



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0078414
(43) 공개일자 2020년07월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/28 (2006.01) *A61K 38/26* (2006.01)
A61K 47/60 (2017.01) *A61K 47/68* (2017.01)
A61P 3/04 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
C07K 14/605 (2006.01) *C07K 14/62* (2006.01)
 (52) CPC특허분류
A61K 38/28 (2013.01)
A61K 38/26 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2019-0173205
 (22) 출원일자 2019년12월23일
 심사청구일자 없음
 (30) 우선권주장
 1020180167798 2018년12월21일 대한민국(KR)

(71) 출원인
 한미약품 주식회사
 경기도 화성시 팔탄면 무하로 214
 (72) 발명자
 김정국
 경기도 화성시 동탄기흥로 550
 이종석
 경기도 화성시 동탄기흥로 550
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 특허법인한일

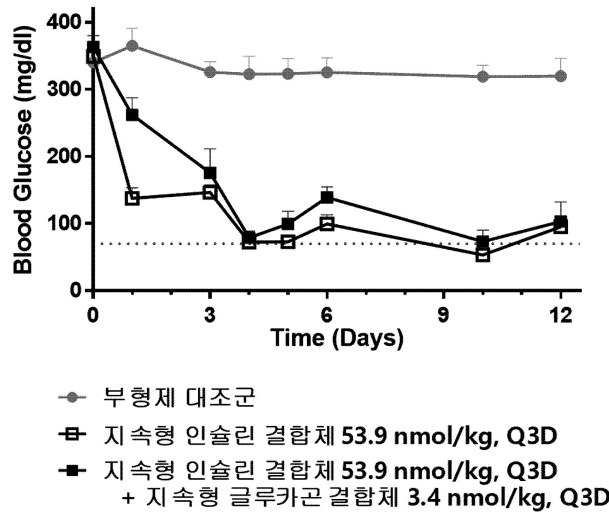
전체 청구항 수 : 총 61 항

(54) 발명의 명칭 인슐린 및 글루카곤을 포함하는 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 인슐린 또는 이의 지속형 결합체 및 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체를 포함하는 조성물 및 복합제에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/60 (2017.08)

A61K 47/6811 (2017.08)

A61P 3/04 (2018.01)

A61P 3/10 (2018.01)

C07K 14/605 (2013.01)

C07K 14/62 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

동주영

경기도 화성시 동탄기흥로 550

이아람

경기도 화성시 동탄기흥로 550

명세서

청구범위

청구항 1

인슐린; 및 글루카곤을 포함하는 인슐린 관련 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 인슐린은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 글루카곤은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 인슐린은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태이고;

상기 글루카곤은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태인, 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인슐린 관련 질환은 인슐린 저항성 질환, 당뇨, 과혈당증, 및 비만으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 인슐린의 부작용인 저혈당을 완화하고, 체중 증가를 억제하는 것인, 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 인슐린 또는 이의 지속형 결합체 : 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체가 0.1:1 내지 100:1의 중량비로 포함하는 것인, 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 글루카곤은 천연형 글루카곤, 또는 천연형 글루카곤에서 하나 이상의 아미노산에 치환, 추가, 제거, 수식 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는 변이가 일어난 글루카곤 아날로그인 것인, 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 글루카곤 아날로그는 하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 조성물:

X1-X2-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X24-W-L-X27-X28-T-X30 (일반식 1, 서열번호: 46)

상기 식에서,

X1은 히스티딘(H), 데스아미노-히스티딜(desamino-histidyl), 디메틸-히스티딜(N-dimethyl-histidyl), 베타-히드록시 이미다조프로피오닐(beta-hydroxy imidazopropionyl), 4-이미다조아세틸(4-imidazoacetyl), 베타-카르복시 이미다조프로피오닐(beta-carboxy imidazopropionyl), 트립토판(W), 또는 티로신(Y)이거나, 부존재하고;

X2는 알파-메틸-글루탐산(α -methyl-glutamic acid), Aib(aminoisobutyric acid), D-알라닌, 글리신(G), Sar(N-methylglycine), 세린(S) 또는 D-세린이며;

X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;

X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;

X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;

X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;

X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;

X15는 아스파르트산(D), 글루탐산(E) 또는 시스테인(C)이고;

X16은 글루탐산(E), 아스파르트산(D), 세린(S), 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;

X17은 아스파르트산(D), 글루타민(Q), 글루탐산(E), 리신(K), 아르기닌(R), 세린(S), 시스테인(C), 또는 발린(V)이거나, 부존재하며;

X18은 알라닌(A), 아스파르트산(D), 글루타민(Q), 글루탐산(E), 아르기닌(R), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;

X19는 알라닌(A), 아르기닌(R), 세린(S), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;

X20은 리신(K), 히스티딘(H), 글루탐산(E), 글루타민(Q), 아스파르트산(D), 아르기닌(R), 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;

X21은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 류신(L), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;

X23은 이소류신(I), 발린(V), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;

X24는 발린(V), 아르기닌(R), 알라닌(A), 시스테인(C), 글루탐산(E), 리신(K), 글루타민(Q), 알파-메틸-글루탐산, 또는 류신(L)이거나, 부존재하며;

X27은 이소류신(I), 발린(V), 알라닌(A), 리신(K), 메티오닌(M), 글루타민(Q), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;

X28은 글루타민(Q), 리신(K), 아스파라긴(N), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;

X30은 시스테인(C)이거나, 부존재함

(단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호: 1과 동일한 경우는 제외함).

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 일반식 1에서,

X1이 히스티딘(H), 트립토판(W), 또는 티로신(Y)이거나, 부존재하고;
 X2가 세린(S) 또는 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
 X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
 X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
 X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
 X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
 X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
 X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이고;
 X16은 글루탐산(E), 세린(S) 또는 시스테인(C)이며;
 X17은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 리신(K), 아르기닌(R), 세린(S), 시스테인(C), 또는 발린(V) 이고;
 X18은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 아르기닌(R), 또는 시스테인(C)이며;
 X19는 알라닌(A), 또는 시스테인(C)이고;
 X20은 글루타민(Q), 아스파르트산(D), 리신(K), 또는 시스테인(C)이며;
 X21은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 류신(L), 발린(V), 또는 시스테인(C)이고;
 X23은 이소류신(I), 발린(V) 또는 아르기닌(R)이며;
 X24는 발린(V), 아르기닌(R), 알라닌(A), 글루탐산(E), 리신(K), 글루타민(Q), 또는 류신(L)이고;
 X27는 이소류신(I), 발린(V), 알라닌(A), 메티오닌(M), 글루타민(Q) 또는 아르기닌(R)이며;
 X28은 글루타민(Q), 리신(K), 아스파라긴(N) 또는 아르기닌(R)이고;
 X30은 시스테인(C)이거나, 부존재하는,
 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 일반식 1에서

X1이 히스티딘(H), 트립토판(W), 또는 티로신(Y)이고;
 X2가 세린(S) 또는 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
 X7은 시스테인(C), 트레오닌(T), 또는 발린(V)이고;
 X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이며;
 X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
 X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이며;
 X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
 X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이며;
 X16은 글루탐산(E), 세린(S) 또는 시스테인(C)이고;
 X17은 글루탐산(E), 리신(K), 아르기닌(R), 시스테인(C), 또는 발린(V)이며;
 X18은 아르기닌(R), 또는 시스테인(C)이고;

X19는 알라닌(A), 또는 시스테인(C)이며;
X20은 글루타민(Q) 또는 리신(K)이고;
X21은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 발린(V), 또는 시스테인(C)이며;
X23은 발린(V)이고;
X24는 발린(V) 또는 글루타민(Q)이며;
X27는 메티오닌(M)이고;
X28은 아스파라긴(N) 또는 아르기닌(R)이며;
X30은 시스테인(C)이거나, 부존재하는,
조성물.

청구항 12

제9항에 있어서,
상기 일반식 1에서
X1이 티로신(Y)이고;
X2가 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
X7은 시스테인(C), 트레오닌(T), 또는 발린(V)이고;
X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이며;
X12는 리신(K)이고;
X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이며;
X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이며;
X16은 글루탐산(E), 세린(S) 또는 시스테인(C)이고;
X17은 리신(K), 아르기닌(R), 시스테인(C), 또는 발린(V)이며;
X18은 아르기닌(R), 또는 시스테인(C)이고;
X19는 알라닌(A), 또는 시스테인(C)이며;
X20은 글루타민(Q) 또는 리신(K)이고;
X21은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 또는 시스테인(C)이며;
X23은 발린(V)이고;
X24는 글루타민(Q)이며;
X27는 메티오닌(M)이고;
X28은 아스파라긴(N) 또는 아르기닌(R)이며;
X30은 시스테인(C)이거나, 부존재하는,
조성물.

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 일반식 1에서

X1이 히스티딘(H), 트립토판(W), 또는 티로신(Y)이거나, 부존재하고;

X2가 세린(S) 또는 Aib(aminoisobutyric acid)이며;

X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;

X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이며;

X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;

X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이며;

X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;

X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이며;

X16은 글루탐산(E), 세린(S) 또는 시스테인(C)이고;

X17은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 리신(K), 아르기닌(R), 세린(S), 시스테인(C), 또는 발린(V) 이며;

X18은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 아르기닌(R), 또는 시스테인(C)이고;

X19는 알라닌(A), 또는 시스테인(C)이며;

X20은 글루타민(Q), 아스파르트산(D), 또는 리신(K)이고;

X21은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이며;

X23은 발린(V)이고;

X24는 발린(V) 또는 글루타민(Q)이며;

X27는 이소류신(I) 또는 메티오닌(M)이고;

X28은 아스파라긴(N) 또는 아르기닌(R)이며;

X30은 시스테인(C)이거나, 부존재하는,

조성물.

청구항 14

제9항에 있어서,

상기 일반식 1에서

X1이 티로신(Y)이고;

X2가 Aib(aminoisobutyric acid)이며;

X7은 트레오닌(T)이고;

X10은 티로신(Y)이며;

X12는 리신(K)이고;

X13은 티로신(Y)이며;

X14는 류신(L)이고;

X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이며;

X16은 글루탐산(E), 세린(S) 또는 시스테인(C)이고;

X17은 리신(K) 또는 아르기닌(R)이며;
 X18은 아르기닌(R)이고;
 X19는 알라닌(A)이며;
 X20은 글루타민(Q), 시스테인(C), 또는 리신(K)이고;
 X21은 아스파르트산(D), 시스테인(C), 발린(V) 또는 글루탐산(E)이며;
 X23은 발린(V) 또는 아르기닌(R)이고;
 X24는 글루타민(Q) 또는 류신(L)이며;
 X27는 메티오닌(M)이고;
 X28은 아스파라긴(N) 또는 아르기닌(R)이며;
 X30은 부존재하는,
 조성물.

청구항 15

제9항에 있어서, 상기 글루카곤 아날로그는 하기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 조성물:
 Y-Aib-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-Y-L-X15-X16-X17-R-A-X20-X21-F-V-X24-W-L-M-N-T-X30 (일반식 2, 서열번호: 47)
 상기 일반식 2에서
 X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
 X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
 X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
 X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이고;
 X16은 글루탐산(E) 또는 세린(S)이며;
 X17은 리신(K) 또는 아르기닌(R)이고;
 X20은 글루타민(Q) 또는 리신(K)이며;
 X21은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이고;
 X24는 발린(V) 또는 글루타민(Q)이고;
 X30은 시스테인(C)이거나, 부존재함.

청구항 16

제9항에 있어서, 상기 일반식 1에서, X10과 X14, X12와 X16, X16과 X20, X17과 X21, X20과 X24, 및 X24와 X28의 아미노산 쌍 중 적어도 하나의 아미노산 쌍에서 각각의 아미노산 간에 고리를 형성하는, 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 일반식 1의 X10과 X14, X12와 X16, X16과 X20, X17과 X21, X20과 X24, 및 X24와 X28의 아미노산 쌍 중 적어도 하나의 아미노산 쌍의 아미노산 각각이 고리를 형성할 수 있는 글루탐산 또는 리신으로 치환된, 조성물.

청구항 18

제9항에 있어서, 상기 글루카곤 아날로그는 서열번호: 2 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 글루카곤 아날로그는 서열번호: 37의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인슐린은 천연형 인슐린; 또는 천연형 인슐린에서 하나 이상의 아미노산에 치환, 추가, 제거, 수식 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는 변이가 일어난 인슐린 아날로그인 것인, 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 인슐린 아날로그는 천연형 인슐린의 B 쇠의 1번 아미노산, 2번 아미노산, 3번 아미노산, 5번 아미노산, 8번 아미노산, 10번 아미노산, 12번 아미노산, 16번 아미노산, 23번 아미노산, 24번 아미노산, 25번 아미노산, 26번 아미노산, 27번 아미노산, 28번 아미노산, 29번 아미노산, 30번 아미노산, A 쇠의 1번, 2번, 5번, 8번 아미노산, 10번 아미노산, 12번 아미노산 14번, 16번 아미노산, 17번 아미노산, 18번 아미노산 19번 및 21번 아미노산으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환, 또는 결실된 인슐린 아날로그인, 조성물.

청구항 22

제20항에 있어서, 상기 인슐린 아날로그는 하기 일반식 3으로 표시되는 서열번호: 48의 A 쇠와 하기 일반식 4로 표시되는 서열번호: 49의 B 쇠를 포함하는 것인, 조성물:

[일반식 3]

Xaa1-Xaa2-Val-Glu-Xaa5-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Xaa12-Leu-Xaa14-Gln-Xaa16-Glu-Asn-Xaa19-Cys-Xaa21(서열번호: 48)

상기 일반식 3에서,

Xaa1는 알라닌, 글리신, 글루타민, 히스티딘, 글루탐산 또는 아스파라긴이고,

Xaa2는 알라닌, 또는 이소류신이고,

Xaa5는 알라닌, 글루탐산, 글루타민, 히스티딘 또는 아스파라긴이고,

Xaa12는 알라닌, 세린, 글루타민, 글루탐산, 히스티딘 또는 아스파라긴이고,

Xaa14는 알라닌, 티로신, 글루탐산, 히스티딘, 라이신, 아스파르트산 또는 아스파라긴이고,

Xaa16는 알라닌, 류신, 티로신, 히스티딘, 글루탐산 또는 아스파라긴이고,

Xaa19는 알라닌, 티로신, 세린, 글루탐산, 히스티딘, 트레오닌, 또는 아스파라긴이고,

Xaa21은 아스파라긴, 글리신, 히스티딘, 또는 알라닌임.

[일반식 4]

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Xaa8-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Xaa16-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Xaa23-Xaa24-Xaa25-Tyr-Xaa27-Xaa28-Lys-Thr(서열번호: 49)

상기 일반식 4에서,

Xaa8은 알라닌, 또는 글리신이고,

Xaa16은 티로신, 글루탐산, 세린, 트레오닌, 또는 아스파르트산이거나, 부존재하며,

Xaa23은 글리신 또는 알라닌이고,

Xaa24는 알라닌 또는 페닐알라닌이고,

Xaa25는 알라닌, 페닐알라닌, 아스파르트산, 또는 글루탐산이거나, 부존재하며,

Xaa27는 트레오닌이거나, 부존재하며,

Xaa28은 프롤린, 글루탐산, 또는 아스파르트산이거나, 부존재함

(여기서 서열번호 48의 A-쇄 및 서열번호 49의 B-쇄를 포함하는 펩티드는 제외됨).

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 인슐린 아날로그는 천연형 인슐린 B 쇠의 8번 아미노산, 23번 아미노산, 24번 아미노산, 25번 아미노산, A 쇠의 1번 아미노산, 2번 아미노산 및 19번 아미노산으로 이루어진 군에서 선택된 하나의 아미노산이 알라닌으로 치환되거나, A 쇠의 14번 아미노산이 글루탐산 또는 아스파라긴으로 치환된 것인, 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 인슐린 아날로그는 서열번호: 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 및 67로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 25

제22항에 있어서, 상기 인슐린 아날로그는 천연형 인슐린 B 쇠의 16번 아미노산이 글루탐산으로 치환되거나; 25번 아미노산이 결실되거나; 또는 천연형 인슐린 A 쇠의 14번 아미노산이 글루탐산 또는 알라닌으로 치환된 것인, 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 인슐린 아날로그는 서열번호: 69 또는 71의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 27

제22항에 있어서, 상기 인슐린 아날로그는 천연형 인슐린 B 쇠의 16번 아미노산이 글루탐산, 세린, 트레오닌, 또는 아스파르트산으로 치환되거나; 25번 아미노산이 아스파르트산 또는 글루탐산으로 치환되거나; 천연형 인슐린 A 쇠의 14번 아미노산이 히스티딘, 라이신, 알라닌, 또는 아스파르트산으로 치환되거나; 또는 19번 아미노산이 글루탐산, 세린, 또는 트레오닌으로 치환된 것인, 조성물.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 인슐린 아날로그는 서열번호 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121 및 123으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 29

제22항에 있어서, 상기 인슐린 아날로그는 상기 일반식 3으로 표시되는 서열번호: 48의 A 쇠 및 상기 일반식 4로 표시되는 서열번호: 49의 B 쇠로 구성되는 이중쇄 형태인 것인, 조성물.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 A쇄 및 B쇄는 이황화 결합으로 연결되는 것인, 조성물.

청구항 31

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는 것인, 조성물:

[화학식 1]



여기서,

X는, 상기 인슐린 또는 글루카곤이고;

L은, 링커이며;

a는, 0 또는 자연수이며, 다만 a가 2 이상일 때, 각각의 L은 서로 독립적이고;

F는, X의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 물질이며;

상기 "-"는 공유 또는 비공유 결합임.

청구항 32

제31항에 있어서,

상기 F는 고분자 중합체, 지방산, 콜레스테롤, 알부민 및 이의 단편, 알부민 결합물질, 특정 아미노산 서열의 반복단위의 중합체, 항체, 항체 단편, FcRn 결합물질, 생체 내 결합조직, 뉴클레오타이드, 파이버넥틴, 트랜스페린(Transferrin), 사카라이드(saccharide), 헤파린, 및 엘라스틴으로 이루어진 군에서 선택되는, 조성물.

청구항 33

제32항에 있어서,

상기 고분자 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 다당류, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히알루론산, 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 34

제31항에 있어서, 상기 F는 면역글로불린 Fc 영역인, 조성물.

청구항 35

제34항에 있어서,

상기 F는 IgG Fc 영역인, 조성물.

청구항 36

제34항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 비당쇄화된 것인, 조성물.

청구항 37

제34항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 (a) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인; (b) CH1 도메인 및 CH2 도메인; (c) CH1 도메인 및 CH3 도메인; (d) CH2 도메인 및 CH3 도메인; (e) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인 중 1개 또는 2개 이상의 도메인과 면역글로불린 힌지 영역 또는 힌지 영역의 일부와의 조합; 및 (f) 중쇄 불변영역 각 도메인과 경쇄 불변영역의 이량체로 구성된 균으로부터 선택되는 것인, 조성물.

청구항 38

제34항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 이황화 결합을 형성할 수 있는 부위가 제거되거나, 천연형 Fc에서 N-말단의 일부 아미노산이 제거되거나, 천연형 Fc의 N-말단에 메티오닌 잔기가 부가되거나, 보체결합부위가 제거되거나 또는 ADCC(antibody dependent cell mediated cytotoxicity) 부위가 제거된 것인, 조성물.

청구항 39

제34항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE 또는 IgM에서 유래된 면역글로불린 Fc 단편인 것인, 조성물.

청구항 40

제34항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM으로 이루어진 균에서 선택되는 면역글로불린에서 유래된 상이한 기원을 가진 도메인의 하이브리드인 것인, 조성물.

청구항 41

제31항에 있어서, 상기 L은 펩타이드, 지방산, 사카라이드 (saccharide), 고분자 중합체, 저분자 화합물, 뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 균으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 고분자 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 다당류, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히알루론산, 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 균으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 43

제31항에 있어서,

상기 L은 폴리에틸렌 글리콜인, 조성물.

청구항 44

제1항에 있어서, 상기 조성물은 인슐린 및 글루카곤이 동시, 순차적 또는 역순으로 병용 투여되는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 45

인슐린; 및 글루카곤을 포함하는 저혈당 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 인슐린은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태인, 조성물.

청구항 47

제45항에 있어서, 상기 글루카곤은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태인, 조성물.

청구항 48

제45항에 있어서, 상기 인슐린은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태이고;

상기 글루카곤은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태인, 조성물.

청구항 49

제45항에 있어서, 상기 조성물은 인슐린 및 글루카곤이 동시, 순차적 또는 역순으로 병용 투여되는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 50

인슐린; 및 글루카곤을 포함하는 인슐린 부작용 개선용 조성물.

청구항 51

제50항에 있어서, 상기 인슐린은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태인, 조성물.

청구항 52

제50항에 있어서, 상기 글루카곤은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된, 지속형

결합체의 형태인, 조성물.

청구항 53

제50항에 있어서, 상기 인슐린은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된, 지속형 결합체 형태이고;

상기 글루카곤은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된, 지속형 결합체 형태인, 조성물.

청구항 54

제50항에 있어서, 상기 조성물은 인슐린 및 글루카곤이 동시, 순차적 또는 역순으로 병용 투여되는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 55

인슐린; 및 글루카곤을 포함하는, 인슐린 관련 질환 환자의 저혈당 개선용 복합제제.

청구항 56

제55항에 있어서, 상기 인슐린은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태인, 복합제제.

청구항 57

제55항에 있어서, 상기 글루카곤은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태인, 복합제제.

청구항 58

제55항에 있어서, 상기 인슐린은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된, 지속형 결합체 형태이고;

상기 글루카곤은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된, 지속형 결합체 형태인, 복합제제.

청구항 59

제55항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 저혈당은 인슐린의 부작용인, 복합제제.

청구항 60

제55항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복합제제는 체중 증가를 억제하는 것인, 복합제제.

청구항 61

제55항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복합제제는 인슐린 또는 이의 지속형 결합체 : 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체를 0.1: 1 내지 100:1의 중량비로 포함하는 것인, 복합제제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인슐린 및 글루카곤을 포함하는 조성물, 및 이를 포함하는 복합제제에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 글루카곤은 약물 치료, 질병, 호르몬 또는 효소 결핍 등과 같은 다양한 원인에 의해 혈당이 저하되면 이자에서 생산되어 분비된다. 분비된 글루카곤은 간에 작용하여 글리코젠을 분해하여 포도당을 방출하도록 유도하고, 결국 혈당 수준을 정상 수준까지 높이는 역할을 한다.

[0005] 또한, 글루카곤과 마찬가지로 이자에서 생산되는 호르몬의 일종인, 인슐린은 이자에서 분비되는 호르몬으로, 혈중 혈당의 증가시, 혈당을 적절한 수준으로 유지하는 역할을 수행하며, 인슐린의 결핍, 부족, 또는 기능 저하로 다양한 질환이 발생한다. 이에, 혈중 포도당의 농도가 높아진 당뇨를 비롯한 인슐린 관련 질환의 치료에 있어서는 인슐린의 투여가 핵심적인 치료법으로 알려져 있다.

[0007] 상기 글루카곤과 인슐린은 혈당에 대해 서로 반대되는 작용, 즉 길항 작용을 하는 것으로 널리 알려져 있어, 서로 다른 병증에 대한 치료제로 사용되어 왔다. 특히, 한국 공개 특허 제10-2017-0023066호는 글루카곤 수용체를 길항 항원 단백질에 의해 차단함으로써, 글루카곤 작용을 길항하는 한편, 인슐린의 보충에 의해 당뇨를 치료하는 방법을 개시하고 있다.

[0008] 즉, 인슐린 및 글루카곤은 체내에서 서로 반대되는 역할을 수행하기 때문에, 이를 함께 투여하는 약물 치료법은 아직 알려진 바 없다.

[0010] 한편, 다양한 인슐린 관련 질환의 치료제인 인슐린을 환자에게 투여할 경우, 체중 증가와 과다 투여, 저혈당과 같은 부작용의 위험이 존재한다.

[0011] 이에, 인슐린 투여에 따른 약효를 유지하면서도 이러한 부작용을 개선할 수 있는 약물 개발의 필요성이 대두되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 인슐린; 및 글루카곤을 포함하는 인슐린 관련 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 하나의 목적은 인슐린; 및 글루카곤을 포함하는 저혈당 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 인슐린; 및 글루카곤을 포함하는 인슐린 부작용 개선용 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 인슐린; 및 글루카곤을 포함하는, 인슐린 관련 질환 환자의 저혈당 개선용 복합제제를 제공하는 것이다.

- [0017] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 약제의 제조에 있어 상기 조성물의 용도를 제공하는 것이다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 조성물 또는 복합제제를 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 인슐린 관련 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 조성물 또는 복합제제를 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 인슐린의 부작용 개선 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0021] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 인슐린; 및 글루카곤을 포함하는 인슐린 관련 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물이다.
- [0022] 하나의 구체예에 따른 조성물로서, 상기 인슐린은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태인 것을 특징으로 한다.
- [0023] 앞선 구체예에 따른 조성물로서, 상기 글루카곤은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태인 것을 특징으로 한다.
- [0024] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 인슐린은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태이고; 상기 글루카곤은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태인 것을 특징으로 한다.
- [0025] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 인슐린 관련 질환은 인슐린 저항성 질환, 당뇨, 과혈당증, 및 비만으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0026] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 조성물은 인슐린의 부작용인 저혈당을 완화하고, 체중 증가를 억제하는 것을 특징으로 한다.
- [0027] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 조성물은 인슐린 또는 이의 지속형 결합체 : 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체가 0.1 : 1 내지 100 : 1의 중량비로 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0028] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 글루카곤은 천연형 글루카곤, 또는 천연형 글루카곤에서 하나 이상의 아미노산에 치환, 추가, 제거, 수식 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는 변이가 일어난 글루카곤 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [0029] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 글루카곤 아날로그는 하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0030] X1-X2-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X24-W-L-X27-X28-T-X30 (일반식 1, 서열번호: 46)
- [0031] 상기 식에서,
- [0032] X1은 히스티딘(H), 데스아미노-히스티딜(desamino-histidyl), 디메틸-히스티딜(N-dimethyl-histidyl), 베타-히드록시 이미다조프로피오닐(beta-hydroxy imidazopropionyl), 4-이미다조아세틸(4-imidazoacetyl), 베타-카르복시 이미다조프로피오닐(beta-carboxy imidazopropionyl), 트립토판(W), 또는 티로신(Y)이거나, 부존재하고;
- [0033] X2는 알파-메틸-글루탐산(α-methyl-glutamic acid), Aib(aminoisobutyric acid), D-알라닌, 글리신(G), Sar(N-methylglycine), 세린(S) 또는 D-세린이며;
- [0034] X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
- [0035] X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
- [0036] X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
- [0037] X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
- [0038] X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;

- [0039] X15는 아스파르트산(D), 글루탐산(E) 또는 시스테인(C)이고;
- [0040] X16은 글루탐산(E), 아스파르트산(D), 세린(S), 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [0041] X17은 아스파르트산(D), 글루타민(Q), 글루탐산(E), 리신(K), 아르기닌(R), 세린(S), 시스테인(C), 또는 발린(V)이거나, 부존재하며;
- [0042] X18은 알라닌(A), 아스파르트산(D), 글루타민(Q), 글루탐산(E), 아르기닌(R), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [0043] X19는 알라닌(A), 아르기닌(R), 세린(S), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [0044] X20은 리신(K), 히스티딘(H), 글루탐산(E), 글루타민(Q), 아스파르트산(D), 아르기닌(R), 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [0045] X21은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 류신(L), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [0046] X23은 이소류신(I), 발린(V), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;
- [0047] X24는 발린(V), 아르기닌(R), 알라닌(A), 시스테인(C), 글루탐산(E), 리신(K), 글루타민(Q), 알파-메틸-글루탐산, 또는 류신(L)이거나, 부존재하며;
- [0048] X27는 이소류신(I), 발린(V), 알라닌(A), 리신(K), 메티오닌(M), 글루타민(Q), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;
- [0049] X28은 글루타민(Q), 리신(K), 아스파라긴(N), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;
- [0050] X30은 시스테인(C)이거나, 부존재함
- [0051] (단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호: 1과 동일한 경우는 제외함).
- [0052] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 일반식 1에서,
- [0053] X1이 히스티딘(H), 트립토판(W), 또는 티로신(Y)이거나, 부존재하고;
- [0054] X2가 세린(S) 또는 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [0055] X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
- [0056] X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
- [0057] X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
- [0058] X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
- [0059] X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
- [0060] X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이고;
- [0061] X16은 글루탐산(E), 세린(S) 또는 시스테인(C)이며;
- [0062] X17은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 리신(K), 아르기닌(R), 세린(S), 시스테인(C), 또는 발린(V) 이고;
- [0063] X18은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 아르기닌(R), 또는 시스테인(C)이며;
- [0064] X19는 알라닌(A), 또는 시스테인(C)이고;
- [0065] X20은 글루타민(Q), 아스파르트산(D), 리신(K), 또는 시스테인(C)이며;
- [0066] X21은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 류신(L), 발린(V), 또는 시스테인(C)이고;
- [0067] X23은 이소류신(I), 발린(V) 또는 아르기닌(R)이며;
- [0068] X24는 발린(V), 아르기닌(R), 알라닌(A), 글루탐산(E), 리신(K), 글루타민(Q), 또는 류신(L)이고;
- [0069] X27는 이소류신(I), 발린(V), 알라닌(A), 메티오닌(M), 글루타민(Q) 또는 아르기닌(R)이며;
- [0070] X28은 글루타민(Q), 리신(K), 아스파라긴(N) 또는 아르기닌(R)이고;

- [0071] X30은 시스테인(C)이거나, 부존재하는 것을 특징으로 한다.
- [0072] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 일반식 1에서
- [0073] X1이 히스티딘(H), 트립토판(W), 또는 티로신(Y)이고;
- [0074] X2가 세린(S) 또는 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [0075] X7은 시스테인(C), 트레오닌(T), 또는 발린(V)이고;
- [0076] X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이며;
- [0077] X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
- [0078] X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이며;
- [0079] X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
- [0080] X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이며;
- [0081] X16은 글루탐산(E), 세린(S) 또는 시스테인(C)이고;
- [0082] X17은 글루탐산(E), 리신(K), 아르기닌(R), 시스테인(C), 또는 발린(V)이며;
- [0083] X18은 아르기닌(R), 또는 시스테인(C)이고;
- [0084] X19는 알라닌(A), 또는 시스테인(C)이며;
- [0085] X20은 글루타민(Q) 또는 리신(K)이고;
- [0086] X21은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 발린(V), 또는 시스테인(C)이며;
- [0087] X23은 발린(V)이고;
- [0088] X24는 발린(V) 또는 글루타민(Q)이며;
- [0089] X27는 메티오닌(M)이고;
- [0090] X28은 아스파라긴(N) 또는 아르기닌(R)이며;
- [0091] X30은 시스테인(C)이거나, 부존재하는 것을 특징으로 한다.
- [0092] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 일반식 1에서
- [0093] X1이 티로신(Y)이고;
- [0094] X2가 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [0095] X7은 시스테인(C), 트레오닌(T), 또는 발린(V)이고;
- [0096] X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이며;
- [0097] X12는 리신(K)이고;
- [0098] X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이며;
- [0099] X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
- [0100] X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이며;
- [0101] X16은 글루탐산(E), 세린(S) 또는 시스테인(C)이고;
- [0102] X17은 리신(K), 아르기닌(R), 시스테인(C), 또는 발린(V)이며;
- [0103] X18은 아르기닌(R), 또는 시스테인(C)이고;
- [0104] X19는 알라닌(A), 또는 시스테인(C)이며;
- [0105] X20은 글루타민(Q) 또는 리신(K)이고;
- [0106] X21은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 또는 시스테인(C)이며;

- [0107] X23은 발린(V)이고;
- [0108] X24는 글루타민(Q)이며;
- [0109] X27는 메티오닌(M)이고;
- [0110] X28은 아스파라긴(N) 또는 아르기닌(R)이며;
- [0111] X30은 시스테인(C)이거나, 부존재하는 것을 특징으로 한다.
- [0112] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 일반식 1에서
- [0113] X1이 히스티딘(H), 트립토판(W), 또는 티로신(Y)이거나, 부존재하고;
- [0114] X2가 세린(S) 또는 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [0115] X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
- [0116] X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이며;
- [0117] X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
- [0118] X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이며;
- [0119] X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
- [0120] X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이며;
- [0121] X16은 글루탐산(E), 세린(S) 또는 시스테인(C)이고;
- [0122] X17은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 리신(K), 아르기닌(R), 세린(S), 시스테인(C), 또는 발린(V)이며;
- [0123] X18은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 아르기닌(R), 또는 시스테인(C)이고;
- [0124] X19는 알라닌(A), 또는 시스테인(C)이며;
- [0125] X20은 글루타민(Q), 아스파르트산(D), 또는 리신(K)이고;
- [0126] X21은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이며;
- [0127] X23은 발린(V)이고;
- [0128] X24는 발린(V) 또는 글루타민(Q)이며;
- [0129] X27는 이소류신(I) 또는 메티오닌(M)이고;
- [0130] X28은 아스파라긴(N) 또는 아르기닌(R)이며;
- [0131] X30은 시스테인(C)이거나, 부존재하는 것을 특징으로 한다.
- [0132] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 일반식 1에서
- [0133] X1이 티로신(Y)이고;
- [0134] X2가 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [0135] X7은 트레오닌(T)이고;
- [0136] X10은 티로신(Y)이며;
- [0137] X12는 리신(K)이고;
- [0138] X13은 티로신(Y)이며;
- [0139] X14는 류신(L)이고;
- [0140] X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이며;
- [0141] X16은 글루탐산(E), 세린(S) 또는 시스테인(C)이고;
- [0142] X17은 리신(K) 또는 아르기닌(R)이며;

- [0143] X18은 아르기닌(R)이고;
- [0144] X19는 알라닌(A)이며;
- [0145] X20은 글루타민(Q), 시스테인(C), 또는 리신(K)이고;
- [0146] X21은 아스파르트산(D), 시스테인(C), 발린(V) 또는 글루탐산(E)이며;
- [0147] X23은 발린(V) 또는 아르기닌(R)이고;
- [0148] X24는 글루타민(Q) 또는 류신(L)이며;
- [0149] X27는 메티오닌(M)이고;
- [0150] X28은 아스파라긴(N) 또는 아르기닌(R)이며;
- [0151] X30은 부존재하는 것을 특징으로 한다.
- [0152] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 글루카곤 아날로그는 하기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0153] Y-Aib-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-Y-L-X15-X16-X17-R-A-X20-X21-F-V-X24-W-L-M-N-T-X30 (일반식 2, 서열번호: 47)
- [0154] 상기 일반식 2에서
- [0155] X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
- [0156] X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
- [0157] X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
- [0158] X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이고;
- [0159] X16은 글루탐산(E) 또는 세린(S)이며;
- [0160] X17은 리신(K) 또는 아르기닌(R)이고;
- [0161] X20은 글루타민(Q) 또는 리신(K)이며;
- [0162] X21은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이고;
- [0163] X24는 발린(V) 또는 글루타민(Q)이고;
- [0164] X30은 시스테인(C)이거나, 부존재함.
- [0165] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 일반식 1에서, X10과 X14, X12와 X16, X16과 X20, X17과 X21, X20과 X24, 및 X24와 X28의 아미노산 쌍 중 적어도 하나의 아미노산 쌍에서 각각의 아미노산 간에 고리를 형성하는 것을 특징으로 한다.
- [0166] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 일반식 1의 X10과 X14, X12와 X16, X16과 X20, X17과 X21, X20과 X24, 및 X24와 X28의 아미노산 쌍 중 적어도 하나의 아미노산 쌍의 아미노산 각각이 고리를 형성할 수 있는 글루탐산 또는 리신으로 치환된 것을 특징으로 한다.
- [0167] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 글루카곤 아날로그의 지속형 결합체에서 상기 글루카곤 아날로그의 pI는 6내지 7이고, 천연형 글루카곤 대비 상대적 *in vitro* 활성이 200% 이상인 것을 특징으로 한다. 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 글루카곤 아날로그는 서열번호: 2 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0168] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 글루카곤 아날로그는 서열번호: 37의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0169] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 인슐린은 천연형 인슐린; 또는 천연형 인슐린에서 하나 이상의 아미노산에 치환, 추가, 제거, 수식 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는 변이가 일어난 인슐린 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [0170] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 인슐린 아날로그는 천연형 인슐린의 B 쇄의 1번 아미노산,

2번 아미노산, 3번 아미노산, 5번 아미노산, 8번 아미노산, 10번 아미노산, 12번 아미노산, 16번 아미노산, 23번 아미노산, 24번 아미노산, 25번 아미노산, 26번 아미노산, 27번 아미노산, 28번 아미노산, 29번 아미노산, 30번 아미노산, A쇄의 1번, 2번, 5번, 8번 아미노산, 10번 아미노산, 12번 아미노산 14번, 16번 아미노산, 17번 아미노산, 18번 아미노산 19번 및 21번 아미노산으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환, 또는 결실된 인슐린 아날로그인 것을 특징으로 한다.

- [0171] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 인슐린 아날로그는 하기 일반식 3으로 표시되는 서열번호: 48의 A-쇄와 하기 일반식 4로 표시되는 서열번호: 49의 B-쇄를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0172] [일반식 3]
- [0173] Xaa1-Xaa2-Val-Glu-Xaa5-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Xaa12-Leu-Xaa14-Gln-Xaa16-Glu-Asn-Xaa19-Cys-Xaa21(서열번호: 48)
- [0174] 상기 일반식 3에서,
- [0175] Xaa1는 알라닌, 글리신, 글루타민, 히스티딘, 글루탐산 또는 아스파라긴이고,
- [0176] Xaa2는 알라닌, 또는 이소류신이고,
- [0177] Xaa5는 알라닌, 글루탐산, 글루타민, 히스티딘 또는 아스파라긴이고,
- [0178] Xaa12는 알라닌, 세린, 글루타민, 글루탐산, 히스티딘 또는 아스파라긴이고,
- [0179] Xaa14는 알라닌, 티로신, 글루탐산, 히스티딘, 라이신, 아스파르트산 또는 아스파라긴이고,
- [0180] Xaa16는 알라닌, 류신, 티로신, 히스티딘, 글루탐산 또는 아스파라긴이고,
- [0181] Xaa19는 알라닌, 티로신, 세린, 글루탐산, 히스티딘, 트레오닌, 또는 아스파라긴이고,
- [0182] Xaa21은 아스파라긴, 글리신, 히스티딘, 또는 알라닌임.
- [0183] [일반식 4]
- [0184] Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Xaa8-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Xaa16-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Xaa23-Xaa24-Xaa25-Tyr-Xaa27-Xaa28-Lys-Thr(서열번호: 49)
- [0185] 상기 일반식 4에서,
- [0186] Xaa8은 알라닌, 또는 글리신이고,
- [0187] Xaa16은 티로신, 글루탐산, 세린, 트레오닌, 또는 아스파르트산이거나, 부존재하며,
- [0188] Xaa23은 글리신, 또는 알라닌이고,
- [0189] Xaa24는 알라닌, 또는 페닐알라닌 이고,
- [0190] Xaa25는 알라닌, 페닐알라닌, 아스파르트산, 또는 글루탐산이거나, 부존재하며,
- [0191] Xaa27는 트레오닌이거나, 부존재하며,
- [0192] Xaa28은 프롤린, 글루탐산, 또는 아스파르트산이거나, 부존재함
- [0193] (여기서 서열번호 48의 A-쇄 및 서열번호 49의 B-쇄를 포함하는 펩티드는 제외됨).
- [0194] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 인슐린 아날로그는 천연형 인슐린 B 쇠의 8번 아미노산, 23번 아미노산, 24번 아미노산, 25번 아미노산, A 쇠의 1번 아미노산, 2번 아미노산 및 19번 아미노산으로 이루어진 군에서 선택된 하나의 아미노산이 알라닌으로 치환되거나, A 쇠의 14번 아미노산이 글루탐산 또는 아스파라긴으로 치환된 것을 특징으로 한다.
- [0195] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 인슐린 아날로그는 서열번호: 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 및 67로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0196] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 인슐린 아날로그는 천연형 인슐린 B 쇠의 16번 아미노산이 글루탐산으로 치환되거나; 25번 아미노산이 결실되거나; 또는 천연형 인슐린 A 쇠의 14번 아미노산이 글루탐산 또는 알라닌으로 치환된 것을 특징으로 한다.

- [0197] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 인슐린 아날로그는 서열번호: 69 또는 71의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0198] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 인슐린 아날로그는 천연형 인슐린 B쇄의 16번 아미노산이 글루탐산, 세린, 트레오닌, 또는 아스파르트산으로 치환되거나; 25번 아미노산이 아스파르트산 또는 글루탐산으로 치환되거나; 천연형 인슐린 A쇄의 14번 아미노산이 히스티딘, 라이신, 알라닌, 또는 아스파르트산으로 치환되거나; 또는 19번 아미노산이 글루탐산, 세린, 또는 트레오닌으로 치환된 것을 특징으로 한다.
- [0199] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 인슐린 아날로그는 서열번호 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121 및 123으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0200] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 인슐린 아날로그는 상기 일반식 3으로 표시되는 서열번호: 48의 A쇄 및 상기 일반식 4로 표시되는 서열번호: 49의 B쇄로 구성되는 이중쇄 형태인 것을 특징으로 한다.
- [0201] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 A쇄 및 B쇄는 이황화 결합으로 연결되는 것을 특징으로 한다.
- [0202] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는 것을 특징으로 한다.
- [0203] [화학식 1]
- [0204] $X - La - F$
- [0205] 여기서,
- [0206] X는, 상기 인슐린 또는 글루카곤이고;
- [0207] L은, 링커이며;
- [0208] a는, 0 또는 자연수이며, 다만 a가 2 이상일 때, 각각의 L은 서로 독립적이고;
- [0209] F는, X의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 물질이며;
- [0210] 상기 "-"는 공유 또는 비공유 결합임.
- [0211] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 F는 고분자 중합체, 지방산, 콜레스테롤, 알부민 및 이의 단편, 알부민 결합물질, 특정 아미노산 서열의 반복단위의 중합체, 항체, 항체 단편, FcRn 결합물질, 생체 내 결합조직, 뉴클레오타이드, 파이브로넥틴, 트랜스페린(Transferrin), 사카라이드(saccharide), 헤파린, 및 엘라스틴으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0212] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 고분자 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 다당류, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히알루론산, 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0213] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 F는 면역글로불린 Fc 영역인 것을 특징으로 한다.
- [0214] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 F는 IgG Fc 영역인 것을 특징으로 한다.
- [0215] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 비당쇄화된 것을 특징으로 한다.
- [0216] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 (a) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인; (b) CH1 도메인 및 CH2 도메인; (c) CH1 도메인 및 CH3 도메인; (d) CH2 도메인 및 CH3 도메인; (e) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인 중 1개 또는 2개 이상의 도메인과 면역글로불린 힌지 영역 또는 힌지 영역의 일부와의 조합; 및 (f) 중쇄 불변영역 각 도메인과 경쇄 불변영역의 이량체로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0217] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 이황화 결합을 형성할 수 있는 부위가 제거되거나, 천연형 Fc에서 N-말단의 일부 아미노산이 제거되거나, 천연형 Fc의 N-말단에 메티오닌 잔기가 부가되거나, 보체결합부위가 제거되거나 또는 ADCC(antibody dependent cell mediated cytotoxicity) 부위가 제거된 것을 특징으로 한다.

- [0218] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE 또는 IgM에서 유래된 면역글로불린 Fc 단편인 것을 특징으로 한다.
- [0219] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM으로 이루어진 군에서 선택되는 면역글로불린에서 유래된 상이한 기원을 가진 도메인의 하이브리드인 것을 특징으로 한다.
- [0220] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 L은 펩타이드, 지방산, 사카라이드 (saccharide), 고분자 중합체, 저분자 화합물, 뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0221] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 고분자 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 다당류, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히알루론산, 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0222] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 L은 폴리에틸렌 글리콜인 것을 특징으로 한다.
- [0224] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 인슐린; 및 글루카곤을 포함하는 저혈당 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0225] 하나의 구체예에 따른 조성물로서, 상기 인슐린은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태인 것을 특징으로 한다.
- [0226] 앞선 구체예에 따른 조성물로서, 상기 글루카곤은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태인 것을 특징으로 한다.
- [0227] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 인슐린은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태이고; 상기 글루카곤은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태인 것을 특징으로 한다.
- [0229] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 인슐린; 및 글루카곤을 포함하는 인슐린 부작용 개선용 조성물을 제공한다.
- [0230] 하나의 구체예에 따른 조성물로서, 상기 인슐린은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태인 것을 특징으로 한다.
- [0231] 앞선 구체예에 따른 조성물로서, 상기 글루카곤은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태인 것을 특징으로 한다.
- [0232] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 인슐린은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태이고; 상기 글루카곤은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태인 것을 특징으로 한다.
- [0234] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 인슐린; 및 글루카곤을 포함하는, 인슐린 관련 질환 환자의 저혈당 개선용 복합제제를 제공한다.
- [0235] 하나의 구체예에 따른 복합제제로서, 상기 인슐린은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태인 것을 특징으로 한다.
- [0236] 앞선 구체예에 따른 복합제제로서, 상기 글루카곤은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태인 것을 특징으로 한다.
- [0237] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 복합제제로서, 상기 인슐린은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태이고; 상기 글루카곤은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생

체적합성물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태인 것을 특징으로 한다.

[0238] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 저혈당은 인슐린의 부작용인 것을 특징으로 한다.

[0239] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 복합제제는 체중 증가를 억제하는 것을 특징으로 한다.

[0240] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 복합제제는 인슐린 또는 이의 지속형 결합체 : 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체를 0.1:1 내지 100:1 중량비로 포함하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0242] 본 발명의 인슐린 또는 이의 지속형 결합체; 및 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체를 포함하는 조성물 또는 복합제제는 인슐린 관련 질환, 예컨대 당뇨병에 대한 예방 또는 치료 효과를 나타내는 동시에, 체중 증가, 저혈당과 같은 인슐린 투여의 부작용을 완화시킬 수 있는 신규한 병용 요법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0244] 도 1은 지속형 인슐린 결합체 및 지속형 글루카곤 결합체의 병용투여에 따른 혈중 혈당 변화를 확인한 도이다.

도 2는 지속형 인슐린 결합체 및 지속형 글루카곤 결합체의 병용투여에 따른 혈당 변화(AUC)를 확인한 도이다.

도 3은 지속형 인슐린 결합체 및 지속형 글루카곤 결합체의 병용투여에 따른 체중 변화를 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0245] 이하에서는, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0246] 한편, 본원에서 개시되는 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다.

[0248] 본 명세서 전반을 통하여, 천연적으로 존재하는 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 사용될 뿐만 아니라 Aib (α -아미노이소부티르산), Sar (N-methylglycine), 알파-메틸-글루탐산 (α -methyl-glutamic acid) 등과 같은 다른 아미노산에 대해 일반적으로 허용되는 3문자 코드가 사용된다. 또한 본 명세서에서 약어로 언급된 아미노산은 IUPAC-IUB 명명법에 따라 기재되었다.

[0250] 알라닌 Ala, A 아르기닌 Arg, R

[0251] 아스파라긴 Asn, N 아스파르트산 Asp, D

[0252] 시스테인 Cys, C 글루탐산 Glu, E

[0253] 글루타민 Gln, Q 글리신 Gly, G

[0254] 히스티딘 His, H 이소류신 Ile, I

[0255] 류신 Leu, L 리신 Lys, K

[0256] 메티오닌 Met, M 페닐알라닌 Phe, F

[0257] 프롤린 Pro, P 세린 Ser, S

[0258] 트레오닌 Thr, T 트립토판 Trp, W

[0259] 티로신 Tyr, Y 발린 Val, V

- [0261] 본 발명을 구현하기 위한 하나의 양태는 인슐린; 및 글루카곤을 포함하는 인슐린 관련 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물이다.
- [0262] 구체적으로, 상기 조성물은
- [0263] (i) 인슐린; 및 글루카곤을 포함하거나;
- [0264] (ii) 인슐린과 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된 인슐린 지속형 결합체; 및 글루카곤을 포함하거나;
- [0265] (iii) 인슐린; 및 글루카곤과 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된 글루카곤 지속형 결합체를 포함하거나; 또는
- [0266] (iv) 인슐린 지속형 결합체; 및 글루카곤 지속형 결합체를 포함하는 것일 수 있다.
- [0268] 본 발명의 인슐린 관련 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물은 인슐린 또는 이의 지속형 결합체; 및 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체를 포함하는 것으로서, 인슐린의 결핍, 부족, 또는 기능 저하에 따라 발생하는 인슐린 관련 질환의 예방 또는 치료 효과를 갖는 인슐린의 약효를 나타내면서도, 인슐린 투여에 따른 부작용 (예컨대, 체중 증가, 저혈당)을 완화할 수 있다.
- [0269] 본 발명의 실시예에서는 상기 인슐린 또는 이의 지속형 결합체; 및 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체를 포함하는 조성물을 투여한 db/db 마우스에서 혈당 강하 효과를 확인하였을 뿐만 아니라, 체중 증가 억제 및 저혈당 완화 효과를 확인하여, 본 발명에 따른 약학 조성물이 인슐린의 약효를 유지하면서도 그 부작용을 개선시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0271] 본 발명의 하나의 구체예로서, 상기 조성물은 인슐린 또는 이의 지속형 결합체; 및 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체를 병용하는 치료학적 용도를 제공하는 것일 수 있다.
- [0273] 본 출원에서, 상기 "조성물"은 인슐린 또는 이의 지속형 결합체; 및 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체를 포함하는 "조합물"과 병용될 수 있다. 상기 조성물은 키트 형태로 제공될 수 있다.
- [0275] 본 발명에서 용어 "조합물(combination)"은 인슐린 또는 이의 지속형 결합체; 및 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체의 병용 투여 용도를 갖는 것으로, "병용 용도(combined used)"와 같은 의미로 이해될 수 있다. 상기 조합물은
- [0276] a) (i) 인슐린 또는 이의 지속형 결합체; 및 (ii) 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체가 혼합된 하나의 혼합물(mixture)로 투여되는 것이거나; 또는
- [0277] b) (i) 인슐린 또는 이의 지속형 결합체; 및 (ii) 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체가 분리된 형태로 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0278] 인슐린 또는 이의 지속형 결합체; 및 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체가 분리된 형태일 경우, 인슐린 또는 이의 지속형 결합체; 및 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체가 별개의 제제로 제제화되어 동시, 개별, 순차, 또는 역순으로 투여될 수 있는 것일 수 있다.
- [0279] 본 발명에서, 병용 투여는 단지 동시의 투여를 의미하는 것뿐만이 아니라, 인슐린 또는 이의 지속형 결합체; 및 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체가 개체에 함께 작용하여 각 물질이 본연의 기능과 동등하거나 그 이상의 수준을 수행할 수 있는 투여 형태로 이해되어야 한다. 따라서, 본원에서, "병용"이란 용어가 사용될 경우 이는 동시, 개별, 순차, 또는 역순 투여를 나타내는 것으로 이해되어야 한다. 상기 투여가 순차, 역순 또는 개별적인 경우, 투여의 순서는 특별히 제한되지 않고 다만 2차 성분 투여의 간격은 상기 병용의 이로운 효과를 잃지 않도록 하는 것이어야 한다.

- [0281] 본 발명에서 용어 "조성물(composition)"은 상기 인슐린 또는 이의 지속형 결합체; 및 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체; 를 포함하는 조합물 그 자체이거나, 이를 포함하고, 치료학적 용도를 갖는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 그 예로, 인슐린 관련 질환의 예방 또는 치료 용도를 갖는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0282] 본 발명에 따른 조성물은 인슐린 또는 이의 지속형 결합체; 및 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체를 병용 투여하기 위한 것으로, 인슐린 또는 이의 지속형 결합체; 및 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체가 하나의 제제로 제제화된 것이거나, 또는 개별적으로 제제화된 것일 수 있다. 구체적으로, 인슐린 또는 이의 지속형 결합체; 및 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체를 동시, 개별, 순차, 또는 역순으로 투여하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0284] 본 발명에서 용어 "키트"는 인슐린 또는 이의 지속형 결합체; 및 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체를 병용 투여하기 위해, 본 발명에 따른 조합물 또는 조성물을 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로, 본 발명에 따른 키트에는 하나의 제제로 제제화된 인슐린 또는 이의 결합체; 및 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체, 또는 인슐린 또는 이의 결합체; 및 글루카곤 또는 이의 결합체의 개별 제제를 포함하는 것일 수 있고, 두 물질의 병용 투여에 필요한 물질을 추가적으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0286] 상기 인슐린; 및 글루카곤은 인슐린; 및 글루카곤에 대해 유의한 수준의 활성을 가지는 다양한 물질, 예컨대 화합물 또는 펩타이드 형태의 물질을 포함한다.
- [0288] 본 발명의 용어, "인슐린 관련 질환"은 인슐린의 결핍, 부족, 또는 기능 저하 등 인슐린 고유의 혈당 조절 기능에 이상이 생겨, 발병되는 질환을 일컫고, 인슐린의 투여로 인해 예방 또는 치료 효과를 기대할 수 있는 질환이라면 본 발명의 범주에 포함된다. 구체적으로, 상기 인슐린 관련 질환은 인슐린 저항성 질환, 당뇨, 과혈당증, 및 비만으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0290] 인슐린 관련 질환의 치료를 위해, 인슐린을 투여할 경우, 원하는 치료 효과를 얻을 수 있음에도 불구하고, 의도하지 않은 부작용, 예를 들어, 저혈당 또는 체중 증가가 나타나며, 이에, 환자에게 또 다른 질병과 고통을 야기하는 문제점이 있다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 인슐린 및 글루카곤의 병용 사용으로, 인슐린의 부작용인 저혈당을 완화하고, 체중 증가를 억제하면서도 인슐린 관련 질환에 대한 치료 효과를 나타낼 수 있다.
- [0292] 본 발명의 약학 조성물은 인슐린 또는 이의 지속형 결합체 : 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체를 인슐린 관련 질환에 대한 치료 효과를 나타내면서도, 부작용을 완화할 수 있는 함량비로 포함할 수 있다. 구체적으로, 0.1:1 내지 100:1의 중량비로 포함하거나 또는, 1:1 내지 30:1, 1:1 내지 20:1, 1:1 내지 16:1의 몰비로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0294] 본 발명에 따른 약학 조성물은 인슐린 또는 이의 지속형 결합체 및 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체를 특정 비율로 포함하여, 부작용이 억제된, 우수한 혈당 조절 효과를 나타낼 수 있다. 상기 중량비를 벗어날 경우, 예를 들어, 인슐린 또는 이의 지속형 결합체가 과량 포함될 경우, 인슐린 부작용이 현저하게 나타날 위험이 높고, 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체가 과량 포함될 경우, 인슐린 관련 질환의 치료 효과가 낮아질 수 있는 문제점이 있다.
- [0296] 본 발명에서 용어, "인슐린"은 이자의 베타세포에서 분비되는 호르몬의 한 종류로, 일반적으로 세포 내 포도당 흡수를 촉진하고 지방의 분해를 억제하여 체내의 혈당을 조절하는 역할을 한다. 인슐린은 혈당조절 기능이 없는 프로인슐린(proinsulin) 전구체의 형태에서 프로세싱을 거쳐 혈당 조절 기능을 가지는 인슐린이 된다. 인슐린은 2개의 폴리펩티드 쇠, 즉 각각 21개 및 30개 아미노산 잔기를 포함하는 A-쇠 및 B-쇠로 구성되어 있고, 이들

은 2개의 이황화 다리도 상호 연결되어 있다. 천연형 인슐린의 A-쇄 및 B-쇄는 각각 하기 서열번호: 124 및 125로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.

- [0297] A-쇄:
- [0298] Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn (서열번호: 124)
- [0300] B-쇄:
- [0301] 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 (서열번호: 125)
- [0303] 본 발명에서 용어, “프로인슐린 (proinsulin)” 은 인슐린의 전구체 분자를 말한다. 상기 프로인슐린은 인슐린 A 쇠 및 B 쇠, 그리고 그 사이에 C-펩타이드를 포함할 수 있다. 상기 프로인슐린은 사람 프로인슐린일 수 있다.
- [0305] 본 발명에서 인슐린은 천연형 인슐린일 수도 있고, 또는 천연형 인슐린에서 하나 이상의 아미노산에 치환, 추가, 제거, 수식 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는 변이가 일어난 아날로그, 유도체, 또는 단편일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0307] 본 발명에서 용어, "인슐린 아날로그(insulin analog)"란 천연형 인슐린과 상이한 비천연형 인슐린을 의미한다.
- [0308] 이러한 인슐린 아날로그는 천연형 인슐린의 일부 아미노산을 부가, 결실 또는 치환의 형태로 변형시킨 아날로그를 포함한다. 예를 들어, 천연형 인슐린의 B 쇠의 1번 아미노산, 2번 아미노산, 3번 아미노산, 5번 아미노산, 8번 아미노산, 10번 아미노산, 12번 아미노산, 16번 아미노산, 23번 아미노산, 24번 아미노산, 25번 아미노산, 26번 아미노산, 27번 아미노산, 28번 아미노산, 29번 아미노산, 30번 아미노산, A쇄의 1번, 2번, 5번, 8번 아미노산, 10번 아미노산, 12번 아미노산 14번, 16번 아미노산, 17번 아미노산, 18번 아미노산 19번 및 21번 아미노산으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환, 또는 결실된 인슐린 아날로그일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 아미노산의 치환은 일반적으로 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성(amphipathic nature)에서의 유사성에 근거하여 발생할 수 있고, 이와 같은 유사한 성질을 갖는 아미노산으로의 보존적 치환은 동일 또는 유사한 활성을 나타낼 것으로 기대할 수 있다.
- [0309] 본 발명의 인슐린 아날로그는 한국 공개특허 제10-2014-0106452호 또는 제10-2017-0026284호의 내용을 참조할 수 있다.
- [0312] 본 발명에 적용되는 인슐린 아날로그는 단쇄이거나, 이중쇄 (two polypeptide chains) 형태일 수 있으며, 보다 바람직하게는 이중쇄 형태이나, 특별히 이에 제한되지 않는다. 상기 이중쇄는 천연형 인슐린의 A-쇄에 대응되는 폴리펩타이드와 천연형 인슐린의 B-쇄에 대응되는 폴리펩타이드, 두 개의 폴리펩타이드로 구성되는 것일 수 있다. 여기서, 상기 천연형 인슐린의 A-쇄 혹은 B-쇄에 대응된다는 것은 상기 이중쇄의 폴리펩타이드 중 어느 하나인 쇠를 천연형 인슐린의 A-쇄 또는 B-쇄와 서열 동일성을 비교하였을 때, 적어도 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 또는 95% 이상의 서열 동일성을 가지는 경우를 들 수 있으며, 특별히 이에 제한되지 않으며, 이중쇄를 구성하는 서열과 천연형 인슐린의 A-쇄 혹은 B-쇄의 서열과의 비교를 통하여 당업자가 용이하게 파악할 수 있다.
- [0313] 본 발명의 용어, "상동성(homology)"은, 야생형(wild type) 단백질의 아미노산 서열 또는 이를 코딩하는 염기 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 본 발명의 아미노산 서열 또는 염기 서열과 상기과 같은 퍼센트 이상의 동일한 서열을 가지는 서열을 포함한다. 이러한 상동성은 두 서열을 육안으로 비교하여 결정할 수도 있으나, 비교대상이 되는 서열을 나란히 배열하여 상동성 정도를 분석해 주는 생물정보 알고리즘(bioinformatic algorithm)을 사용하여 결정할 수 있다. 상기 두 개의 아미노산 서열 사이의 상동성은 백분율로 표시할 수 있다. 유용한 자동화된 알고리즘은 Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group, Madison,

W, USA)의 GAP, BESTFIT, FASTA와 TFASTA 컴퓨터 소프트웨어 모듈에서 이용가능하다. 상기 모듈에서 자동화된 배열 알고리즘은 Needleman & Wunsch와 Pearson & Lipman과 Smith & Waterman 서열 배열 알고리즘을 포함한다. 다른 유용한 배열에 대한 알고리즘과 상동성 결정은 FASTP, BLAST, BLAST2, PSIBLAST와 CLUSTAL W를 포함하는 소프트웨어에서 자동화되어 있다.

- [0314] 본 발명에 이용되는 인슐린 및 글루카곤의 서열 및 이를 코딩하는 염기서열의 정보는 NCBI 등 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있다.
- [0316] 구체적인 일 실시예에서, 본 발명의 인슐린 아날로그는 하기 일반식 3으로 표시되는 서열번호: 48의 A 쇄와 하기 일반식 4로 표시되는 서열번호: 49의 B 쇄를 포함하는 조성물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:
- [0317] [일반식 3]
- [0318] Xaa1-Xaa2-Val-Glu-Xaa5-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Xaa12-Leu-Xaa14-Gln-Xaa16-Glu-Asn-Xaa19-Cys-Xaa21(서열번호: 48)
- [0319] 상기 일반식 3에서,
- [0320] Xaa1는 알라닌, 글리신, 글루타민, 히스티딘, 글루탐산 또는 아스파라긴이고,
- [0321] Xaa2는 알라닌, 또는 이소류신이고,
- [0322] Xaa5는 알라닌, 글루탐산, 글루타민, 히스티딘 또는 아스파라긴이고,
- [0323] Xaa12는 알라닌, 세린, 글루타민, 글루탐산, 히스티딘 또는 아스파라긴이고,
- [0324] Xaa14는 알라닌, 티로신, 글루탐산, 히스티딘, 라이신, 아스파르트산 또는 아스파라긴이고,
- [0325] Xaa16는 알라닌, 류신, 티로신, 히스티딘, 글루탐산 또는 아스파라긴이고,
- [0326] Xaa19는 알라닌, 티로신, 세린, 글루탐산, 히스티딘, 트레오닌, 또는 아스파라긴이고,
- [0327] Xaa21은 아스파라긴, 글리신, 히스티딘, 또는 알라닌임.
- [0328] [일반식 4]
- [0329] Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Xaa8-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Xaa16-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Xaa23-Xaa24-Xaa25-Tyr-Xaa27-Xaa28-Lys-Thr(서열번호: 49)
- [0330] 상기 일반식 4에서,
- [0331] Xaa8은 알라닌, 또는 글리신이고,
- [0332] Xaa16은 티로신, 글루탐산, 세린, 트레오닌, 또는 아스파르트산이거나, 부존재하며,
- [0333] Xaa23은 글리신, 또는 알라닌이고,
- [0334] Xaa24는 알라닌, 또는 페닐알라닌이고,
- [0335] Xaa25는 알라닌, 페닐알라닌, 아스파르트산, 또는 글루탐산이거나, 부존재하며,
- [0336] Xaa27는 트레오닌이거나, 부존재하며,
- [0337] Xaa28은 프롤린, 글루탐산, 또는 아스파르트산이거나, 부존재함
- [0338] (여기서 서열번호 48의 A-쇄 및 서열번호 49의 B-쇄를 포함하는 펩티드는 제외됨)
- [0340] 보다 구체적으로, 상기 인슐린 아날로그는 천연형 인슐린 B 쇄의 8번 아미노산, 23번 아미노산, 24번 아미노산, 25번 아미노산, A 쇄의 1번 아미노산, 2번 아미노산 및 19번 아미노산으로 이루어진 군에서 선택된 하나의 아미노산이 알라닌으로 치환되거나, A 쇄의 14번 아미노산이 글루탐산 또는 아스파라긴으로 치환된 것일 수 있고, 특히, 서열번호: 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 및 67로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 상기 아미노산 서열로 구성될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0342] 또한, 상기 인슐린 아날로그는 천연형 인슐린 B 쇠의 16번 아미노산이 글루탐산으로 치환되거나; 25번 아미노산이 결실되거나; 또는 천연형 인슐린 A 쇠의 14번 아미노산이 글루탐산 또는 알라닌으로 치환된 것일 수 있고, 특히 서열번호: 69 또는 71의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 상기 아미노산 서열로 구성될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0344] 또한, 상기 인슐린 아날로그는 천연형 인슐린 B 쇠의 16번 아미노산이 글루탐산, 세린, 트레오닌, 또는 아스파르트산으로의 치환되거나; 25번 아미노산이 아스파르트산 또는 글루탐산으로의 치환되거나; 천연형 인슐린 A 쇠의 14번 아미노산이 히스티딘, 라이신, 알라닌, 또는 아스파르트산으로 치환되거나; 또는 19번 아미노산이 글루탐산, 세린, 또는 트레오닌으로 치환된 것일 수 있고, 특히, 서열번호: 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121 및 123으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 상기 아미노산 서열로 구성될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0346] 본원에서 '특정 서열번호로 구성되는'이라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 해당 서열번호의 아미노산 서열 앞뒤의 무의미한 서열 추가 또는 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 혹은 이의 잠재성 돌연변이 (silent mutation)를 제외하는 것이 아니며, 이러한 서열 추가 혹은 돌연변이를 가지는 경우에도 본원의 범위 내에 속하는 것이 자명하다.
- [0347] 이상의 내용은 본 발명의 다른 구체에 혹은 다른 양태에도 적용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0349] 한편, 본 발명의 인슐린 아날로그는 C-펩타이드가 제거되지 않은 단쇄 인슐린의 형태로, 상기 일반식 3으로 표시되는 서열번호: 48의 A 쇠 및 상기 일반식 4로 표시되는 서열번호: 49의 B 쇠를 포함하며, 인슐린의 활성 및 기능을 갖는 물질일 수 있다.
- [0351] 또한, 본 발명의 인슐린 아날로그는 A쇄 및 B쇄 사이에 C-펩타이드를 포함하는 프로인슐린에서 상기 C-펩타이드를 제거하여 제조된 것일 수 있다. 상기 C-펩타이드의 제거는 당업계에서 알려진 방법을 통해 수행될 수 있으며, 구체적으로 트립신(Trypsin)과 카복시펩티데이즈 B (Carboxypeptidase B)의 처리에 의해 제조된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0353] 구체적으로, 본 발명의 인슐린 아날로그는 상기 일반식 3으로 표시되는 서열번호: 48의 A 쇠 및 상기 일반식 4로 표시되는 서열번호: 49의 B 쇠로 구성되는 것일 수 있고, 보다 구체적으로, 상기 A쇄 및 B쇄는 서로 2개의 이황화 다리로 연결된 이중쇄 인슐린 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0354] 본 발명에서 특정 서열번호로 표현되는, 프로인슐린 형태의 인슐린 아날로그에서 C-펩타이드를 제거하여 이중쇄 형태로 제조한 인슐린 아날로그 역시 본 발명의 범주에 포함됨은 자명하다.
- [0356] 상기 인슐린 아날로그는 천연형 인슐린과 비교하여 아미노산 서열에 하나 이상의 차이가 있는 펩타이드, 천연형 인슐린 서열을 개질(modification)을 통하여 변형시킨 펩타이드, 천연형 인슐린과 같이 생체 내의 혈당 조절 기능을 조절하는 천연형 인슐린의 모방체를 포함할 수 있다. 본 발명에서, 상기 인슐린 아날로그는 인슐린 유도체와 혼용되어 사용될 수 있다. 이러한 천연형 인슐린의 유도체는 생체 내 혈당 조절 기능을 가지는 것일 수 있다.
- [0357] 구체적으로, 인슐린의 유도체는 천연형 인슐린에서 일부 아미노산이 치환(substitution), 추가(addition), 제거(deletion) 및 수식(modification) 중 어느 하나의 방법 또는 이러한 방법들의 조합을 통하여 변형시킬 수 있다.
- [0358] 구체적으로, 천연형 인슐린의 A 쇠, B 쇠와 각각 적어도 80% 이상 아미노산 서열에서 상동성을 보이는 것일 수

있고/있거나 인슐린의 아미노산 한 잔기의 일부 그룹이 화학적으로 치환(예; alpha-methylation, alpha-hydroxylation), 제거(예; deamination) 또는 수식(예; N-methylation) 된 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0359] 유도체 제조를 위한 여러 방법들의 조합으로 본 발명에 적용되는 천연형 인슐린의 유도체를 제조할 수 있다.
- [0360] 또한, 인슐린의 유도체의 제조를 위한 이러한 변형은 L-형 혹은 D-형 아미노산, 및/또는 비-천연형 아미노산을 이용한 변형; 및/또는 천연형 서열을 개질 혹은 번역 후 변형 (예, 메틸화, 아실화, 유비퀴틴화, 분자 내 공유 결합 등) 함으로써 변형하는 것을 모두 포함한다.
- [0361] 또한, 인슐린의 아미노 및/또는 카르복시 말단에 하나 또는 그 이상의 아미노산이 추가된 것을 모두 포함한다.
- [0362] 상기 치환되거나 추가되는 아미노산은 인간 단백질에서 통상적으로 관찰되는 20개의 아미노산뿐만 아니라 비정형 또는 비-자연적 발생 아미노산을 사용할 수 있다. 비정형 아미노산의 상업적 출처에는 Sigma-Aldrich, ChemPep과 Genzyme pharmaceuticals가 포함된다. 이러한 아미노산이 포함된 펩타이드와 정형적인 펩타이드 서열은 상업화된 펩타이드 합성 회사, 예를 들어 미국의 American peptide company나 Bachem, 또는 한국의 Anygen을 통해 합성 및 구매 가능하나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [0364] 본 발명에서 용어, "천연형 인슐린, 인슐린 아날로그 또는 인슐린의 유도체의 단편"은 천연형 인슐린, 인슐린 아날로그 혹은 천연형 인슐린의 유도체의 아미노 말단 혹은 카르복시 말단에 하나 또는 그 이상의 아미노산이 제거된 형태를 말한다. 이러한 단편은 체내에서 혈당조절 기능을 보유할 수 있다.
- [0365] 또한, 본 발명의 인슐린 아날로그는 상기 천연형 인슐린의 유도체 및 단편의 제조에 사용된 각각의 제조 방법이 독립적으로 사용되거나, 조합되어 사용되어 제조된 것일 수 있다.
- [0366] 구체적으로, 본 발명에 따른 인슐린 아날로그는 상기와 같은 천연형 인슐린의 A-쇄 및 B-쇄에서 특정 아미노산 잔기의 변형을 포함하는 것으로, 구체적으로는 천연형 인슐린의 A-쇄의 특정 아미노산 잔기가 변형되고/되거나 B-쇄의 특정 아미노산 잔기가 변형된 것일 수 있다.
- [0368] 본 발명에 따른 약학 조성물은 인슐린의 혈당 조절 능력을 보유하는 한, (i) 천연형 인슐린; (ii) 인슐린 아날로그, (iii) 인슐린 유도체, (iv) 이들의 단편, 또는 (v) 이들의 조합을 유효 성분의 하나인 인슐린으로서 포함할 수 있다.
- [0370] 본 발명에서 용어, "글루카곤"은 이자의 알파세포에서 분비되는 호르몬의 한 종류로, 글리코겐의 분해를 촉진함으로써 포도당의 농도를 상승시켜 체내의 혈당을 높이는 역할을 한다. 천연형 글루카곤은 다음의 아미노산 서열을 가질 수 있다:
- [0372] His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr(서열번호: 1)
- [0374] 본 발명에서 글루카곤은 천연형 글루카곤일 수도 있고, 또는 천연형 글루카곤에서 하나 이상의 아미노산에 치환, 추가, 제거, 수식 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는 변이가 일어난 아날로그, 유도체, 또는 단편일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0375] 본 발명에서 용어, "글루카곤 아날로그(glucagon analog)"란 천연형 글루카곤과 상이한 비천연형 글루카곤을 의미한다.
- [0376] 이러한 글루카곤 아날로그는 천연형 글루카곤의 일부 아미노산을 부가, 결실 또는 치환의 형태로 변형시킨 아날로그를 포함한다.

- [0378] 본 발명의 글루카곤 아날로그는 천연형 글루카곤과 서열 동일성을 비교하였을 때, 적어도 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 또는 95% 이상의 서열 동일성을 가지는 경우를 들 수 있으며, 혈당을 높이는 효과를 갖는 이상, 특정 서열로 제한되지 않는다. 본 발명의 글루카곤 아날로그에 대해서는 한국 공개특허 제10-2017-003466호, 제10-2018- 0002544호 및 제10-2016-0082482호를 참조할 수 있다.
- [0380] 하나의 구체적인 양태로서, 상기 글루카곤 아날로그는 하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있다.
- [0382] X1-X2-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X24-W-L-X27-X28-T-X30 (일반식 1, 서열번호: 46)
- [0384] 상기 식에서,
- [0385] X1은 히스티딘, 데스아미노-히스티딜(desamino-histidyl), 디메틸-히스티딜(N-dimethyl-histidyl), 베타-히드록시 이미다조프로피오닐(beta-hydroxy imidazopropionyl), 4-이미다조아세틸(4-imidazoacetyl), 베타-카르복시 이미다조프로피오닐(beta-carboxy imidazopropionyl), 트립토판, 또는 티로신이거나, 부존재하고;
- [0386] X2는 알파-메틸-글루탐산(α -methyl-glutamic acid), Aib(aminoisobutyric acid), D-알라닌, 글리신, Sar(N-methylglycine), 세린 또는 D-세린이며;
- [0387] X7은 트레오닌, 발린 또는 시스테인이고;
- [0388] X10은 티로신 또는 시스테인이고;
- [0389] X12는 리신 또는 시스테인이고;
- [0390] X13은 티로신 또는 시스테인이고;
- [0391] X14는 류신 또는 시스테인이고;
- [0392] X15는 아스파르트산, 글루탐산 또는 시스테인이고;
- [0393] X16은 글루탐산, 아스파르트산, 세린, 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인이거나, 부존재하며;
- [0394] X17은 아스파르트산, 글루타민, 글루탐산, 리신, 아르기닌, 세린, 시스테인, 또는 발린이거나, 부존재하며;
- [0395] X18은 알라닌, 아스파르트산, 글루타민, 글루탐산, 아르기닌, 발린, 또는 시스테인이거나, 부존재하며;
- [0396] X19는 알라닌, 아르기닌, 세린, 발린, 또는 시스테인이거나, 부존재하며;
- [0397] X20은 리신, 히스티딘, 글루탐산, 글루타민, 아스파르트산, 아르기닌, 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인이거나, 부존재하며;
- [0398] X21은 아스파르트산, 글루탐산, 류신, 발린, 또는 시스테인이거나, 부존재하며;
- [0399] X23은 이소류신, 발린, 또는 아르기닌이거나, 부존재하며;
- [0400] X24는 발린, 아르기닌, 알라닌, 시스테인, 글루탐산, 리신, 글루타민, 알파-메틸-글루탐산, 또는 류신이거나, 부존재하며;
- [0401] X27는 이소류신, 발린, 알라닌, 리신, 메티오닌, 글루타민, 또는 아르기닌이거나, 부존재하며;
- [0402] X28은 글루타민, 리신, 아스파라긴, 또는 아르기닌이거나, 부존재하며;
- [0403] X30은 시스테인이거나, 부존재할 수 있다
- [0404] (단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호: 1과 동일한 경우는 제외함).

- [0406] 보다 더 구체적으로는,
- [0407] 상기 일반식 1에서,
- [0408] X1이 히스티딘, 트립토판, 또는 티로신이거나, 부존재하고;
- [0409] X2가 세린 또는 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [0410] X7은 트레오닌, 발린 또는 시스테인이고;
- [0411] X10은 티로신 또는 시스테인이고;
- [0412] X12는 리신 또는 시스테인이고;
- [0413] X13은 티로신 또는 시스테인이고;
- [0414] X14는 류신 또는 시스테인이고;
- [0415] X15는 아스파르트산, 또는 시스테인이고;
- [0416] X16은 글루탐산, 세린 또는 시스테인이며;
- [0417] X17은 아스파르트산, 글루탐산, 리신, 아르기닌, 세린, 시스테인, 또는 발린 이고;
- [0418] X18은 아스파르트산, 글루탐산, 아르기닌, 또는 시스테인이며;
- [0419] X19는 알라닌, 또는 시스테인이고;
- [0420] X20은 글루타민, 아스파르트산, 리신, 또는 시스테인이며;
- [0421] X21은 아스파르트산, 글루탐산, 류신, 발린, 또는 시스테인이고;
- [0422] X23은 이소류신, 발린 또는 아르기닌이며;
- [0423] X24는 발린, 아르기닌, 알라닌, 글루탐산, 리신, 글루타민, 또는 류신이고;
- [0424] X27는 이소류신, 발린, 알라닌, 메티오닌, 글루타민 또는 아르기닌이며;
- [0425] X28은 글루타민, 리신, 아스파라긴 또는 아르기닌이고;
- [0426] X30은 시스테인이거나, 부존재할 수 있다 (일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호 1과 동일한 경우는 제외함).

[0428] 그 예로, 상기 글루카곤 아날로그는 서열번호: 2 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호: 2 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 글루카곤 아날로그는 6 내지 7의 pI를 갖고/갖거나, 천연형 글루카곤 대비 상대적 *in vitro* 활성이 200% 이상인 것일 수 있고, 보다 구체적으로, 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 보다 더 구체적으로, 서열번호 37의 서열로 (필수적으로) 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0430] 구체적으로, 상기 일반식 1에서,
- [0431] 상기 일반식 1에서
- [0432] X1이 히스티딘, 트립토판, 또는 티로신이고;
- [0433] X2가 세린 또는 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [0434] X7은 시스테인, 트레오닌, 또는 발린이고;
- [0435] X10은 티로신 또는 시스테인이고;
- [0436] X12는 리신 또는 시스테인이고;
- [0437] X13은 티로신 또는 시스테인이고;

- [0438] X14는 류신 또는 시스테인이고;
- [0439] X15는 아스파르트산, 또는 시스테인이고;
- [0440] X16은 글루탐산, 세린 또는 시스테인이며;
- [0441] X17은 글루탐산, 리신, 아르기닌, 시스테인, 또는 발린이고;
- [0442] X18은 아르기닌, 또는 시스테인이며;
- [0443] X19는 알라닌, 또는 시스테인이고;
- [0444] X20은 글루타민 또는 리신이며;
- [0445] X21은 아스파르트산, 글루탐산, 발린, 또는 시스테인이고;
- [0446] X23은 발린이며;
- [0447] X24는 발린 또는 글루타민이고;
- [0448] X27는 메티오닌이며;
- [0449] X28은 아스파라긴 또는 아르기닌이고;
- [0450] X30은 시스테인이거나, 부존재하는 것일 수 있다.

[0452] 그 예로, 상기 펩타이드는 서열번호: 3, 11 내지 17, 19 내지 27, 29, 31, 33, 35 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호: 3, 11 내지 17, 19 내지 27, 29, 31, 33, 35 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0454] 구체적으로,
- [0455] 상기 일반식 1에서
- [0456] X1이 티로신이고;
- [0457] X2가 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [0458] X7은 시스테인, 트레오닌, 또는 발린이고;
- [0459] X10은 티로신 또는 시스테인이고;
- [0460] X12는 리신이고;
- [0461] X13은 티로신 또는 시스테인이고;
- [0462] X14는 류신 또는 시스테인이고;
- [0463] X15는 아스파르트산, 또는 시스테인이고;
- [0464] X16은 글루탐산, 세린 또는 시스테인이며;
- [0465] X17은 리신, 아르기닌, 시스테인, 또는 발린이고;
- [0466] X18은 아르기닌, 또는 시스테인이며;
- [0467] X19는 알라닌, 또는 시스테인이고;
- [0468] X20은 글루타민 또는 리신이며;
- [0469] X21은 아스파르트산, 글루탐산, 또는 시스테인이고;
- [0470] X23은 발린이며;
- [0471] X24는 글루타민이고;

- [0472] X27는 메티오닌이며;
- [0473] X28은 아스파라긴 또는 아르기닌이고;
- [0474] X30은 시스테인이거나, 부존재하는 것일 수 있다 (일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호: 1과 동일한 경우는 제외함).

- [0476] 그 예로, 상기 펩타이드는 서열번호: 12, 14, 17, 19 내지 25, 27, 29, 33, 35 내지 38, 40 내지 42, 및 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호: 12, 14, 17, 19 내지 25, 27, 29, 33, 35 내지 38, 및 40 내지 42, 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0478] 구체적으로, 상기 일반식 1에서
- [0479] X1이 히스티딘, 트립토판, 또는 티로신이거나, 부존재하고;
- [0480] X2가 세린 또는 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [0481] X7은 트레오닌, 발린 또는 시스테인이고;
- [0482] X10은 티로신 또는 시스테인이고;
- [0483] X12는 리신 또는 시스테인이고;
- [0484] X13은 티로신 또는 시스테인이고;
- [0485] X14는 류신 또는 시스테인이고;
- [0486] X15는 아스파르트산, 또는 시스테인이고;
- [0487] X16은 글루탐산, 세린 또는 시스테인이며;
- [0488] X17은 아스파르트산, 글루탐산, 리신, 아르기닌, 세린, 시스테인, 또는 발린 이고;
- [0489] X18은 아스파르트산, 글루탐산, 아르기닌, 또는 시스테인이며;
- [0490] X19는 알라닌, 또는 시스테인이고;
- [0491] X20은 글루타민, 아스파르트산, 또는 리신이며;
- [0492] X21은 아스파르트산, 또는 글루탐산이고;
- [0493] X23은 발린이며;
- [0494] X24는 발린 또는 글루타민이고;
- [0495] X27는 이소류신 또는 메티오닌이며;
- [0496] X28은 아스파라긴 또는 아르기닌이고;
- [0497] X30은 시스테인이거나, 부존재하는 것일 수 있다 (일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호 1과 동일한 경우는 제외함).

- [0499] 그 예로, 상기 펩타이드는 서열번호 2 내지 13, 15, 17, 20 내지 24, 26 내지 30, 32 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호 2 내지 13, 15, 17, 20 내지 24, 26 내지 30, 32 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0501] 구체적으로, 상기 일반식 1에서

- [0502] X1이 티로신이거나;
- [0503] X2가 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [0504] X7은 트레오닌이고;
- [0505] X10은 티로신이고;
- [0506] X12는 리신이고;
- [0507] X13은 티로신이고;
- [0508] X14는 류신이고;
- [0509] X15는 아스파르트산, 또는 시스테인이고;
- [0510] X16은 글루탐산, 세린 또는 시스테인이며;
- [0511] X17은 리신 또는 아르기닌이고;
- [0512] X18은 아르기닌이며;
- [0513] X19는 알라닌이고;
- [0514] X20은 글루타민, 시스테인, 또는 리신이며;
- [0515] X21은 아스파르트산, 시스테인, 발린 또는 글루탐산이고;
- [0516] X23은 발린 또는 아르기닌이며;
- [0517] X24는 글루타민 또는 류신이고;
- [0518] X27는 메티오닌이며;
- [0519] X28은 아스파라긴 또는 아르기닌이고;
- [0520] X30은 부존재하는 것일 수 있다.

- [0522] 그 예로, 상기 펩타이드는 서열번호: 14, 16, 18, 19, 25, 및 31로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호: 14, 16, 18, 19, 25, 및 31로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0524] 더 구체적으로, 상기 펩타이드는 하기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있다:

- [0526] Y-Aib-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-Y-L-X15-X16-X17-R-A-X20-X21-F-V-X24-W-L-M-N-T-X30 (일반식 2, 서열번호: 47)

- [0528] 상기 일반식 2에서
- [0529] X7은 트레오닌, 발린 또는 시스테인이고;
- [0530] X10은 티로신 또는 시스테인이고;
- [0531] X12는 리신 또는 시스테인이고;
- [0532] X15는 아스파르트산, 또는 시스테인이고;
- [0533] X16은 글루탐산 또는 세린이며;
- [0534] X17은 리신 또는 아르기닌이고;
- [0535] X20은 글루타민 또는 리신이며;

- [0536] X21은 아스파르트산, 또는 글루탐산이고;
- [0537] X24는 발린 또는 글루타민이고;
- [0538] X30은 시스테인이거나, 부존재할 수 있다.
- [0540] 그 예로, 상기 펩타이드는 서열번호: 12, 13, 15 및 36 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호: 12, 13, 15 및 36 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 보다 더 구체적으로, 상기 펩타이드는 서열번호: 12, 20, 혹은 37의 아미노산 서열을 포함하거나, 해당 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성되는 것을 특징으로 한다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0542] 구체적으로, 상기 일반식 2에서
- [0543] X7은 트레오닌, 발린 또는 시스테인이고;
- [0544] X10은 티로신 또는 시스테인이고;
- [0545] X12는 리신이고;
- [0546] X15는 아스파르트산이고;
- [0547] X16은 글루탐산 또는 세린이며;
- [0548] X17은 리신 또는 아르기닌이고;
- [0549] X20은 글루타민 또는 리신이며;
- [0550] X21은 아스파르트산 또는 글루탐산이고;
- [0551] X24는 글루타민이고;
- [0552] X30은 시스테인이거나, 부존재하는 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0553] 그 예로, 상기 펩타이드는 서열번호: 12, 36 내지 38, 40 내지 42, 및 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호: 12, 36 내지 38, 40 내지 42, 및 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0555] 상술한 글루카곤 아날로그는 분자 내 가교 (intramolecular bridge)를 포함할 수 있으며 (예컨대, 공유결합적 가교 또는 비공유결합적 가교), 구체적으로 고리를 포함하는 형태일 수 있다. 예컨대 글루카곤 아날로그의 16번 및 20번 아미노산 사이에 고리가 형성된 형태일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0556] 상기 고리의 비제한적인 예로 락탐 가교 (또는 락탐 고리)를 포함할 수 있다.
- [0557] 또한, 상기 글루카곤 아날로그는 고리를 포함하도록, 목적하는 위치에 고리를 형성할 수 있는 아미노산을 포함하도록 변형된 것을 모두 포함한다.
- [0558] 이러한 고리는 상기 글루카곤 아날로그 내의 아미노산 곁 사슬 간에 형성될 수 있으며, 그 예로 리신의 곁 사슬과 글루탐산의 곁 사슬 간에 락탐 고리가 형성되는 형태일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0559] 예컨대, 상기 일반식 1 혹은 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 일반식 1 혹은 일반식 2의 X10과 X14, X12와 X16, X16과 X20, X17과 X21, X20과 X24, 및 X24와 X28의 아미노산 쌍에서, 각 아미노산 쌍의 아미노산이 각각 글루탐산 또는 리신으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기, X_n (n은 자연수)에서 n은 제시된 아미노산 서열의 N-말단으로부터의 아미노산 위치를 나타낸다.
- [0560] 또한, 상기 일반식 1 혹은 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 X12와 X16의 아미노산 쌍, X16과 X20의 아미노산 쌍, 또는 X17과 X21의 아미노산 쌍의 아미노산 각각이 고리를 형성할 수 있는 글루탐산 또는 리신으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0561] 또한, 상기 일반식 1 혹은 2에서, X10과 X14, X12와 X16, X16과 X20, X17과 X21, X20과 X24, 및 X24와 X28의 아미노산 쌍 중 적어도 하나의 아미노산 쌍에서 각 아미노산 쌍의 각각의 아미노산 간에 고리 (예컨대, 락탐 고리)를 형성한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0562] 또한, 상기 일반식 1 또는 2에서, X16이 글루탐산이고, X20은 리신이며, X16과 X20의 측쇄가 락탐 고리를 형성하고 있는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0565] 본 발명에서 용어, "글루카곤의 유도체"는 천연형 글루카곤과 비교하여 아미노산 서열에 하나 이상의 차이가 있는 펩타이드, 천연형 글루카곤 서열을 개질(modification)을 통하여 변형시킨 펩타이드, 천연형 글루카곤과 같이 글루카곤 수용체를 활성화시킬 수 있는 천연형 글루카곤의 모방체를 포함한다. 이러한 천연형 글루카곤의 유도체는 생체 내 혈당 조절 기능을 가지는 것일 수 있다. 본 발명에서, 상기 글루카곤의 유도체는 글루카곤 아날로그와 혼용되어 사용될 수 있다.
- [0567] 본 발명의 글루카곤 아날로그 또는 글루카곤 유도체는 천연형 글루카곤에 대해 변화된 pI를 가져 개선된 물성을 나타내는 것일 수 있으며, 글루카곤 수용체를 활성화시키는 활성을 보유하면서 용해도가 개선된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0568] 또한, 상기 글루카곤 아날로그 또는 글루카곤 유도체는 천연적으로 존재하지 않는(non-naturally occurring) 것일 수 있다.
- [0570] 본 발명에서 용어, "등전점(isoelectric point)" 또는 "pI"는 어떤 폴리펩타이드 혹은 펩타이드 같은 분자에 있어서 그 전체 순하전(net charge)이 없게 되는(0) pH 값을 의미한다. 다양한 하전된 작용기가 존재하는 폴리펩타이드의 경우, pI에서 이들 하전의 합은 제로이다. pI보다 높은 pH에서 폴리펩타이드의 전체 순하전은 음성이 될 것이고, pI보다 낮은 pH 값에서 폴리펩타이드의 전체 순하전은 양성이 될 것이다.
- [0571] pI는 폴리알라미드, 전분 또는 아가로스로 구성되는 고정된 pH 구배 겔상에서 등전점 전기영동에 의해 또는 예를 들어 ExPASy 서버에서 pI/MW 툴(http://expasy.org/tools/pi_tool.html; Gasteiger et al., 2003)을 사용하여 아미노산 서열로부터 pI를 추산함으로써 결정될 수 있다.
- [0572] 본 발명에서 용어 "변화된 pI"는 천연 글루카곤의 아미노산 서열에서 일부 서열이 음전하 및 양전하를 띤 아미노산 잔기로 치환되어 천연 글루카곤의 pI와는 다른, 즉 이보다 감소하거나 증가한 pI를 갖는 것을 의미한다. 이렇게 변화된 pI를 갖는 펩타이드는 중성 pH에서 개선된 용해도 및/또는 높은 안정성을 나타낼 수 있다. 그러나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0573] 보다 구체적으로, 상기 글루카곤 아날로그 또는 유도체는 천연형 글루카곤의 pI 값 (6.8)이 아닌 변화된 pI 값을 가지는 것일 수 있으며, 보다 더 구체적으로 6.8 미만, 구체적으로 6.7 이하, 더 구체적으로 6.5 이하인 pI 값, 또한 구체적으로 6.8 초과, 7 이상, 더 구체적으로 7.5 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 천연형 글루카곤과 상이한 pI 값을 가진다면 본 발명의 범주에 포함된다. 특히, 천연형 글루카곤과 상이한 pI 값을 가짐으로써 천연형 글루카곤에 비해 중성 pH에서 개선된 용해도를 나타냄으로써 응집(agggregation)되는 정도가 낮다면, 본 발명의 범주에 특히 포함된다.
- [0574] 더 구체적으로, 4 내지 6.5 및/또는 7 내지 9.5, 더 구체적으로 7.5 내지 9.5, 더욱 더 구체적으로 8.0 내지 9.3의 pI 값을 가지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이 경우, 천연형 글루카곤에 비해 높거나 낮은 pI를 갖기 때문에 중성 pH 에서 천연형 글루카곤에 비해 개선된 용해도 및 높은 안정성을 나타낼 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0576] 구체적으로, 글루카곤의 유도체는 천연형 글루카곤에서 일부 아미노산이 치환(substitution), 추가(addition), 제거(deletion) 및 수식(modification) 중 어느 하나의 방법 또는 이러한 방법들의 조합을 통하여 변형시킬 수 있다. 상기 아미노산의 치환은 일반적으로 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성

(amphipathic nature)에서의 유사성에 근거하여 발생할 수 있고, 이와 같은 유사한 성질을 갖는 아미노산으로의 보존적 치환은 동일 또는 유사한 활성을 나타낼 것으로 기대할 수 있다.

- [0578] 이러한 방법들의 조합으로 제조되는 글루카곤의 유도체의 예로, 천연형 글루카곤과 아미노산 서열이 하나 이상 다르고, N-말단 아미노산 잔기에 탈아미노화 (deamination)된, 글루카곤 수용체에 대한 활성화 기능을 보유한 펩타이드 등이 있으나, 이에 제한되지 않으며, 유도체 제조를 위한 여러 방법들의 조합으로 본 발명에 적용되는 천연형 글루카곤의 유도체를 제조할 수 있다.
- [0579] 또한, 천연형 글루카곤의 유도체의 제조를 위한 이러한 변형은 L-형 혹은 D-형 아미노산, 및/또는 비-천연형 아미노산을 이용한 변형; 및/또는 천연형 서열을 개질, 예를 들어 측쇄 작용기의 변형, 분자 내 공유결합, 예컨대, 측쇄 간 고리 형성, 메틸화, 아실화, 유비퀴틴화, 인산화, 아미노핵산화, 바이오틴화 등과 같이 개질함으로써 변형하는 것을 모두 포함한다. 또한, 상기 변형은 비 천연형 화합물로의 치환을 모두 포함한다.
- [0580] 또한, 천연형 글루카곤의 아미노 및/또는 카르복시 말단에 하나 또는 그 이상의 아미노산이 추가된 것을 모두 포함한다.
- [0581] 상기 치환되거나 추가되는 아미노산은 인간 단백질에서 통상적으로 관찰되는 20개의 아미노산뿐만 아니라 비정형 또는 비-자연적 발생 아미노산을 사용할 수 있다. 비정형 아미노산의 상업적 출처에는 Sigma-Aldrich, ChemPep과 Genzyme pharmaceuticals가 포함된다. 이러한 아미노산이 포함된 펩타이드와 정형적인 펩타이드 서열은 상업화된 펩타이드 합성 회사, 예를 들어 미국의 American peptide company나 Bachem, 또는 한국의 Anygen을 통해 합성 및 구매 가능하다.
- [0582] 아미노산 유도체도 마찬가지로 방식으로 입수할 수 있는데, 그 예를 일부만 들자면 4-이미다조아세트산 (4-imidazoacetic acid) 등을 사용할 수 있다.
- [0584] 본 발명에서 용어, "천연형 글루카곤, 글루카곤 아날로그 또는 글루카곤의 유도체의 단편"은 체내에서 혈당 상승 효과를 가지면서, 천연형 글루카곤, 글루카곤 아날로그 혹은 천연형 글루카곤의 유도체의 아미노 말단 혹은 카르복시 말단에 하나 또는 그 이상의 아미노산이 제거된 형태를 말한다.
- [0585] 또한, 본 발명의 글루카곤 아날로그는 상기 천연형 글루카곤의 유도체 및 단편의 제조에 사용된 각각의 제조 방법이 독립적으로 사용되거나, 조합되어 사용되어 제조된 것일 수 있다.
- [0587] 본 발명에 따른 약학 조성물은 글루카곤의 혈당 조절 능력을 보유하는 한, (i) 천연형 글루카곤; (ii) 글루카곤 아날로그, (iii) 글루카곤 유도체, (iv) 이들의 단편, 또는 (v) 이들의 조합을 유효 성분의 하나인 글루카곤으로서 포함할 수 있다.
- [0589] 또한, 본 발명에 따른 펩타이드(예컨대, 인슐린, 인슐린 아날로그, 글루카곤, 글루카곤 아날로그 등)는 N-말단 및/또는 C-말단이 변형되지 않은 것일 수 있으나, 생체 내의 단백질 절단 효소들로부터 보호하고 안정성을 증가시키기 위하여 이의 N-말단 및/또는 C-말단 등이 화학적으로 수식되거나 유기단으로 보호되거나, 또는 펩타이드 말단 등에 아미노산이 추가되어 변형된 형태 역시 본 발명에 따른 펩타이드의 범주에 포함된다. C-말단이 변형되지 않은 경우, 본 발명에 따른 펩타이드의 말단은 카르복실기를 가지나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0590] 특히, 화학적으로 합성한 펩타이드의 경우, N- 및 C-말단이 전하를 띠고 있기 때문에, 이러한 전하를 제거하기 위하여 N-말단을 아세틸화 (acetylation) 및/또는 C-말단을 아미드화 (amidation)할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.
- [0591] 구체적으로, 본 발명의 인슐린 또는 이의 아날로그, 또는 글루카곤 또는 이의 아날로그의 N-말단 또는 C-말단은 아민기(-NH₂) 또는 카르복실기(-COOH)를 가질 수 있고, 글루카곤 또는 이의 아날로그의 C-말단은 아민기를 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0592] 본 명세서에서 따로 가리키는 바가 없으면, 본 발명에 따른 "펩타이드" 또는 이러한 펩타이드가 생체적합성 물질에 공유결합으로 연결된 "결합체"에 대한 명세서 상세한 설명이나 청구 범위의 기술은 해당 펩타이드 또는 결

합체는 물론이고, 해당 펩타이드 또는 결합체의 염(예컨대, 상기 펩타이드의 약학적으로 허용가능한 염), 또는 이의 용매화물의 형태를 모두 포함하는 범주에도 적용된다. 따라서 명세서에 "펩타이드" 또는 "결합체"라고만 기재되어 있더라도 해당 기재 내용은 그 특정 염, 그 특정 용매화물, 그 특정 염의 특정 용매화물에도 마찬가지로 적용된다. 이러한 염 형태는 예를 들어 약학적으로 허용되는 임의의 염을 사용한 형태일 수 있다. 상기 염의 종류는 특별히 제한되지는 않는다. 다만, 개체, 예컨대 포유류에게 안전하고 효과적인 형태인 것이 바람직하나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0593] 상기 용어, "약학적으로 허용되는"은 의약학적 판단의 범위 내에서, 과도한 독성, 자극, 또는 알레르기 반응 등을 유발하지 않고 원하는 용도에 효과적으로 사용 가능한 물질을 의미한다.
- [0594] 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용되는 염"이란 약학적으로 허용되는 무기산, 유기산, 또는 염기로부터 유도된 염을 포함한다. 적합한 산의 예로는 염산, 브롬산, 황산, 질산, 과염소산, 푸마르산, 말레산, 인산, 글리콜산, 락트산, 살리실산, 숙신산, 톨루엔-p-설폰산, 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 메탄설폰산, 포름산, 벤조산, 말론산, 나프탈렌-2-설폰산, 벤젠설폰산 등을 들 수 있다. 적합한 염기로부터 유도된 염은 나트륨, 칼륨 등의 알칼리 금속, 마그네슘 등의 알칼리 토금속, 및 암모늄 등을 포함할 수 있다.
- [0595] 또한, 본 발명에서 사용된 용어 "용매화물"은 본 발명에 따른 펩타이드, 결합체, 또는 이의 염이 용매 분자와 복합체를 형성한 것을 말한다.
- [0597] 또한, 본 발명의 펩타이드는 그 길이에 따라 이 분야에서 잘 알려진 방법, 예를 들어 자동 펩타이드 합성기에 의해 합성할 수 있으며, 유전자 조작 기술에 의하여 생산할 수도 있다.
- [0598] 구체적으로, 본 발명의 펩타이드는 표준 합성 방법, 재조합 발현 시스템, 또는 임의의 다른 당해 분야의 방법에 의해 제조될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 글루카곤 유도체는, 예를 들어 하기를 포함하는 방법을 포함하는 다수의 방법으로 합성될 수 있다:
- [0599] (a) 펩타이드를 고체상 또는 액체상 방법의 수단으로 단계적으로 또는 단편 조립에 의해 합성하고, 최종 펩타이드 생성물을 분리 및 정제하는 방법; 또는
- [0600] (b) 펩타이드를 인코딩하는 핵산 작제물을 숙주세포 내에서 발현시키고, 발현 생성물을 숙주 세포 배양물로부터 회수하는 방법; 또는
- [0601] (c) 펩타이드를 인코딩하는 핵산 작제물의 무세포 시험관 내 발현을 수행하고, 발현 생성물을 회수하는 방법; 또는
- [0602] (a), (b) 및 (c)의 임의의 조합으로 펩타이드의 단편을 수득하고, 이어서 단편을 연결시켜 펩타이드를 수득하고, 당해 펩타이드를 회수하는 방법.
- [0603] 보다 구체적인 예로, 유전자 조작을 통하여, 융합파트너 및 인슐린 또는 글루카곤, 또는 이의 아날로그를 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 융합 유전자를 제조하고 이를 숙주 세포에 형질전환시킨 후, 융합 단백질 형태로 발현하고, 단백질 분해효소 또는 화합물을 이용하여 융합 단백질로부터 인슐린 또는 글루카곤, 또는 이의 아날로그를 절단, 분리하여 원하는 펩타이드를 생산할 수 있다. 이를 위하여 예를 들어 Factor Xa나 엔테로키나제와 같은 단백질 분해효소, CNBr 또는 하이드록실아민과 같은 화합물에 의해 절단될 수 있는 아미노산 잔기를 코딩하는 DNA 서열을 융합파트너와 인슐린 또는 글루카곤, 또는 이의 아날로그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 사이에 삽입할 수 있다.
- [0605] 하나의 구체예에서, 본 발명의 인슐린 또는 글루카곤은 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태일 수 있다.
- [0607] 본 발명의 용어, 인슐린 또는 글루카곤의 "지속형 결합체" 또는 "결합체"는 인슐린 또는 글루카곤과 생체적합성물질이 결합된 구조를 가지며, 상기 생체적합성물질이 결합되지 않은 인슐린 또는 글루카곤에 비해 증가된 효력의 지속성을 나타낼 수 있다. 상기 지속형 결합체에서 생체적합성물질은 인슐린 또는 글루카곤에 공유결합으로 연결된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다. 본 발명에서, 상기 결합체의 일 구성 요소인 인슐

린 또는 글루카곤은, 천연형 서열을 갖는 인슐린 또는 글루카곤일 수 있고, 또는, 천연형 서열에서 하나 이상의 아미노산에 치환, 추가, 제거, 수식, 또는 이들의 조합의 변이가 일어난 인슐린 또는 글루카곤의 아날로그 또는 이의 유도체, 단편일 수 있으나, 천연형 인슐린 또는 글루카곤의 혈당 강하/상승 효과를 갖는 한, 제한 없이 본 발명의 결합체의 일 구성 요소로 사용될 수 있다.

- [0609] 본 발명에서 용어, "생체적합성물질"은 생리활성물질 (예, 글루카곤 유도체, 인슐린 분비 펩타이드 등)에 결합되어 생체적합성 물질부 또는 캐리어와 결합되지 않은 생리활성물질에 비하여 생리활성물질의 효력의 지속성을 증가시켜줄 수 있는 물질을 지칭한다. 상기 생체적합성물질은 생리활성물질에 공유결합으로 연결된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [0611] 구체적으로, 상기 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는, 결합체이다:
- [0612] [화학식 1]
- [0613] $X - La - F$
- [0614] 여기서,
- [0615] X는 상기 인슐린 또는 글루카곤이고;
- [0616] L은, 링커이며;
- [0617] a는, 0 또는 자연수이며, 다만 a가 2 이상일 때, 각각의 L은 서로 독립적이고;
- [0618] F는, X의 반감기를 증가시킬 수 있는 물질임.
- [0620] 본 발명의 조성물은 (i) 인슐린 및 글루카곤 (ii) 인슐린 지속형 결합체 및 글루카곤, (iii) 인슐린 및 글루카곤 지속형 결합체, 또는 (iv) 인슐린 지속형 결합체 및 글루카곤 지속형 결합체를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 지속형 결합체 형태의 인슐린 또는 글루카곤은 증가된 체내 지속성을 바탕으로, 우수한 혈당 조절 효과를 나타내는 한편, 인슐린의 부작용을 개선할 수 있다.
- [0622] 상기 결합체에서 F는 X, 즉 인슐린 또는 글루카곤의 반감기를 증가시킬 수 있는 물질로서, 본 발명의 상기 결합체를 구성하는 모이어티의 일 구성에 해당한다.
- [0623] 상기 F는 X와 공유 화학결합 또는 비공유 화학결합으로 서로 결합되는 것일 수 있으며, 공유 화학결합, 비공유 화학결합 또는 이들의 조합으로 L을 통하여 F와 X가 서로 결합되는 것일 수 있다.
- [0624] 상기 X의 반감기를 증가시킬 수 있는 물질은 생체적합성 물질일 수 있으며, 예를 들어, 고분자 중합체, 지방산, 콜레스테롤, 알부민 및 이의 단편, 알부민 결합물질, 특정 아미노산 서열의 반복단위의 중합체, 항체, 항체 단편, FcRn 결합물질, 생체 내 결합조직, 뉴클레오타이드, 파이브로넥틴, 트랜스페린(Transferrin), 다당류(saccharide), 헤파린, 및 엘라스틴으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [0625] 상기 엘라스틴의 경우 수용성 전구체인 인간 트로포엘라스틴(tropoelastin) 일 수 있으며, 이들 중 일부 서열 혹은 일부 반복단위의 중합체일 수 있으며, 예컨대, 엘라스틴 유사 폴리펩타이드인 경우를 모두 포함하나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0626] 상기 고분자 중합체의 예로, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 다당류, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히알루론산, 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 고분자 중합체를 들 수 있고, 상기 다당류는 텍스트란일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [0627] 상기 폴리에틸렌 글리콜은, 에틸렌 글리콜 동중 중합체, PEG 공중합체, 또는 모노메틸-치환된 PEG 중합체(mPEG)의 형태를 모두 포괄하는 용어이나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0628] 또한, 상기 생체적합성 물질은 폴리-리신, 폴리-아스파르트산 및 폴리-글루탐산과 같은 폴리-아미노산을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0629] 또한, 지방산은 생체 내 알부민과 결합력을 갖는 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [0630] 보다 구체적인 예로, 상기 FcRn 결합물질은 면역글로불린 Fc 영역일 수 있으며, 보다 구체적으로 IgG Fc 영역일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [0631] 본 발명의 펩타이드 내의 하나 이상의 아미노산 측쇄는 생체 내에서 가용성 및/또는 반감기를 증가시키고/시키거나 생체이용율을 증가시키기 위해 이러한 생체적합성 물질에 접합될 수 있다. 이러한 변형은 또한 치료학적 단백질 및 펩타이드의 소거 (clearance)를 감소시킬 수 있다.
- [0632] 상술한 생체적합성 물질은 수용성 (양친매성 또는 친수성) 및/또는 무독성 및/또는 약학적으로 허용가능한 것일 수 있다.
- [0633] 상기 F는 X와 직접적으로 연결되거나 (즉, 상기 화학식 1에서 a가 0이거나), 또는 링커 (L)를 통해 연결된 것일 수 있다.
- [0635] 본 발명에서, "면역글로불린 Fc 영역"은, 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역을 제외한, 중쇄 불변영역 2(CH2) 및/또는 중쇄 불변영역 3(CH3)부분을 포함하는 부위를 의미한다. 상기 면역글로불린 Fc 영역은 본 발명의 결합체의 모이어티를 이루는 일 구성일 수 있다.
- [0636] 이러한 면역글로불린 Fc 영역은 중쇄 불변영역에 힌지(hinge) 부분을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 천연형과 실질적으로 동등하거나 향상된 효과를 갖는 한, 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역만을 제외하고, 일부 또는 전체 중쇄 불변영역 1(CH1) 및/또는 경쇄불변영역 1(CL1)을 포함하는 확장된 Fc 영역일 수 있다. 또한, CH2 및/또는 CH3에 해당하는 상당히 긴 일부 아미노산 서열이 제거된 영역일 수도 있다.
- [0637] 예컨대, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 1) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인, 2) CH1 도메인 및 CH2 도메인, 3) CH1 도메인 및 CH3 도메인, 4) CH2 도메인 및 CH3 도메인, 5) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인 중 1개 또는 2개의 이상의 도메인과 면역글로불린 힌지 영역(또는 힌지 영역의 일부)와의 조합, 6) 중쇄 불변 영역 각 도메인과 경쇄 불변영역의 이량체일 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0638] 또한, 하나의 구체예로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 이합체 형태 (dimeric form)일 수 있으며, 이합체 형태의 하나의 Fc 영역에 X 한 분자가 공유결합적으로 연결될 수 있으며, 이때 상기 면역글로불린 Fc와 X는 비펩타이드성 중합체에 의해 서로 연결될 수 있다. 한편, 이합체 형태의 하나의 Fc 영역에 X 두 분자가 대칭적으로 결합하는 것 역시 가능하다. 이때 상기 면역글로불린 Fc와 X는 비펩타이드성 링커에 의해 서로 연결될 수 있다. 그러나, 상기 기술된 예에 제한되는 것은 아니다.
- [0639] 또한, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 천연형 아미노산 서열뿐만 아니라 이의 서열 유도체를 포함한다. 아미노산 서열 유도체란 천연 아미노산 서열 중의 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 것을 의미한다.
- [0640] 예를 들면, IgG Fc의 경우 결합에 중요하다고 알려진 214 내지 238, 297 내지 299, 318 내지 322 또는 327 내지 331번 아미노산 잔기들이 변형을 위해 적당한 부위로서 이용될 수 있다.
- [0641] 또한, 이황화 결합을 형성할 수 있는 부위가 제거되거나, 천연형 Fc에서 N-말단의 몇몇 아미노산이 제거되거나 또는 천연형 Fc의 N-말단에 메티오닌 잔기가 부가될 수도 있는 등 다양한 종류의 유도체가 가능하다. 또한, 이펙터 기능을 없애기 위해 보체결합부위, 예로 C1q 결합부위가 제거될 수도 있고, ADCC (antibody dependent cell mediated cytotoxicity) 부위가 제거될 수도 있다. 이러한 면역글로불린 Fc 영역의 서열 유도체를 제조하는 기술은 국제특허공개 제W0 97/34631호, 국제특허공개 제96/32478호 등에 개시되어 있다.
- [0642] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩타이드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다 (H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다. 경우에 따라서는

인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation), 아세틸화(acetylation) 및 아미드화(amidation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다.

- [0643] 상기 기술한 Fc 유도체는 본 발명의 Fc 영역과 동등한 생물학적 활성을 나타내며 Fc 영역의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성을 증대시킨 것일 수 있다.
- [0644] 또한, 이러한 Fc 영역은 인간, 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트 또는 기니아 피그 등의 동물의 생체 내에서 분리한 천연형으로부터 얻어질 수도 있고, 형질전환된 동물세포 또는 미생물로부터 얻어진 재조합형 또는 이의 유도체일 수 있다. 여기서, 천연형으로부터 획득하는 방법은 전체 면역글로불린을 인간 또는 동물의 생체로부터 분리한 후, 단백질 분해효소를 처리하여 획득하는 방법일 수 있다. 파파인을 처리할 경우에는 Fab 및 Fc로 절단되고, 펩신을 처리할 경우에는 pF'c 및 F(ab)₂로 절단된다. 이를 크기 배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography) 등을 이용하여 Fc 또는 pF'c를 분리할 수 있다. 더 구체적인 실시 형태에서는 인간 유래의 Fc 영역을 미생물로부터 수득한 재조합형 면역글로불린 Fc 영역이다.
- [0645] 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 천연형 당쇄, 천연형에 비해 증가된 당쇄, 천연형에 비해 감소한 당쇄 또는 당쇄가 제거된 형태일 수 있다. 이러한 면역글로불린 Fc 당쇄의 증감 또는 제거에는 화학적 방법, 효소학적 방법 및 미생물을 이용한 유전 공학적 방법과 같은 통상적인 방법이 이용될 수 있다. 여기서, Fc에서 당쇄가 제거된 면역글로불린 Fc 영역은 보체(c1q)와의 결합력이 현저히 저하되고, 항체-의존성 세포독성 또는 보체-의존성 세포 독성이 감소 또는 제거되므로, 생체 내에서 불필요한 면역 반응을 유발하지 않는다. 이런 점에서 약물의 캐리어로서의 본래의 목적에 보다 부합하는 형태는 당쇄가 제거되거나 비당쇄화된 면역글로불린 Fc 영역이라 할 것이다.
- [0646] 본 발명에서 "당쇄의 제거(Deglycosylation)"는 효소로 당을 제거한 Fc 영역을 말하며, 비당쇄화(Aglycosylation)는 원핵동물, 더 구체적인 실시 형태에서는 대장균에서 생산하여 당쇄화되지 않은 Fc 영역을 의미한다.
- [0647] 한편, 면역글로불린 Fc 영역은 인간 또는 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 피그 등의 동물기원일 수 있으며, 더 구체적인 실시 형태에서는 인간기원이다.
- [0648] 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 혼성(hybrid)에 의한 Fc 영역일 수 있다. 더 구체적인 실시 형태에서는 인간 혈액에 가장 풍부한 IgG 또는 IgM 유래이며, 보다 더 구체적인 실시 형태에서는 리간드 결합 단백질의 반감기를 향상시키는 것으로 공지된 IgG 유래이다. 더욱 더 구체적인 실시 형태에서 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG4 Fc 영역이며, 가장 구체적인 실시 형태에서 상기 면역글로불린 Fc 영역은 인간 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 영역이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0649] 한편, 본 발명에서 "조합(combination)"이란 이량체 또는 다량체를 형성할 때, 동일 기원 단쇄 면역글로불린 Fc 영역을 암호화하는 폴리펩타이드가 상이한 기원의 단쇄 폴리펩타이드와 결합을 형성하는 것을 의미한다. 즉, IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc 및 IgE의 Fc 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 2개 이상의 단편으로부터 이량체 또는 다량체의 제조가 가능하다.
- [0650] 또한, 상술한 결합체는 효력의 지속성이 천연형 인슐린 또는 글루카곤에 비해, 또는 F가 수식되지 않은 X에 비해 증가된 것일 수 있으며, 이러한 결합체는 상술한 형태뿐만 아니라, 생분해성 나노파티클에 봉입된 형태 등을 모두 포함한다.
- [0652] 또한, 상기 L은 펩타이드성 링커 또는 비펩타이드성 링커일 수 있다.
- [0653] 상기 L이 펩타이드성 링커일 때, 1개 이상의 아미노산을 포함할 수 있으며, 예컨대 1개부터 1000개의 아미노산을 포함할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 F와 X를 연결하기 위하여 공지된 다양한 펩타이드 링커가 본 발명에 사용될 수 있으며, 그 예로 [GS]_x 링커, [GGGS]_x 링커 및 [GGGGS]_x 링커 등을 포함하며, 여기서 x는 1 이상의 자연수일 수 있다. 그러나, 상기 예에 제한되는 것은 아니다.
- [0654] 본 발명에서 "비펩타이드성 링커"는 반복 단위가 2개 이상 결합된 생체 적합성 중합체를 포함한다. 상기 반복 단위들은 펩타이드 결합이 아닌 임의의 공유결합을 통해 서로 연결된다. 상기 비펩타이드성 링커는 본 발명의 결합체의 모이어티를 이루는 일 구성일 수 있으며, 상기 화학식 1에서 L에 해당된다. 본 발명에서 상기 비펩타

이드성 링커는 비펩타이드성 중합체와 혼용되어 사용될 수 있다.

- [0655] 본 발명에서 비펩타이드성 링커는 말단에 반응기를 포함하여, 결합체를 구성하는 다른 구성 요소와 반응을 통해 결합체를 형성할 수 있다. 양 말단에 반응성 작용기를 갖는 비펩타이드성 링커가 각 반응기를 통해 상기 화학식 1의 X 및 F와 결합하여 결합체를 형성할 경우, 상기 비펩타이드성 링커 또는 비펩타이드성 중합체는 비펩타이드성 중합체 연결부(linker moiety) 또는 비펩타이드성 링커 연결부로 명명할 수 있다.
- [0656] 상기 La에서 a는 1 이상일 수 있으며, a가 2 이상일 때 각각의 L은 독립적일 수 있다.
- [0657] 또한, 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 결합체는 양쪽 말단에 F, 구체적으로 면역글로불린 Fc 영역 및 X, 구체적으로 펩타이드 약물과 결합될 수 있는 반응기를 포함하는 비펩타이드성 링커를 통하여 F와 X가 서로 공유 결합적으로 연결된 것일 수 있다.
- [0658] 구체적으로, 상기 비펩타이드성 링커는 지방산, 다당류 (saccharide), 고분자 중합체, 저분자 화합물, 뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [0659] 특별히 이에 제한되지 않으나, 본 발명에서 상기 고분자 중합체는 0 초과 약 100 kDa 범위, 구체적으로 약 1 내지 약 100 kDa 범위, 보다 더 구체적으로 약 1 내지 약 20 kDa 범위일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0660] 본 발명에서 용어, "약"은 ± 0.5 , ± 0.4 , ± 0.3 , ± 0.2 , ± 0.1 등을 모두 포함하는 범위로, 약 이란 용어 뒤에 나오는 수치와 동등하거나 유사한 범위의 수치를 모두 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0662] 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 고분자 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 다당류, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히알루론산, 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있고, 상기 다당류는 텍스트란일 수 있다. 보다 구체적인 실시형태에서 상기 L은 폴리에틸렌글리콜일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0663] 본 발명에서 사용될 수 있는 비펩타이드성 링커는 생체 내 단백질 분해 효소에 저항성 있는 중합체이면 제한 없이 사용될 수 있다. 비펩타이드성 중합체의 분자량은 약 1 내지 약 100 kDa 범위, 구체적으로 약 1 내지 약 20 kDa 범위이나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 F에 해당하는 폴리펩타이드와 결합되는 본 발명의 비펩타이드성 링커는 한 종류의 중합체뿐만 아니라 상이한 종류의 중합체들의 조합이 사용될 수도 있다.
- [0664] 본 발명에서 용어, "약"은 ± 0.5 , ± 0.4 , ± 0.3 , ± 0.2 , ± 0.1 등을 모두 포함하는 범위로, 약 이란 용어 뒤에 나오는 수치와 동등하거나 유사한 범위의 수치를 모두 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0666] 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 비펩타이드성 링커의 양 말단은 각각 F, 예컨대 면역글로불린 Fc 영역의 아민기 또는 티올기 및 X의 아민기 또는 티올기에 결합할 수 있다.
- [0667] 구체적으로, 상기 비펩타이드성 중합체는 양쪽 말단에 각각 F (예컨대, 면역글로불린 Fc 영역) 및 X와 결합될 수 있는 반응기, 구체적으로는 X, 혹은 F (예컨대, 면역글로불린 Fc 영역)의 N-말단 또는 리신에 위치한 아민기, 또는 시스테인의 티올기와 결합될 수 있는 반응기를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0668] 또한, F, 예컨대 면역글로불린 Fc 영역 및 X와 결합될 수 있는, 상기 비펩타이드성 중합체의 반응기는 알데히드기, 말레이미드기 및 석시니미드 유도체로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0669] 상기에서, 알데히드기로 프로피온 알데히드기 또는 부틸 알데히드기를 예로서 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0670] 상기에서, 석시니미드 유도체로는 석시니미딜 발레르에이트, 석시니미딜 메틸부타노에이트, 석시니미딜 메틸프로피온에이트, 석시니미딜 부타노에이트, 석시니미딜 프로피오네이트, N-하이드록시석시니미드, 히드록시 석시니미딜, 석시니미딜 카르복시메틸 또는 석시니미딜 카보네이트가 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0671] 비펩타이드성 링커는 이러한 반응기를 통하여 X와 F에 연결될 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0672] 또한, 알데히드 결합에 의한 환원성 아민화로 생성된 최종 산물은 아미드 결합으로 연결된 것보다 훨씬 안정적

이다. 알데히드 반응기는 낮은 pH에서 N-말단에 선택적으로 반응하며, 높은 pH, 예를 들어 pH 9.0 조건에서는 리신 잔기와 공유결합을 형성할 수 있다.

- [0673] 또한, 상기 비펩타이드성 링커의 양쪽 말단의 반응기는 서로 동일하거나 또는 서로 상이할 수 있으며, 예를 들어, 한쪽 말단에는 말레이미드기를, 다른 쪽 말단에는 알데히드기, 프로피온 알데히드기, 또는 부틸 알데히드기를 가질 수 있다. 그러나, 비펩타이드성 링커의 각 말단에 Fc, 구체적으로 면역글로불린 Fc 영역과 X가 결합될 수 있다면, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [0674] 예를 들어, 상기 비펩타이드성 링커의 한쪽 말단에는 반응기로서 말레이미드기를 포함하고, 다른 쪽 말단에는 알데히드기, 프로피온 알데히드기 또는 부틸 알데히드기 등을 포함할 수 있다.
- [0675] 양쪽 말단에 히드록시 반응기를 갖는 폴리에틸렌 글리콜을 비펩타이드성 중합체로 이용하는 경우에는 공지의 화학반응에 의해 상기 히드록시기를 상기 다양한 반응기로 활성화하거나, 상업적으로 입수 가능한 변형된 반응기를 갖는 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 본 발명의 지속형 단백질 결합체를 제조할 수 있다.
- [0676] 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 비펩타이드성 중합체는 X의 시스테인 잔기, 보다 구체적으로 시스테인의 -SH 기에 연결되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0677] 예컨대, 상기 X에 해당하는 펩타이드에서 10번 시스테인 잔기, 13번 시스테인 잔기, 15번 시스테인 잔기, 17번 시스테인 잔기, 19번 시스테인 잔기, 21번 시스테인 잔기, 24번 시스테인 잔기, 28번 시스테인 잔기, 29번 시스테인 잔기, 30번 시스테인 잔기, 31번 시스테인 잔기, 40번 시스테인 잔기, 또는 41번 시스테인 잔기에 상기 비펩타이드성 중합체가 연결된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [0678] 구체적으로, 상기 시스테인 잔기의 -SH 기에 비펩타이드성 중합체의 반응기가 연결될 수 있으며, 반응기에 대해서는 앞서 기술한 내용이 모두 적용된다. 만약, 말레이미드-PEG-알데히드를 사용하는 경우, 말레이미드기는 X의 -SH 기와 티오에테르(thioether) 결합으로 연결하고, 알데히드기는 Fc, 구체적으로 면역글로불린 Fc의 -NH₂기와 환원적 아민화 반응을 통해 연결할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 이는 하나의 일례에 해당한다.
- [0679] 또한, 상기 결합체에서, 비펩타이드성 중합체의 반응기가 면역글로불린 Fc 영역의 N-말단에 위치한 -NH₂와 연결된 것일 수 있으나, 이는 하나의 일례에 해당한다.
- [0681] 본 발명의 용어, "예방"은 상기 조성물의 투여로 인슐린 관련 질환의 의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 상기 조성물의 투여로 인슐린 관련 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.
- [0682] 본 발명의 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 조성물의 투여 경로는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 조성물이 생체 내 표적에 도달할 수 있는 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 예를 들어 복강 내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장 내 투여 등이 될 수 있다.
- [0684] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다.
- [0685] 본 발명에서 용어 "약학적으로 허용가능한"이란 치료효과를 나타낼 수 있을 정도의 충분한 양과 부작용을 일으키지 않는 것을 의미하며, 질환의 종류, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 투여 경로, 투여 방법, 투여횟수, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물 등 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0686] 약학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소 및 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제 및 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제 및 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서, 서스펜션, 시럽 및 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 그 외에도 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐 및 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.

- [0687] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0688] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 동결건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.
- [0689] 또한, 상기 결합체는 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 텍스트란과 같은 탄수화물, 아스코르브산(ascorbic acid) 또는 글루타티온과 같은 항산화제(antioxidants), 킬레이트제, 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(stabilizers) 등이 약제로 사용될 수 있다.
- [0690] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량과 횟수는 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중 및 질환의 중등도 등의 여러 관련 인자와 함께, 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.
- [0691] 본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량 (single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량 (multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법 (fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 결합체의 바람직한 전체 용량은 하루에 환자 체중 1 kg당 약 0.0001 mg 내지 500 mg일 수 있다. 그러나 상기 결합체의 용량은 약학적 조성물의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설을 등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 상기 본 발명의 조성물의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.
- [0693] 본 발명의 약학적 조성물은 인슐린 또는 이의 지속형 결합체; 및 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체가 동시, 순차적 또는 역순으로 병용 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0695] 상술한 바와 같이, 상기 병용 투여는
- [0696] a) (i) 인슐린 또는 이의 지속형 결합체; 및 (ii) 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체가 혼합된 하나의 혼합물 (mixture)로 투여되는 것이거나; 또는
- [0697] b) (i) 인슐린 또는 이의 지속형 결합체; 및 (ii) 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체가 분리된 형태로 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0699] 인슐린 또는 이의 지속형 결합체; 및 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체가 분리된 형태일 경우, 인슐린 또는 이의 지속형 결합체; 및 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체가 별개의 제제로 제제화되어 동시, 개별, 순차, 또는 역순으로 투여될 수 있는 것일 수 있다.
- [0701] 본 발명을 구현하기 위한 다른 하나의 양태는 인슐린; 및 글루카곤을 포함하는 저혈당 예방 또는 치료용 약학 조성물이다.
- [0703] 구체적으로, 상기 조성물은
- [0704] (i) 인슐린; 및 글루카곤을 포함하거나;
- [0705] (ii) 인슐린과 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된 인슐린 지속형 결합체; 및 글루카곤을 포함하거나;

- [0706] (iii) 인슐린; 및 글루카곤과 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된 글루카곤 지속형 결합체를 포함하거나; 또는
- [0707] (iv) 인슐린 지속형 결합체; 및 글루카곤 지속형 결합체를 포함하는 것일 수 있다.
- [0709] 본 발명의 인슐린 또는 글루카곤은 천연형 서열을 갖는 인슐린 또는 글루카곤 뿐만 아니라, 하나 이상의 아미노산에 치환, 추가, 제거, 수식, 또는 이들의 조합인 변이가 도입된 아날로그, 유도체, 또는 이의 단편이 될 수 있음은 상술한 바와 같다.
- [0711] 본 발명에 따른 저혈당 예방 또는 치료용 약학 조성물은 인슐린 또는 이의 지속형 결합체; 및 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체를 포함하는 것으로서, 인슐린 투여에 따른 부작용으로 발생하는 저혈당을 완화할 수 있는 효과를 가지는 동시에, 체중 증가를 억제하는 효과도 나타낸다.
- [0712] 본 발명의 실시예에서는 상기 인슐린 또는 이의 지속형 결합체; 및 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체를 포함하는 조성물을 투여한 db/db 마우스에서 혈당 강하 효과를 확인하였을 뿐만 아니라, 체중 증가 억제 및 저혈당 완화 효과를 확인하여, 본 발명에 따른 약학 조성물이 인슐린의 약효를 유지하면서도 그 부작용을 개선시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0714] 본 발명의 약학적 조성물은 인슐린 또는 이의 지속형 결합체; 및 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체가 동시, 순차적 또는 역순으로 병용 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 병용 투여는 상술한 바와 같다.
- [0716] 본 발명을 구현하기 위한 또 다른 하나의 양태는 인슐린; 및 글루카곤을 포함하는 인슐린 부작용 개선용 조성물이다.
- [0718] 구체적으로, 상기 조성물은
- [0719] (i) 인슐린; 및 글루카곤을 포함하거나;
- [0720] (ii) 인슐린과 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된 인슐린 지속형 결합체; 및 글루카곤을 포함하거나;
- [0721] (iii) 인슐린; 및 글루카곤과 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성물질이 결합된 글루카곤 지속형 결합체를 포함하거나; 또는
- [0722] (iv) 인슐린 지속형 결합체; 및 글루카곤 지속형 결합체를 포함하는 것일 수 있다.
- [0724] 본 발명의 인슐린 또는 글루카곤은 천연형 서열을 갖는 인슐린 또는 글루카곤 뿐만 아니라, 하나 이상의 아미노산에 치환, 추가, 제거, 수식, 또는 이들의 조합인 변이가 도입된 아날로그, 유도체, 또는 이의 단편이 될 수 있음은 상술한 바와 같다.
- [0726] 본 발명에 따른 인슐린 부작용 개선용 조성물은 인슐린 또는 이의 지속형 결합체; 및 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체를 포함하는 것으로서, 인슐린 투여에 따른 부작용(예컨대, 저혈당 또는 체중 증가)를 완화하는 효과를 나타낸다.
- [0728] 본 발명의 약학적 조성물은 인슐린 또는 이의 지속형 결합체; 및 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체가 동시, 순차적 또는 역순으로 병용 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 병용 투여는 상술한 바와 같다.

- [0730] 본 발명을 구현하기 위한 또 다른 하나의 양태는
- [0731] (i) 인슐린 및 글루카곤;
- [0732] (ii) 인슐린 지속형 결합체 및 글루카곤;
- [0733] (iii) 인슐린 및 글루카곤 지속형 결합체; 또는
- [0734] (iv) 인슐린 지속형 결합체 및 글루카곤 지속형 결합체를 포함하는 인슐린 관련 질환 환자의 저혈당 개선용 복합제제이다.
- [0736] 하나의 구체예에서, 본 발명에 따른 복합제제는 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다.
- [0737] 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용가능한" 및 "약학적으로 허용되는 담체"에 대해서는 상술한 바와 같다.
- [0739] 본 발명에 따른 복합제제는 인슐린 관련 질환의 치료를 위한 복합제제로서, 인슐린에 의한 부작용(예컨대, 체중 증가, 저혈당)을 완화할 수 있는 효과를 가진다. 구체적으로, 상기 복합제제는 인슐린의 부작용인 저혈당을 개선할 수 있고, 또한, 체중 증가를 억제할 수 있다.
- [0740] 본 발명의 복합제제는 인슐린 또는 이의 지속형 결합체 : 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체를 0.1: 1 내지 100:1 중량비로 포함하거나 또는, 1:1 내지 30:1, 1:1 내지 20:1, 1:1 내지 16:1의 몰비로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0742] 본 발명을 구현하기 위한 또 다른 하나의 양태는
- [0743] (i) 인슐린 및 글루카곤;
- [0744] (ii) 인슐린 지속형 결합체 및 글루카곤;
- [0745] (iii) 인슐린 및 글루카곤 지속형 결합체; 또는
- [0746] (iv) 인슐린 지속형 결합체 및 글루카곤 지속형 결합체를 인슐린 관련 질환의 발병 위험이 있거나 발병한 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 인슐린 관련 질환의 예방 또는 치료 방법이다.
- [0747] 상기 투여하는 단계는 (i) 인슐린 및 글루카곤, (ii) 인슐린 지속형 결합체 및 글루카곤, (iii) 인슐린 및 글루카곤 지속형 결합체, 또는 (iv) 인슐린 지속형 결합체 및 글루카곤 지속형 결합체를 병용 투여하는 것에 의해 수행될 수 있다. 상기 물질은 각각 동시, 순차적, 또는 역순으로 투여될 수 있으며, 적절한 유효량의 조합으로 동시에 투여될 수 있으나, 특정 투여 방법 또는 순서에 제한되지 않는다. 또한 본 발명의 예방 또는 치료 방법은 상기 (i) 내지 (iv) 중 어느 하나를 포함하는 조성물 또는 복합제제를 개체에게 투여하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 투여되는 인슐린 또는 이의 지속형 결합체; 및 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체는 개별 제제일 수 있고, 또는 복합 제제일 수 있다.
- [0749] 인슐린 또는 이의 지속형 결합체 및 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체를 포함하는 본 발명의 조성물 또는 복합제제는 인슐린의 활성 또는 기능을 보충하여, 혈당을 우수하게 낮추면서도 체중 증가 및 저혈당과 같은 인슐린의 부작용을 억제하는 바, 인슐린 관련 질환 치료에 우수한 효과를 나타낸다.
- [0750] 또한, 상기 조성물 또는 복합제제는 약학적 분야에서 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위 투여형의 제제, 구체적으로는 단백질 의약품의 투여에 유용한 제제 형태로 제형화시켜 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여 방법을 이용하여 경구, 또는 피부, 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 골수 내, 수막강 내, 심실 내, 폐, 경피, 피하, 복 내, 비강 내, 소화관 내, 국소, 설하, 질 내 또는 직장 경로를 포함하는 비경구 투여 경로에 의하여 투여될 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0752] 본 발명의 방법은 상기 펩타이드를 포함하는 약학적 조성물을 약학적 유효량으로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 본 발명의 목적상, 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.

[0754] 본 발명을 구현하기 위한 또 다른 하나의 양태는

[0755] (i) 인슐린 및 글루카곤;

[0756] (ii) 인슐린 지속형 결합체 및 글루카곤;

[0757] (iii) 인슐린 및 글루카곤 지속형 결합체; 또는

[0758] (iv) 인슐린 지속형 결합체 및 글루카곤 지속형 결합체를 인슐린 부작용이 발생할 위험이 있거나 발생한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 인슐린 부작용의 개선 방법이다.

[0760] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 인슐린 관련 질환의 치료를 위한 약제의 제조에 있어 상기 조성물 또는 복합제제의 용도를 제공하는 것이다.

[0762] 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.

[0764] **실시예 1: 글루카곤 아날로그의 제조**

[0766] 본 발명자들은 인슐린 및 글루카곤의 병용 투여에 따른 당뇨 치료 효과를 확인하고, 더 나아가, 인슐린의 부작용인 저혈당의 위험을 상기 병용 투여에 의해 낮출 수 있는지 확인하고자 하였다.

[0768] 이에, 먼저, 하기의 표 1에 기재된 것과 같이, 천연형 글루카곤 및 이와 동등한 활성을 갖는 글루카곤 아날로그를 제조하였다. 한국 공개특허 제 10-2016-0082482호 및 제10-2017-003466, 제10-2018-0002544호를 참조하여 글루카곤 아날로그를 합성하고, 그의 pI 및 *in vitro* 활성을 측정하였다.

표 1

[0771]

| 서열번호 | 글루카곤 아날로그 서열 | 고리 여부 | 형성 pI | <i>In vitro</i> 활성(서열번호 1에 대한 상대적 활성,%) |
|---------|-------------------------------|-------|-------|---|
| 서열번호: 1 | HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT | - | 6.8 | 100 |
| 서열번호: 2 | HSQGTFTSDYSKYLDCDRAQDFVQWLMNT | - | 4.56 | 0.6 |
| 서열번호: 3 | HSQGTFTSDYSKYLDCERAQDFVQWLMNT | - | 4.66 | 6.1 |
| 서열번호: 4 | HSQGTFTSDYSKYLDSCDAQDFVQWLMNT | - | 4.13 | < 0.1 |
| 서열번호: 5 | HSQGTFTSDYSKYLDSCEAQDFVQWLMNT | - | 4.22 | 0.3 |
| 서열번호: 6 | HSQGTFTSDYSKYLDSCEADDFVQWLMNT | - | 4.03 | < 0.1 |
| 서열번호: 7 | YSQGTFTSDYSKYLDSCEADDFVQWLMNT | - | 3.71 | < 0.1 |
| 서열번호: 8 | YXQGTFTSDYSKYLDSCEADDFVQWLINT | - | 3.77 | < 0.1 |
| 서열번호: 9 | YXQGTFTSDYSKYLDSCEADDFVWLINT | - | 3.77 | < 0.1 |

| | | | | |
|----------|----------------------------------|-------|------|-------|
| 서열번호: 10 | YXQGTFTSDYSKYLDSCDADDFVWLINT | - | 3.66 | < 0.1 |
| 서열번호: 11 | YXQGTFTSDYSKYLDEKCAKEFVQWLMNT | - | 4.78 | 4.6 |
| 서열번호: 12 | YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTC | 고리 형성 | 6.20 | 56.3 |
| 서열번호: 13 | YXQGTFTSDYSCYLDSSRAQDFVQWLMNT | - | 4.43 | 5.2 |
| 서열번호: 14 | YXQGTFTSDYSKYLDCRAKEFVQWLMNT | - | 8.12 | 18.1 |
| 서열번호: 15 | YXQGTFTSDYSKYLCEKRAQDFVWLMNT | - | 6.11 | 1.1 |
| 서열번호: 16 | YXQGTFTSDYSKYLDCRRAQVFVQWLMRT | - | 9.11 | 4.2 |
| 서열번호: 17 | YXQGTFTSDYSKYLDCVRAQDFVQWLMRT | - | 6.03 | 23.2 |
| 서열번호: 18 | YXQGTFTSDYSKYLDSRRACDFRLWLMNT | - | 8.15 | < 0.1 |
| 서열번호: 19 | YXQGTFTSDYSKYLCEKRAKEFVQWLMNT | 고리 형성 | 8.12 | 12.1 |
| 서열번호: 20 | YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNT | 고리 형성 | 4.78 | 299.7 |
| 서열번호: 21 | YXQGTFTSDYSKYLDEKCAKEFVQWLMNT | 고리 형성 | 4.78 | 57.8 |
| 서열번호: 22 | YXQGTFTSDYSKYLDEKRCKEFVQWLMNT | 고리 형성 | 6.20 | 147.8 |
| 서열번호: 23 | YXQGTFTSDYSKYCDEKRAKEFVQWLMNT | 고리 형성 | 6.20 | 76.8 |
| 서열번호: 24 | YXQGTFTSDYSKCLDEKRAKEFVQWLMNT | 고리 형성 | 6.21 | 58.0 |
| 서열번호: 25 | YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKCFVQWLMNT | 고리 형성 | 8.12 | 46.9 |
| 서열번호: 26 | WXQGTFTSDYSKYLDEKRAKDFVQWLMNT | 고리 형성 | 4.68 | 1.0 |
| 서열번호: 27 | YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKDFVQWLMNT | 고리 형성 | 4.68 | 93.6 |
| 서열번호: 28 | WXQGTFTSDYSKYLDEKRAKDFVQWLMNT | 고리 형성 | 4.68 | < 0.1 |
| 서열번호: 29 | YXQGTFTSDYSKCLDEERRAKDFVQWLMNT | 고리 형성 | 6.15 | 61.3 |
| 서열번호: 30 | WXQGTFTSDYSKCLDEERRAKDFVQWLMNT | 고리 형성 | 4.44 | 0.3 |
| 서열번호: 31 | YXQGTFTSDYSKYLDCRAKEFVQWLMNT | 고리 형성 | 8.12 | 6.3 |
| 서열번호: 32 | -SQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNT | 고리 형성 | 4.78 | 0.7 |
| 서열번호: 33 | YXQGTFTSDYSKYLDSRRRAQDFVQWLMNT | - | 6.04 | 108.2 |
| 서열번호: 34 | WXQGTFTSDYSKYCDEERRAKKEFVQWLMNT | 고리 형성 | 6.21 | 0.2 |
| 서열번호: 35 | YXQGTFTSDYSKYCDEERRAKKEFVQWLMNT | 고리 형성 | 6.2 | 17.7 |
| 서열번호: 36 | YXQGTFTSDCSKYLDEERRAKKEFVQWLMNT | 고리 형성 | 6.21 | 9.9 |
| 서열번호: 37 | YXQGTFTSDYSKYLDEERRAKKEFVQWLMNTC | 고리 형성 | 6.21 | 225.5 |
| 서열번호: 38 | YXQGTFCSDYSKYLDEERRAKKEFVQWLMNT | 고리 형성 | 6.15 | 167.3 |
| 서열번호: 39 | YXQGTFTSDCSKYLDEERRAKDFVQWLMNT | 고리 형성 | 6.15 | 3.7 |
| 서열번호: 40 | YXQGTFTSDYSKYLDEERRAKDFVQWLMNTC | 고리 형성 | 6.15 | 40.8 |
| 서열번호: 41 | YXQGTFCSDYSKYLDEERRAKDFVQWLMNT | 고리 형성 | 6.03 | 45.2 |
| 서열번호: 42 | YXQGTFCSDYSKYLDSRRRAQDFVQWLMNT | - | 6.03 | 37.9 |
| 서열번호: 43 | YXQGTFTSDCSKYLDSRRRAQDFVQWLMNT | - | 6.03 | 1.6 |
| 서열번호: 44 | YXQGTFTSDYSKYLDSRRRAQDFVQWLMNTC | - | 6.21 | 75.4 |
| 서열번호: 45 | YXQGTFTSDYSCYLDEKRAKEFVQWLMNT | - | 6.04 | |

[0772] 상기 표 1에 기재된 서열에서 X로 표기된 아미노산은 비천연형 아미노산인 아미노이소부티르산(Aib)을, 아미노산 기호 아래 밑줄은 밑줄 친 해당 아미노산 쌍의 측쇄들 사이에서 락탐 고리의 형성을, 그리고 "-"는 해당 위치에는 아미노산 잔기가 없음을 나타낸다. 또한, 고리형성 여부에 대한 열에서 "-"은 해당 서열에는 고리가 형성되어 있지 않음을 가리킨다.

[0774] **실시예 2: 인슐린 아날로그의 제조**

[0776] 본 발명자들은 글루카곤 또는 이의 지속형 결합체와 병용 투여할 인슐린의 아날로그를 제조하고자 하였다. 구체적으로, 한국 공개특허 제10-2014-0106452호를 참조하여, 하기 표 2의 아날로그를 제조하였다.

[0778] 하기 표 2에 각각의 A 쇠 또는 B쇄의 아미노산의 변화 서열 및 아날로그 이름을 나타냈다. 즉, 아날로그 1의 경우 A 쇠의 1번 글리신이 알라닌으로 치환, 아날로그 4의 경우 B쇄의 8번 글리신이 알라닌으로 치환된 형태이다.

표 2

[0781]

| 아날로그 | 아미노산 변형 |
|--------|-----------------------|
| 아날로그 1 | A ¹ G → A |
| 아날로그 2 | A ² I → A |
| 아날로그 3 | A ¹⁹ Y → A |
| 아날로그 4 | B ⁸ G → A |
| 아날로그 5 | B ²³ G → A |
| 아날로그 6 | B ²⁴ F → A |
| 아날로그 7 | B ²⁵ F → A |
| 아날로그 8 | A ¹⁴ Y → E |
| 아날로그 9 | A ¹⁴ Y → N |

[0782]

하기 표 3에 각각의 인슐린 아날로그 1 내지 9의 DNA 서열 및 단백질 서열을 나타냈다.

표 3

[0784]

| | 서열 | 서열번호 | |
|--------|-----|---|----|
| 아날로그 1 | DNA | ttc gtt aac caa cac ttg tgt ggc tca cac ctg gtg gaa gct ctc tac cta gtg tgc ggg gaa cga ggc ttc ttc tac aca ccc aag acc cgc cgg gag gca gag gac ctg cag gtg ggg cag gtg gag ctg ggc ggg ggc cct ggg gca ggc agc ctg cag ccc ttg gcc ctg gag ggg tcc ctg cag aag cgt gcg att gtg gaa caa tgc tgt acc agc atc tgc tcc ctc tac cag ctg gag aac tac tgc aac | 50 |
| | 단백질 | 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 Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Ala Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn | 51 |
| 아날로그 2 | DNA | ttc gtt aac caa cac ttg tgt ggc tca cac ctg gtg gaa gct ctc tac cta gtg tgc ggg gaa cga ggc ttc ttc tac aca ccc aag acc cgc cgg gag gca gag gac ctg cag gtg ggg cag gtg gag ctg ggc ggg ggc cct ggg gca ggc agc ctg cag ccc ttg gcc ctg gag ggg tcc ctg cag aag cgt ggc gcg gtg gaa caa tgc tgt acc agc atc tgc tcc ctc tac cag ctg gag aac tac tgc aac | 52 |
| | 단백질 | 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 Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ala Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn | 53 |
| 아날로그 3 | DNA | ttc gtt aac caa cac ttg tgt ggc tca cac ctg gtg gaa gct ctc tac cta gtg tgc ggg gaa cga ggc ttc ttc tac aca ccc aag acc cgc cgg gag gca gag gac ctg cag gtg ggg cag gtg gag ctg ggc ggg ggc cct ggg gca ggc agc ctg cag ccc ttg gcc ctg gag ggg tcc ctg cag aag cgt ggc att gtg gaa caa tgc tgt acc agc atc tgc tcc ctc tac cag ctg gag aac gcg tgc aac | 54 |
| | 단백질 | 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 Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Ala Cys Asn | 55 |

| | | | |
|--------|-----|---|----|
| 아날로그 4 | DNA | ttc gtt aac caa cac ttg tgt gcg tca cac ctg gtg gaa gct ctc tac cta gtg tgc ggg gaa cga ggc ttc ttc tac aca ccc aag acc cgc cgg gag gca gag gac ctg cag gtg ggg cag gtg gag ctg ggc ggg ggc cct ggt gca ggc agc ctg cag ccc ttg gcc ctg gag ggg tcc ctg cag aag cgt ggc att gtg gaa caa tgc tgt acc agc atc tgc tcc ctc tac cag ctg gag aac tac tgc aac | 56 |
| | 단백질 | Phe Val Asn Gln His Leu Cys Ala Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn | 57 |
| 아날로그 5 | DNA | ttc gtt aac caa cac ttg tgt ggc tca cac ctg gtg gaa gct ctc tac cta gtg tgc ggg gaa cga gcg ttc ttc tac aca ccc aag acc cgc cgg gag gca gag gac ctg cag gtg ggg cag gtg gag ctg ggc ggg ggc cct ggt gca ggc agc ctg cag ccc ttg gcc ctg gag ggg tcc ctg cag aag cgt ggc att gtg gaa caa tgc tgt acc agc atc tgc tcc ctc tac cag ctg gag aac tac tgc aac | 58 |
| | 단백질 | Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Ala Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn | 59 |
| 아날로그 6 | DNA | ttc gtt aac caa cac ttg tgt ggc tca cac ctg gtg gaa gct ctc tac cta gtg tgc ggg gaa cga ggc gcg ttc tac aca ccc aag acc cgc cgg gag gca gag gac ctg cag gtg ggg cag gtg gag ctg ggc ggg ggc cct ggt gca ggc agc ctg cag ccc ttg gcc ctg gag ggg tcc ctg cag aag cgt ggc att gtg gaa caa tgc tgt acc agc atc tgc tcc ctc tac cag ctg gag aac tac tgc aac | 60 |
| | 단백질 | Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Ala Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn | 61 |
| 아날로그 7 | DNA | ttc gtt aac caa cac ttg tgt ggc tca cac ctg gtg gaa gct ctc tac cta gtg tgc ggg gaa cga ggc ttc gcg tac aca ccc aag acc cgc cgg gag gca gag gac ctg cag gtg ggg cag gtg gag ctg ggc ggg ggc cct ggt gca ggc agc ctg cag ccc ttg gcc ctg gag ggg tcc ctg cag aag cgt ggc att gtg gaa caa tgc tgt acc agc atc tgc tcc ctc tac cag ctg gag aac tac tgc aac | 62 |
| | 단백질 | Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Ala Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn | 63 |
| 아날로그 8 | DNA | ttc gtt aac caa cac ttg tgt ggc tca cac ctg gtg gaa gct ctc tac cta gtg tgc ggg gaa cga ggc ttc ttc tac aca ccc aag acc cgc cgg gag gca gag gac ctg cag gtg ggg cag gtg gag ctg ggc ggg ggc cct ggt gca ggc agc ctg cag ccc ttg gcc ctg gag ggg tcc ctg cag aag cgt ggc att gtg gaa caa tgc tgt acc agc atc tgc tcc ctc gaa cag ctg gag aac tac tgc aac tga | 64 |
| | 단백질 | 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 Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn | 65 |

| | | | |
|--------|-----|--|----|
| 아날로그 9 | DNA | ttc gtt aac caa cac ttg tgt ggc tca cac ctg gtg gaa gct ctc tac cta gtg tgc ggg gaa cga ggc ttc ttc tac aca ccc aag acc cgc cgg gag gca gag gac ctg cag gtg ggg cag gtg gag ctg ggc ggg ggc cct ggt gca ggc agc ctg cag ccc ttg gcc ctg gag ggg tcc ctg cag aag cgt ggc att gtg gaa caa tgc tgt acc agc atc tgc tcc ctc aac cag ctg gag aac tac tgc aac tga | 66 |
| | 단백질 | Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Asn Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn | 67 |

[0786] 또한, 본 발명자들은 한국 공개특허 제10-2017-0026284호를 참조하여, 하기 표 4의 인슐린 아날로그를 제조하였다.

표 4

| | |
|---------|---|
| 아날로그 | 아미노산 변형 |
| 아날로그 10 | A ¹⁴ Tyr → Glu + B ²⁵ 결실 |
| 아날로그 11 | A ¹⁴ Tyr → Ala + B ¹⁶ Tyr → Glu, B ²⁵ 결실 |

[0790] 하기 표 5에 각각의 인슐린 아날로그 10 및 11의 DNA 서열 및 단백질 서열을 나타내었다.

표 5

| | 서열 | 서열번호 | |
|---------|-----|---|----|
| 아날로그 10 | DNA | TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC GAA CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC TGA | 68 |
| | 단백질 | Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn | 69 |
| 아날로그 11 | DNA | TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC GAG CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC GCC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC TGA | 70 |
| | 단백질 | Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Ala Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn | 71 |

[0794] 추가적으로, 본 발명자들은 하기 표 6의 인슐린 아날로그를 제조하였다. 구체적으로, 보유 중인 천연형 인슐린 발현 벡터를 주형으로 하여 A-쇄 또는 B-쇄의 아미노산을 하나씩 변형시킨 인슐린 아날로그들을 제작하기 위해 순방향 및 역방향 올리고 뉴클레오타이드를 합성한 후(표 7), PCR을 진행하여 각각의 아날로그 유전자를 증폭하였다.

표 6

[0796]

| 아날로그 | 변화서열 |
|---------|-----------------------|
| 아날로그 12 | A ¹⁴ Y → H |
| 아날로그 13 | A ¹⁴ Y → K |
| 아날로그 14 | A ¹⁹ Y → E |
| 아날로그 15 | A ¹⁹ Y → S |
| 아날로그 16 | A ¹⁹ Y → T |
| 아날로그 17 | B ¹⁶ Y → E |
| 아날로그 18 | B ¹⁶ Y → S |
| 아날로그 19 | B ¹⁶ Y → T |
| 아날로그 20 | A ¹⁴ Y → A |
| 아날로그 21 | A ¹⁴ Y → D |
| 아날로그 22 | B ¹⁶ Y → D |
| 아날로그 23 | B ²⁵ F → D |
| 아날로그 24 | B ²⁵ F → E |

[0798] 인슐린 아날로그 증폭을 위한 프라이머는 하기 표 7에 나타났다.

표 7

[0800]

| 아날로그 | 서열 | 서열 번호 |
|---------|--|-------|
| 아날로그 12 | 5' CAGCATCTGCTCCCTCCATCAGCTGGAGAACTAC 3' | 72 |
| | 5' GTAGTTCTCCAGCTGATGGAGGGAGCAGATGCTG 3' | 73 |
| 아날로그 13 | 5' CAGCATCTGCTCCCTCAAGCAGCTGGAGAACTAC 3' | 74 |
| | 5' GTAGTTCTCCAGCTGCTTGAGGGAGCAGATGCTG 3' | 75 |
| 아날로그 14 | 5' CTACCAGCTGGAGAACGAGTGCAACTGAGGATCC 3' | 76 |
| | 5' GGATCCTCAGTTGCACTCGTTCACAGCTGGTAG 3' | 77 |
| 아날로그 15 | 5' CTACCAGCTGGAGAACTCCTGCAACTGAGGATCC 3' | 78 |
| | 5' GGATCCTCAGTTGCAGGAGTTCACAGCTGGTAG 3' | 79 |
| 아날로그 16 | 5' CTACCAGCTGGAGAACCTGCAACTGAGGATCC 3' | 80 |
| | 5' GGATCCTCAGTTGCAGGTGTTCTCCAGCTGGTAG 3' | 81 |
| 아날로그 17 | 5' CTGGTGGAAGCTCTCGAGCTAGTGTGCGGGGAAC 3' | 82 |
| | 5' GTTCCCGCACACTAGCTCGAGAGCTTCCACCAG 3' | 83 |
| 아날로그 18 | 5' CTGGTGGAAGCTCTCTCCCTAGTGTGCGGGGAAC 3' | 84 |
| | 5' GTTCCCGCACACTAGGGAGAGCTTCCACCAG 3' | 85 |
| 아날로그 19 | 5' CTGGTGGAAGCTCTACCCTAGTGTGCGGGGAAC 3' | 86 |
| | 5' GTTCCCGCACACTAGGGTGAGAGCTTCCACCAG 3' | 87 |
| 아날로그 20 | 5' CAGCATCTGCTCCCTCGCCAGCTGGAGAACTAC 3' | 88 |
| | 5' GTAGTTCTCCAGCTGGGCGAGGGAGCAGATGCTG 3' | 89 |
| 아날로그 21 | 5' CAGCATCTGCTCCCTCGACCAGCTGGAGAACTAC 3' | 90 |
| | 5' GTAGTTCTCCAGCTGGTCGAGGGAGCAGATGCTG 3' | 91 |

| | | |
|---------|---|----|
| 아날로그 22 | 5' CTGGTGGGAAGCTCTCGACCTAGTGTGCGGGGAAC 3' | 92 |
| | 5' GTTCCCCGCACACTAGGTCGAGAGCTTCCACCAG 3' | 93 |
| 아날로그 23 | 5' GGGGAACGAGGCTTCGACTACACACCCAAGACC 3' | 94 |
| | 5' GGTCTTGGGTGTGTAGTCGAAGCCTCGTTCCCC 3' | 95 |
| 아날로그 24 | 5' GGGGAACGAGGCTTCGAGTACACACCCAAGACC 3' | 96 |
| | 5' GGTCTTGGGTGTGTACTCGAAGCCTCGTTCCCC 3' | 97 |

[0802] 인슐린 아날로그 증폭을 위한 PCR 조건은 95℃ 30초, 55℃에서 30초, 68℃에서 6분으로 이 과정을 18회 반복하였다. 이와 같은 조건에서 얻어진 인슐린 아날로그 단편은 세포내의 봉입체 형태로 발현시키기 위하여 pET22b 벡터에 삽입되어 있으며 이렇게 얻어진 발현 벡터를 pET22b-인슐린 아날로그 1 내지 13라 명명하였다. 상기 발현 벡터는 T7 프로모터의 조절 하에 인슐린 아날로그 1 내지 13의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함한다. 상기 발현 벡터를 포함하는 숙주 내에서 인슐린 아날로그 단백질을 봉입체 형태로 발현시켰다.

[0803] 하기 표 4에 각각의 인슐린 아날로그 1 내지 13의 DNA 서열 및 단백질 서열을 나타냈다.

[0804] 각각의 서열 변경 확인은 DNA 서열 분석을 통하여 확인하였고, 그 결과, 각각의 인슐린 아날로그가 목적하는 바에 따라, 서열이 변경이 되었음을 확인할 수 있었다.

표 8

[0806]

| 아날로그 | 서열 | 서열번호 | |
|---------|-----|--|-----|
| 아날로그 12 | DNA | TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC CAT CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC | 98 |
| | 단백질 | 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 Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu His Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn | 99 |
| 아날로그 13 | DNA | TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC AAG CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC | 100 |
| | 단백질 | 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 Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Lys Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn | 101 |

| | | | |
|------------|-----|---|-----|
| 아날로그 14 | DNA | TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC GAG TGC AAC | 102 |
| | 단백질 | 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 Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Glu Cys Asn | 103 |
| 아날로그 15 | DNA | TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TCC TGC AAC | 104 |
| | 단백질 | 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 Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Ser Cys Asn | 105 |
| 아날로그 16 | DNA | TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC ACC TGC AAC | 106 |
| | 단백질 | 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 Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Thr Cys Asn | 107 |
| 아날로그 17 | DNA | TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC GAG CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC | 108 |
| | 단백질 | Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn | 109 |

| | | | |
|------------|-----|---|-----|
| 아날로그 18 | DNA | TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TCC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC | 110 |
| | 단백질 | Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Ser Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn | 111 |
| 아날로그 19 | DNA | TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC ACC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC | 112 |
| | 단백질 | Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Thr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn | 113 |
| 아날로그 20 | DNA | TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC GCC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC | 114 |
| | 단백질 | 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 Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Ala Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn | 115 |
| 아날로그 21 | DNA | TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC GAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC | 116 |
| | 단백질 | 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 Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Asp Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn | 117 |

| | | | |
|---------|-----|---|-----|
| 아날로그 22 | DNA | TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC GAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC | 118 |
| | 단백질 | Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Asp Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn | 119 |
| 아날로그 23 | DNA | TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC GAC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC | 120 |
| | 단백질 | Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Asp Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn | 121 |
| 아날로그 24 | DNA | TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC GAG TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC | 122 |
| | 단백질 | Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Glu Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn | 123 |

[0807] 실시예 3: 재조합 인슐린 아날로그 융합 펩타이드의 발현

[0809] T7 프로모터 조절하의 상기 재조합 인슐린 아날로그 발현을 수행 하였다. 각각의 재조합 인슐린 아날로그 발현 벡터로 *E.coli* BL21-DE3(*E. coli* B F-dcm ompT hsdS(rB-mB-) gal λDE3); 노바젠)을 형질전환하였다. 형질 전환 방법은 노바젠사에서 추천하는 방법을 따랐다. 각 재조합 발현 벡터가 형질 전환된 각각의 단일 콜로니를 취하여 암피실린(50 µg/ml)이 포함된 2X 루리아 브로스(Luria Broth, LB) 배지에 접종하고, 37°C에서 15시간 배양하였다. 재조합 균주 배양액과 30% 글리세롤이 포함된 2X LB 배지를 1:1(v/v)의 비율로 혼합하여 각 1 ml씩 크라이오-튜브에 분주하고, -140°C에 보관하였다. 이를 재조합 융합 단백질의 생산을 위한 세포 스톡(cell stock)으로 사용하였다.

[0810] 재조합 인슐린 아날로그들의 발현을 위하여, 각 세포 스톡 1 바이알을 녹여 500 ml의 2X 루리아 브로스에 접종하고 37°C에서 14~16시간 동안 진탕 배양하였다. OD600의 값이 5.0 이상을 나타내면 배양을 종료하고, 이를 종 배양액으로 사용하였다. 50 L 발효기(MSJ-U2, B.E.MARUBISHI, 일본)를 이용하여 종 배양액을 17 L의 발효 배지

에 집중하고 초기 배스(bath) 발효를 시작하였다. 배양조건은 온도 37℃, 공기량 20 L/분(1 vvm), 교반 속도 500 rpm 그리고 30% 암모니아수를 사용하여 pH 6.70으로 유지시켰다. 발효 진행은 배양액 내의 영양소가 제한되었을 때, 추가배지(feeding solution)를 첨가하여 유가배양을 진행하였다. 균주의 성장은 OD 값에 의해 모니터링하며, OD 값이 100이상에서 최종 농도 500 μM의 IPTG로 도입하였다. 배양은 도입 후 약 23~25시간까지 더 진행하며, 배양 종료 후, 원심 분리기를 사용하여 재조합 균주를 수확하여 사용 시까지 -80℃에 보관하였다.

[0812] 실시예 4: 재조합 인슐린 아날로그의 회수 및 재접힘 (refolding)

[0814] 상기 실시예 3에서 발현시킨 재조합 인슐린 아날로그들을 가용성 형태로 바꾸기 위해 세포를 파쇄하고 리폴딩하였다. 세포 펠렛 100 g(wet weight)을 1 L 용해 완충액(50 mM Tris-HCl(pH 9.0), 1 mM EDTA(pH 8.0), 0.2 M NaCl 및 0.5% 트리톤 X-100)에 재 부유하였다. 미세용액화 프로세서 Microfluidizer (Microfluidic Corp. Model M-110EH-30)를 이용하여 15,000 psi 압력으로 수행하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포 용해물을 7,000 rpm으로 4~8℃에서 20분 원심분리하여 상층액을 버리고, 3 L 세척완충액(0.5% 트리톤 X-100 및 50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA)에 재부유하였다. 7,000 rpm으로 4~8℃에서 20분 동안 원심 분리하여 펠렛을 증류수에 재부유한 후, 동일한 방법으로 원심 분리하였다. 펠렛을 취하여 완충액(1 M L-Glycine, 3.78 g L-Cysteine-HCl, pH 10.6)에 재 부유하여 상온에서 1시간 동안 교반하였다. 재 부유된 재조합 인슐린 아날로그 회수를 위하여 8M 우레아를 추가한 후 3~5시간 교반하였다. 가용화된 재조합 프로인슐린 아날로그의 재접힘(refolding)을 위하여 7,000 rpm으로 4~8℃에서 30분간 원심분리한 후 상층액을 취한 후, 환원제(15mM L-Cysteine-HCL)을 1시간 처리하고 여기에 일정 배수의 증류수를 연동펌프(peristaltic pump)를 이용하여 넣어주면서 4~8℃에서 12시간 이상 교반하였다.

[0816] 실시예 5: 양이온 교환 크로마토그래피 정제

[0818] 45% 에탄올이 포함된 20 mM 소듐 사이트레이트 (pH 2.0) 완충액으로 평형화된 SP FF (GE healthcare사) 컬럼에 재접힘이 끝난 시료를 결합시킨 후, 염화칼륨 0.5 M과 45% 에탄올이 포함된 20 mM 소듐 사이트레이트 (pH 2.0) 완충액을 사용하여 농도가 0% 에서 100% 가 되도록 10 컬럼 용량의 선형 농도구배로 인슐린 아날로그 단백질을 용출하였다.

[0820] 실시예 6: 트립신(Trypsin)과 카복시펩티데이즈 B(Carboxypeptidase B) 처리

[0822] 용출된 시료를 환외여과막으로 염을 제거하고, 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 8.0)으로 교체하였다. 얻어진 시료 단백질량의 약 30,000 몰비에 해당하는 트립신과 약 3,000 몰비에 해당하는 카복시펩티데이즈 B를 첨가한 후, 4~8℃에서 16시간이상 교반하였다.

[0824] 실시예 7: 양이온 교환 크로마토 그래피 정제

[0826] 반응이 끝난 시료를 45% 에탄올이 포함된 20 mM 소듐 사이트레이트 (pH 2.0) 완충액으로 평형화된 SP HP (GE healthcare사) 컬럼에 다시 결합시킨 후, 염화칼륨 0.5 M과 45% 에탄올이 포함된 20 mM 소듐 사이트레이트(pH 2.0) 완충액을 사용하여 농도가 0% 에서 100% 가 되도록 10 컬럼 용량의 선형 농도구배로 인슐린 아날로그 단백질을 용출하였다.

[0828] 실시예 8: 역상 크로마토 그래피 정제

[0830] 상기 실시예 7에서 얻어진 시료에서 순수한 인슐린 아날로그를 순수 분리하기 위해 소듐포스페이트와 아이소프로판올을 포함한 버퍼로 평형화된 역상 크로마토 그래피 Source3ORPC (GE healthcare, 미국)에 결합시킨 후, 소듐포스페이트와 이소프로판올을 포함한 완충액을 사용하여 선형 농도 구배로 인슐린 아날로그 단백질을 용출하였다.

[0832] **실시예 9: 인슐린 및 글루카곤의 지속형 결합체 제조**

[0834] 상기 실시예에서 제조된 인슐린과 글루카곤 아날로그를 링커로서 폴리에틸렌글리콜을 이용하여 면역글로불린 Fc 영역을 결합시켜, 인슐린 및 글루카곤의 지속형 결합체를 제조하였다. 지속형 글루카곤 결합체 제조에 사용된 글루카곤 아날로그는 pI는 6내지 7이고, 천연형 글루카곤 대비 상대적 in vitro 활성이 200% 이상인 아날로그이다. 지속형 인슐린 결합체 제조에 사용된 인슐린은 천연형 인슐린 또는 천연형 인슐린의 A 체인에 1개 아미노산이 치환된 아날로그이다.

[0836] 구체적으로, 인슐린(인도 Biocon사) B-쇄의 N-말단에 3.4K propion-ALD(2) PEG (양 말단에 각각 프로피온 알데히드를 하나씩 지니고 있는 3.4kDa의 PEG, 미국 NOF사)를 폐길화시키기 위하여, 인슐린:PEG의 몰 비를 1 : 4로, 인슐린의 농도를 5 mg/ml로 4°C에서 약 2시간 반응시켰다. 이때 반응은 50mM 구연산 나트륨 완충액 (pH 5.0)과 45% 아이소프로판올의 혼합 용매에서, 3mM 농도의 소듐 시아노보로하이드라이드 (sodium cyanoborohydride (NaCNBH₃))환원제를 첨가하여 반응시켰다. 반응액은 구연산 나트륨 (pH 3.0), 45% EtOH가 포함된 버퍼와 KCl 농도 구배를 이용한 SP-HP (GE Healthcare) 컬럼을 사용하여 정제하였다.

[0837] 다음으로, 상기 인슐린이 부착된 PEG를 면역글로불린 Fc 단편의 N-말단에 연결시키기 위하여, 상기 정제된 모노-폐길화된 (mono-PEGylated) 인슐린과 면역글로불린 Fc 단편의 몰비가 1 : 1.2가 되도록 하고, 전체 단백질 농도를 20 mg/ml로 하여 25°C에서 15시간 반응시켰다. 이때 반응액은 100 mM 헤페스 (HEPES) 완충액(pH 8.2)과 염화나트륨에 환원제로서 20 mM 소듐 시아노보로하이드라이드를 첨가하였다.

[0838] 반응이 종결된 후 반응액은 Tris-HCl(pH 7.5) 버퍼와 NaCl 농도 구배를 이용하여 Q-HP(GE, 미국) 컬럼에 적용하고, 황산암모늄 (ammoniumsulfate)과 Tris-HCl (pH 7.5)의 농도 구배를 이용하여, Source 15ISO (GE, 미국)에 적용하여, 인슐린 - 3.4K PEG - 면역글로불린 Fc 결합체를 정제하였다.

[0840] 또한, 지속형 글루카곤 결합체 제조를 위해, 양 말단에 각각 말레이미드기 및 알데히드기를 가지는 10kDa의 PEG, 즉 말레이미드-PEG-알데히드 (10kDa, NOF, 일본)를 글루카곤 아날로그의 시스테인 잔기에 폐길화시키기 위하여, 글루카곤 아날로그와 말레이미드-PEG-알데히드의 몰비를 1:1~5, 단백질의 농도를 3~10 mg/ml로 하여 저온에서 1~3 시간 동안 반응시켰다. 이때, 반응은 50 mM Tris 완충액(pH 7.5)에 20~60 % 아이소프로판올이 첨가된 환경하에서 수행되었다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액을 SP sepharose HP(GE healthcare, 미국)에 적용하여 시스테인에 모노-폐길화된 글루카곤 유도체를 정제하였다.

[0841] 다음으로, 상기 정제된 모노-폐길화된 글루카곤 아날로그와 면역글로불린 Fc을 몰비가 1:2~10, 단백질의 농도를 10~50mg/ml로 하여 4~8°C에서 12~18시간 동안 반응시켰다. 반응액은 100 mM 인산칼륨 완충액(pH 6.0)에 환원제인 10~50 mM 소듐시아노보로하이드라이드와 10~20% 아이소프로판올이 첨가된 환경 하에서 수행되었다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액을 Butyl sepharose FF 정제컬럼(GE healthcare, 미국)과 Source ISO 정제컬럼 (GE healthcare, 미국)에 적용하여, 글루카곤 아날로그와 면역글로불린 Fc를 포함하는 결합체를 정제하였다.

[0843] **실시예 10: DIO/STZ rats에서의 글루카곤 및 인슐린 병용 투여의 혈당 강하 효과 확인**

[0845] 상기 실시예 9에서 제조된 글루카곤 및 천연형 인슐린의 지속형 결합체를 비만 및 2형당뇨 모델로 알려진 DIO/STZ rats에 투여하였다. 글루카곤 및 천연형 인슐린의 지속형 결합체의 병용 투여에 따른 혈당강하 치료효

력을 확인하고자 시험은 부형제 대조군, 지속형 인슐린 결합체 단독투여 군 (53.9 nmol/kg(2997 ug/kg), Q3D), 지속형 인슐린 결합체 (53.9 nmol/kg, Q3D) 및 지속형 글루카곤 결합체 (3.4 nmol/kg(182 ug/kg), Q3D)의 병용 투여 군으로 나누었고, 해당 물질들을 2주간 피하로 반복투여 하였다. 2주 반복투여를 하면서 각 rat의 혈액을 꼬리정맥에서 취한 후, 혈당측정계 (OneTouch® Ultra®)를 통하여 혈당의 변화정도를 측정하였다.

[0847] 지속형 인슐린 결합체를 2주간 반복 투여한 결과, 부형제 대조군에서 나타나던 고혈당의 수치가 정상 수준 및 저혈당 수준 (70 mg/dL 이하)으로 강하한 것을 확인할 수 있었다(도 1). 이를 통해 고용량의 인슐린은 혈당 강하 효과를 나타내지만, 저혈당을 유발할 수 있음을 확인할 수 있었다. 그러나, 지속형 인슐린 결합체와 지속형 글루카곤 결합체를 병용투여 한 경우에는 지속적인 저혈당없이 혈당의 정상화가 이루어진 것을 확인할 수 있었다.

[0849] 또한, 투여기간 중 혈당 변화를 AUC (area under curve)로 수치화하여 도 2와 같이 분석한 결과, 지속형 글루카곤 결합체를 지속형 인슐린 결합체와 병용 투여할 경우, 지속형 인슐린 결합체 및 지속형 글루카곤 결합체 병용 투여가 지속형 인슐린 결합체의 전반적인 혈당강하 효력에는 큰 영향을 주지않으면서도 지속형 인슐린 결합체 투여의 부작용인 저혈당은 예방할 수 있는 것을 확인하였다 (도 2). 이를 통해 지속형 글루카곤 결합체를 지속형 인슐린 결합체와 병용 투여함으로써 지속형 인슐린 결합체의 저혈당 위험은 줄이면서 혈당강하 효능은 유지할 수 있음을 확인하였다.

[0851] **실시예 11: DIO/STZ rats에서의 글루카곤 및 인슐린 병용 투여의 인슐린 부작용 개선 효과**

[0853] 상기 실시예 10에서 사용한 천연형 인슐린의 지속형 결합체의 경우, 다른 지속형 인슐린과 마찬가지로 저혈당과 더불어 체중 증가라는 부작용을 가지고 있다.

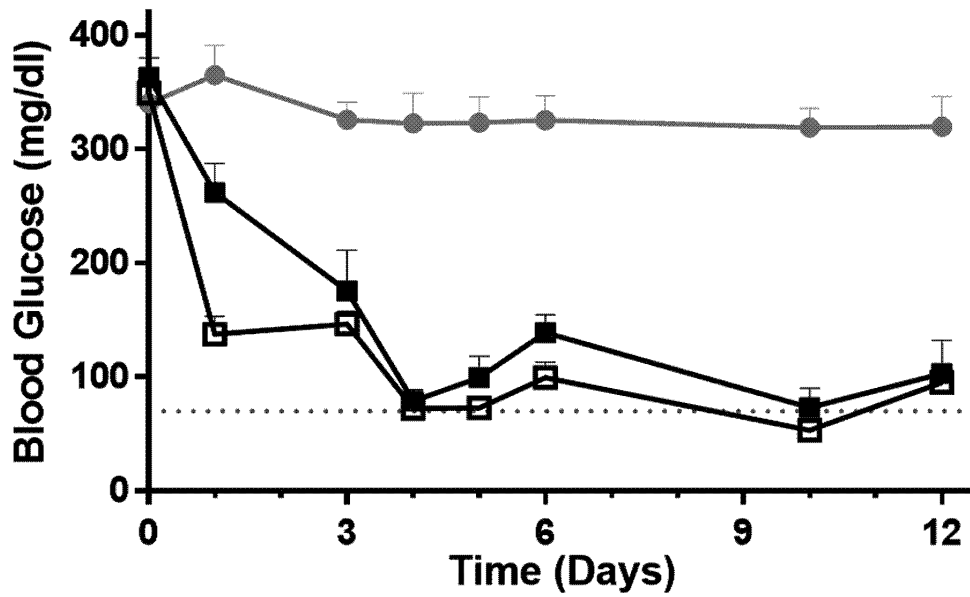
[0854] 실제로 도 3에서와 같이 지속형 인슐린 결합체를 DIO/STZ rats에 2주간 반복투여한 경우, 부형제 대조군 대비 유의적인 체중의 증가가 나타남을 확인할 수 있었다. 하지만, 지속형 글루카곤 결합체를 지속형 인슐린 결합체와 병용 투여한 경우에는 이러한 체중증가가 중화 (neutralization)된 것은 물론, 부형제 대조군보다 체중이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해서 지속형 인슐린 결합체 및 지속형 글루카곤 결합체의 병용투여가 지속형 인슐린 결합체 투여에 따른 부작용인 저혈당 및 체중증가를 완화할 수 있음을 확인하였다.

[0856] 상기 실시예로부터, 지속형 인슐린 결합체 및 지속형 글루카곤 결합체의 병용 투여에 의해, 혈당 강하 효과를 얻으면서도 인슐린 투여에 따른 부작용(저혈당 및 체중 증가)을 억제할 수 있음을 확인하였는 바, 본 발명에 따른 지속형 인슐린 결합체 및 지속형 글루카곤 결합체의 병용 투여가 인슐린 관련 질환 치료 효과 뿐만 아니라, 저혈당 및 인슐린 부작용 개선을 이룰 수 있음을 확인하였다.

[0858] 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 실시 예들은 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.

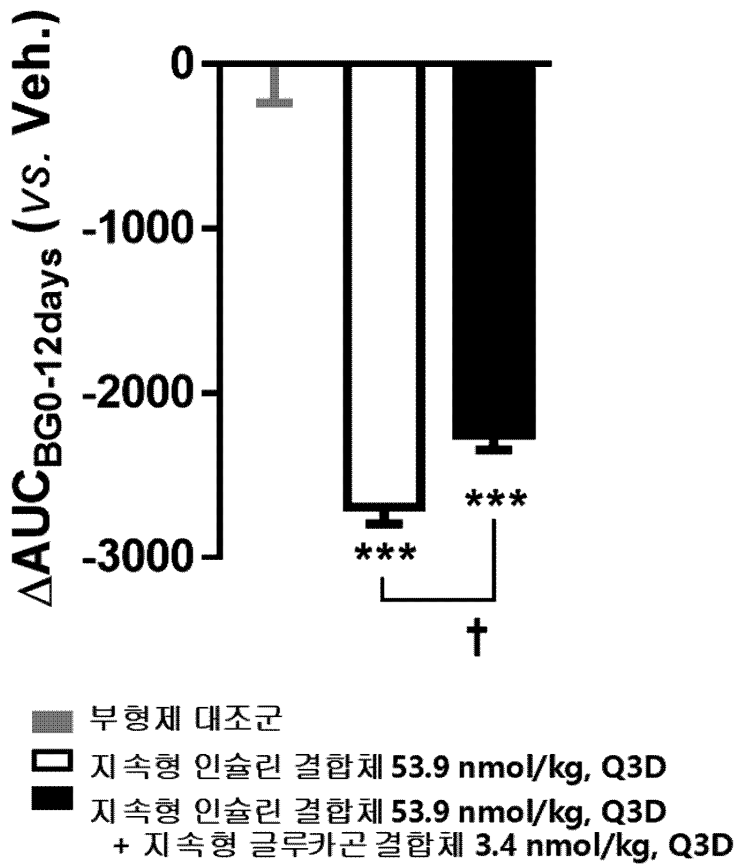
도면

도면1

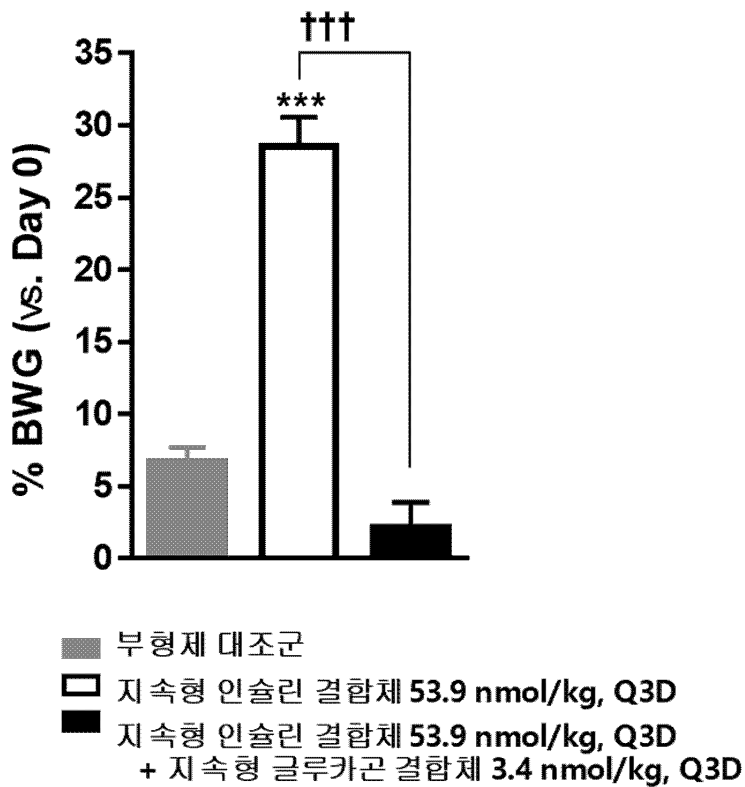


- 부형제 대조군
- 지속형 인슐린 결합체 53.9 nmol/kg, Q3D
- 지속형 인슐린 결합체 53.9 nmol/kg, Q3D + 지속형 글루카곤 결합체 3.4 nmol/kg, Q3D

도면2



도면3



서열목록

<110> HANMI PHARM. CO., LTD.
 <120> A pharmaceutical composition comprising insulin and glucagon
 <130> KPA181585-KR-P1
 <150> KR 10-2018-0167798
 <151> 2018-12-21
 <160> 125
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 1

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 2
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <400> 2

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Cys
 1 5 10 15
 Asp Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 3
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <400> 3

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Cys

1 5 10 15

Glu Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 4

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<400> 4

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Cys Asp Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 5

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<400> 5

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Cys Glu Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 6

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<400> 6

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Cys Glu Ala Asp Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 7

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<400> 7

Tyr Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Cys Glu Ala Asp Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 8

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<400> 8

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Cys Asp Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Ile Asn Thr

20 25

<210> 9

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<400> 9
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15

Cys Asp Ala Gln Asp Phe Val Val Trp Leu Ile Asn Thr
 20 25

<210> 10

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<400> 10

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15

Cys Asp Ala Asp Asp Phe Val Val Trp Leu Ile Asn Thr
 20 25

<210> 11

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<400>

> 11

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15

Lys Cys Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 12

<211> 30

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring

<400> 12
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
 20 25 30

<210> 13
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <400> 13
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Cys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15
 Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 14
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <400> 14
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Cys
 1 5 10 15
 Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 15
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <400> 15
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Cys Glu
 1 5 10 15
 Lys Arg Ala Gln Asp Phe Val Val Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 16
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <400> 16
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Cys
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Gln Val Phe Val Gln Trp Leu Met Arg Thr
 20 25

<210> 17
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 ><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <400> 17
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Cys
 1 5 10 15
 Val Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Arg Thr
 20 25
 <210> 18
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222>
 > (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <400> 18
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Cys Asp Phe Arg Leu Trp Leu Met Asn Thr
 20 25
 <210> 19
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221

> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring

<400> 19

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Cys Glu

1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 20

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring

<400> 20

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Cys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 21

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring
 <400> 21
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Lys Cys Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25
 <210> 22
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring
 <400> 22
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Lys Arg Cys Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25
 <210> 23
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring
 <400> 23
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Cys Asp Glu
 1 5 10 15
 Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 24

<211> 29

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring

<400> 24

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Cys Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 25

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)
 <223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring
 <400> 25
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Lys Arg Ala Lys Cys Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 26
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)
 <223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring
 <400> 26
 Trp Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Cys Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 27
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)

<223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring

<400> 27

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Val Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Cys Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 28

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring

<400> 28

Trp Xaa Gln Gly Thr Phe Val Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Cys Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 29

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring

<400> 29
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Cys Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 30
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring
 <400> 30

Trp Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Cys Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 31
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(21)
 <223> amino acids at positions 17 and 21 form a ring
 <400> 31

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Cys
 1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 32

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(19)

<223> amino acids at positions 15 and 19 form a ring

<400> 32

Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Cys
 1 5 10 15

Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 33

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<400> 33

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 34

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring

<400> 34

Trp Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Cys Asp Glu

1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 35

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring

<400> 35

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Cys Asp Glu

1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 36

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring

<400> 36

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Cys Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 37

<211> 30

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring

<400> 37

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys

20 25 30

<210> 38

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring
 <400> 38
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Cys Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 39
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring
 <400> 39
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Val Ser Asp Cys Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 40
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring
 <400> 40
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Val Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
 20 25 30

<210> 41
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring
 <400> 41
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Cys Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 42
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<400> 42

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Cys Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 43

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<400> 43

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Cys Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 44

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<400> 44

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys

20 25 30

<210> 45

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<400> 45

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Cys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 46

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)

<223> Xaa is histidine, desamino-histidyl, N-dimethyl-histidyl,
beta-hydroxy imidazopropionyl, 4-imidazoacetyl, beta-carboxy

imidazopropionyl, tryptophan, or tyrosine, or is absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is alpha-methyl-glutamic acid, aminoisobutyric acid (Aib),
D-alanine, glycine, Sar (N-methylglycine), serine, or D-serine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)

<223> Xaa is threonine, valine, or cysteine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)

<223> Xaa is tyrosine or cysteine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)

<223> Xaa is lysine or cysteine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (13)

<223> Xaa is tyrosine or cysteine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (14)

<223> Xaa is leucine or cysteine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (15)

<223> Xaa is aspartic acid, glutamic acid, or cysteine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)

<223> Xaa is glutamic acid, aspartic acid, serine,
alpha-methyl-glutamic acid, or cysteine, or is absent;

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (17)

<223> Xaa is aspartic acid, glutamine, glutamic acid, lysine, arginine,

serine, cysteine, or valine, or is absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (18)

<223> Xaa is alanine, aspartic acid, glutamine, glutamic acid,
arginine, valine, or cysteine, or is absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (19)

<223> Xaa is alanine, arginine, serine, valine, or cysteine, or is
absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (20)

<223> Xaa is lysine, histidine, glutamic acid, glutamine, aspartic

acid, arginine, alpha-methyl-glutamic acid, or cysteine, or is

absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (21)

<223> Xaa is aspartic acid, glutamic acid, leucine, valine, or cysteine, or is absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (23)

<223> Xaa is isoleucine, valine, or arginine, or is absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (24)

<223> Xaa is valine, arginine, alanine, cysteine, glutamic acid, lysine, glutamine, alpha-methyl-glutamic acid, or leucine, or is absent;

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (27)

<223> Xaa is isoleucine, valine, alanine, lysine, methionine, glutamine, or arginine, or is absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (28)

<223> Xaa is glutamine, lysine, asparagine, or arginine, or is absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (30)

<223> Xaa is cysteine, or is absent

<400> 46

Xaa Xaa Gln Gly Thr Phe Xaa Ser Asp Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Trp Leu Xaa Xaa Thr Xaa

20 25 30

<210> 47

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)

<223> Xaa is threonine, valine, or cysteine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)

<223> Xaa is tyrosine or cysteine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)

<223> Xaa is lysine or cysteine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (15)

<223> Xaa is aspartic acid or cysteine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)

<223> Xaa is glutamic acid or serine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (17)

<223> Xaa is lysine or arginine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (20)

<223> Xaa is glutamine or lysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (21)

<223> Xaa is aspartic acid or glutamic acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (24)

<223> Xaa is valine or glutamine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (30)

<223> Xaa is cysteine or is absent

<400> 47

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Xaa Ser Asp Xaa Ser Xaa Tyr Leu Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa Arg Ala Xaa Xaa Phe Val Xaa Trp Leu Met Asn Thr Xaa

20 25 30

<210> 48

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Insulin analog, A-chain

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)

<223> Xaa is alanine, glycine, glutamine, histidine, glutamic acid, or

asparagine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is alanine, or isoleucine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)

<223> Xaa is alanine, glutamic acid, glutamine, histidine, or

asparagine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)

<223> Xaa is alanine, serine, glutamine, glutamic acid, histidine, or

asparagine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (14)

<223> Xaa is alanine, tyrosine, glutamic acid, histidine, lysine,

aspartic acid, or asparagine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)

<223> Xaa is alanine, leucine, tyrosine, histidine, glutamic acid, or asparagine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (19)

<223> Xaa is alanine, tyrosine, serine, glutamic acid, histidine, threonine, or asparagine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (21)

<223> Xaa is asparagine, glycine, histidine, or alanine

<400> 48

Xaa Xaa Val Glu Xaa Cys Cys Thr Ser Ile Cys Xaa Leu Xaa Gln Xaa

1 5 10 15

Glu Asn Xaa Cys Xaa

20

<210> 49

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Insulin analog, B-chain

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)

<223> Xaa is alanine, or glycine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)

<223> Xaa is tyrosine, glutamic acid, serine, threonine, or aspartic acid or is absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (23)

<223> Xaa is glycine, or alanine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (24)

<223> Xaa is alanine or phenylalanine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (25)
 <223> Xaa is alanine, phenylalanine, aspartic acid, or glutamic acid or is absent

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (27)

<223> Xaa is threonine, or is absent
 <220><221> MISC_FEATURE

<222> (28)
 <223> Xaa is proline, glutamic acid, or aspartic acid, or is absent

<400> 49
 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Xaa Ser His Leu Val Glu Ala Leu Xaa
 1 5 10 15

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

<210> 50
 <211> 258
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 1
 <400> 50
 ttcgtaacc aacacttgtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtcggg 60
 gaacaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120
 caggtggagc tggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180
 tcctgcaga agcgtgcat tgtggaaca tgctgtacca gcatctgctc cctctaccag 240

ctggagaact actgcaac 258

<210> 51
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 1
 <400> 51
 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

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
 35 40 45

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
 50 55 60

Arg Ala Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
 65 70 75 80

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 85

<210> 52

<211> 258

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 2

<400> 52

ttcgttaacc aacacttggt ggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtcggg 60

gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtaggg 120

caggtggagc tgggcggggg ccttggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180

tccttcgaga agcgtggcgc ggtggaacaa tgctgtacca gcctctgctc cctctaccag 240

ctggagaact actgcaac 258

<210> 53

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 2

<400> 53

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

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro

35 40 45
 Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
 50 55 60
 Arg Gly Ala Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
 65 70 75 80
 Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

85

<210> 54
 <211> 258
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 3

<400> 54

ttcgttaacc aacacttggt ggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgctggg 60
 gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcagggtgggg 120
 caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180
 tcctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tctgtacca gcatctgtct cctctaccag 240
 ctggagaacg cgtgcaac 258

<210> 55
 <211> 86
 <212> PRT

<213>
 Artificial Sequence

<220><223> Analog 3

<400> 55

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
 Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
 35 40 45
 Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
 50 55 60

Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
 65 70 75 80

Leu Glu Asn Ala Cys Asn
 85

<210> 56

<211> 258

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 4

<400> 56

ttcgttaacc aacacttgtg tgcgtcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60
 gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120
 caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180

tccttcgaga agcgtggcat tgtggaacaa tctgtacca gcatctgctc cctctaccag 240
 ctggagaact actgcaac 258

<210> 57

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 4

<400> 57

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Ala 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

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
 35 40 45

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
 50 55 60

Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
 65 70 75 80

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 85

<210> 58
 <211> 258
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Analog 5

<400> 58
 ttcgttaacc aaccttgtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60
 gaacgagcgt tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120
 caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180
 tccttcaga agcgtggcat tgtggaaca tgctgtacca gcatctgctc cctctaccag 240
 ctggagaact actgcaac 258

<210> 59
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Analog 5

<400>
 59
 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 Ala Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg
 20 25 30
 Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
 35 40 45
 Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
 50 55 60
 Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
 65 70 75 80
 Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 85

<210> 60
 <211> 258
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 6

<400> 60

ttcgttaacc aacacttgtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60
 gaacgaggcg cgttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120
 caggtggagc tgggccccgg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180
 tccttcgaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcatctgctc cctctaccag 240

ctggagaact actgcaac 258

<210> 61

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 6

<400> 61

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 Ala Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg

20 25 30

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro

35 40 45

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

85

<210> 62

<211> 258

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 7

<400> 62

ttcgttaacc aacacttgtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60

gaacgaggct tcgcgtacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120

caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180

tcctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcatctgctc cctctaccag 240

ctggagaact actgcaac 258

<210> 63

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 7

<400> 63

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 Ala Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg

20 25 30

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro

35 40 45

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

85

<210> 64

<211> 261

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 8

<400> 64

ttcgttaacc aaccttgtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60

gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120

caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180

tcctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcatctgctc cctcgaacag 240

ctggagaact actgcaactg a 261

<210> 65

<211> 86

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> Analog 8

<400> 65

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

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro

35 40 45

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

85

<210> 66

<211> 261

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 9

<400> 66

ttcgttaacc aacacttgtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60

gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120

caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180

tccttcgaga agcgtggcat tgtggaaca tgctgtacca gcacttgctc cctcaaccag 240

ctggagaact actgcaactg a 261

<210> 67

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 9

<400> 67

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

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro

35 40 45

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys

50 55 60

Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Asn Gln

65 70 75 80

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

85

<210> 68

<211> 258

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 10

<400> 68

ttcgtaacc aacacttgtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60

gaacgaggct tctacacacc caagaccgc cgggaggcag aggacctgca ggtggggcag 120

gtggagctgg gcgggggccc tgggtcagge agcctgcage ccttggccct ggaggggtcc 180

ctgcagaagc gtggcattgt ggaacaatgc tgtaccagca tctgtccct cgaacagctg 240

gagaactact gcaactga 258

<210> 69

<211> 85

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 10

<400>

> 69

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 Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu

20 25 30

Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly

35 40 45

Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asn Tyr Cys Asn

85

<210> 70

<211> 258

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 11

<400> 70

ttcgttaacc aacacttggt tggctcacac ctggtggaag ctctcgagct agtgtgcggg 60

gaacgaggct tctacacacc caagaccgc cgggaggcag aggacctgca ggtggggcag 120

gtggagctgg gcgggggccc tgggtcaggc agcctgcagc ccttggccct ggaggggtcc 180

ctgcagaage gtggcattgt ggaacaatgc tgtaccagca tctgtccct cgcccagctg 240

gagaactact gcaactga 258

<210> 71

<211> 85

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 11

<400> 71

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

1 5 10 15

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

20 25 30
 Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly
 35 40 45

Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg
 50 55 60

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Ala Gln Leu
 65 70 75 80

Glu Asn Tyr Cys Asn
 85

<210> 72

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 72

cagcatctgc tcctccatc agctggagaa ctac 34

<210> 73

<211> 34

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 73

gtagttctcc agctgatgga gggagcagat gctg 34

<210> 74

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 74

cagcatctgc tcctcaagc agctggagaa ctac 34

<210> 75

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 75
 gtagttctcc agctgcttga gggagcagat gctg 34

<210> 76
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 76
 ctaccagctg gagaacgagt gcaactgagg atcc 34

<210> 77
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 77
 ggatcctcag ttgcactcgt tctccagctg gtag 34

<210> 78
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 78
 ctaccagctg gagaactcct gcaactgagg atcc 34

<210> 79
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 79
 ggatcctcag ttgcaggagt tctccagctg gtag 34

<210> 80

<211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 80
 ctaccagctg gagaacacct gcaactgagg atcc 34
 <210> 81
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 81
 ggatcctcag ttgcaggtgt tctccagctg gtag 34

 <210> 82
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 82
 ctggtggaag ctctcgagct agtgtgctggg gaac 34
 <210> 83
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 83
 gttccccgca cactagctcg agagcttcca ccag 34
 <210> 84
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 84

ctggtggaag ctctctcct agtgtgctggg gaac 34

<210> 85
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 85

gttccccgca cactaggag agagcttcca ccag 34

<210> 86
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 86

ctggtggaag ctctcacct agtgtgctggg gaac 34

<210> 87
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 87

gttccccgca cactagggtg agagcttcca ccag 34

<210> 88
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 88

cagcatctgc tcctcgccc agctggagaa ctac 34

<210> 89
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Primer
 <400> 89
 gtagttctcc agctgggcga gggagcagat gctg 34
 <210> 90
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 90
 cagcatctgc tcctcgacc agctggagaa ctac 34

 <210> 91
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 91
 gtagttctcc agctggtcga gggagcagat gctg 34
 <210> 92
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 92
 ctggtggaag ctctcgacct agtgtcggg gaac 34
 <210> 93
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 93
 gttcccgcga cactaggtcg agagettcca ccag 34

 <210> 94
 <211> 33

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 94
 ggggaacgag gcttcgacta cacaccaag acc 33
 <210> 95
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 95
 ggtcttgggt gtgtagtcga agcctcgctc ccc 33
 <210> 96
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 96
 ggggaacgag gcttcgagta cacaccaag acc 33

 <210> 97
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 97
 ggtcttgggt gtgtactcga agcctcgctc ccc 33
 <210> 98
 <211> 258
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Analog 12
 <400> 98
 ttcgttaacc aacacttgtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtcggg 60
 gaacgagget tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120

caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180

tccttcgaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcatctgctc cctccatcag 240

ctggagaact actgcaac 258

<210> 99

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 12

<400> 99

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

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro

35 40 45

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys

50 55 60

Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu His Gln

65 70 75 80

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

85

<210> 100

<211> 258

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 13

<400> 100

ttcgttaacc aacacttgtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtcggg 60

gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120

caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180

tccttcgaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcatctgctc cctcaagcag 240

ctggagaact actgcaac 258

<210> 101
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Analog 13

<400

> 101

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
 Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
 35 40 45
 Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
 50 55 60
 Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Lys Gln

65 70 75 80
 Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 85

<210> 102
 <211> 258
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Analog 14

<400

ttcgttaacc aacacttgtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgctggg 60
 gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcagggtgggg 120
 caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180
 tccctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgetgtacca gcatctgctc cctctaccag 240

 ctggagaacg agtgcaac 258

<210> 103
 <211> 86
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 14

<400> 103

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

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro

35 40 45

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Glu Asn Glu Cys Asn

85

<210> 104

<211> 258

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 15

<400> 104

ttcgttaacc aacacttggt ggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60

gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtagggg 120

caggtggagc tggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agccctggc cctggagggg 180

tcctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcatctgctc cctctaccag 240

ctggagaact cctgcaac 258

<210> 105

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 15

<400> 105

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

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro

 35 40 45

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys

 50 55 60

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

 65 70 75 80

Leu Glu Asn Ser Cys Asn

85

<210> 106

<211> 258

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 16

<400> 106

ttcgttaacc aacacttgtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60

gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120

caggtggagc tggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180

tcctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcatctgctc cctctaccag 240

ctggagaaca cctgcaac 258

<210> 107

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 16

<400> 107

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

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
 35 40 45

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys

50 55 60
 Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
 65 70 75 80

Leu Glu Asn Thr Cys Asn
 85

<210> 108

<211> 258

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 17

<400> 108

ttcgtaacc aacacttggtg tggctcacac ctggtggaag ctctcgagct agtgtgcggg 60
 gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120
 caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180

tcctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcatctgctc cctctaccag 240
 ctggagaact actgcaac 258

<210> 109

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 17

<400> 109

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

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

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
 35 40 45

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

85

<210> 112

<211> 258

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 19

<400> 112

ttcgttaacc aacacttgtg tggctcacac ctggtggaag ctctaccct agtgtcggg 60

gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtaggg 120

caggtggagc tggcggggg ccttggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180

tcctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tctgtacca gcactgtctc cctctaccag 240

ctggagaact actgcaac 258

<210> 113

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 19

<400> 113

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro

35 40 45

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

85

<210> 114

<211> 258

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Analog 20
 <400> 114
 ttcgttaacc aaccttgtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60
 gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120
 caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180
 tcctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgcgttacca gcctctgctc cctcggccag 240
 ctggagaact actgcaac 258

<210> 115
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Analog 20
 <400> 115
 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
 Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
 35 40 45
 Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
 50 55 60
 Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Ala Gln
 65 70 75 80
 Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

85

<210> 116
 <211> 258
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Analog 21

<400> 116
 ttcgtaacc aacacttggtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgctggg 60
 gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120
 caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180
 tcctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcactgctc cctcgaccag 240
 ctggagaact actgcaac 258

<210> 117
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Analog 21

<400> 117
 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
 Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
 35 40 45
 Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
 50 55 60
 Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Asp Gln
 65 70 75 80
 Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 85

<210> 118
 <211> 258
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Analog 22
 <400> 118
 ttcgtaacc aacacttggtg tggctcacac ctggtggaag ctctcgacct agtgtgctggg 60
 gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120

caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180

tccttcgaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcatctgctc cctctaccag 240

ctggagaact actgcaac 258

<210> 119

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 22

<400> 119

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro

35 40 45

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

85

<210> 120

<211> 258

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 23

<400> 120

ttcgtaaac aacacttgtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtcggg 60

gaacgaggct tcgactacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120

caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180

tccttcgaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcatctgctc cctctaccag 240

ctggagaact actgcaac 258

<210> 121
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Analog 23

<400

> 121

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 Asp Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg
 20 25 30
 Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
 35 40 45
 Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
 50 55 60
 Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln

65 70 75 80
 Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 85

<210> 122
 <211> 258
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Analog 24

<400> 122

ttcgttaacc aacacttgtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgctggg 60
 gaacgaggct tcgagtacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcagggtgggg 120
 caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180
 tccttcgaga agcgtggcat tgtggaacaa tctgtacca gcatctgctc cctctaccag 240

 ctggagaact actgcaac 258

<210> 123
 <211> 86
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 24

<400> 123

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 Glu Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg

20 25 30

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro

35 40 45

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

85

<210> 124

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 124

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> 125

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

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