



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0080747
(43) 공개일자 2020년07월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/62 (2006.01) C12P 21/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/62 (2013.01)
C12P 21/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0170529
(22) 출원일자 2018년12월27일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
주식회사 폴루스
인천광역시 연수구 송도과학로 32, 엠1202호(송
도동, 송도테크노파크아이티센터)
(72) 발명자
김진환
인천광역시 연수구 송도미래로 9, 2동 403호 (송
도동, 비알씨(주)연구소)
변승민
경기도 부천시 상일로 71, 1805동 405호 (상동,
반달마을건영, 동아, 선경아파트)
(뒤편에 계속)
(74) 대리인
이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 인슐린 전구체의 인슐린 효소 전환용 조성물 및 이를 이용하여 인슐린 전구체를 인슐린으로 전환하는 방법

(57) 요약

본 발명은 염화칼슘(Calcium Chloride), 글라이신(Glycine) 및 프롤린(Prolin)으로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상; 및 트립신 및/또는 카르복시펩티데이즈 B를 포함하는, 프로인슐린 또는 프로인슐린 아날로그를 인슐린 또는 인슐린 아날로그로 전환하는 효소 전환 반응용 조성물 및 상기 조성물을 이용하여 프로인슐린 또는 프로인슐린 아날로그를 인슐린 또는 인슐린 아날로그로 전환하는 방법에 관한 것으로, 본 발명을 이용하면 인슐린 단백질의 구조적 안정성과 효소의 안정성을 동시에 증가시켜, 효소 전환의 수율 및 인슐린의 순도를 현저히 향상시킬 수 있는 바, 인슐린 생산 공정에 유용하다.

(52) CPC특허분류

C12Y 304/17002 (2013.01)

C12Y 304/21004 (2013.01)

(72) 발명자

조문정

인천광역시 남동구 구월로 192, 1507동 2604호 (구월동, 구월힐스테이트롯데캐슬골드아파트)

김현욱

인천광역시 연수구 송도문화로28번길 81, 109동 1504호 (송도동, 송도더샵그린스퀘어)

김동규

인천광역시 연수구 송도문화로84번길 24, 206동 1004호 (송도동, 송도에듀포레푸르지오)

명세서

청구범위

청구항 1

염화칼슘(Calcium Chloride), 글라이신(Glycine) 및 프롤린(Prolin)으로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상; 및 트립신 및/또는 카르복시펩티데이즈 B를 포함하는, 인슐린 전구체를 인슐린으로 전환하는 효소 전환용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 완충용액을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 완충용액은 1~100mM의 Tris-HCl 또는 1~100mM의 붕산염인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 트립신은 인슐린 전구체 대비 1/1,000~1/40,000 의 중량비로 포함되고(되거나), 상기 카르복시펩티데이즈 B는 인슐린 전구체 대비 1/600~1/20,000의 중량비로 포함되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 인슐린은 인슐린 글라진인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물은 염화칼슘(Calcium Chloride), 글라이신(Glycine) 및 프롤린(Prolin)를 모두 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제1항 또는 제6항에 있어서, 염화칼슘은 5~30 mM, 글라이신은 3~60 mM, 프롤린은 20~80 mM로 포함되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 조성물에 인슐린 전구체를 첨가하고 반응시키는 단계를 포함하는, 인슐린 전구체를 인슐린으로 전환하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 염화칼슘은 5~30 mM, 글라이신은 3~60 mM, 프롤린은 20~80 mM로 포함되는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 인슐린 전구체의 인슐린 효소 전환용 조성물 및 이를 이용하여 인슐린 전구체를 인슐린으로 전환하는 방법에 관한 것으로, 더 상세하게는 인슐린 전구체를 인슐린으로 전환하는 효소 반응에서 인슐린의 수율과 순도를 향상시키기 위해 효소와 함께 첨가되는 인슐린 효소 전환용 조성물 및 이를 이용하여 인슐린 전구체를 인슐린으로 전환하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 당뇨병은 고혈당을 특징으로 하는 대사질환으로 유전적 요인과 환경적 요인의 복합적인 작용에 의해 발생한다. 당뇨병은 1형 당뇨병, 2형 당뇨병, 임신성 당뇨병 및 고혈당증 등의 상태를 유발하고, 췌장이 불충분한 양의 인슐린을 생성하거나 인체의 세포가 인슐린에 적절하게 반응하지 못해 포도당을 흡수하는 능력이 저하된 대사장애를 의미하며, 그 결과 포도당이 혈액 중에 축적되어 나타난다.

[0004] 당뇨병을 치료하기 위한 가장 대표적인 방법으로는 인슐린을 투여하여 환자의 혈당을 정상 수준으로 조절하는 방법이 있다. 인슐린은 인체의 췌장에서 분비되는 혈당 조절 호르몬으로, 혈액 내의 잉여 포도당을 세포로 옮겨 세포에 에너지를 공급하는 한편 혈당을 정상 수준으로 유지시켜 주는 역할을 한다.

[0005] 재조합 단백질 제조 기술이 발달하면서 다양한 종류의 인슐린 제품이 출시되었으며, 그 반응성에 따라 크게 초속효성 인슐린, 속효성 인슐린, 중시간형 인슐린, 혼합형 인슐린 및 지속형 인슐린 5가지 종류로 구분할 수 있다. 이 중 가장 신속한 반응성을 나타내는 초속효성 인슐린은 약효가 빠르게 나타나 1분에서 20분 사이에 작용하기 시작하여, 1시간 후 즈음 최고의 약효를 보이고 3시간 내지 5시간 효과가 지속되는 특징이 있으며, 대표적인 제품으로는 인슐린 아스파르트(NovoRapid[®]), 인슐린 리스프로(Humalog[®]), 인슐린 글루리신(Apidra[®])이 있다. 다음으로 빠른 반응성을 나타내는 인슐린은 속효성 인슐린으로, 속효성 인슐린은 투여 후 약 30분 후에 혈당을 낮추기 시작하여 2시간에서 4시간 사이에 최고의 약효를 보이고 6시간 내지 8시간 효과가 지속된다. 대표적인 속효성 인슐린으로는 Actrapid[®], Humilin[®] R, Hypurin Neutral 등이 있다. 중시간형 인슐린은 약효를 늦추기 위하여 프로타민이나 아연을 더한 물질로, 주사 후 약 1시간 30분부터 작용하기 시작하여 4시간에서 12시간 사이에 약효가 최대에 달하며, 16시간에서 24시간 지속되고, 대표적인 제품으로는 Protaphane[®], Humulin[®] NPH, Hypurin Isophane[®]가 있다. 혼합형 인슐린은 초속효성 인슐린이나 속효성 인슐린을 중시간형 인슐린과 미리 섞어 두 종류의 인슐린을 한 번의 주사로 쉽게 투여할 수 있도록 한 것으로, NovoMix[®] 30 (30% 인슐린 아스파르트, 70% 프로타민 결정 인슐린 아스파르트), Humalog[®] Mix 25 (25% 인슐린 리스프로, 75% 인슐린 리스프로 프로타민 현탁), Humalog[®] Mix 50 (50% 인슐린 리스프로, 50% 인슐린 리스프로 프로타민 현탁)가 시중에 판매되고 있다. 마지막으로 지속형 인슐린은 하루에 한 번 혹은 두 번 주사하며 약효가 24시간까지 지속되는 인슐린으로 이는 보통 기저 인슐린으로 사용되는데, Lantus[®] (인슐린 글라진 insulin glargine, EP 0368187), Levemir[®] (인슐린 디테미어 insulin detemir, US 5,750,497), Tresiba[®] (인슐린 디글루텍 insulin degludec, US 7,615,532)가 판매되고 있다.

[0006] 한편, 인슐린은 생산 경로에 따라 다양한 번역 후 변형 과정을 거치게 된다. 생산과 분비는 독립적이며, 제조된 인슐린은 분비를 위해 저장된다. C-펩타이드와 성숙 인슐린은 생물학적으로 활성을 나타내게 된다.

[0007] 포유류에서 인슐린은 췌장의 베타 세포에서 합성되며, 인슐린은 두 개의 폴리펩타이드 사슬, 즉 A 쇄와 B 쇄로 구성되어 있고, 이들은 이황화 결합으로 연결되어 있다. 초기 인슐린은 베타 세포에서 프리프로인슐린이라 불리는 단일한 폴리펩타이드로 합성된다. 프리프로인슐린은 신생 폴리펩타이드 사슬을 조면소포체(rough endoplasmic reticulum)로 이동시키는 24개 아미노산 잔기의 신호 펩타이드를 포함하고 있다. 신호 펩타이드는 조면소포체의 내강으로 이동을 유도한 후 절단되어 프로인슐린이 형성된다. 조면소포체에서 프로인슐린은 정확한 형태로 접힘(folding)이 일어나고 3개의 이황화 결합을 형성한다. 소포체에서 조립된 후 5~10분 후, 프로인슐린은 미성숙 과립이 형성되는 트랜스-골지 네트워크로 수송된다.

[0008] 프로인슐린은 엑소프로테아제 카르복시펩티데이즈 E와 프로호르몬 컨버타아제(PC1, PC2)로 알려진 세포 엔도펩티다아제의 활성에 의해 활성형 인슐린으로 성숙된다. 엔도펩티다아제는 2개의 위치에서 절단을 유도하여 C-펩

타이드라 불리는 단편을 방출하고, 2개의 펩타이드 쇠인 B 쇠 및 A 쇠는 2개의 이황화 결합으로 연결되게 된다. 절단 부위는 각각 한 쌍의 염기성 잔기(라이신(Lys)-64와 아르지닌(Arg)-65, 아르지닌(Arg)-31과 아르지닌(Arg)-32) 뒤에 위치한다. C-펩타이드가 절단된 후에, 이들 2 쌍의 염기성 잔기는 카르복시펩티데이즈에 의해 제거된다. C-펩타이드는 프로 인슐린의 중앙 부에 위치하며, 프로인슐린의 일차 구조는 순서에 따라 "B-C-A"에 해당한다(B 쇠와 A 쇠는 질량을 바탕으로 동정되었고, C-펩타이드는 추후에 발견되었다.).

[0009] 만들어진 성숙 인슐린(활성형 인슐린)은 성숙 과립 내에 포장되어 있다가 대사신호(예: 류신(Leu), 아르지닌(Arg), 포도당, 만노오즈)와 미주 신경 자극에 의해 세포에서 순환계로 분비되게 된다.

[0010] 당뇨를 치료하기 위해서는 활성형 인슐린을 투여하게 되는데, 활성형 인슐린을 제조하기 위한 유전자 재조합 인슐린 제조 기술로, 우선, 일라이 릴리(Eli Lilly)사는 대장균을 이용하여 A 쇠와 B 쇠를 각각 발현시키고, *in vitro*에서 혼합시켜 이황화 결합을 만들고 A 쇠와 B 쇠를 연결시키는 방법을 사용하였으나, 생산효율이 좋지 않다는 문제점이 있었다. 이 후, 일라이 릴리(Eli Lilly)사는 프로인슐린을 발현시키고 *in vitro* 조건으로 이황화 결합을 만들고 나서, 트립신과 카르복시펩티다제 B로 C-펩타이드를 잘라내어 인슐린을 만드는 방법으로 전환하였다.

[0011] 노보 노디스크(Novo Nordisk)사는 B 쇠와 A 쇠를 염기성의 아미노산 2개로 연결한 미니프로인슐린을 효모에서 발현시키고, 실험실적 조건으로 트립신 처리하여 인슐린을 수득하는 방법을 개발하였는데, 이 방법은 미니프로인슐린이 발현, 분비되는 과정에서 이황화 결합을 형성시키는 장점을 가지고 있고, 배지 중에 분비되기 때문에 분리 및 정제가 용이하다는 장점이 있으나, 대장균만큼 대규모의 생산에는 어려움이 있었다.

[0012] 유전자 재조합 인슐린의 신규한 제조방법의 개발은 이후에도 적극적으로 진행되었는데, 헥스트사는 신규 인슐린 유도체 또는 프리프로인슐린을 대장균에서 발현시키고, *in vitro* 조건에서 이황화 결합을 형성시키고, 리실렌도 펩티다제 (lysylendopeptidase) 또는 클로스트리파인(clostripain)과 카르복시펩티다제 (carboxypeptidase) B로 처리하여 인슐린을 수득하는 방법을 개발하였고, 바이오테크놀로지 제너럴 코퍼레이션(BIO-TECHNOLOGY GENERAL CORP.)사가 대장균에서 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(SOD)에 프로인슐린을 연결한 융합단백질을 발현시켜 발현효과와 *in vitro* 조건에서의 이황화 결합 형성 효율을 향상시켰다. 인슐린으로 변환은 트립신과 카르복시펩티데이즈 B로 행하였다. 이와 같이, 유전자 재조합 인슐린의 제조방법은 많은 시도가 있고, 발현 효율, 이황화 결합의 형성 효율, 인슐린으로 변환 방법의 관점에서 개량되고 있다(KR 10-2001-7013921).

[0014] 본 발명자들은 천연 인슐린에 비해 생체 내 반감기가 증가되어 지속성이 향상된 인슐린 글라진 전구체를 인슐린 글라진으로 효소 전환시키는 공정에 적합한 반응 조성물 개발을 위해 예의 노력하였고, 그 결과, 인슐린 및 인슐린 유사체들의 구조적 안정성을 향상시키고 효소의 안정성을 증가시키는 효소 전환 반응 조성물을 고안하고 상기 효소 전환 반응 조성물을 이용하여 효소 전환 반응을 진행하는 경우 인슐린 글라진의 수율과 순도가 증가하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0016] (특허문헌 0001) EP 0368187
(특허문헌 0002) US 5,750,497
(특허문헌 0003) US 7,615,532
(특허문헌 0004) KR 10-2001-7013921

발명의 내용

해결하려는 과제

[0017] 본 발명의 목적은 인슐린 전구체를 인슐린으로 전환하는 효소 공정에 적합한 효소 전환용 조성물 및 상기 조성

물을 이용한 효소 전환 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0018] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 염화칼슘(Calcium Chloride), 글라이신(Glycine) 및 프롤린(Prolin)으로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상; 및 트립신 및/또는 카르복시펩티데이즈 B를 포함하는, 인슐린 전구체를 인슐린으로 전환하는 효소 전환용 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명은 또한, 상기 조성물에 인슐린 전구체를 첨가하고 반응시키는 단계를 포함하는, 인슐린 전구체를 인슐린으로 전환하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명에 따른 인슐린 전구체의 인슐린 효소 전환용 조성물 및 이를 이용하여 인슐린 전구체를 인슐린으로 전환하는 방법을 이용하면, 인슐린 단백질의 구조적 안정성과 효소의 안정성을 동시에 증가시켜, 효소 전환의 수율 및 인슐린의 순도를 현저히 향상시킬 수 있는바, 인슐린 생산 공정에 유용하게 활용될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0024] 본 발명에서는 인슐린 글라진 전구체를 인슐린 글라진으로 전환시키는 효소 전환에서, 반응용 조성물에 염화칼슘과 아미노산(프롤린 또는 글라이신)을 각각 또는 함께 첨가하는 경우 효소 전환 수율이 향상되고 인슐린 순도가 증가하는 것을 확인하였다.
- [0025] 따라서, 본 발명은 일 관점에서 염화칼슘(Calcium Chloride), 글라이신(Glycine) 및 프롤린(Prolin)으로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상; 및 트립신 및/또는 카르복시펩티데이즈 B를 포함하는, 인슐린 전구체를 인슐린으로 전환하는 효소 전환용 조성물에 관한 것이다.
- [0027] 본 발명에서 용어, "인슐린 전구체"는 인슐린 A 쇠 및 B 쇠, 그리고 그 사이에 C-펩타이드를 포함하는 한 가닥 사슬의 펩타이드로, "프로인슐린 (proinsulin)"과 혼용되어 사용될 수 있다. 본 발명에서 상기 인슐린 전구체는 천연형 인슐린 전구체, 인슐린 아날로그 전구체, 이들의 유도체의 전구체 형태를 모두 포함하는 개념이다. 상기 인슐린 전구체는 당해 분야의 통상의 기술자가 EP 0,211,299, EP 0,227,938, EP 0,229,998, EP 0,286,956, 또는 KR 10-0158197 등의 문헌에서 공개된 방법을 참조하여 준비한 것일 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 용어, "인슐린 (insulin)"은 체내의 혈당을 조절하는 역할을 수행하는 단백질로, 천연형 인슐린은 췌장에서 분비되는 호르몬으로서 일반적으로 세포 내 포도당 흡수를 촉진하고 지방의 분해를 억제하여 체내의 혈당을 조절하는 역할을 한다. 본 발명에서 상기 인슐린은 천연형 인슐린, 인슐린 아날로그 및 이들의 유도체의 형태를 모두 포함하는 개념이다.
- [0029] 인슐린은 혈당조절 기능이 없는 인슐린 전구체(proinsulin) 형태에서 프로세싱을 거쳐 혈당 조절 기능을 가지는 인슐린이 된다. 인슐린은 2개의 폴리펩티드 사슬, 즉 각각 21개 및 30개 아미노산 잔기를 포함하는 A-쇄 및 B-쇄로 구성되어 있고, 이들은 2개의 이황화 다리로 상호 연결되어 있다. 천연형 인슐린의 A-쇄 및 B-쇄는 각각 하기 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0030] A-쇄:
- [0031] Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn
- [0032] B-쇄:
- [0033] Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-

Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr

- [0035] 본 발명에서 사용하는 인슐린 전구체 및 인슐린은 사람 유래일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0037] 본 발명에서 인슐린 아날로그 (analog)는 천연형과 비교하였을 때, B 쇠 또는 A 쇠의 아미노산이 변이된 것을 포함한다. 상기 인슐린 아날로그는 천연형 인슐린과 동일 또는 상응하는 생체 내의 혈당 조절기능을 보유할 수 있다. 구체적으로, 상기 인슐린 아날로그 전구체 또는 인슐린 아날로그는 천연형에서 적어도 하나 이상의 아미노산이 치환 (substitution), 추가 (addition), 결실 (deletion), 수식 (modification) 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는 변형이 일어난 것일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0038] 본 발명에 사용할 수 있는 인슐린 아날로그는 유전자 재조합 기술로 만든 인슐린 아날로그를 포함하며, 상기 인슐린 아날로그는 역방향 인슐린 (inverted insulin), 인슐린 변이체 (variants), 인슐린 단편 (fragments) 등의 개념을 포함한다.
- [0039] 상기 유도체는 체내에서 혈당을 조절하는 기능을 보유하면서, 천연형 인슐린 또는 인슐린 아날로그의 A-쇄 및 B-쇄의 아미노산 서열 각각에 대해 상동성을 보이며, 아미노산 한 잔기의 일부 그룹이 화학적으로 치환 (예: alpha-methylation, alpha-hydroxylation), 제거 (예: deamination) 또는 수식 (예: N-methylation) 된 형태의 펩타이드 형태를 포함한다. 상기 인슐린 단편은 인슐린에 하나 이상의 아미노산이 추가 또는 삭제된 형태를 의미하며 추가된 아미노산은 천연에 존재하지 않는 아미노산 (예: D형 아미노산)일 수 있고, 이러한 인슐린 단편은 체내에서 혈당을 조절하는 기능을 보유한다.
- [0040] 상기 인슐린 변이체는 인슐린과 아미노산 서열이 하나 이상 다른 펩타이드로서 체내에서 혈당을 조절하는 기능을 보유한다.
- [0041] 본 발명의 인슐린 아날로그, 유도체, 단편 및 변이체는 독립적으로 사용될 수 있고 조합도 가능하다. 예를 들어 아미노산 서열이 하나 이상 다르고 아미노 말단 아미노산 잔기에 탈아미노화 (deamination)가 도입된 것으로 체내에서 혈당을 조절하는 기능을 보유한 펩타이드 역시 본 발명의 범주에 포함된다.
- [0042] 구체적으로, 본 발명에서 상기 인슐린 아날로그는 인슐린 글라진일 수 있다. 인슐린 글라진은 인슐린 A-쇄의 21 번째 아미노산인 아르파라진(asparagine)을 글라이신(glycine)으로 치환하여 안정성을 도모하였고, B-쇄의 카르복시 말단에 2개의 아르지닌(arginine)을 추가하여 약산성 pH에서 용해성을 갖도록 하였으며, 산성용액(pH 4.0)으로 투여하면 피하조직에서 미세침전(microprecipitation)을 형성하고 인슐린 글라진 헥사머(glargine hexamer)인 미세침전으로부터 서서히 용해되어 유리되어 작용시간이 길어져, 지속시간이 24시간에 도달하도록 개발된 인슐린 아날로그이다. 인슐린 글라진의 A-쇄 및 B-쇄는 각각 하기 아미노산 서열을 포함할 수 있다(US 5,656,722 참조).
- [0043] A-쇄:
- [0044] Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Gly
- [0045] B-쇄:
- [0046] Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr-Arg-Arg
- [0048] 본 발명에서 용어 "효소 전환"이란 인슐린 전구체를 효소로 분해하여 인슐린으로 전환시키는 것을 의미한다. 즉, 상기 효소 전환은 효소를 이용하여 A쇄와 B 쇠 사이에 C-펩타이드를 포함하는 인슐린 전구체(Proinsulin)를 인슐린 (Insulin)으로 전환시키는 것으로, 상기 효소 전환에 사용되는 효소는 트립신, 카르복시펩타다아제 B 또는 이들의 조합에서 선택되는 것을 이용할 수 있다. 상기 용어 "효소 전환"은 "효소 절단(enzyme cleavage)" 또는 "효소 분해(enzyme digestion)" 등의 용어와 상호 교환적으로 사용될 수 있다.
- [0049] 본 발명에서 상기 조성물은 완충용액을 추가로 포함할 수 있다. 효소 반응의 완충용액은 1mM 내지 100mM의 Tris-HCl 또는 1mM 내지 100mM 붕산염(Borate)일 수 있으며, 바람직하게는 약 50mM의 Tris-HCl 또는 붕산염일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

- [0050] 본 발명에 사용되는 효소는 트립신, 카르복시펩티데이즈 B 또는 이들의 조합에서 선택되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0051] 본 발명에서 상기 인슐린 전구체는 1~15mg/mL의 농도로 상기 조성물과 반응하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0052] 본 발명에서 상기 트립신은, 인슐린 전구체 대비 1/1,000 ~ 1/40,000의 중량비(w/w), 바람직하게는 1/1000 ~ 1/30,000 (w/w), 보다 바람직하게는 1/1,000 ~ 1/20,000 (w/w), 보다 더 바람직하게는 1/5,000 ~ 1/10,000 (w/w)의 비율로 사용될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0053] 본 발명에서 상기 카르복시펩티데이즈 B는 인슐린 전구체 대비 1/600 ~ 1/20,000 (w/w), 바람직하게는 1/600 ~ 1/15,000 (w/w)의 비율로 사용될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0054] 본 발명의 효소 반응의 완충용액에는 염화칼슘, 글라이신, 프롤린이 단독으로 또는 함께 첨가될 수 있다.
- [0055] 본 발명에 있어서, 상기 염화칼슘은 1~50mM, 바람직하게는 5~40mM, 더 바람직하게는 10~40mM, 더 바람직하게는 15~40mM, 더 바람직하게는 20~35mM, 가장 바람직하게는 25~35mM로 포함될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0056] 본 발명에 있어서, 상기 글라이신은 3~60mM, 바람직하게는 10~60mM, 더 바람직하게는 20~60mM, 더 바람직하게는 30~60mM, 가장 바람직하게는 40~60mM로 포함될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0057] 본 발명에 있어서, 상기 프롤린은 20~80mM, 바람직하게는 20~70mM, 더 바람직하게는 20~60mM, 더 바람직하게는 20~50mM, 가장 바람직하게는 20~40mM로 포함될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0058] 본 발명의 다른 양태로서, 상기 조성물에 염화칼슘은 5~30 mM, 글라이신은 3~60 mM, 프롤린은 20~80 mM로 각각 또는 함께 포함될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0060] 또 다른 관점에서, 본 발명은 상기 조성물에 인슐린 전구체를 첨가하고 반응시키는 단계를 포함하는, 인슐린 전구체를 인슐린으로 전환하는 방법에 관한 것이다.
- [0061] 본 발명의 효소 전환시, 반응액의 pH는 인슐린 전구체로부터 인슐린의 효과적인 전환이 가능하다면 특별히 이에 한정되지는 않으나, pH 7.5 ~ 9.5일 수 있으며, 바람직하게는 8.5 ~ 9.0일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0062] 본 발명의 효소 전환에서 반응온도는 4.0 ~ 25.0℃일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0063] 본 발명의 효소 전환에서 반응시간은 0.5 ~ 24 시간일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0065] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.
- [0067] **실시예 1: 인슐린 전구체의 준비**
- [0069] 1-1. 인슐린 글라진 전구체의 재접힘(refolding)
- [0070] 본 사에서 제작한 인슐린 글라진 전구체를 가용화 하기 위하여 3.75g의 인슐린 글라진 전구체에 0.2M Tris-HCl 완충용액을 넣어 250mL이 되도록 하고, 이후 상온에서 1시간 동안 교반하였다. 가용화가 완료된 용액은 재접힘을 위하여 산화제 0.4mM 시스테인(cysteine)이 포함된 0.2M Tris-HCl 완충용액으로 10배 희석하여 저온에서 10시간 동안 교반하였다. 교반이 끝난 용액은 염산을 사용하여 pH 9.0으로 낮추었다.
- [0072] 1-2. 음이온 교환 크로마토그래피 정제
- [0073] 상기 실시예 1-2.에서 제조된 인슐린 글라진 전구체를 포함하는 용액을, 50mM Tris-HCl(pH 9.0) 완충용액으로 평형화된 POROS 50D (Thermo scientific) 이온 수지에 결합시킨 다음, 염화나트륨 0.5M이 포함된 50mM Tris-HCl(pH 9.0) 완충용액을 이용하여 농도가 10~14% 되도록 선형 농도 구배로 인슐린 글라진 전구체를 용출하였다.

[0075] 1-3. 시트라코닐레이션

[0076] 본 과정은 인슐린 글라진 전구체를 효소 전환시에 발생할 수 있는 불순물을 줄이기 위한 선택적 공정으로, 실시예 1-2에서 정제된 인슐린 글라진 전구체를 사용하여 효소 처리전 과정을 진행하였다. 정제된 글라진 전구체를 50 mM Tris-HCl 용액으로 1~15 mg/mL 사이 농도로 희석하였다. 이후 시트라코닉안하이드라이드 : 인슐린 글라진 전구체의 몰농도 비율이 1 : 9.9 ~ 266.5가 되도록 희석된 인슐린 글라진 전구체 용액에 시트라코닉안하이드라이드를 첨가하고, 수산화나트륨 수용액으로 pH를 8.5~9.0으로 적정하여 2시간 동안 교반하였다.

[0078] 비교예 1: 염이나 아미노산을 첨가하지 않은 효소 전환

[0080] 실시예 1-3에서 수득된 용액에 효소 처리를 하여 인슐린 글라진 전구체에서 인슐린 글라진으로 전환 실험을 하였다. 인슐린 글라진 전구체를 1~15mg/mL의 농도 조건하에서 단백질의 1/100,000~1/1,000 중량비에 해당하는 트립신을 첨가한 후 2시간 동안 교반하였다. 교반이 완료된 후 아세트산으로 pH를 2.5로 적정하여 반응을 완료하였다. 반응이 완료된 인슐린 글라진의 순도 및 수율을 확인하기 위해 RP-HPLC를 사용하여 분석하였다.

[0082] 실시예 2: 염화칼슘 첨가에 의한 효소 전환 반응 수율의 향상

[0084] 염화칼슘의 첨가가 효소 전환 반응의 수율에 미치는 영향을 확인하기 위하여 실시예 1-3에서 수득된 인슐린 글라진 전구체를 1~15 mg/mL 농도 조건 하에서 단백질의 중량비의 1/40,000~1/5,000에 해당하는 트립신을 첨가한 후 2시간 동안 교반하였다. 이 때 반응액은 50 mM Tris-HCl이며, 1~20 mM이 되도록 염화칼슘을 첨가하였으며, 이때 pH는 8.5~9.0로 적정하였다. 교반이 완료된 후 아세트산으로 pH를 2.5로 적정하여 반응을 완료하였다.

[0085] 완료된 인슐린 글라진의 순도 및 수율을 확인하기 위해 비교예 1과 같이 RP-HPLC를 사용하여 분석하였다. 효소 전환 반응에 염화칼슘을 첨가하였을 경우, 첨가하지 않은 경우보다 효소 반응 전환 수율이 향상되었으며 이러한 효과는 염화칼슘을 최종농도 20mM로 첨가하였을 경우 가장 현저하게 나타남을 확인하였다. (표1)

[0086]

[0087] 하기 표 1은 인슐린 글라진 전구체의 효소 전환 반응 시 염화칼슘의 농도에 따른 효소 전환 반응의 수율을 나타낸 것이다.

표 1

[0089]

	농도 (mM)	순도 (%)	수율 (%)
비교예 1	-	33.4	39.5
염화칼슘	1	35.5	41.6
	5	36.4	43.0
	10	37.0	43.3
	15	37.2	43.7
	20	37.5	44.1

[0091] 표 1에 나타난 바와 같이, 염화칼슘의 농도에 따라 수율 및 순도가 모두 증가하는데, 순도는 비첨가시 33.4%에서 염화칼슘 첨가시 농도에 따라 35.5 ~ 37.5까지 증가하였고, 수율은 비첨가시 39.5%에서 염화칼슘 첨가시 농도에 따라 41.6 ~ 44.1%까지 증가하였다. 이와 같은 결과로부터, 효소 전환 반응시 염화칼슘을 첨가하는 경우 수율 및 순도가 향상되는 효과를 알 수 있었다.

[0093] 실시예 3: 글라이신 첨가에 의한 효소 전환 반응 수율의 향상

[0095] 글라이신의 첨가가 효소 전환 반응의 수율에 미치는 영향을 확인하기 위하여 실시예 1-3에서 수득된 인슐린 글라진 전구체를 1~15mg/mL 의 농도 조건하에서 단백질의 중량비의 1/100,000~1/1,000에 해당하는 트립신을 첨가한 후 2시간 동안 교반하였다. 이때 반응액은 50mM Tris-HCl이며, 20~140mM이 되도록 글라이신을 첨가하였고, pH는 8.5~9.0으로 적정하였다. 교반이 완료된 후 아세트산으로 pH를 2.5로 적정하여 반응을 완료하였다.

[0096] 완료된 인슐린 글라진의 순도 및 수율을 확인하기 위해 비교예 1과 같이 RP-HPLC를 사용하여 분석하였다. 효소 전환 반응에 글라이신을 첨가하였을 경우, 첨가하지 않은 경우보다 전반적으로 효소 반응 전환 수율이 향상되었으며 이러한 효과는 글라이신을 최종 농도 60mM로 첨가하였을 경우 가장 현저하게 나타남을 확인 하였다(표 2).

[0098] 하기 표 2는 인슐린 글라진 전구체의 효소 전환 반응 시 글라이신의 농도에 따른 효소 전환 반응의 수율을 나타낸 것이다.

표 2

	농도 (mM)	순도 (%)	수율 (%)
비교예 1	-	30.3	42.4
글라이신	20	31.6	43.1
	60	31.4	43.3
	100	30.8	42.8
	140	30.8	42.2

[0101] 표 2에 나타난 바와 같이, 글라이신의 농도에 따라 수율 및 순도의 차이를 보여주었는데, 구체적으로 순도는 글라이신 첨가 전 30.3%에서 20mM 첨가시 31.6%, 60mM 첨가시 31.4%로 증가하였으나, 100mM, 140mM 첨가시에는 순도 증가율이 다소 감소하였다. 한편, 수율도 글라이신 첨가 전 42.4%에서 20 mM 첨가시 43.1%, 60 mM 첨가시 43.3%로 증가하였으나, 100mM, 140mM 첨가시에는 수율 증가율이 다소 감소하였다. 이와 같은 결과로부터, 효소 전환 반응시 글라이신을 적정 농도로 첨가하는 경우 수율 및 순도가 향상되는 효과를 알 수 있었다.

[0103] 실시예 4: 프롤린 첨가에 의한 효소 전환 반응 수율의 향상

[0105] 프롤린의 첨가가 효소 전환 반응의 수율에 미치는 영향을 확인하기 위하여 실시예 1-3에서 수득된 인슐린 글라진 전구체를 1~15mg/mL의 농도 조건 하에서 단백질의 중량비의 1/100,000~1/1,000에 해당하는 트립신을 첨가한 후 2시간 동안 교반하였다. 이때 반응액은 50mM Tris-HCl 이며, 20~80mM이 되도록 프롤린을 첨가하였고, pH는 8.5~9.0으로 적정하였다. 교반이 완료된 후 아세트산으로 pH 2.5 로 적정하여 반응을 완료하였다.

[0106] 완료된 인슐린 글라진의 순도 및 수율을 확인하기 위해 비교예 1과 같이 RP-HPLC를 사용하여 분석하였다. 효소 전환 반응에 프롤린을 첨가하였을 경우, 첨가하지 않은 경우보다 전반적으로 효소 반응 전환 수율이 향상되었으며 이러한 효과는 프롤린 최종 농도 60mM로 첨가하였을 경우 가장 현저하게 나타남을 확인하였다 (표 3).

[0108] 하기 표 3은 인슐린 글라진 전구체의 효소 전환 반응 시 프롤린의 농도에 따른 효소 전환 반응의 수율을 나타낸 것이다.

표 3

	농도 (mM)	순도 (%)	수율 (%)
비교예 1	-	35.8	41.6

프롤린	20	37.8	43.1
	40	38.0	43.0
	60	37.6	43.2
	80	36.8	42.8

[0112] 표 3에 나타난 바와 같이, 프롤린을 첨가함에 따라, 인슐린 글라진의 순도와 수율이 증가하였는데, 이로써 프롤린의 첨가가 인슐린 글라진의 효소 전환 반응에서 순도 및 수율 향상에 영향을 미치는 것을 확인하였다.

[0114] **실시예 5: 염화칼슘/글라이신/프롤린 첨가에 의한 효소 전환 반응 수율의 향상**

[0115] 염화칼슘, 글라이신 및 프롤린 첨가가 효소 전환 반응의 수율에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 실시예 1-3에서 수득된 인슐린 글라진 전구체를 1~15mg/mL 의 농도 조건하에서 단백질의 중량비의 1/100,000~1/1,000에 해당하는 트립신을 첨가한 후 2시간 동안 교반하였다. 이때 반응액은 50mM Tris-HCl이며, 염화칼슘/글라이신/프롤린 복합염의 농도는 표 4와 같이 첨가하고, pH는 8.5~9.0으로 적정하였다. 교반이 완료된 후 아세트산으로 pH를 2.5로 적정하여 반응을 완료하였다.

표 4

[0117]

염화칼슘 농도 (mM)	프롤린 농도 (mM)	글라이신 농도 (mM)
30.0	10.0	50.0
20.0	20.0	35.0
20.0	20.0	50.0
20.0	20.0	50.0
20.0	20.0	50.0
10.0	10.0	50.0
20.0	3.2	35.0
20.0	36.8	35.0
20.0	20.0	60.2
10.0	30.0	50.0
30.0	30.0	50.0
0.0	0.0	0.0

[0119] 완료된 인슐린 글라진의 순도 및 수율 확인하기 위해 비교예 1과 같이 RP-HPLC를 사용하여 분석하였다. 효소 전환 반응에 염화칼슘/글라이신/프롤린 복합염을 첨가하였을 경우, 첨가하지 않은 경우보다 전반적으로 효소 반응 전환 수율이 향상되었으며 이러한 효과는 30 mM 염화칼슘, 30mM 프롤린, 50mM 글라이신 농도로 첨가하였을 경우 가장 현저하게 나타남을 확인하였다(표 5).

[0121] 하기 표 5는 인슐린 글라진 전구체의 효소 전환 반응 시 염화칼슘/글라이신/프롤린의 농도에 따른 효소 전환 반응의 수율을 나타낸 것이다.

표 5

[0123]

염화칼슘 농도 (mM)	프롤린 농도 (mM)	글라이신 농도 (mM)	순도 (%)	수율 (%)
30.0	10.0	50.0	39.8	44.8
20.0	20.0	35.0	38.8	44.8

20.0	20.0	50.0	39.0	44.9
20.0	20.0	50.0	39.2	44.6
20.0	20.0	50.0	39.1	44.9
10.0	10.0	50.0	38.6	44.5
20.0	3.2	35.0	39.1	44.8
20.0	36.8	35.0	39.8	44.9
20.0	20.0	60.2	39.9	44.8
10.0	30.0	50.0	38.6	44.4
30.0	30.0	50.0	39.7	45.0
0.0	0.0	0.0	33.2	39.6

[0125] 즉, 표 5에 나타난 바와 같이, 염화칼슘/글라이신/프롤린 복합염의 농도에 따라 수율 및 순도가 증가함을 보이는데, 이는 전반적으로 세 가지 염을 함께 처리하였을 때, 그렇지 않은 경우에 비해 순도는 5.4~6.8%, 수율은 4.8~5.4% 증가하는 것을 확인한바, 염화칼슘/글라이신/프롤린의 첨가가 인슐린 글라진 효소 전환 반응의 순도 및 수율 향상에 매우 효과적임을 알 수 있었다.

[0127] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.