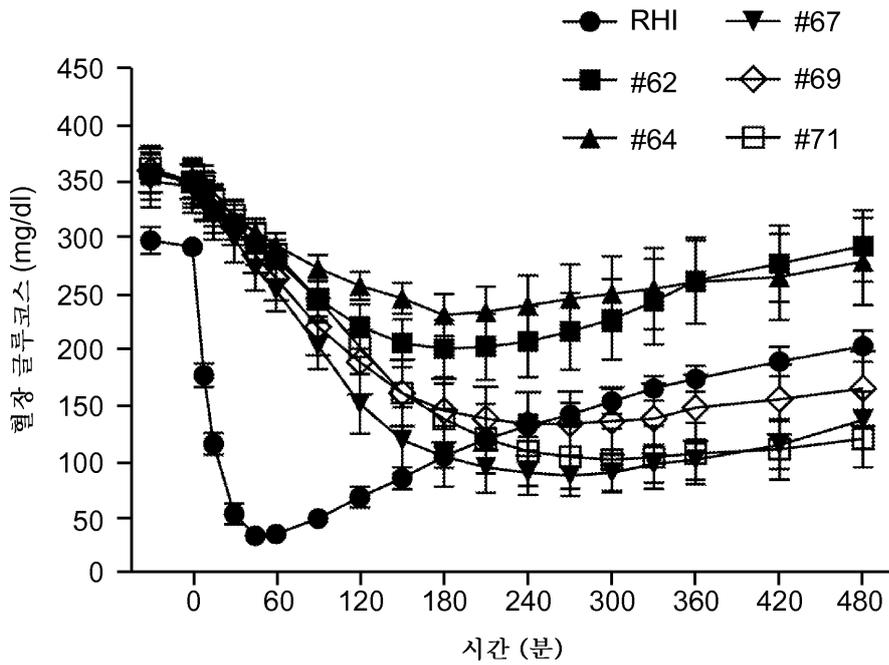
도면7e



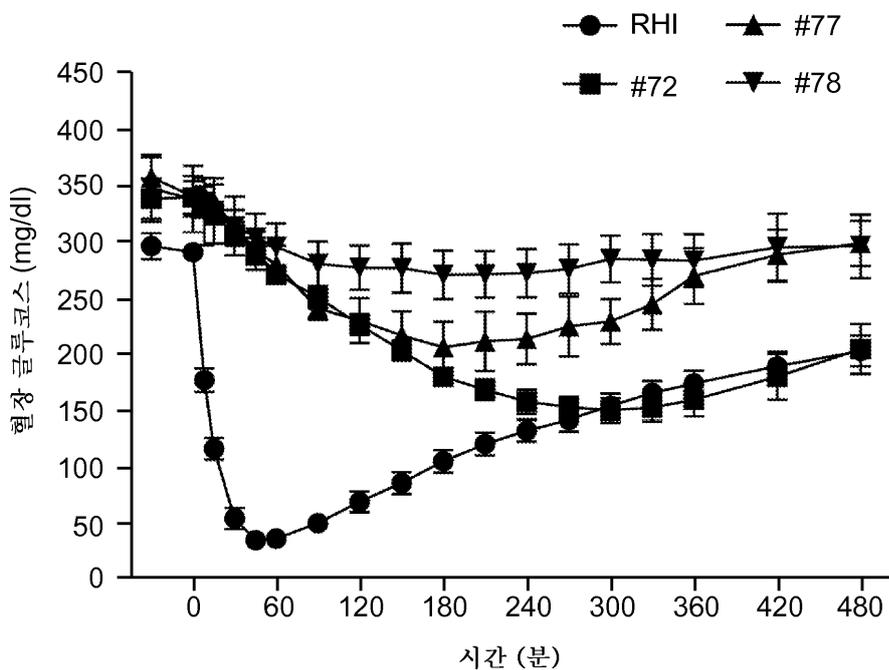
도면7f



도면7g



도면7h



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Lin, Songnian  
 Yan, Lin  
 Huo, Pei

Pissarnitski, Dmitri  
Feng, Danqing  
Nargund, Ravi  
Zhu, Yuping  
Kekec, Ahmet  
Madsen-Duggan, Christina B  
Shi, Zhi-Cai  
Wu, Zhicai  
Mu, Yingjun

<120> INSULIN RECEPTOR PARTIAL AGONISTS

<130> 23876

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

1                    5                    10                    15

Glu Asn Tyr Cys Asn

20

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

1                    5                    10                    15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

20

25

30

<210> 3

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Insulin A chain mutiens

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is isoleucine or threonine

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is valine, glycine, or leucine

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is threonine or histidine

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> Xaa is glutamic acid or glutamine

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (19)..(19)

<223> Xaa is tyrosine, 4-methoxy-phenylalanine, alanine, or 4-amino phenylalanine

<220><221> misc\_feature

<222> (21)..(21)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (23)..(23)

<223> Xaa is asparagine or glycine

<400> 3

Gly Xaa Xaa Glu Gln Cys Cys Xaa Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu

1                    5                    10                    15

Xaa Asn Xaa Cys Xaa

20

<210> 4

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Insulin B chain variants  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa is histidine or threonine

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(25)  
 <223> With the proviso that at least one of 24 or 25 is lysine

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa is alanine, glycine, or serine

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa is histidine, aspartic acid, glutamic acid, homocysteic acid,  
 or cysteic acid

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Xaa is proline or lysine

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> Xaa is proline or lysine

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (25)..(25)  
 <223> Xaa is proline or lysine

<400> 4  
 Xaa Leu Cys Gly Xaa Xaa Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Glu Arg Gly Phe Xaa Tyr Thr Xaa Xaa  
                   20                    25

<210> 5  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Insulin B chain variants

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is phenylalanine or desamino-phenylalanine

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(32)

<223> With the proviso that at least one of 28 or 29 is lysine

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is histidine or threonine

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is glycine or leucine

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa is alanine, glycine, or serine

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is histidine, aspartic acid, glutamic acid, homocysteic acid,  
or cysteic acid

<220><221> MISC\_FEATURE

<

222> (25)..(25)

<223> Xaa is phenylalanine or aspartic acid

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> Xaa is aspartic acid, proline, or lysine

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> Xaa is lysine or proline

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (30)..(30)

<223> Xaa is threonine, alanine, or absent

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> Xaa is arginine or absent

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (32)..(32)

<223> Xaa is arginine or absent

<400> 5

Xaa Val Asn Gln Xaa Xaa Cys Gly Xaa Xaa Leu Val Glu Ala Leu Tyr

1	5	10	15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Xaa Tyr Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa			
	20	25	30

<210> 6

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Insulin lispro B chain

<400> 6

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

1	5	10	15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Lys Pro Thr			
	20	25	30

<210> 7

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Insulin glargine A chain

<400> 7

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

1	5	10	15
Glu Asn Tyr Cys Gly			
	20		

<210> 8

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Insulin glargine B chain

<400> 8

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

1                    5                    10                    15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg

                  20                    25                    30

<210> 9

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Insulin aspart B chain

<400> 9

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

1                    5                    10                    15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Asp Lys Thr

                  20                    25                    30

<210> 10

<211>

29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Des30 B chain

<400> 10

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

1                    5                    10                    15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys

                  20                    25

<210> 11

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> A chain Y19A

<400> 11

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

1

5

10

15

Glu Asn Ala Cys Asn

20