



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0138251
(43) 공개일자 2015년12월09일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
<i>C07K 14/62</i> (2006.01) <i>A61K 38/28</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
<i>C07K 14/62</i> (2013.01)
<i>A61K 38/28</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2015-7029605</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2014년03월17일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2015년10월15일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2014/030387</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2014/145593
국제공개일자 2014년09월18일</p> <p>(30) 우선권주장
61/798,165 2013년03월15일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
케이스 웨스턴 리저브 유니버시티
미국 44106 오하이오주 클리블랜드 유클리드 애비뉴 10900</p> <p>(72) 발명자
웨이쯔, 마이클 에이.
미국, 오하이오 44022, 모어랜드 힐즈, 70 우드번 드라이브</p> <p>(74) 대리인
정문영</p> |
|--|---|

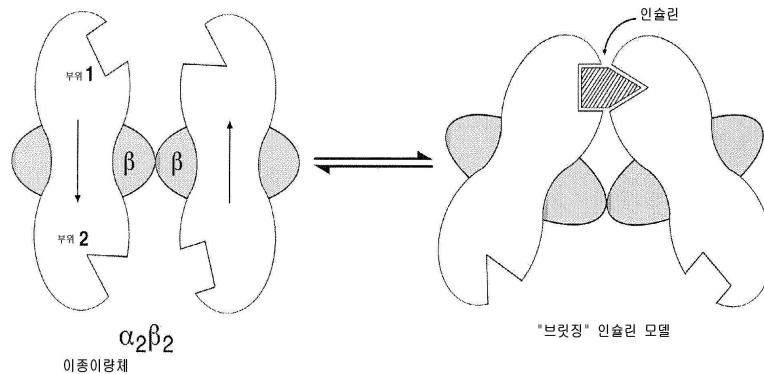
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 부위 2 인슐린 유사체

(57) 요약

인슐린 유사체는 B13, B17, A12, A13, 및/또는 A17 위치에서의 잔기 중 하나 이상을 포함하는 명백한 단백질 표면에서 하나 이상의 변형을 함유한다. 상기 유사체의 제형은 6개의 인슐린 유사체 단량체당 2.2 내지 10개의 아연 이온의 몰 비로 또는 6개의 인슐린 유사체 단량체당 1개 미만의 아연 이온의 존재하에 U-100 내지 U-1000의 연속적인 강도에서 가용성 용액 속에서 적어도 pH 6.8 내지 8.0인 적어도 pH 값을 갖는다. 인슐린 펌프 또는 폐쇄된 루프 시스템으로서 연속적인 글루코즈 모니터 및 컴퓨터-기반 조절 알고리즘과 기능적으로 통합된 인슐린 펌프속에서의 상기 제형의 용도가 개재되어 있다. 진성 당뇨병 환자의 치료방법은 생리학적 유효량의 인슐린 유사체 또는 생리학적으로 허용되는 이의 염을 환자에게 정맥내, 복강내, 또는 피하 주사에 의해 투여함을 포함한다.

대표도 - 도3



명세서

청구범위

청구항 1

B13에서 Ala, Asp, His, 또는 Leu 치환, B17에서 Glu, Gln, Ala, His, Trp 또는 Tyr 치환, A12에서 Ala, Thr, Asp, Asn, Glu, Gln, His 또는 Tyr 치환, A13에서 Ala, Glu, Gln, His, Tyr, Phe 또는 Trp 치환, 및 A17에서 Ala, Gln, His, Trp, 또는 Tyr 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 위치에서 치환을 포함하는 야생형 인슐린에 대하여 적어도 하나의 치환을 함유하는 인슐린 유사체.

청구항 2

청구항 1에 있어서, B28 위치에서 Asp 또는 Lys 치환을 추가로 포함하는 인슐린 유사체.

청구항 3

청구항 2에 있어서, B29 위치에서 Pro 치환을 추가로 포함하는 인슐린 유사체.

청구항 4

청구항 1 내지 청구항 3 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 유사체가 A13 위치에서 Glu, His, Trp, Tyr, Ala 또는 Phe 치환을 함유하는 인슐린 유사체.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 파라-클로로 페닐알라닌, 오르토-플루오로 페닐알라닌 및 사이클로헥실알라닌으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 B24 위치에서의 치환을 추가로 포함하는 인슐린 유사체.

청구항 6

청구항 5에 있어서, B24 위치에서 오르토-플루오로-페닐알라닌 치환을 포함하고 B10 위치에서 아스파르트산 치환을 추가로 포함하는 인슐린 유사체.

청구항 7

청구항 1 내지 청구항 3 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 유사체가 A17 위치에서 알라닌 치환을 함유하는 오르토-플루오로.

청구항 8

청구항 1 내지 청구항 3 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 유사체가 A13 위치에서 알라닌 또는 페닐알라닌 치환을 함유하는 인슐린 유사체.

청구항 9

청구항 1 내지 청구항 3 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 유사체가 A17에서의 Glu 치환을 함유하는 인슐린 유사체.

청구항 10

청구항 1 내지 청구항 3에 있어서, 상기 A-쇄 서열이 서열 번호 4 내지 8로부터 선택되는 인슐린 유사체.

청구항 11

청구항 1 내지 청구항 3에 있어서, 상기 B-쇄가 서열 번호 9 내지 11로부터 선택되는 인슐린 유사체.

청구항 12

청구항 1의 인슐린 유사체의 A 쇠를 암호화하는 DNA 서열.

청구항 13

서열 번호 4, 5, 6, 7, 또는 8에 따르는 인슐린 유사체의 A 쇠를 암호화하는 DNA 서열.

청구항 14

청구항 1의 인슐린 유사체의 B 쇠를 암호화하는 DNA 서열.

청구항 15

서열 번호 9, 10, 또는 11에 따르는 인슐린 유사체의 B 쇠를 암호화하는 DNA 서열.

청구항 16

서열 번호 9, 10 또는 11에 따르고 B24 위치에서 넨센스 코돈(nonsense codon)을 추가로 함유하는 인슐린 유사체의 B 쇠를 암호화하는 DNA 서열.

청구항 17

환자의 혈당을 저하시키기 위한, 청구항 1 내지 청구항 3 중의 어느 한 항에 따른 인슐린 유사체의 용도.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 상기 유사체가 6개의 일본쇄 인슐린 유사체 단량체당 2 내지 10개의 아연 이온의 몰 비에서 아연 이온을 함유하는 조성물로 제형화되고, 당해 제형의 pH가 pH 6.8 내지 pH 8.0인 용도.

청구항 19

청구항 18에 있어서, 상기 인슐린 유사체가 적어도 U-100의 강도로 제형화되는 용도.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 상기 인슐린 유사체가 U-500 내지 U-1000의 사이의 강도로 제형화되는 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 연방정부가 후원하는 연구 또는 개발에 관한 기술

[0002] 본 발명은 승인 번호 제DK040949호 및 제DK074176호 하에 미국 국립보건원이 지급하는 협력협정 하의 정부 지원으로 이루어졌다. 미국 정부는 본 발명에 대해 특정 권리를 가질 수 있다.

[0003] 발명의 배경

[0004] 본 발명은 변경된 약동학적 및 약력학적 특성과 같은 향상된 약제학적 특성을 나타내는, 즉 상응하는 야생형 사람 호르몬의 가용성 제형과 관련하여 축소된 기간을 부여하는 폴리펩타이드 호르몬 유사체에 관한 것이다. 보다 특히, 본 발명은 (i) 이의 "부위-2 수용체-결합 표면"에서 하나 이상의 아미노산 치환과 함께 임의로 (ii) 피하 데포트(subcutaneous depot)로부터 혈류내로 인슐린 유사체의 흡수를 촉진시키는 것으로 당해 분야에 공지된 하나 이상의 B-쇄 치환을 함유하는 인슐린 유사체에 관한 것이다. 본 발명의 인슐린 유사체는 A-과 B-쇄 사이의 연결 도메인(C 도메인)을 임의로 함유할 수 있으며(및 따라서 일본쇄 유사체로서 기술된다) A- 또는 B-쇄내 다른 부위에서 표준 또는 비-표준 아미노산 치환을 임의로 함유할 수 있다. 본 발명에서 근본적인 필수 사상은 호르몬의 부위-2 수용체-결합 표면에서 치환의 동시 포함을 통해 신속히 작용하는 유사체의 안전성 및 효능을 향상시키는 것이다. 치환의 이러한 조합은 당뇨병의 치료 방법으로서 피하 주사를 수반한 혈당 농도의 식사 조절에 있어서의 용도 및 진성 당뇨병의 치료를 위한 폐쇄-루프 시스템(closed-loop system) ["스마트 펌프(smart pump)"]의 알고리즘-기반 작동에 있어서의 용도의 "신속한-작동(fast-on)/신속한-작동 정지(fast-off) 약동학적 특성을 부여한다.

배경 기술

[0005]

치료제 및 백신을 포함하는 단백질의 가공은 광범위한 의학적 및 사회적 이점을 지닐 수 있다. 사람, 일반적으로 다른 포유동물, 척추동물 유기체, 비척추동물 유기체, 또는 진핵 세포의 계층 속에 암호화된 것으로서, 천연적으로 존재하는 단백질은 흔히 2개 이상의 기능성 표면을 함유한다. 단백질 유사체의 이점은 생물학적 활성의 미세-조정(fine-tuning)을 제공하는 것과 같은 이들 기능성 표면 중 하나 또는 다른 것의 선택적 변형을 달성할 수 있다. 치료학적 단백질의 예로서 인슐린이 제공된다. 야생형 인슐린의 3-차원 구조는 아연 욕량체로서, 아연-유리된 이량체로서, 및 용액 중 분리된 단량체로서 잘 특성화되어 왔다(도 1 및 도 2). 야생형 사람 인슐린 및 다른 포유동물의 계층내에서 암호화된 인슐린 분자는 인슐린 수용체(IRs)에 결합하며, 이들 각각은 다중 도메인 및 관련된 도메인 표면을 함유한다. IR은 $\alpha\beta$ 반-수용체의 이량체($(\alpha\beta)_2$ 로 지정됨)이며, 여기서 α 쇠 및 β 쇠는 단일의 전구체 폴리펩타이드의 해독후 생성물이다. $(\alpha\beta)_2$ 이량체의 호르몬-결합 표면은 수용체의 비-선택 결합 및 역학적 특성과 관련하여 부위 1 및 부위 2로 분류되어 왔다. 이러한 결합 도식은 도 3에서 개략적인 형태로 나타낸다. IR 엑토도메인의 단편의 구조적 및 생화학적 분석에 있어서의 최근의 진전은, $(\alpha\beta)_2$ 이량체내 소단위: 하나의 소단위의 N-말단 L1 도메인 및 다른 것의 C-말단 α -나선(α CT) 둘 다에 의해 형성된 트랜스-결합 성분으로 이루어진다[참조: Whittaker J, Whittaker LJ, Roberts CT Jr, Phillips NB, Ismail-Beigi F, Lawrence MC, and Weiss MA. α -Helical element at the hormone-binding surface of the insulin receptor functions as a signaling element to activate its tyrosine kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109, 1116-71(2012)]. 부위 2의 위치는 잘 특성화되어 있지 않으나 제1 및 제2의 퍼브로넥틴-상동성 도메인의 일부를 포함하는 것으로 제안되어 있다.

[0006]

인슐린 또는 인슐린 유사체의 수용체-결합 표면은 동족기준으로 유사하게 분류될 수 있다: 각각의 부위-1 결합 표면(전통적인 수용체-결합 표면) 및 부위 2-결합 표면(비-전통적인 수용체-결합 표면). 인슐린의 부위-1-결합 표면은 B 쇠내 이의 이량체-형성 계면과 오버랩되어 있는 반면 부위-2-결합 표면은 이의 욕량체-형성 계면과 오버랩되어 있다. 부위 1 호르몬-IR 계면은 최근에 낮은 해상도에서 가시화되어 왔다[참조: Menting JG, Whittaker J, Margetts MB, Whittaker LJ, Kong GK, Smith BJ, Watson CJ, Zakova L, Kletvikova E, Jiracek J, Chan SJ, Steiner DF, Dodson GG, Brzozowski AM, Weiss MA, Ward CW, and Lawrence MC. How insulin engages its primary binding site on the insulin receptor. Nature 493, 241-5(2103)]. 추정되는 부위 2-관련된 잔기는, 돌연변이가 결합을 손상시키는 부위 1에 대해 고유한 위치를 기준으로 또는 돌연변이의 역학적 효과를 기준으로 정의될 수 있다. 이들 기준은 비-전통적인 잔기 A12, A13, A17, B13 및 B17의 잠재적인 중요성을 강조한다. 각각의 부위-1-관련된 및 부위-2-관련된 표면은 도 4에서 인슐린 단량체의 표면과 관련하여 나타낸다. 피하 데포트(depot)로부터 인슐린의 흡수를 가속화시키는 것으로 당해 분야에 공지된 치환이 호르몬의 부위-1-결합 표면(잔기 B24, B28 또는 B29에서와 같음)내에 및 이에 인접하여 존재하나, 본 출원인은, 부위-2-결합 표면의 변형이 표적 세포 또는 조직의 표면에 관여하면 호르몬-수용체 복합체에 의한 시그널링의 세포 기간을 조절할 수 있다고 추정하였다. 이론으로 제한하려는 의도는 없지 않지만, 본 출원인은, 시그널링의 세포 기간의 이러한 단점이 신속하게-작동하는 인슐린 유사체("패스트-온")에 "패스트-오프" 약동학적 특성을 부여할 수 있고, 여기서 피하 데포트내 이의 분해는 당해 분야에 공지된 바와 같이 부위-1-결합 표면내에서 또는 이에 인접하여 치환에 의해 가속화된 것으로 추가로 고려하였다(이유에 대해 도 6 참조). 따라서, 부위-1/부위-2-관련된 치환의 이러한 신규 조합은 함께 진성 당뇨병의 치료시 신규 용도의 패스트-온/패스트-오프 약동학적 특성의 바람직한 조합을 부여할 수 있다.

[0007]

인슐린의 전통적인 수용체-결합 표면내 변형 또는 치환이, 피하 또는 정맥내 주사되는 경우, 변이체 인슐린의 능력에 의한 평가로서 생체내 효능에 있어서 유의적인 효과없이 약 5배(예를 들면, 0.05nM의 해리 상수로부터 0.25nM의 해리 상수까지)까지 이의 수용체에 대한 호르몬의 시험관내 친화성을 손상시킴으로써 혈당 농도에 있어서 감소를 유발할 수 있음은 당해 분야에 공지되어 있다. 이러한 건강함은 적어도 부분적으로 혈류로부터 호르몬의 친화성과 청소율 사이의 보완 관계에 기여한다. IR에 대한 결합은 인슐린 작용과, 큰 정도로는 인슐린 청소 둘다에 기여하므로, 친화성에 있어서의 감소는 순환하는 반감기에 있어서의 비례적인 증가 및 따라서 생물학적 시그널링을 발휘하기 위한 기회를 초래한다. 이러한 보완의 예는, 이의 개재내용이 본원에 참조로 포함된, 2012년 7월 13일자로 출원된 국제 특허원 일련 번호 제PCT/US12/46575호 및 2013년 1월 22일자로 출원된 미국 가특허원 제61/755,020호에 기재된, B24 위치에서 페닐알라닌이 사이클로헥사닐알라닌(Cha)으로 치환된 인슐린 유사체와 관련하여 기재되어 왔다. B24 위치에서 Cha의 비-평면 지방족 환(도 8에 나타냄)은 약 역치까지의 수

용체-결합 친화성을 약 3배 손상시키지만 당뇨병 스프라그-다울리 랫트((Sprague-Dawley rat)에서 시험한 것으로서 KP-인슐린의 효능 또는 약동학 특성에 있어 효과를 지니지 않는다(도 9a). 추가의 예가 도 7에 예시되고 (야생형 이량체 계면과 관련하여) 및 본원에 참조로 포함된 것으로서, 각각 2012년 7월 18일 및 2011년 1월 31 일자로 출원된 미국 특허된 일련 번호 제13/515,192호, 제13/018,011호 및 2012년 10월 4일자로 출원된 미국 가 특허된 제61/709,448호, 각각 2010년 12월 13일 및 2012년 10월 29일자로 출원된 국제 특허된 제 PCT/US2010/60085호 및 제PCT/US 2012/62423호에 개제된 것으로서 B24 위치에서 플루오로-방향족 및 클로로-방 향족 치환에 의한 변형으로 제공되어 왔다. 따라서, 방향족 환의 오르토 위치에서 단일의 클로로-치환(2-C1-Phe^{B24})에 의한 KP-인슐린(Humalog[®]의 활성 성분); 제조원: Eli Lilly and Co.)으로 또한 지정된 인슐린 리스프 로([Lys^{B28}, Pro^{B29}]-인슐린내 Phe^{B24}의 변형은 스트렙토토신에 의해 당뇨병성이 되도록 한 스프라그-다울리 랫트 (Sprague-Dawley) 랫트에서 평가된 것으로서 또는 내인성 인슐린 분비가 정맥내 옥트레오타이드에 의해 억제된 마취된 비-당뇨병 성체 요크셔 돼지(Yorkshire pig)에서 평가된 것으로서 시험관내에서 분리된 IR에 대한 변이 체 호르몬의 생화학적 친화성을 이의 생체내 효능에 있어서 변화없이 약 3배까지 손상시킨다(테이타는 나타내지 않음). 보다 더 극적으로, 2-F-Phe^{B24}(B24 위치에서 오르토-모노플루오로-페닐알라닌)을 함유하는 [Asp^{B10}, Lys^{B28}, Pro^{B29}]-인슐린(DKP-인슐린)의 유도체는 수용체-결합 친화성에 있어서 유사한 감소(KP-인슐린에 대해 약 35(±5)%)를 나타내는 반면, 이의 효능 및 시그널링의 기간은 2011년 1월 31일자로 출원된 미국 특허된 일련번호 제13/018,011호(이는 본원에 참조로 포함됨)에 개제된 바와 같이 당뇨병성 스프라그-다울리 랫트에서 향상 되어 있다. 따라서, 시험관내에서 평가된 바와 같이 IR 결합에 대한 중간의 교란이 도입된 인슐린 분자내에서 일반적으로 변형 또는 치환은 생체내에서 잘 내성화될 수 있고 효능 또는(자가-조립에 있어서의 효과의 부재하 에서) 다른 약리학적 특징과 관련하여 야생형-인슐린과는 구별되지 않거나-또는 2-F-Phe^{B24}-DKP-인슐린의 경우에 서와 같이 심지어 보다 강력하며 연장된 것으로 예측될 수 있다. 따라서, 부위 2내에서의 치환 또는 변형은 5배 미만의 IR에 대한 변이체 인슐린의 생화학적 친화성에 대한 교란을 부여함에도 불구하고 생체내 인슐린 활성의 기간을 현저하게 단축시킬 수 있다. B13, B17, A12, A13, 및 A17 위치에서 측쇄는 인슐린 수용체의 주요 호르몬 -결합 표면에서 관여하는 것으로 고려되지 않지만, 알라닌 스캐닝 돌연변이유발은, 부위-2-관련된 위치에서 단 일의 알라닌 치환이 다음과 같이 상대적인 수용체-결합 친화성에 영향을 미침이 밝혀져 있다:(B13 위치에서) 12(±3)%, (B17)62(±14)%, (A12) 108(±28)%, (A13) 30(±7)%, 및 (A17) 56(±20)%.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008]

인슐린의 투여는 진성 당뇨병에 대한 치료로서 장기간 확립되어 왔다. 진성 당뇨병 환자에서 통상의 인슐린 대 체 요법의 주요 목표는 건강한 사람 대상체의 정상 범위 특징 이상 또는 이하의 이의 폭주(excursion)을 방지하 기 위한 혈당 농도의 강력한 조절이다. 정상 범위 이하의 폭주는 아드레날린성 또는 신경포도당 결핍 증상과 관 련되어 있으며, 이는 심각한 사건하에서 경련, 혼수, 및 사망을 초래한다. 정상 범위를 초과하는 폭주는 망막병 증(retinopathy), 실명, 및 신부전을 포함하는 미세혈관 질환의 증가된 장기간 위험과 관련되어 있다. 인슐린은 척추동물에서 물질대사에 있어 중추적 역할을 하는 작은 구형 단백질이다. 인슐린은 2개의 쇠, 21개의 잔기를 함유하는 A 쇠, 및 30개의 잔기를 함유하는 B 쇠를 함유하고; 개개 잔기는 아미노산의 동질성(전형적으로 표준 3문자 코드를 사용함), 쇠 및 서열 위치에 의해 나타난다. 호르몬은 췌장 β-세포내에 Zn²⁺ 안정화된 육량체로 서 저장되지만, 혈류 속에서 Zn²⁺-유리된 단량체로서 작용한다. 인슐린은 일본-쇠 전구체인, 프로인슐린의 생성 물이며, 여기서 연결 영역(35개 잔기)는 B쇄(잔기 B30)의 C-말단 잔기를 A쇄의 N-말단 잔기로 연결한다. 다양한 증거는, 이것이 인슐린-유사 코어(core) 및 장애가 있는 연결 펩타이드로 이루어져 있음을 나타낸다. 3개의 특 수한 이황화물 브릿지(A6-A11, A7-B7, 및 A20-B19; 도 2에서 표지됨)의 형성은 조면 소포체(ER)내에서 프로인슐 린의 산화성 폴딩과 커플링되는 것으로 고려되고 있다. 프로인슐린은 조립하여 ER로부터 골지체로 배출 직후 가 용성의 Zn²⁺-배위된 육량체를 형성하는 것으로 고려되고 있다. 내단백질분해성 소화 및 인슐린으로의 전환은 미 성숙 분비 파립에 이은 형태학적 농축에 의해 발생한다. 성숙한 저장 파립내에서 아연 인슐린 육량체의 결정성 배열은 전자 현미경(EM)에 의해 가시되어 왔다.

[0009]

(i) 피하 데포트내 인슐린 복합체의 가속화된 분해와(ii) 호르몬-수용체 복합체가 표적 세포 또는 조직의 표면

에서 관여하면 세포 시그널링의 단축된 기간을 결합시키는 신속하게 작용하는 2개의 쇠 인슐린 유사체 또는 일본쇄 인슐린 유사체를 가공하기 위한 의학적 및 사회적 요구가 존재한다. 또한 말기 식후 저혈당증 및 안전성 및 효능과 관련하여 폐쇄된-루프 알고리즘-계 펌프 시스템("스마트 펌프")의 충족하지 않은 수행 규격을 피하기 위해 식사 인슐린 주사로 처리한 환자의 부집합의 충족하지 않은 요구가 존재한다. 스마트 펌프내에서의 피이드백 조절은, 과-전달 현상의 효과가 축소될 수 있으므로 시그널링의 단축된 기간에 의해 보다 강건하게 만들 수 있다. 따라서, B 쇠내의 조합된 변형이 어딘가에서 시그널링의 단축된 기간을 초래하는 단백질 분자내 변형을 지닌 인슐린 복합체의 분해를 가속화하도록 설계된 인슐린 유사체의 신규 부류를 제공하는 것이 요구될 수 있다.

과제의 해결 수단

[0010]

발명의 요약

[0011]

따라서, 본 발명의 국면은(i) B 쇠의 부위-1-관련된 표면내의 또는 당해 표면에 인접한 치환 또는 변형으로 인한 혈류내로의 신속한 흡수 및(ii) A- 및/또는 B 쇠의 부위-2-관련된 표면의 돌연변이 또는 변형으로 인한 표적 세포 시그널링의 단축된 기간을 제공하는 2개-쇄 및 단일-쇄 인슐린 유사체를 제공하는 것이다. 부위-2-관련 치환은 다음의 위치 중 하나 이상에서의 변형이다: B13, B17, A12, A13, 및 A17. 본 발명의 유사체는 야생형 인슐린의 생물학적 활성의 적어도 일부를 함유함으로써 피하 또는 정맥내 주사시 혈당 농도에 있어서의 감소를 지시한다. 본 발명의 국면은, 유사체의 등전점을 3.5 내지 6.0의 범위내에 들으로써 pH 범위가 6.8 내지 8.0인 선명한 가용성 용액으로서의 제형이 가능하도록 하는 것이다.

[0012]

본 발명의 유사체는 B10 위치에서 히스티딘을 함유할 수 있으므로 아연 인슐린 옥량체와 같은 제형으로 조절될 수 있다. 임의로, 본 발명의 유사체는 단백질내 어디에서든 치환 또는 변형과 합해지는 경우 B10 위치에서 아스파르트산을 함유함으로써 IR에 대해 친화성을 나타내는 유사체가 야생형 인슐린의 것과 동일하거나 이의 미만이 고(및 또한 달리는 호르몬-수용체 복합체내 연장된 잔류 시간을 나타냄) 제1형 IGF-1 수용체에 대한 친화성이 야생형 인슐린의 것과 동일하거나 이의 미만이라도(및 따라서 IGF-I-관련된 미토겐생성(mitogenicity)을 나타내기 위함) 할 수 있다.

발명의 효과

[0013]

본 발명에 대한 관련 항목은 사람 프로인슐린의 특징인 36개-잔기 야생형 C 도메인대신 길이가 6 내지 11개 잔기인 신규의 단축된 C 도메인의 발명이다. 일본쇄 인슐린 유사체는 아연-유리된 단량체로서의 제형으로 조절가능한 세동-내성 인슐린 유사체의 설계에 대한 양호한 시도를 제공한다. 이러한 일본쇄 유사체는 신속히 작용하는 약동학을 부여하는 것과 같은 B 쇠의 부위-1-결합 표면내의 또는 당해 표면에 인접한 치환을 지니도록 설계할 수 있다. B13, B17, A12, A13, 또는 A17로부터 선택된 하나 이상의 위치에서 추가의 변형에 적합한 일본쇄 인슐린 유사체는 미국 특허원 제12/989,399호(2010년 10월 22일자로 출원됨) 및 미국 특허 제8,192,957호에 개재되어 있으며, 이는 본원에 참조로 포함되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0014]

도면의 수개의 측면의 간단한 설명

도 1은 대표적인 약제학적 제형 속에서 및 혈류 속 분리된 단량체로서의 인슐린 구조를 나타낸다.(A) 페놀-안정화된 R₆ 아연 옥량체. 축 아연 이온(오버레이드(overlaid))는 히스티딘 측쇄에 의해 배워된 동시발생하는 흑색 구체로서 나타낸다. A-쇄는 암회색으로 나타내고, B-쇄는 중간 회색(잔기 B1-B8) 및 담회색(B9-B30)으로 나타낸다. (B) 인슐린 단량체의 구조, A 쇠는 암회색으로 나타내고, B 쇠는 중간 회색으로 나타내며; 이황화물 브릿지는 공형 및 막대형으로 표시한다(표지는 도 2에 제공됨).

도 2는 인슐린 이량체 및 코어 베타-쉬트 구조를 나타낸다.

항-평행 베타-쉬트에 대한 잔기 B24-B28(중간 회색)은 옥량체내에서 대칭에 의해 3회 반복하였다. A- 및 B 쇠

는 달리는 담회색 및 암회색으로 각각 나타낸다. Phe^{B24}의 위치는 암회색의 화살표로 강조한다. 시스테인은 구체로 나타낸 황 원자에 의해 확인된다. 배위는 T₆ 옥량체(PDB 4INS)로부터 수득하였다.

도 3은 인슐린 수용체의 모델을 나타낸다: 수용체의 각각의 α 소단위는 2개의 명백한 인슐린-결합 부위: 부위 1(고 친화성) 및 부위 2(저 친화성이나 시그널 전파에 중요함)를 함유한다. 구체적인 인슐린 결합은 2개의 α 소단위를 브릿징하여, 궁극적으로 β 소단위 사이의 배향을 변경시키고, 시그널을 세포내 타이로신 키나제(TK) 도메인으로 교통한다.

도 4는 인슐린의 기능성 표면을 나타낸다. 인슐린의 전통적인 수용체-결합 표면은 IR 부위 1(B12, B16, B24-B26)에 관여하는 반면, 이의 부위 2-관련 표면은 옥량체 접촉부 Val^{B17} 및 Leu^{A13}을 포함하고; 제안된 부위 2 잔기는 이웃하는 잔기 B10과 함께 나타나 있으며(B13, B17, A12, A13, 및 A17), 이는 부위 1 및 2 둘 다에 기여할 수 있다. A- 및 B쇄는 달리는 담회색 및 암회색으로 각각 나타낸다.

도 5는 인슐린 옥량체, 이량체 및 단량체의 표면에서 Leu^{A13}의 위치를 나타낸다. 배위는 R₆ 옥량체(PDB 1TRZ)로부터 수득하였다.

도 6은 식사 인슐린 유사체의 설계 및 제형을 위한 원리를 나타낸다. 아연 옥량체의 신속한 분해는, 모세관내로 도입될 수 있는 이량체 및 단량체를 수득한다. 현재의 식사시간 인슐린 유사체는 코어 베타-쉬트의 가장자리에서 표준 치환을 포함한다.

도 7은 파라-C1-Phe^{B24} 변형의 구조-기반 설계를 나타낸다.(A) 야생형 R₆ 아연 인슐린 옥량체의 리본 모델. A- 및 B쇄는 담회색 및 암회색으로 나타내며, 축 아연 이온(오버레이드)은 구체로서, 및 Phe^{B24} 측쇄는 중회색으로 나타낸다.(B) 인슐린 이량체의 리본 모델; 항-평행 B24-B28 β-쉬트는 중간에 나타낸다. 색상 도해는 패널 A에서와 같다.(C) 입체 쌓은 이량체 계면내 방향족 무리를 나타낸다: 잔기 B24 및 B24', B25 및 B25', 및 B26 및 B26'.(D) 변형된 이량체 계면의 예측된 모델; B24(방향족 환 위치 2)에서 파라-클로로 원자는 구체로 나타낸다(반데르 발스(van der Waals) 반경의 50%).

도 8은 방향족 및 비-방향족 환 시스템을 나타낸다.(A) Phe는 평면 6-탄소 방향족 환을 함유한다.(B) 사이클로헥사닐알라닌(Cha)은 비-평면 6-탄소 지환족 환을 함유한다. 각각의 아미노산의 3개의 측면을 나타낸다. 각각의 패널에서 구- 및-막대 모델(ball-and-stick model)을 상단에 나타내고, 분자 표면 모델은 하단에 나타낸다. 탄소 및 수소 원자는 각각 중간 및 담회색인 반면, 산소(질소) 원자는 암회색이고 질소 원자는 검정색이다.

도 9는 부류-1-관련된 변형을 지닌 인슐린 유사체의 약력학을 나타낸다. 스프라그-다울리 랫트에서 인슐린 리스프로(KP-인슐린) 또는 유사체의 피하 주사에 대한 혈당 반응의 연구는 스트렙토조토신에 의해 당뇨병성으로 되도록 한다. (A) 랫트당 20 μg의 투여량에서 KP-인슐린(속이 찬 다이아몬드형) 및 Cha B24 -DKP-인슐린(B24Cha KP, 빈 사각형). Cha^{B24}-DKP-인슐린의 상대적인 친화성은 약 30(±5)%이다.(B) 랫트당 50 μg의 투여량에서 KP-인슐린(채워진 다이아몬드형) 및 오르토-모노플루오로-Phe^{B24}-DKP-인슐린(2F B24 DKP, 빈 사각형)의 비교. 2-F-Phe^{B24}-DKP-인슐린의 상대적인 친화성은 약 35(+5)%이다.

도 10은 수용체-결합 연구를 나타낸다. 사람 인슐린 수용체의 고정된 액틴-정제된 동형 B를 사용한 비교 결합 검정.(A) Trp^{A13}-KP-인슐린(삼각형) 및 KP-인슐린(사각형)의 비교.(B) 상부 패널, Tyr^{A13}-KP-인슐린(위쪽을 향한 삼각형) 및 야생형 사람 인슐린(사각형). 하부 패널, Trp^{A13}-KP-인슐린의 4-C1-Phe^{B24} 유도체의 비교(역삼각형) 및 야생형 사람 인슐린(사각형).(KP-인슐린의 친화성은 야생형 사람 인슐린의 것과 유사하므로 적합한 대조군을 제공한다).

도 11은 약동학적 검정을 나타낸다.(A) 불활성 대조군 시료와 비교하여 Trp^{A13}-KP-인슐린(삼각형, A13W-KP) 및 KP-인슐린(다이아몬드형, KP)에 대한 시간에 따른 혈당 수준의 비교: 희석물 단독(원형) 및 약 100배까지 수용체 결합을 손상시키는 부위-1-관련 표면내 돌연변이를 함유하는 유사체(Trp^{A13}-KP-인슐린; 사각형, A3W-KP).(B) KP-인슐린(채워진 다이아몬드) 및 Tyr^{A13}-KP-인슐린(빈 원형, YA13-KP)에 대한 시간에 걸친 혈당 수준의 비교.(C) 4-C1-Phe^{B24}-Trp^{A13}-KP-인슐린(사각형, WA13 4C1 B24 KP), Trp^{A13}-KP-인슐린(원형, WA13-KP), 2-C1-Tyr^{A14}-

KP-인슐린(삼각형, YA13 2CL B24 KP), 및 KP-인슐린(다이아몬드); 희석물 대조군은 사용하지 않았다. 패널 A에서 혈당 농도의 강하(평균 초기 값에 대한 퍼센트로서; 약 400 mg/dl)는 피하 주사 후 시간의 함수로 나타낸 반면 패널 B 및 C에서는 평균 글루코스 농도를 나타낸다. 초기 고혈당증의 정도는 각각의 날에 랫트의 각각의 세트에서 유사하였다. 투여량은 각각의 경우에 랫트당 60 µg이었다. 기호는 또한 각각의 패널의 하단 우측에 삽도로서 정의된다.

도 12는 원형 이색성 스펙트럼을 나타낸다. A13 위치에서 치환을 함유하는 인슐린 유사체의 원-자외선 CD 스펙트럼은 모 유사체 KP-인슐린의 CD 스펙트럼과 관련하여 나타낸다. 범례는 상부 우측에 나타내고 다음을 포함한다: KP-인슐린, (YA13 B24 Cha KP) Cha^{B24}-Tyr^{A13}-KP-인슐린, (WA13 B24 4C1 KP)4-C1-Phe^{B24}-Trp^{A13}-KP-인슐린, (WA13 KP) Trp^{A13}-KP-인슐린, (YA13 B24 4C1 KP) 4-C1-Phe^{B24}-Tyr^{A13}-KP-인슐린, 및 (YA13 KP), Tyr^{A13}-KP-인슐린. 인슐린 유사체는 25°C의 온도에서 50mM 인산칼륨(pH 7.4) 속에서 약 60 µM로 제조하였다.

도 13은 화학적 변성 연구를 나타낸다. 변성된 구아니딘 하이드로클로라이드의 농도의 함수로서 비폴딩된 단백질의 CD-검출된 연구(평행축). 기호는 범례에서 정의한다:(속이 찬 검정색 사각형, KP) KP-인슐린, (원형, YA13 Cha KP) Cha^{B24}-Tyr^{A13}-KP-인슐린, (삼각형) 4-C1-Phe^{B24}-Trp^{A13}-KP-인슐린, (역 삼각형) Trp^{A13}-KP-인슐린, (다이아몬드형) 4-C1-Phe^{B24}-Tyr^{A13}-KP-인슐린, 및 (회전된 삼각형), Tyr^{A13}-KP-인슐린. 타원형은 222nm의 파장에서 모니터링되었다.

발명의 상세한 설명

본 발명은(i) 피하 데포트로부터의 신속한 흡수 및 (ii) 단축된 작용 기간 둘다를 제공하며, IR-A/IR-B 수용체-결합 친화성이 5 내지 100%(프로인슐린에 상응하도록 선택된 하한치) 범위에서의 절대 친화성을 지닌 야생형 인슐린의 것과 유사한 이분쇄 또는 일본쇄 인슐린 유사체에 관한 것이다. 신속한 흡수를 부여하는 B-쇄 치환의 예는 B28 위치에서 프롤린과 임의로 조합된, B29 위치에서 아르파르트산 또는 라이신이다. B28 위치로부터 프롤린의 제거는 치환된 아미노산의 특성과 상관없이 감소된 이량체화 강도 및 용량제 조립과 관련되어 있다. 신속한 흡수를 부여하는 B-쇄 치환의 여전히 다른 예는 아연 이온의 부재하에서 제형화되는 경우 B3 위치에서 라이신 및 B29 위치에서 글루탐산의 조합이다. 시그널링의 단축된 기간을 발휘하기 위해 도입된 아미노산 치환은 다음 위치 중의 하나 이상일 수 있다: B13, B17, A12, A13, 및 A17. 이러한 치환의 예는 트립토판, 타이로신(A13에서 제외), 알라닌, 히스티딘, 글루탐산(B13 및 A17에서 제외), 및 글루타민(B13에서 제외)에 의해 제공된다. 본 발명의 특징은, 일본쇄 유사체의 등전점이 3.5 내지 6.0 사이이어서 가용성 제형 중성 조건(pH 6.8 내지 8.0)이 용이할 수 있다는 것이다.

또한, 일본쇄 유사체가 비-제한적인 예로서 돼지, 소, 말, 및 개와 같은 동물 인슐린으로부터 기원한 A- 및 B-도메인 서열로 제조될 수 있음이 고려된다. 추가로 또는 대안적으로, 본 발명의 인슐린 유사체는 B1 내지 B3 잔기의 결실을 함유할 수 있거나 라이신(예를 들면, 야생형 사람 인슐린에서 Lys^{B29})을 결여한 변이체 B 쇠와 결합하여 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세레비지시아에(*Saccharomyces cerevisiae*), 또는 다른 효모 발현 중 또는 균주에서 효모 생합성에 있어서 전구체 폴리펩타이드의 Lys-지시된 단백질분해를 피할 수 있다. 본 발명의 일본쇄 인슐린의 B-도메인은 B20 및/또는 B23위치에서 D-아미노산과 같은 비-표준 치환(열동역학적 안정성, 수용체-결합 친화성, 및 세동에 대한 내성을 향상시키도록 의도됨), Phe^{B24}의 2번 환 위치에서 할로젠 변형(즉, 오르토-F-Phe^{B24}, 오르토-Cl-Phe^{B24}, 또는 오르토-Br-Phe^{B24}; 열동역학적 안정성 및 세동에 대한 내성을 향상시키도록 의도됨), Phe^{B24}의 2-메틸 환 변형(수용체-결합 친화성을 향상시키도록 의도됨)을 임의로 함유할 수 있다. C-도메인에서 Thr^{B27}, Thr^{B30}, 또는 하나 이상의 세린 잔기는 단독으로 또는 당류 첨가물에 의해, 함께 변형될 수 있으며; 예로서 0-연결된 N-아세틸-β-D-갈락토피라노시드(GalNAc-O^β-Ser 또는 GalNAc-O^β-Thr로 지정됨), 0-연결된 α-D-만노피라노시드(만노즈-O^β-Ser 또는 만노즈-O^β-Thr), 및/또는 α-D-글루코피라노시드(글루코스-O^β-Ser 또는 글루코스-O^β-Thr)이 제공된다.

또한, 사람과 동물 인슐린 사이의 유사성의 측면에서, 및 진성 당뇨병 사람 환자에서 과거 동물 인슐린의 사용 측면에서, 인슐린의 서열내 다른 소수의 변형이 특히 "보존적"으로 고려된 치환을 도입할 수 있는 것으로 고찰된다. 예를 들어, 아미노산의 추가의 치환은 본 발명에 벗어남이 없이, 유사한 측쇄를 지닌 아미노산의 그룹내에서 이루어질 수 있다. 이들은 천연의 소수성 아미노산: 알라닌(Ala 또는 A), 발린(Val 또는 V), 루이신(Leu

또는 L), 이소루이신(Ile 또는 I), 프롤린(Pro 또는 P), 트립토판(Trp 또는 W), 페닐알라닌(Phe 또는 F) 및 메티오닌(Met 또는 M)을 포함한다. 유사하게, 중성 중성 아미노산은 글리신(Gly 또는 G), 세린(Ser 또는 S), 트레오닌(Thr 또는 T), 타이로신(Tyr 또는 Y), 시스테인(Cys 또는 C), 글루탐산(Glu 또는 Q), 및 아스파라긴(Asn 또는 N)의 그룹 내에서 서로 치환될 수 있다. 염기성 아미노산은 라이신(Lys 또는 K), 아르기닌(Arg 또는 R) 및 히스티딘(His 또는 H)을 포함하는 것으로 고려된다. 산성 아미노산은 아스파르트산(Asp 또는 D) 및 글루탐산(Glu 또는 E)이다. 달리 나타내지 않거나 내용으로부터 명백하지 않는 경우, 본원에 나타낸 아미노산은 L-아미노산으로 고려될 수 있다. 표준 아미노산은 또한 동일한 화학 부류에 속하는 비-표준 아미노산으로 치환될 수 있다. 비-제한적인 예로서, 염기성 측쇄 Lys는 보다 짧은 측쇄 길이의 아미노산(오르니틴, 디아미노부티르산, 또는 디아미노프로피온산)으로 치환될 수 있다. Lys는 또한 천연의 지환족 이소시트레레노르루이신(Nle)으로 치환될 수 있으며, 이는 궁극적으로 보다 짧은 지환족 측쇄(아미노부티르산 또는 아미노프로피온산)를 함유하는 유사체로 치환될 수 있다.

사람 프로인슐린의 아미노산 서열이 비교 목적을 위해 서열 번호 1로서 제공된다.

서열 번호 1(사람 프로인슐린)

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-Tyr-Cys-Asn

사람 인슐린의 A 쇠의 아미노산 서열은 서열 번호 2로서 제공된다.

서열 번호 2(사람 A 쇠)

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

사람 인슐린의 B 쇠의 아미노산 서열은 서열 번호 3으로 제공된다.

서열 번호 3(사람 B 쇠)

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

A12번 위치에서 변형된 사람 인슐린의 A 쇠의 아미노산은 서열 번호 4로서 제공된다.

서열 번호 4(변이체 사람 A 쇠)

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Xaa-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn

여기서 Xaa는 Ala, Thr, Asp, Asn, Glu, Gln, His 또는 Tyr을 나타낸다.

A13번 위치에서 변형된 사람 인슐린의 A 쇠의 아미노산 서열은 서열 번호 5로서 제공된다.

서열 번호 5(변이체 사람 A 쇠)

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Xaa-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn

여기서 Xaa는 Ala, Glu, Gln, His, Tyr 또는 Trp를 나타낸다.

A17번 위치에서 변형된 사람 인슐린의 A 쇠의 아미노산 서열은 서열 번호 6으로 제공된다.

서열 번호 6(변이체 사람 A 쇠)

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu- Xaa -Asn-Tyr-
Cys-Asn

여기서 Xaa는 Ala, Gln, His, Trp, 또는 Tyr을 나타낸다.

A12, A13, 및/또는 A17 위치의 하나 이상에서 변형된 사람 인슐린의 A 쇠의 아미노산 서열은 서열 번호 7로서 제공된다.

서열 번호 7(변이체 사람 A 쇠)

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys- Xaa₁- Xaa₂-Tyr-Gln-Leu- Xaa₃-Asn-
Tyr-Cys-Asn

여기서 Xaa 부위 중 적어도 하나는 야생형 사람 인슐린과 관련된 치환을 함유하며, 여기서 Xaa₁은 Ser, Ala, Thr, Asp, Asn Glu, Gln, His 또는 Tyr을 나타내고; 여기서 Xaa₂는 Leu, Ala, Glu, Gln, His, 또는 Trp을 나타내며; 여기서 Xaa₃은 Glu, Ala, Gln, His, Trp, 또는 Tyr을 나타낸다.

A8 잔기에서 변형되고 또한 A12, A13, 및/또는 A17 위치 중 하나 이상에서 변형된 사람 인슐린의 A 쇠의 아미노산 서열은 서열 번호 8로 제공된다.

서열 번호 8(변이체 사람 A 쇠)

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Xaa₁-Ser-Ile-Cys-Xaa₂-Xaa₃-Tyr-Gln-Leu-Xaa₄-Asn-
Tyr-Cys-Asn

여기서, 부위-2-관련 부위(A12, A13, 및 A17) 중 적어도 하나는 야생형 사람 인슐린과 관련된 치환을 함유하고 여기서, Xaa₂는 Ser,Ala, Thr, Asp, Asn Glu, Gln, His 또는 Tyr을 나타내며; 여기서 Xaa₃은 Leu, Ala, Glu, Gln, His, 또는 Trp를 나타내고; 여기서 Xaa₄는 Glu, Ala, Gln, His, Trp, 또는 Tyr을 나타내며; 여기서 Xaa₁은 His, Glu, Gln, Arg, 또는 Lys를 나타낸다.

B13 위치에서 변형된 사람 인슐린의 변이체 B 쇠의 아미노산 서열은 서열 번호 9로서 제공된다.

서열 번호 9(변이체 사람 B 쇠)

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Xaa₃-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-
Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Xaa₁-Xaa₂-Thr

여기서 Xaa₃는 Ala, Asp, His, 또는 Leu를 나타내고; 여기서 Xaa₁은 글리신, 트립토판, 페닐알라닌, 타이로신, 및 시스테인을 제외한 어떠한 아미노산도 나타내며; 여기서 Xaa₂는 Pro, Glu 또는 Lys를 나타낸다.

B17 위치에서 변형된 사람 인슐린의 B 쇠의 아미노산 서열은 서열 번호 10으로서 제공된다.

서열 번호 10(변이체 사람 B 쇠)

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Xaa₃-Val-Cys-
Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr- Xaa₁-Xaa₂-Thr

여기서 Xaa₃은 Glu, Gln, Ala, His, Trp, 또는 Tyr을 나타내고; 여기서 Xaa₁은 글리신, 트립토판, 페닐알라닌, 타이로신, 및 시스테인을 제외한 어떠한 아미노산도 나타내며; 여기서 Xaa₂는 Pro, Glu, 또는 Lys를 나타낸다.

B13 및 B17 위치 둘 다에서 변형된 사람 인슐린의 변이체 B 쇠의 아미노산 서열은 서열 번호 11로서 제공된다.

서열 번호 11(변이체 사람 B 쇠)

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val- Xaa₁-Ala-Leu-Tyr-Xaa₂-Val-
Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr- Xaa₃-Xaa₄-Thr

여기서 Xaa₁은 Ala, Asp, His, 또는 Leu를 나타내고; 여기서 Xaa₂는 Gln, Glu, Ala, His, Trp, 또는 Tyr을 나타내며; 여기서 Xaa₃은 글리신, 트립토판, 페닐알라닌, 타이로신, 및 시스테인을 제외한 어떠한 아미노산도 나타내고; 여기서 Xaa₄는 Pro, Glu, 또는 Lys를 나타낸다.

본 발명의 일분쇄 인슐린 유사체의 아미노산 서열은 서열 번호 12 내지 14로 제공된다.

서열 번호 12

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-Xaa₁-Leu-Val-Xaa₁-Ala-Leu-Tyr-Xaa₂-Val-
Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr- Xaa₆-Xaa₇-Thr-Gly-Z-Arg-Arg-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-
Cys-Cys-Xaa₈-Ser-Ile-Cys-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₉-Gln-Leu-Xaa₅-Asn-Tyr-Cys-Asn

여기서 부위-2-관련된 부위(B13, B17, A12, A13, 및 A17) 중 적어도 하나는 야생형 사람 인슐린과 관련한 치환을 함유하고, 여기서 Xaa₁은 Glu, Ala, Asp, His, 또는 Leu를 나타내며; 여기서 Xaa₂는 Leu, Glu, Gln, Ala, His, Trp, 또는 Tyr을 나타내고; 여기서 Xaa₃은 Ser, Ala, Thr, Asp, Asn, Glu, Gln, Tyr, 또는 His을 나타내며; 여기서 Xaa₄는 Leu, Ala, Glu, Gln, His, Tyr, 또는 Trp을 나타내고; 여기서 Xaa₅는 Glu, Gln, Ala, His, Trp, Tyr 또는 Leu를 나타내며; 여기서 Xaa₆는 His 또는 Asp을 나타내고; 여기서 Xaa₇은 글리신, 트립토판, 페닐알라닌, 타이로신, 및 시스테인을 제외하고 어떠한 아미노산도 나타내며; 여기서 Xaa₈은 Pro 또는 Lys을 나타내고; Xaa₈은 Glu, Gln, His, Arg, Lys 또는 오르니틴을 나타내며; 여기서 Xaa₉은 Tyr 또는 Glu를 나타내고; 여기서 Z는 3 내지 8개 길이의 폴리펩타이드 분절을 나타낸다.

서열 번호 13

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-Xaa₁-Leu-Val-Xaa₁-Ala-Leu-Tyr-Xaa₂-Val-
Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr- Xaa₆- Xaa₇-Thr-Glu-Glu-Z-Arg-Arg-Gly-Ile-Val-
Glu-Gln-Cys-Cys-Xaa₈-Ser-Ile-Cys-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₉-Gln-Leu-Xaa₅-Asn-Tyr-Cys-Asn

여기서 부위-2-관련된 부위(B13, B17, A12, A13, 및 A17)의 적어도 하나는 야생형 사람 인슐린과 관련된 치환을 함유하고, 여기서 Xaa₁은 Glu, Ala, Asp, His, 또는 Leu를 나타내며; 여기서 Xaa₂는 Leu, Glu, Gln, Ala, His, Trp, 또는 Tyr을 나타내고; 여기서 Xaa₃은 Ser, Ala, Thr, Asp, Asn, Glu, Gln, Tyr, 또는 His을 나타내며; 여기서 Xaa₄는 Leu, Ala, Glu, Gln, His, Tyr, 또는 Trp을 나타내고; 여기서 Xaa₅는 Glu, Gln, Ala, His, Trp, Tyr 또는 Leu를 나타내며; 여기서 Xaa₆는 His 또는 Asp를 나타내고; 여기서 Xaa₇은 글리신, 트립토판, 페닐알라닌, 타이로신, 및 시스테인을 제외한 어떠한 아미노산도 나타내며; 여기서 Xaa₈은 Pro 또는 Lys을 나타내고; Xaa₈은 Glu, Gln, His, Arg, Lys 또는 오르니틴을 나타내며; 여기서 Xaa₉은 Tyr 또는 Glu를 나타내고; 여기서 Z는 2 내지 7 길이의 폴리펩타이드 분절을 나타낸다.

서열 번호 14

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-Xaa₁-Leu-Val-Xaa₁-Ala-Leu-Tyr-Xaa₂-Val-
Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr- Xaa₆- Xaa₇-Thr-Glu--Z-Ser-Arg-Gly-Ile-Val-Glu-
Gln-Cys-Cys-Xaa₈-Ser-Ile-Cys-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₉-Gln-Leu-Xaa₅-Asn-Tyr-Cys-Asn

여기서 부위-2-관련된 부위(B13, B17, A12, A13, 및 A17) 중 적어도 하나는 야생형 사람 인슐린과 관련된 치환을 함유하고, 여기서 Xaa₁은 Glu, Ala, Asp, His, 또는 Leu를 나타내며; 여기서 Xaa₂는 Leu, Glu, Gln, Ala, His, Trp, 또는 Tyr을 나타내고; 여기서 Xaa₃은 Ser, Ala, Thr, Asp, Asn, Glu, Gln, Tyr, 또는 His을 나타내며; 여기서 Xaa₄는 Leu, Ala, Glu, Gln, His, Tyr, 또는 Trp를 나타내고; 여기서 Xaa₅는 Glu, Gln, Ala, His, Trp, Tyr 또는 Leu를 나타내며; 여기서 Xaa₆은 His 또는 Asp를 나타내고; 여기서 Xaa₇은 글리신, 트립토판, 페닐알라닌, 타이로신, 및 시스테인을 제외한 어떠한 아미노산도 나타내며; 여기서 Xaa₈은 Pro 또는 Lys를 나타내고; Xaa₉은 Glu, Gln, His, Arg, Lys 또는 오르니틴을 나타내며; 여기서 Xaa₉는 Tyr 또는 Glu을 나타내고; 여기서 Z는 3 내지 8 길이의 폴리펩타이드 분절을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015]

유사체 합성 유전자는 경우의 소세트에서 제조되어 왔으며 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)에서 클로닝되어 왔다. 2개-쇄 인슐린 유사체의 생산을 위해, 53-잔기 미니-프로인슐린 전구체가 발현되어, 폴딩되고, 피. 파스토리스에 의해 문헌[참조: Kjeldsen T, Pettersson AF, Hach M. The role of leaders in intracellular transport and secretion of the insulin precursor in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biotechnol. 75, 195-208(1999)]에 기술된 바와 같이 N-말단 시그널 펩타이드에 의해 필수적으로 분비되었다. A13 위치를 암호화하는 코돈은 부위-지시된 돌연변이유발에 의해 변경되어 Trp, Tyr, His, 또는 Glu를 암호화하였다. TrpA13 및 TyrA13 유사체(서열 번호 5)는 초기 특성화를 의해 선택되었다.

[0016]

본 발명자들은, 부위 2 내의 Trp^{A13}(서열 번호 20)이 KP-인슐린의 IR에 대한 결합을 약 2배 손상시켰으며(표 1 및 도 10a) 여기서 결합 친화성에 있어서 Tyr^{A13}(서열 번호 23)의 효과는 무시할 정도임(표 1 및 도 10b, 상단)을 관측하였다. 따라서, 대조군 유사체 Tyr^{A13}-KP-인슐린에 대한 Trp^{A13}-KP-인슐린의 비교는, 부위-2 변형에 의한 생화학적 친화성에 대한 중간 교란이 생체내에서 인슐린 작용의 단축된 기간; 즉, 고려되는 길지만(long-sought) "패스트-오프" 약동학적 특성의 충족되지 않은 목표를 초래할 수 있다는 안내 가설을 제공하였다. 따라서, 본 발명자들은 하기에 상세히 설명한 바와 같이 진성 당뇨병의 랫트 모델에서 이들 및 관련된 인슐린 유사체의 약동학적 특성 및 관련된 효능을 시험하였다. 이들 결과는 도 10 및 11에 나타난 바와 같이 획득되었다. Trp^{A13}-KP-인슐린의 약동학적(PD) 특성의 단점은 4-Cl-Phe^{B24} 과의 동시-변형에 의해 추가로 향상되었다(도 11C; 서열 번호 17). 이들 변형이 수용체-결합 친화성에 있어서 무시가능한 효과를 가진다고 해도(도 10b, 도 10a에서 모 Trp^{A13}-KP-인슐린에 대해서는 하단), 상승적인 증진이 단축의 정도에서 관찰된다. 부위-1-관련 표면과 부위-2-관련 표면의 변형 사이의 이러한 상승은 식사 인슐린 치료요법 및 폐쇄된-루프 시스템의 풍부하고 안정한 작동의 관점으로부터 바람직하다. 작용 기간이 짧을 수록, 폐쇄된 루프 시스템은 보다 신속하게 과-전달 현상을 상충할 수 있다.

[0017]

Trp^{A13} 또는 Tyr^{A13}을 함유하는 KP-인슐린의 유사체는 트립신-촉매된 반-합성에 의해 제조되었다. 필수적인 사상은 유기 공-용매에서 합성 효소로서 트립신을 "역으로(in reverse)" 사용하는 것이다. 당해 프로토콜은 (i) 잔기(N)-GXFYTKPT "KP" 치환(밑줄침)을 나타내는 합성 옥타펩타이드 및 (ii) 트렁케이티된(truncated) 유사체 데스-옥타펩타이드[B23-B30]-인슐린(DOI), Trp^{A13}-DOI, 또는 Tyr^{A13}-DOI를 사용한다. 옥타펩타이드는 야생형 B23-B30 서열(GFFYTPAT)와는 상이하므로, 라이신 ε-아미노 그룹의 보호는 트립신 처리 동안 필요하지 않다. 프로토콜을 확장하여 합성 옥타펩타이드내 함유된 것으로서 B24 위치에서 비천연 아미노산 치환을 지닌 A13 부위의 동시-변형을 가능하도록 하였다. 야생형 DOI는 사람 또는 돼지 인슐린으로부터 제조하였으며; DOI의 A13 유사체는 효모 균주 피키아 파스토리스로부터 발현되고 분비된 것으로서 A13 코돈에서 변형된 53-잔기 미니-프로인슐린(MPI) 전구체의 트립신 분해에 의해 생성되었다. 각각의 경우에 3개의 천연 이황화물 브릿지가 공정 전체에서 유지된다.

[0018]

요약하면, 데스-옥타펩타이드 인슐린(150 mg) 및 옥타펩타이드(150 mg)를 디메틸아세트아미드/1,4-부탄디올/10mM 아세트산칼슘 및 1mM 에틸렌 디아민 테트라-아세트산(EDTA)(35:35:30, v/v, 4ml)을 함유하는 0.2M 트리소 아세테이트(pH 8)의 혼합물 속에 용해하였다. DOI보다 5배 몰 과량의 옥타펩타이드는, 트립신의 역 반응(단백질 분해)은, 트립신(단백질분해)의 역 반응이 기질 포화에 의해 방지되었음을 보증하였다. 최종적인 pH를 0.1ml의 N-메틸모르폴린을 사용하여 7.0로 조절하였다. 당해 용액을 12℃로 냉각시키고, 15mg의 TPCK-트립신을

가하고 2일 동안 12°C에서 항온처리하였다. 추가로 15mg의 트립신을 24시간 후 가하였다. 이후에 반응물을 0.1% 트리플루오로아세트산으로 산성화하고 제조 역상 HPLC(C4)로 정제하였다. 생성물을 질량 분광계(MALDI-TOF-TOF; 제조원: Applied Biosystems, 캘리포니아주 포스터 시티 소재)로 확인하였다. Phe^{B24}, 2-Cl-Phe^{B24}, 4-Cl-Phe^{B24}, 또는 Cha^{B24}(각각 약 600mg의 조 물질)를 함유하는 KP-옥타펩타이드는 업자(CCF Peptide Core Facility)에 의해 제공되었다.

[0019]

DOI 및 DOI 유사체는 인슐린 제조업자로부터 다량으로 이용가능한, 사람 인슐린의 트립신 분해로 생성하였다. DOI 또는 DOI 유사체를 생성시키기 위해, 인슐린(300mg)을 1M 우레아를 함유하는 0.1M 중탄산암모늄(60ml)의 용액에 가하였다. 트립신(30mg)을 우선 1.0ml의 증류된 탈이온수 속에 용해한 후 단백질 용액에 가하고; 절단을 48시간 동안 진행한다. DOI 또는 DOI 유사체를 트립신, 미반응된 인슐린 및 어떠한 다른 오염물질로부터 제조 역상 HPLC에 의해 C4 컬럼을 사용하여 정제하였다. 적어도 150mg의 정제된 DOI의 수율을 전형적으로 수득하였다. 분석적 역상 HPLC(C18)을 사용하여 반-합성의 시간을 경과한 후 폴리펩타이드 시약 및 생성물의 순도를 분석적 HPLC 및 MALDI-TOF MS(하기)에 의해 생성물 <1%의 반-정량적 평가를 위해 평가하였다.

[0020]

KP-인슐린의 Trp^{A13} 및 Tyr^{A13}에 대한 수용체-결합 친화성은 도 10에 나열된 바와 같이 생체내 경쟁적 대체 검정에 의해 측정하였다. 수용체-결합 활성의 검정을 위한 프로토콜은 다음과 같았다. 미세역가 스트립 플레이트(제조원: Nunc Maxisorb)를 4°C에서 밤새 AU5 IgG(인산염-완충된 염수 중 100 µl/well)의 40 mg/ml과 함께 항온처리하였다. 결합 데이터를 2개-부위 연속적 모델로 분석하였다. 데이터는 비특이적 결합에 대해 교정하였다(1M 사람 인슐린의 존재하에서 관련된 막에 잔존하는 방사활성의 양). 모든 검정에서 경쟁적 리간드의 부재하에서 결합된 미량원소의 퍼센트를 15% 미만으로 하여 리간드-고갈 인공물을 피하였다. 해리 상수(K_d)는 문헌[참조: Whittaker and Whittaker(2005. J. Biol. Chem. 280, 20932-20936)]에 기술된 바와 같은 수학적 모델에 피팅함으로써 측정하였으며; 당해 모델은 이중의 경쟁의 추정과 함께 비-선형 회귀에서 사용하였다(참조: Wang, 1995, FEBS Lett. 360, 111-114). 결과는 표 1에 요약한다. Tyr^{A13}은 KP-인슐린의 수용체 결합에 영향을 미치지 않지만, Trp^{A13}은 약 2배까지 결합 친화성의 감소를 초래한다. 중간 변화가 또한 앞서 개재된 연구에 따라 Cha^{B24}, 또는 2-Cl-Phe^{B24}, 또는 4-Cl-Phe^{B24}의 동시-치환으로 관찰되었다.

표 1

인슐린 유사체의 특성

단백질	수용체-결합 친화성	열역학적 안정성 (25 °C)
사람 인슐린 wt	100%	3.3(±0.1) kcal/mole
KP-인슐린	90-100	2.9(±0.1) kcal/mole
Trp ^{A13} -KP-인슐린	50-60	2.6(±0.1) kcal/mole
4-Cl-Phe ^{B24} -Trp ^{A13} -KP-ins.	45-55	2.5(±0.1) kcal/mole
Tyr ^{A13} -KP-인슐린	90-110	2.8(±0.1) kcal/mole
4-Cl-Phe ^{B24} -Tyr ^{A13} -KP-ins.	ND	2.5(±0.1) kcal/mole
Cha ^{B24} -Trp ^{A13} -KP-ins.	ND	2.1(±0.1) kcal/mole

[0021]

[0022]

원편광 이색성(CD) 스펙트럼을 25°C에서 Aviv 분광편광계를 사용하여 도 12에 나타낸 바와 같이 획득하였다(참조: Weiss et al., Biochemistry 39, 15429-15440). CD 패턴은 각각의 경우에 알파-나선의 우세성과 일치하며; 2차 구조의 안정성에 있어서의 작은 교란을 반영할 수 있거나 추가의 또는 변형된 방향족 측쇄로부터 발생하는 중첩된 CD 밴드를 나타낼 수 있는 변이가 관찰된다. 시료는 50mM 인산칼슘(pH 7.4) 속에서 약 60 μM KP-인슐린 또는 유사체를 함유하였으며; 시료는 구아니딘-유도된 변성 연구를 위해 25°C에서 5 μM로 희석시켰다. 대표적인 구아니딘 적정은 도 13에 나타낸다. 폴딩되지 않은 유리 에너지를 추출하기 위하여, 변성 전이를 2-상태 모델에 대한 비-선형 최소-제곱법에 의해 문헌[참조: Sosnick et al., Methods Enzymol. 317, 393-409]에 기술된 바와 같이 피팅하였다. 요약하면, CD 데이터^(x)(여기서, x는 변성체의 농도를 나타낸다)를 다음 식에 따라서 비-선형 최소-제곱법 프로그램으로 피팅하였다:

$$\theta(x) = \frac{\theta_A + \theta_B e^{(-\Delta G_{H_2O}^0 - mx)/RT}}{1 + e^{(-\Delta G_{H_2O}^0 - mx)/RT}}$$

[0023]

[0024]

여기서, x는 구아니딘의 농도이고 여기서 θ_A 및 θ_B 는 천연 및 폴딩되지 않은 상태에서의 기본 값이다. 기본 선은 해독전 및 해독후 선 $\theta_A(x) = \theta_A^{H_2O} + m_A x$ 및 $\theta_B(x) = \theta_B^{H_2O} + m_B x$ 에 의해 대략화되었다. 변이체 폴딩되지 않은 전이를 피팅하는데 있어서 획득된 m 값은 야생형의 폴딩되지 않은 곡선을 피팅하는데 있어서 획득된 m 값 보다 더 낮다. 당해 2-단계 모델의 적용으로부터 획득된 것으로서, 폴딩되지 않은 유리 에너지의 평가는 표 1에 제공한다.

[0025]

동물 모델에서 유사체의 생물학적 활성 및 효능을 평가하기 위하여, 수컷 스프라그-다울리 랫트(평균 체중 ~300 그램)을 스트렙토조토신(STZ)으로 처리하여 당뇨병이 되도록 하였다. 단백질 용액은 KP-인슐린(인슐린 리스프로, Humalog[®]의 활성 성분)을 함유하는 단백질 용액, 야생형 사람 인슐린, 및/또는 본 발명의 이본쇄 또는 일본쇄 인슐린을 함유한다. 대조군은 16mg의 글리신, 1.6mg의 메토-크레졸, 0.65mg의 페놀, 및 3.8mg의 인산 나트륨 pH 7.4으로 구성된 단백질-유리된 릴리 회석제(제조원: Eli Lilly and Co.으로부터 수득함)를 주사함으로써 제공하였다. 인슐린 유사체의 활성은, Humalog[®] (유효한 시판 바이알로부터 취한 시판되는 U-100 강도)의 것과 관련하여 평가하였다. 20 또는 60 마이크로그램의 각각의 이들 제형을 피하 주사하고, 혈당 농도에서의 수득되는 변화를 임상 혈당측정기(Hypoguard Advance Micro-Draw meter)를 사용한 일련의 측정으로 모니터링하였다. 랫트에게 t = 0에 5개 그룹(N = 4내지 6마리)으로 피하 주사하였다. 혈액을 0시간째 및 매 10분마다 360분까지 꼬리의 클립처리된 끝으로부터 수득하였다. 본 발명의 대표적인 2개-쇄 유사체, Trp^{A14}-KP-인슐린이 Humalog[®] 과 유사한 제형의 조건 하에 인슐린의 생물학적 활성의 실질적인 비율 및 Humalog[®] 과 관련하여 단축된 작용 기간을 보유하였다. 대표적인 약력학적 데이터는 도 11에 나타난다. 청구된 발명에 따른 다양한 유사체가 표 2에서 제공된다.

표 2

유사체 서열

GluA13 LysB28 ProB29	A-쇄	GIVEQCCTSICSEYQLENYCN (서열 번호 15)
	B-쇄	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT (서열 번호 16)
GluA13 파라클로로 - PheB24 LysB28 ProB29	A-쇄	GIVEQCCTSICSEYQLENYCN (서열 번호 15)
	B-쇄	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGXFYTKPT , X= 파라클로로페닐알라닌
HisA13 LysB28 ProB29	A-쇄	GIVEQCCTSICSHYQLENYCN (서열 번호 18)
	B-쇄	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT (서열 번호 16)
HisA13 파라클로로 - PheB24 LysB28 ProB29	A-쇄	GIVEQCCTSICSHYQLENYCN (서열 번호 19)
	B-쇄	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGXFYTKPT , X= 파라클로로페닐알라닌 (서열 번호 17)
TrpA13 LysB28 ProB29	A-쇄	GIVEQCCTSICSWYQLENYCN
	B-쇄	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT (서열 번호 16)
TrpA13 파라클로로 - PheB24 LysB28	A-쇄	GIVEQCCTSICSWYQLENYCN (서열 번호 20)
	B-쇄	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGXFYTKPT

[0026]

ProB29	, X= 파라클로로페닐알라닌 (서열 번호 17)
TrpA13 AspB10 오르토폴루오로-	A-쇄 GIVEQCCTSICSWYQLENYCN (서열 번호 20)
PheB24 LysB28 ProB29	B-쇄 FVNQHLCGSDLVEALYLVCGERGXFYTKPT , X= 오르토폴루오로페닐알라닌 (서열 번호 21)
GlnA8 TrpA13 LysB28 ProB29	A-쇄 GIVEQCCQSICSWYQLENYCN (서열 번호 22) B-쇄 FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT (서열 번호 16)
GlnA8 TrpA13 파라클로로-	A-쇄 GIVEQCCQSICSWYQLENYCN (서열 번호 22)
PheB24 LysB28 ProB29	B-쇄 FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGXFYTKPT , X= 파라클로로페닐알라닌 (서열 번호 17)
TyrA13 LysB28 ProB29	A-쇄 GIVEQCCTSICSYQLENYCN (서열 번호 23) B-쇄 FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT (서열 번호 16)
TyrA13 파라클로로-	A-쇄 GIVEQCCTSICSYQLENYCN (서열 번호 23)
PheB24 LysB28 ProB29	B-쇄 FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGXFYTKPT , X= 파라클로로페닐알라닌 (서열 번호 17)
TyrA13 오르토폴루오로-	A-쇄 GIVEQCCTSICSYQLENYCN (서열 번호 23)
PheB24 LysB28 ProB29	B-쇄 FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGXFYTKPT , X= 오르토폴루오로페닐알라닌 (서열 번호 24)
TyrA13 사이클로헥실알라닌	A-쇄 GIVEQCCTSICSYQLENYCN (서열 번호 23)
-B24 LysB28 ProB29	B-쇄 FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGXFYTKPT , X= 사이클로헥실알라닌 (서열 번호 25)
AlaA13 LysB28 ProB29	A-쇄 GIVEQCCTSICSA YQLENYCN (서열 번호 26) B-쇄 FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT (서열 번호 16)
GluB17 LysB28 ProB29	A-쇄 GIVEQCCTSICSLYQLENYCN (서열 번호 2) B-쇄 FVNQHLCGSHLVEALYEVCGERGFFYTKPT (서열 번호 27)

[0027]

PheA13 LysB28 ProB29	A-쇄	GIVEQCCTSICSFYQLENYCN (서열 번호 28)
	B-쇄	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT (서열 번호 16)
PheB17 LysB28 ProB29	A-쇄	GIVEQCCTSICSLYQLENYCN (서열 번호 29)
	B-쇄	FVNQHLCGSHLVEALYFVCGERGFFYTKPT (서열 번호 16)
GlnA8 TrpA13 GlnB13 파라클로로- PheB24 LysB28 ProB29	A-쇄	GIVEQCCQSICSWYQLENYCN (서열 번호 30)
	B-쇄	FVNQHLCGSHLVQALYLVCGERGXFYTKP T, X= 파라클로로페닐알라닌 (서열 번호 31)

[0028]

[0029]

특허청구된 발명의 다양한 유사체에 의한 수용체 결합을 다음과 같이 분석하였다. 사용된 시험관내 활성 검정에 서 사람 인슐린 수용체 동형 B(hIR-B) 및/또는 동형 A(hIR-A) 및/또는 상동성 사람 제1형 인슐린-유사 성장 인자 수용체(hIGFR)의 사용된 에피토프-태그된 단독수용체를 96웰 플레이트 상에 고정시켰다. 상대적 활성은 결합된 ¹²⁵I-TyrA14 사람 인슐린(IR의 경우에) 또는 ¹²⁵I-Tyr31 사람 IGF-I(IGFR의 경우에)의 경쟁적 대체에 의해 측정된 것으로서 특이적인 해리 상수의 비로서 정의한다. 해리 상수(K_d)는 문헌[참조: Whittaker and Whittaker(2005. J. Biol. Chem.280, 20932-20936]에 기술된 바와 같이 수학적 모델에 피팅하여 측정하였고; 당해 모델은 이동 경쟁의 추정을 사용하여 비-선형 회귀를 사용하였다(참조: Wang, 1995, FEBS Lett.360, 111-114). 표 3에 나타난 결과(검정: hIR-A, hIR-B)은 천연의 생체내 효능과 일치한다. 유사분열 IGF 수용체에 대한 교차-결합의 상응하는 연구(검정: hIGFR)는 천연의 인슐린과 유사한 친화성을 입증하였다.

표 3

유사체	시험관내 데이터						
	hIR-A		hIR-B		IGFR		ΔGU
	Kd	오차	Kd	오차	Kd	오차	kcal/mol
GluA13 LysB28 ProB29	0.14	0.02	0.23	0.03	9.03	1.48	ND
GluA13 파라클로로- PheB24 LysB28 ProB29	0.23	0.03	0.31	0.04	27.8	5.30	ND
HisA13 LysB28 ProB29	0.04	0.01	0.07	0.01	2.87	0.45	ND
TrpA13 LysB28 ProB29	ND		0.11	0.02	ND		2.6±0.1
TrpA13 PheB24 LysB28 ProB29	ND		0.07	0.01	ND		2.5±0.1
GlnA8 TrpA13 LysB28 ProB29	0.03	0.01	0.07	0.01	4.64	0.71	ND
GlnA8 TrpA13 파라클로로- PheB24 LysB28 ProB29	ND		0.04	0.01	ND		ND
TryA13 LysB28 ProB29	ND		15.4	2.7	ND		2.8±0.1
TyrA13 파라클로로- PheB24 LysB28 ProB29	ND		0.03	0.01	ND		2.5±0.1
TyrA13 오르토클로로- PheB24 LysB28 ProB29	ND		0.06	0.01	ND		2.1±0.1
TyrA13 사이클로헥실알라닌- B24 LysB28 ProB29	ND		0.22	0.03	ND		ND
AlaA13 LysB28 ProB29	0.05	0.01	0.17	0.03	9.7	1.6	ND
GluB17 LysB28 ProB29	0.06	0.01	0.11	0.02	2.64	0.42	ND
PheA13 LysB28 ProB29	0.05	0.01	0.07	0.01	3.12	0.51	ND
PheB17 LysB28 ProB29	0.07	0.01	0.07	0.01	3.03	0.48	ND

ND: 수행되지 않음

[0030]

[0031]

동물 모델에서 유사체의 생물학적 활성(작용 효능 및 기간)을 평가하기 위하여, 수컷 스프라그-다울리 랫트를 스트렙토조토신(STZ)을 처리하여 당뇨병이 되도록 하였다. 인슐린 유사체의 활성을 Humalog® (유효한 시판 바이알로부터 취한 시판되는 U-100 강도)의 것과 관련하여 평가하였다. 5, 20 또는 60 마이크로그램의 각각의 유사체 제형을 피하 주사하고, 혈당 농도에서의 수득되는 변화를 임상 혈당측정기(Hypoguard Advance Micro-Draw meter)를 사용한 일련의 측정으로 모니터링하였다. 랫트에게 t = 0에 5개 그룹(N = 4내지 6마리)으로 피하 주사하였다. 혈액을 0시간째 및 매 10분마다 360분까지 꼬리의 클립처리된 끝으로부터 수득하여 혈당에 있어서의 강하를 Δ/분 및 Δ/시간으로서 첫번째 시간에 걸쳐 측정하였다. 본 발명의 대표적인 유사체는 Humalog® 과 유사한 제형의 조건 하에서, 인슐린의 생물학적 활성의 실질적인 비율 및 Humalog® 과 관련하여 단축된 작용 기간을 보유함이 밝혀졌다.

표 4

유사체(나타낸 바와 같은 치환, 모든 다른 위치는 야생형 사람 인솔린이다)	작은 동물 활성(랫트)	
	Δ 혈당 (60ug 투여량)	오차
GluA13 LysB28 ProB29	-303.34 Δ /hr	8.86
	-5.16 Δ /min	0.15
GluA13 파라클로로-PheB24 LysB28 ProB29	-310.54 Δ /hr	8.5
	-5.18 Δ /min	0.14
TrpA13 LysB28 ProB29	-256.03* Δ /hr	17.91
	-4.26* Δ /min	0.3

[0032]

TrpA13 파라클로로 -PheB24 LysB28 ProB29	-218.89 Δ/hr	35.61
	-3.65 Δ/min	0.61
GlnA8 TrpA13 LysB28 ProB29	-206.36 Δ/hr	29.8
	-3.44 Δ/min	0.5
GlnA8 TrpA13 파라클로로-PheB24 LysB28 ProB29	-287.96 Δ/hr	24.87
	-4.80 Δ/min	0.41
TryA13 LysB28 ProB29	-300.38 Δ/hr	28.53
	-5.01 Δ/min	0.48
TyrA13 파라클로로 -PheB24 LysB28 ProB29	-239.66 Δ/hr	20.21
	-3.99 Δ/min	0.34
TyrA13 오르토크로로 -PheB24 LysB28 ProB29	-303.75 Δ/hr	23.82
	-5.06 Δ/min	0.4
TyrA13 사이클로헥실알라닌 -B24 LysB28 ProB29	-263.84 Δ/hr	5.92
	-4.40 Δ/min	0.1
AlaA13 LysB28 ProB29	-272.06 Δ/hr	19.53
	-4.93 Δ/min	0.33
GluB17 LysB28 ProB29	-296.83 Δ/hr	14.87
	-4.95 Δ/min	0.25
PheA13 LysB28 ProB29	-300.26 Δ/hr	33
	-5.00 Δ/min	0.55
PheB17 LysB28 ProB29	-259.14 Δ/hr	6.22
	-4.32 Δ/min	0.1

[0033]

[0034]

이의 체장 β 및 α-세포 기능이 IV 옥트레오타이드 아세테이트에 의해 억제된 비-당뇨병성의 마취된 신클레어 돼지(Sinclair pig)를 거대 동물 생체내 효과 및 약력학을 평가하는데 사용하였다. 초기 옥트레오타이드 아세테이트 주입 후 대략 30분째에, 기본선 정상혈당(euglycemia)가 10% 텍스트로즈 주입으로 확립되었다. 정상혈당 상태에서, 0.1 내지 0.2U/kg의 인슐린을 혈관 삽입 포트(vascular access port at)를 통해 정맥내 투여하였다. 말초 인슐린-매개된 글루코즈 흡수를 정량화하기 위해, 혈당을 매 5분마다 측정하는 한편 가변물 글루코즈 주입은 약 85mg/dL의 혈당 수준을 유지하였다. 당해 글루코즈 주입은, 내인성 혈당이 기본선 수준(인슐린 주입 전)으로 되돌아 갈 때까지 유지하였다. 약력학적(PD) 효과는 최대 효과의 1/2(T_{1/2} 초기), 반감기 효과의 1/2에 도달하는 시간(T_{1/2} 말기), 및 최대 효과까지의 시간으로 측정하였다. 이들 분석 각각에 대해, 20-분 이동 평균 곡선 피트를 사용하였다. 본 발명의 대표적인 유사체는 표 5에 나타낸 바와 같이 천연의 인슐린과 비교하여 큰 동물 생물학적 효과를 입증하였다.

표 5

유사체(나타낸 바와 같은 치환, 모든 다른 위치는 야생형 사람 인슐린이다)	큰 동물 활성(돼지)
	0.1-0.2Ukg 투여량
TrpA13 파라클로로 -PheB24 LysB28 ProB29	10.0 min T1/2 조기
	56.0 min T1/2 말기
TyrA13 파라클로로 -PheB24 LysB28 ProB29	12.0 min T1/2 조기
	54.0 min T1/2 말기
TyrA13 사이클로헥실알라닌 -B24 LysB28 ProB29	8.0 min T1/2 조기
	58.0 min T1/2 말기

[0035]

[0036]

진성 당뇨병 환자를 치료하는 방법은 본원에 기술된 바와 같은 일본쇄 인슐린을 투여하는 것을 포함한다. 본 발명의 다른 국면은, 일본쇄 인슐린 유사체를 효모(피키아 파스토리스) 또는 천연의 단편 연결에 의해 전체적인 화학적 합성에 적용시켜 제조할 수 있다는 것이다. 본 발명자들은 또한, 본 발명의 유사체를 진성 당뇨병 또는 대사 증후군의 치료 방법에 제공함을 고찰한다. 인슐린 유사체의 전달 경로는 주사기 또는 펜 장치(pen device)의 사용을 통한 피하 주사에 의한다.

[0037]

본 발명의 일본쇄 인슐린 유사체는 또한 이의 개재내용이 본원에 참조로 포함도 동시-계류중인 미국 특허원 제 13/018,011호에 보다 완전히 기술된 바와 같이, B24, B25, 또는 B26 위치에서 할로겐 원자와 같은 다른 변형을 함유할 수 있다. 본 발명의 인슐린 유사체는 또한 동시 계류중인 미국 가특허원 제61/589,012호에 보다 충분히 기술된 바와 같이 잔기 B1-B3의 결실로 인하여 단축된 B-쇄를 함유할 수 있다.

[0038]

약제학적 조성물은 이러한 인슐린 유사체를 포함할 수 있으며, 이는 임의로 아연을 포함할 수 있다. 아연 이온은 인슐린 유사체 육량체 당 2.2개 아연 원자 내지 인슐린 유사체 육량체당 3개 이하의 아연 원자의 범위의 다양한 아연 이온:단백질 비를 포함할 수 있다. 제형의 pH는 pH 6.8 내지 8.0의 범위이다. 이러한 제형에서, 인슐린 유사체의 농도는 전형적으로 약 0.6 내지 5.0mM일 수 있으며; 5mM 이하의 농도가 바이알 또는 펜 속에서 사용될 수 있고; 보다 더 농축된 제형(U-200 이상)이 현저한 인슐린 내성 환자에서 특히 유리할 수 있다. 부형제는 글리세롤, 글리신, 아르기닌, 트리스, 다른 완충제 및 염, 및 페놀 및 메타-크레졸과 같은 항-미생물 방부제를 포함할 수 있으며; 후자의 방부제는 인슐린 육량체의 안전성을 향상시키는 것으로 공지되어 있다. 일본쇄 인슐린 유사체는 아연 이온의 존재 또는 이들의 부재하에서 제형화될 수 있다. 위에서 기술된 바와 같은 이러한 약제학적 조성물을 사용하여 생리학적 유효량의 조성물을 환자에게 투여함으로써 진성 당뇨병 또는 다른 의학적 상태의 환자를 치료할 수 있다.

[0039]

앞서의 개재내용을 기본으로 하여, 제공된 일본쇄 또는 일본쇄 인슐린 유사체가 상기 설정된 목적을 수행할 것임이 이제 명백할 수 있다. 즉, 이들 인슐린 유사체는 피하 데포트로부터 혈류내로의 가속화된 흡수("페스트 온") 및 시그날의 단축된 기간("페스트 오프") 둘 다를 나타내는 반면 적어도 야생형 인슐린의 생물학적 활성의 분해를 유지할 것이다. 따라서, 어떠한 변화 현상도 특허청구된 발명의 영역내에 있으므로, 특이적인 성분 요소

의 선택이 본원에 개재되고 기술된 본 발명의 취지에 벗어남이 없이 측정될 수 있음이 이해되어야 한다.

[0040] 다음의 문헌은, 본원에 기술된 시험 및 검정 방법이 당해 분야의 통상의 기술자에 의해 이해될 수 있음을 입증한다.

[0041] 참조 문헌:

Glendorf, T., Knudsen, L., Stidsen, C.E., Hansen, B.F., Hegelund, A.C., Sørensen, A.R., Nishimura, E., & Kjeldsen, T. 2012. Systematic evaluation of the metabolic to mitogenic potency ratio for B10-substituted insulin analogues. *PLoS One* 7(2), e29198.

Hohsaka, T., & Sisido, M. 2012. Incorporation of non-natural amino acids into proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 809-15.

Hua, Q.X., Nakagawa, S.H., Jia, W., Huang, K., Phillips, N.B., Hu, S. & Weiss, M.A. (2008) Design of an active ultrastable single-chain insulin analog: synthesis, structure, and therapeutic implications. *J. Biol. Chem.* 283, 14703-14716.

Kristensen, C., Andersen, A.S., Hach, M., Wiberg, F.C., Schiffer, L., & Kjeldsen, T. 1995. A single-chain insulin-like growth factor I/insulin hybrid binds with high affinity to the insulin receptor. *Biochem. J.* 305, 981-6.

Lee, H.C., Kim, S.J., Kim, K.S., Shin, H.C., & Yoon, J.W. 2000. Remission in models of type 1 diabetes by gene therapy using a single-chain insulin analogue. *Nature* 408, 483-8. Retraction in: Lee HC, Kim KS, Shin HC. 2009. *Nature* 458, 600.

Phillips, N.B., Whittaker, J., Ismail-Beigi, F., & Weiss, M.A. (2012) Insulin fibrillation and protein design: topological resistance of single-chain analogues to thermal degradation with application to a pump reservoir. *J. Diabetes Sci. Technol.* 6, 277-288.

Sciacca, L., Cassarino, M.F., Genua, M., Pandini, G., Le Moli, R., Squatrito, S., & Vigneri, R. 2010. Insulin analogues differently activate insulin receptor isoforms and post-receptor signalling. *Diabetologia* 53, 1743-53.

Wang, Z.X. 1995. An exact mathematical expression for describing competitive binding of two different ligands to a protein molecule *FEBS Lett.* 360: 111-114.

[0042] Whittaker, J., and Whittaker, L. 2005. Characterization of the functional insulin binding epitopes of the full-length insulin receptor. *J. Biol. Chem.* 280: 20932-20936.

[0043]

[0044] 서열 번호 1(사람 프로인슐린)

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-Gly-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

[0045]

[0046] 서열 번호 2(사람 A 쇠)
 Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-
 Cys-Asn

[0047]

[0048] 서열 번호 3(사람 B 쇠)

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

[0049]

[0050] 서열 번호 4(변이체 사람 A 쇠)

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Xaa-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-
 Cys-Asn

[0051]

[0052] 여기서 Xaa는 Ala, Thr, Asp, Asn, Glu, Gln, His 또는 Tyr을 나타낸다.

[0053] 서열 번호 5(변이체 사람 A 쇠)

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser- Xaa-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-
 Cys-Asn

[0054]

[0055] 여기서 Xaa는 Ala, Glu, Gln, His, Tyr 또는 Trp를 나타낸다.

[0056] 서열 번호 6(변이체 사람 A 쇠)

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu- Xaa -Asn-Tyr-
 Cys-Asn

[0057]

[0058] 여기서 Xaa는 Ala, Gln, His, Trp, 또는 Tyr을 나타낸다.

[0059] 서열 번호 7(변이체 사람 A 쇠)

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys- Xaa₁- Xaa₂-Tyr-Gln-Leu- Xaa₃-Asn-
 Tyr-Cys-Asn

[0060]

[0061] 여기서 Xaa 부위 중 적어도 하나는 야생형 사람 인슐린과 관련한 치환을 함유하며, 여기서 Xaa₁은 Ala, Thr, Asp, Asn Glu, Gln, His 또는 Tyr을 나타내고; 여기서 Xaa₂는 Ala, Glu, Gln, His, 또는 Trp를 나타내며; 여기서 Xaa₃은 Ala, Gln, His, Trp, 또는 Tyr을 나타낸다.

[0062] 서열 번호 8(변이체 사람 A 쇠)

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Xaa₁-Ser-Ile-Cys-Xaa₂-Xaa₃-Tyr-Gln-Leu-Xaa₄-Asn-
 Tyr-Cys-Asn

[0063]

[0064] 여기서, 부위-2-관련된 부위(A12, A13, 및 A17) 중 적어도 하나는 야생형 사람 인슐린과 관련된 치환을 함유하고, 여기서 Xaa₂는 Ala, Thr, Asp, Asn Glu, Gln, His 또는 Tyr을 나타내며; 여기서 Xaa₃은 Ala, Glu, Gln, His, 또는 Trp를 나타내고; 여기서 Xaa₄는 Ala, Gln, His, Trp, 또는 Tyr을 나타내며; 여기서 Xaa₁은 His, Glu, Gln, Arg, 또는 Lys를 나타낸다.

[0065]

서열 번호 9(변이체 사람 B 쇠)

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Xaa₃-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-
Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Xaa₁-Xaa₂-Thr

[0066]

[0067]

여기서 Xaa₃는 Ala, Asp, His, 또는 Leu를 나타내고; 여기서 Xaa₁은 프롤린, 글리신, 트립토판, 페닐알라닌, 타이로신, 및 시스테인을 제외한 어떠한 아미노산도 나타내며; 여기서 Xaa₂는 Pro, Glu 또는 Lys를 나타낸다.

[0068]

서열 번호 10(변이체 사람 B 쇠)

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Xaa₃-Val-Cys-
Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr- Xaa₁-Xaa₂-Thr

[0069]

[0070]

여기서 Xaa₃는 Glu, Gln, Ala, His, Trp, 또는 Tyr을 나타내고; 여기서 Xaa₁은 프롤린, 글리신, 트립토판, 페닐알라닌, 타이로신, 및 시스테인을 제외한 어떠한 아미노산도 나타내며; 여기서 Xaa₂는 Pro, Glu, 또는 Lys를 나타낸다.

[0071]

서열 번호 11(변이체 사람 B 쇠)

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val- Xaa₁-Ala-Leu-Tyr-Xaa₂-Val-
Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr- Xaa₃-Xaa₄-Thr

[0072]

[0073]

여기서 Xaa₁은 Ala, Asp, His, 또는 Leu를 나타내고; 여기서 Xaa₂는 Gln, Glu, Ala, His, Trp, 또는 Tyr을 나타내며; 여기서 Xaa₃는 프롤린, 글리신, 트립토판, 페닐알라닌, 타이로신, 및 시스테인을 제외한 어떠한 아미노산도 나타내고; 여기서 Xaa₄는 Pro, Glu, 또는 Lys를 나타낸다.

[0074]

서열 번호 12

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-Xaa₁-Leu-Val-Xaa₁-Ala-Leu-Tyr-Xaa₂-Val-

[0075]

Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr- Xaa₆-Xaa₇-Thr-Gly-Z-Arg-Arg-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-
Cys-Cys-Xaa₈-Ser-Ile-Cys-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₉-Gln-Leu-Xaa₅-Asn-Tyr-Cys-Asn

[0076]

[0077]

여기서 부위-2-관련된 부위(B13, B17, A12, A13, 및 A17) 중 적어도 하나는 야생형 사람 인슐린과 관련된 치환을 함유하고, 여기서 Xaa₁은 Glu, Ala, Asp, His, 또는 Leu를 나타내며; 여기서 Xaa₂는 Leu, Glu, Gln, Ala, His, Trp, 또는 Tyr을 나타내고; 여기서 Xaa₃은 Ser, Ala, Thr, Asp, Asn, Glu, Gln, Tyr, 또는 His를 나타내며; 여기서 Xaa₄는 Leu, Ala, Glu, Gln, His, Tyr, 또는 Trp를 나타내고; 여기서 Xaa₅는 Glu, Gln, Ala, His, Trp, Tyr 또는 Leu를 나타내며; 여기서 Xaa₆은 His 또는 Asp를 나타내고; 여기서 Xaa₇은 프롤린, 글리신, 트립토판, 페닐알라닌, 타이로신, 및 시스테인을 제외하고 어떠한 아미노산도 나타내며; 여기서 Xaa₈은 Pro 또는 Lys를 나타내고; Xaa₉는 Glu, Gln, His, Arg, Lys 또는 오르니틴을 나타내며; 여기서 Xaa₉는 Tyr 또는 Glu를 나타내고; 여기서 Z는 3 내지 8개 길이의 폴리펩타이드 분절을 나타낸다.

[0078]

서열 번호 13

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-Xaa₁-Leu-Val-Xaa₁-Ala-Leu-Tyr-Xaa₂-Val-
Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr- Xaa₆- Xaa₇-Thr-Glu-Glu-Z-Arg-Arg-Gly-Ile-Val-
Glu-Gln-Cys-Cys-Xaa₈-Ser-Ile-Cys-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₉-Gln-Leu-Xaa₅-Asn-Tyr-Cys-Asn

[0079]

[0080]

여기서 부위-2-관련된 부위(B13, B17, A12, A13, 및 A17)의 적어도 하나는 야생형 사람 인슐린과 관련된 치환을

함유하고, 여기서 Xaa₁은 Glu, Ala, Asp, His, 또는 Leu를 나타내며; 여기서 Xaa₂는 Leu, Glu, Gln, Ala, His, Trp, 또는 Tyr을 나타내고; 여기서 Xaa₃은 Ser, Ala, Thr, Asp, Asn, Glu, Gln, Tyr, 또는 His을 나타내며; 여기서 Xaa₄는 Leu, Ala, Glu, Gln, His, Tyr, 또는 Trp을 나타내고; 여기서 Xaa₅는 Glu, Gln, Ala, His, Trp, Tyr 또는 Leu를 나타내며; 여기서 Xaa₆는 His 또는 Asp를 나타내고; 여기서 Xaa₇은 프롤린, 글리신, 트립토판, 페닐알라닌, 타이로신, 및 시스테인을 제외한 어떠한 아미노산도 나타내며; 여기서 Xaa₈은 Pro 또는 Lys을 나타내고; Xaa₉은 Glu, Gln, His, Arg, Lys 또는 오르니틴을 나타내며; 여기서 Xaa₉는 Tyr 또는 Glu를 나타내고; 여기서 Z는 2 내지 7 길이의 폴리펩타이드 분절을 나타낸다.

[0081] 서열 번호 14

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-Xaa₁-Leu-Val-Xaa₁-Ala-Leu-Tyr-Xaa₂-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr- Xaa₆- Xaa₇-Thr-Glu--Z-Ser-Arg-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Xaa₃-Ser-Ile-Cys-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₉-Gln-Leu-Xaa₅-Asn-Tyr-Cys-Asn

[0082]
[0083] 여기서 부위-2-관련된 부위(B13, B17, A12, A13, 및 A17) 중 적어도 하나는 야생형 사람 인슐린과 관련된 치환을 함유하고, 여기서 Xaa₁은 Glu, Ala, Asp, His, 또는 Leu를 나타내며; 여기서 Xaa₂는 Leu, Glu, Gln, Ala, 또는 His을 나타내고; 여기서 Xaa₃은 Ser, Ala, Thr, Asp, Asn, Glu, Gln 또는 His을 나타내며; 여기서 Xaa₄는 Leu, Ala, Glu, Gln, His 또는 Trp를 나타내고; 여기서 Xaa₅는 Glu, Gln, Ala, His 또는 Leu를 나타내며; 여기서 Xaa₆는 His 또는 Asp를 나타내고; 여기서 Xaa₇은 프롤린, 글리신, 트립토판, 페닐알라닌, 타이로신, 및 시스테인을 제외한 어떠한 아미노산도 나타내며; 여기서 Xaa₈은 Pro 또는 Lys를 나타내고; Xaa₉은 Glu, Gln, His, Arg, Lys 또는 오르니틴을 나타내며; 여기서 Xaa₉는 Tyr 또는 Glu를 나타내고; 여기서 Z는 3 내지 8 길이의 폴리펩타이드 분절을 나타낸다.

[0084] GIVEQCCTSICSEYQLENYCN (서열 번호 15)

[0085] FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT (서열 번호 16)

[0086] FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGXFYTKPT, X= 파라클로로페닐알라닌(서열 번호 17)

[0087] GIVEQCCTSICSHYQLENYCN (서열 번호 18)

[0088] GIVEQCCTSICSHYQLENYCN (서열 번호 19)

[0089] GIVEQCCTSICSWYQLENYCN (서열 번호 20)

[0090] FVNQHLCGSDLVEALYLVCGERGXFYTKPT, X= 오르토폴루오로페닐알라닌(서열 번호 21)

[0091] GIVEQCCQSICSWYQLENYCN (서열 번호 22)

[0092] GIVEQCCTSICSYQLENYCN (서열 번호 23)

[0093] FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGXFYTKPT, X=

[0094] 오르토폴루오로페닐알라닌(서열 번호 24)

[0095] FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGXFYTKPT, X = 사이클로헥실알(서열 번호 25)

[0096] GIVEQCCTSICSA YQLENYCN (서열 번호 26)

[0097] FVNQHLCGSHLVEALYEVCGERGFFYTKPT (서열 번호 27)

[0098] GIVEQCCTSICSFYQLENYCN (서열 번호 28)

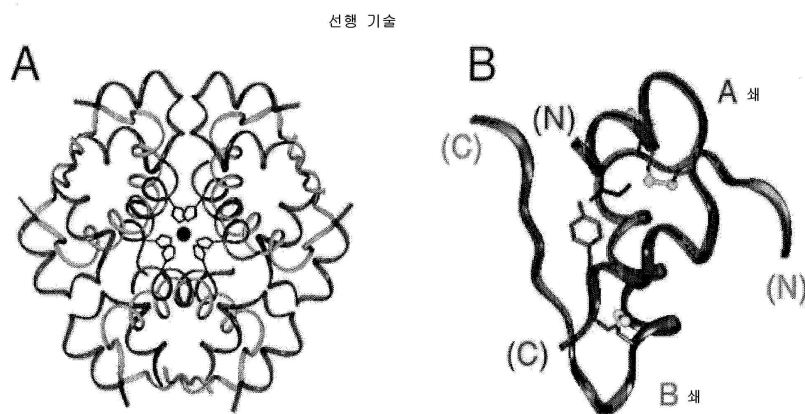
[0099] GIVEQCCTSICSLYQLENYCN (서열 번호 29)

[0100] GIVEQCCQSICSWYQLENYCN (서열 번호 30)

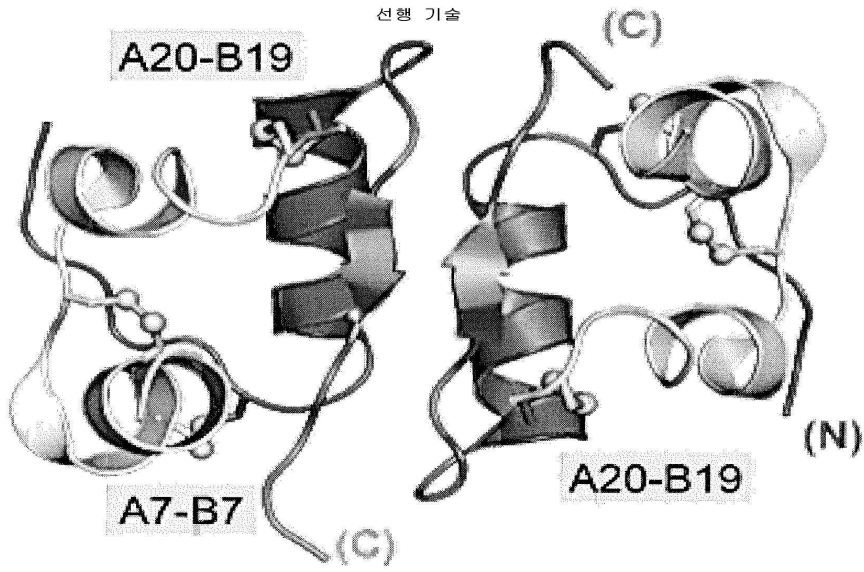
[0101] FVNQHLCGSHLVQALYLVCGERGXFYTKPT, X = 파라클로로페닐알라닌(서열 번호 31)

도면

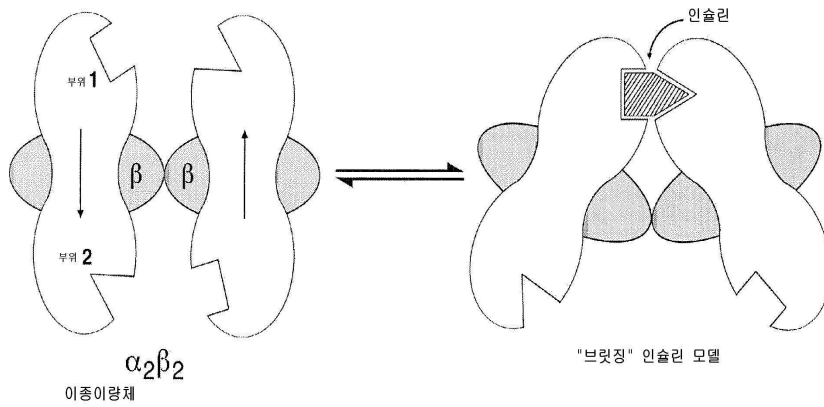
도면1



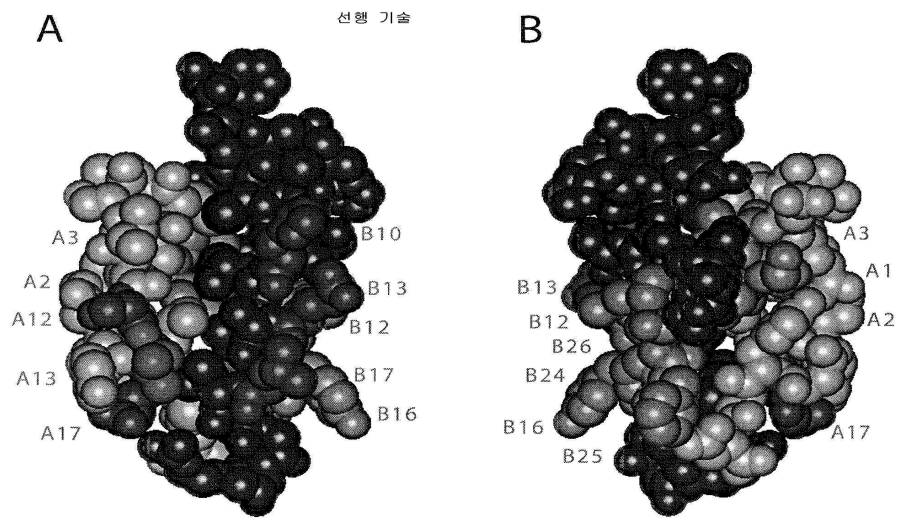
도면2



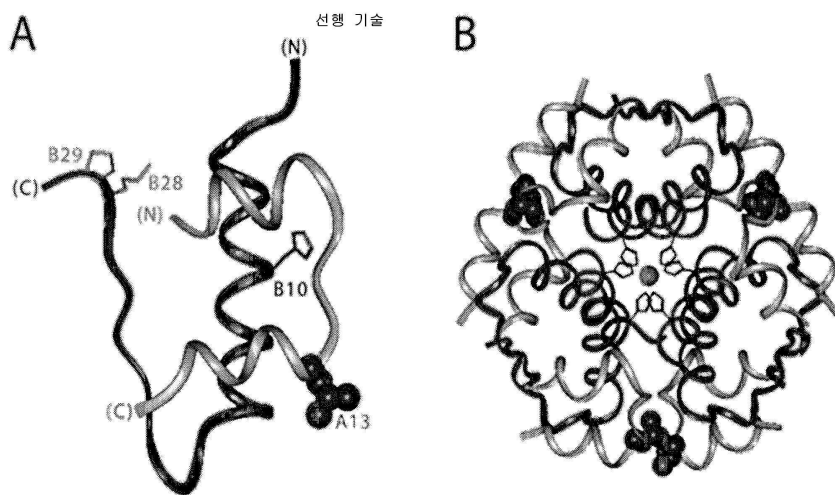
도면3



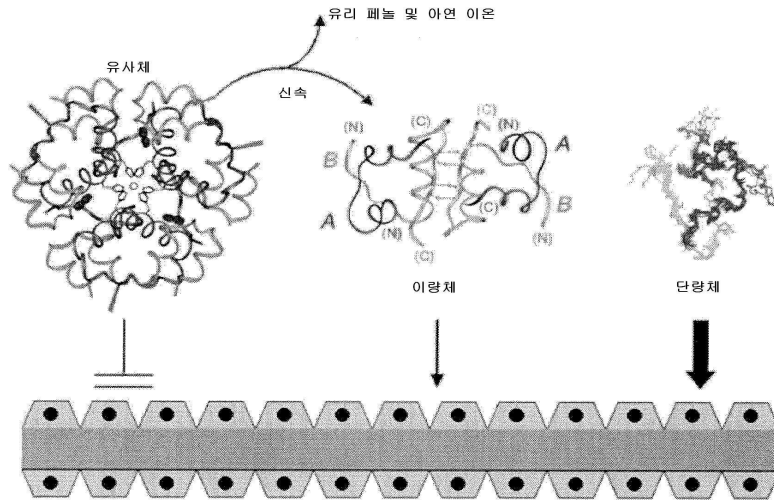
도면4



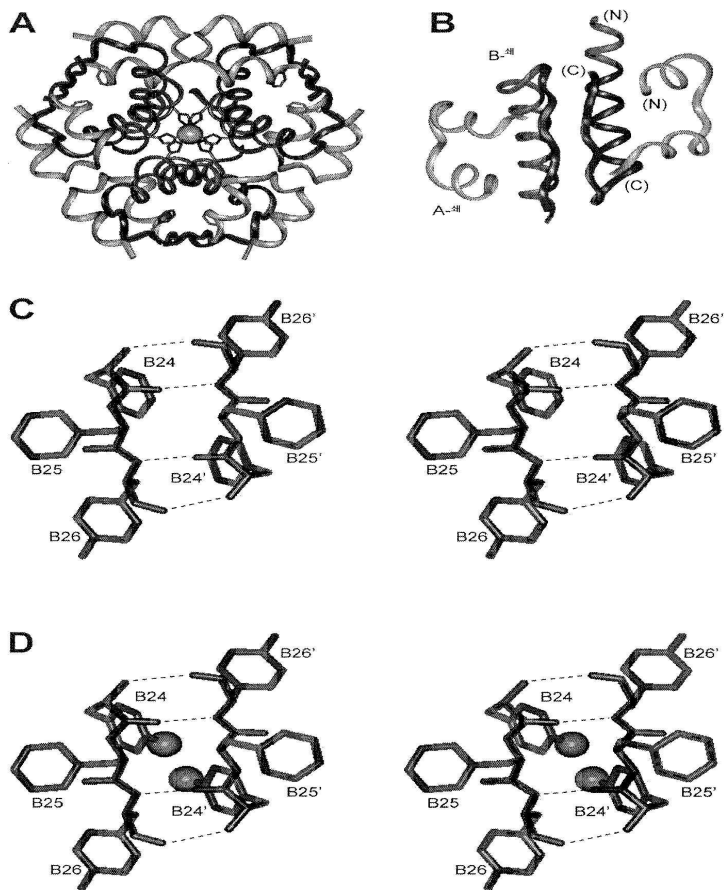
도면5



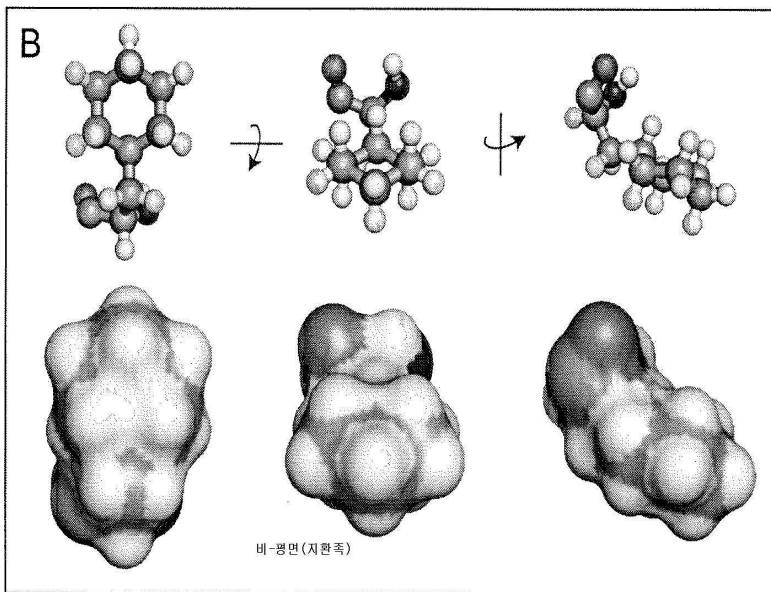
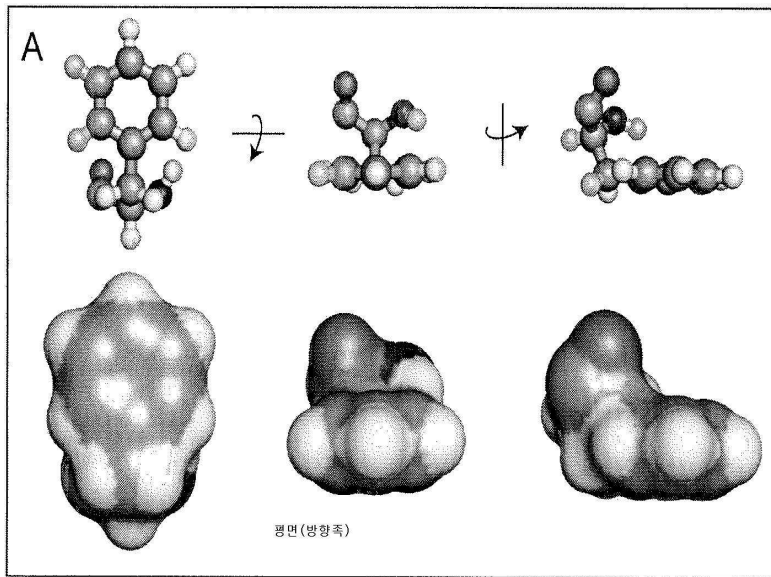
도면6



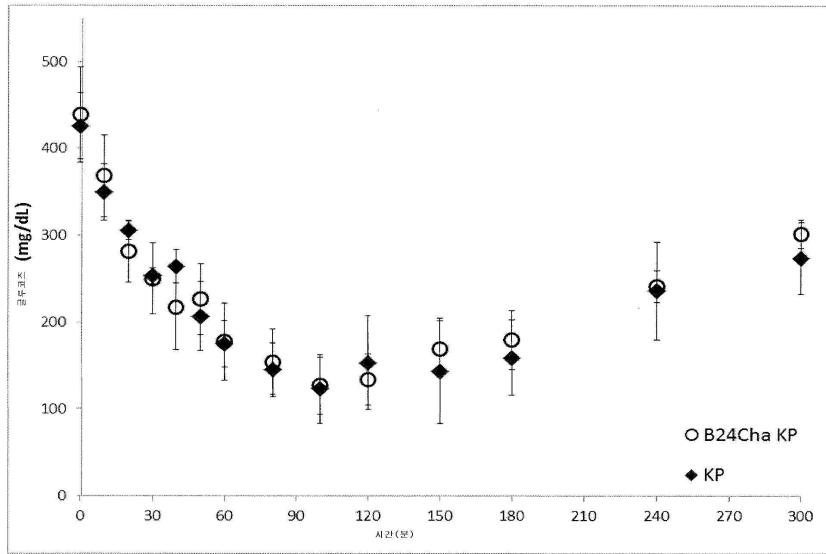
도면7



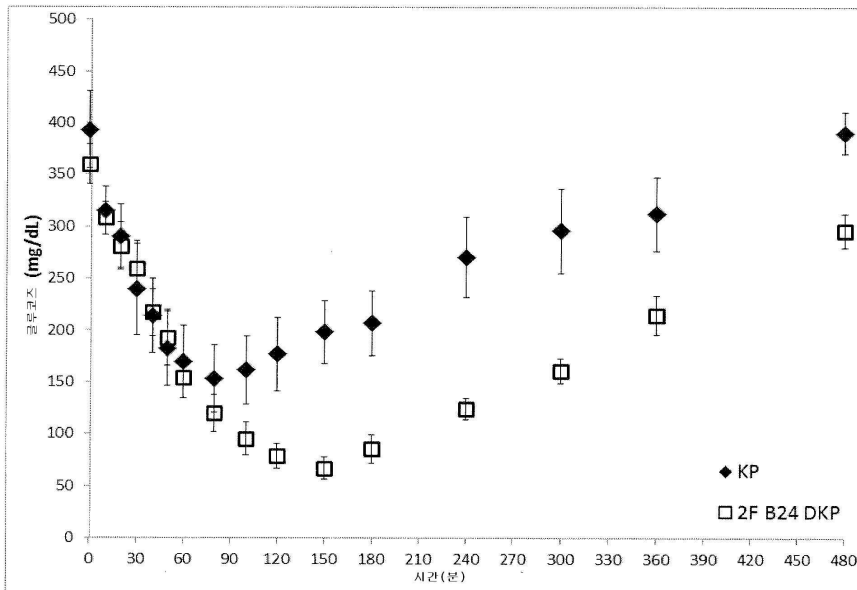
도면8



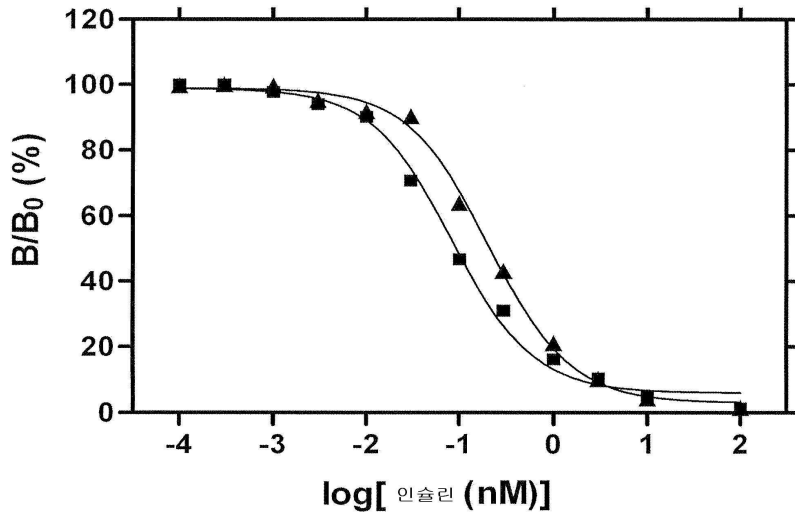
도면9a



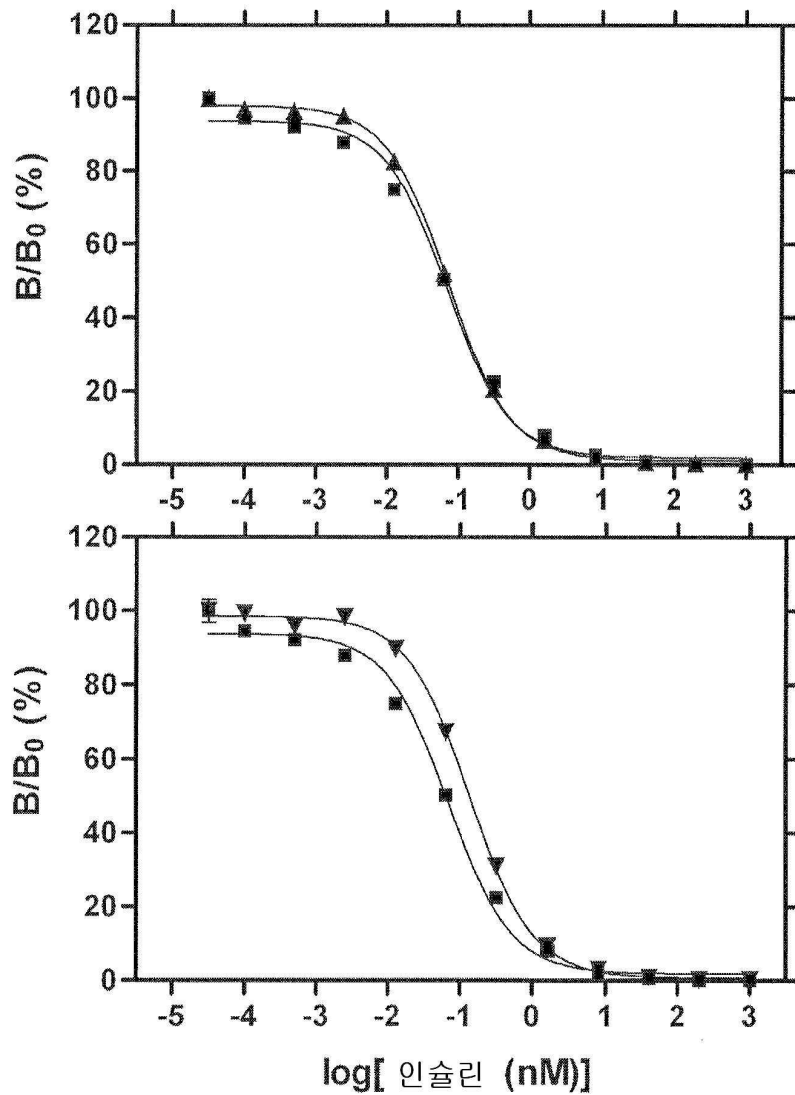
도면9b



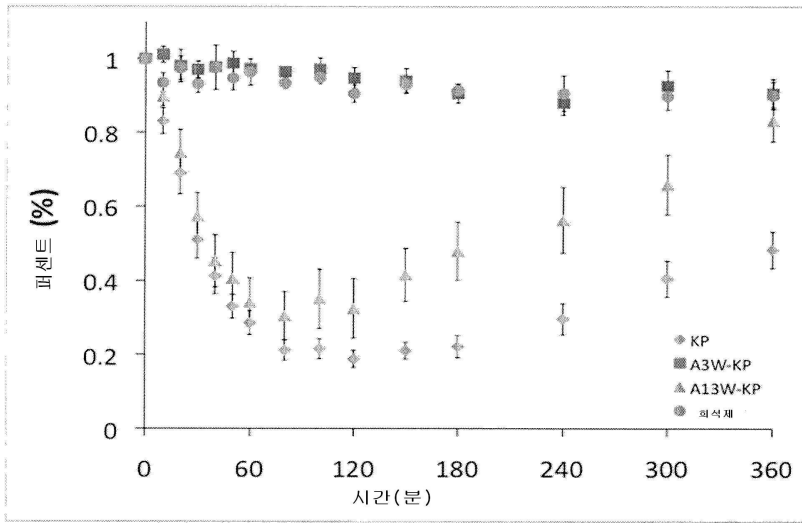
도면10a



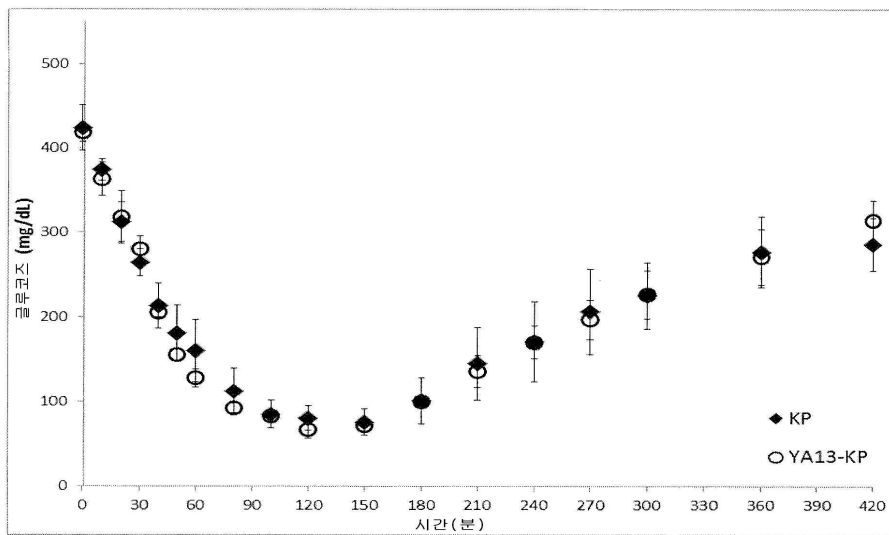
도면10b



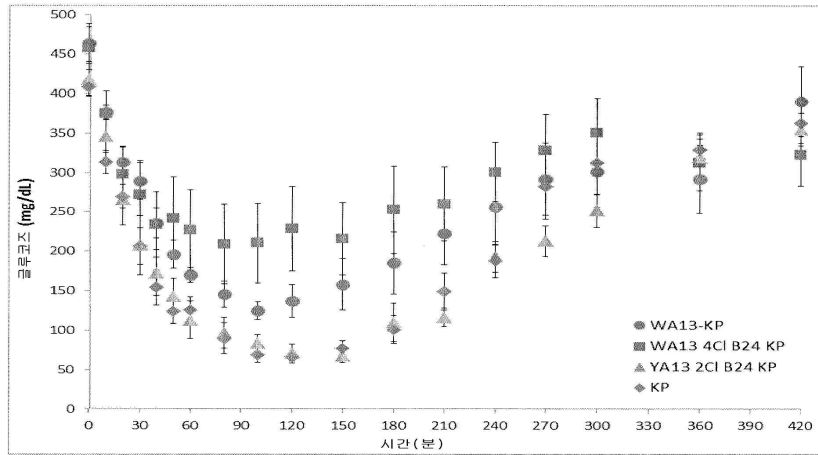
도면11a



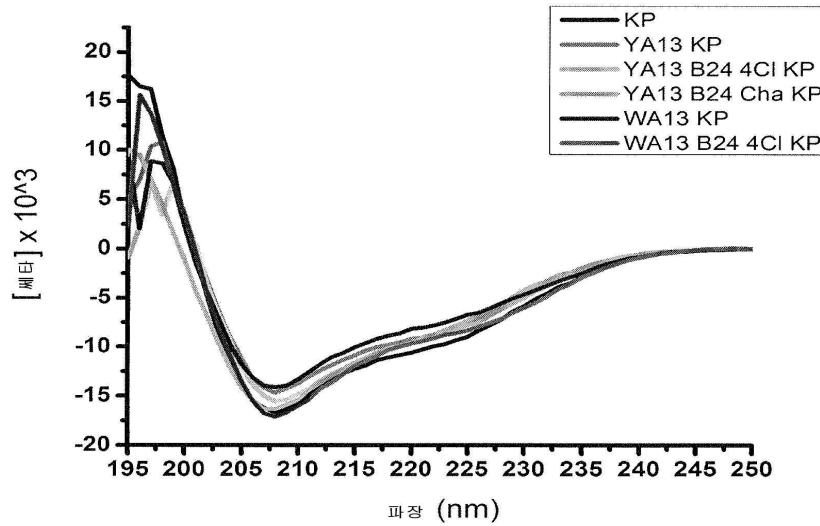
도면11b



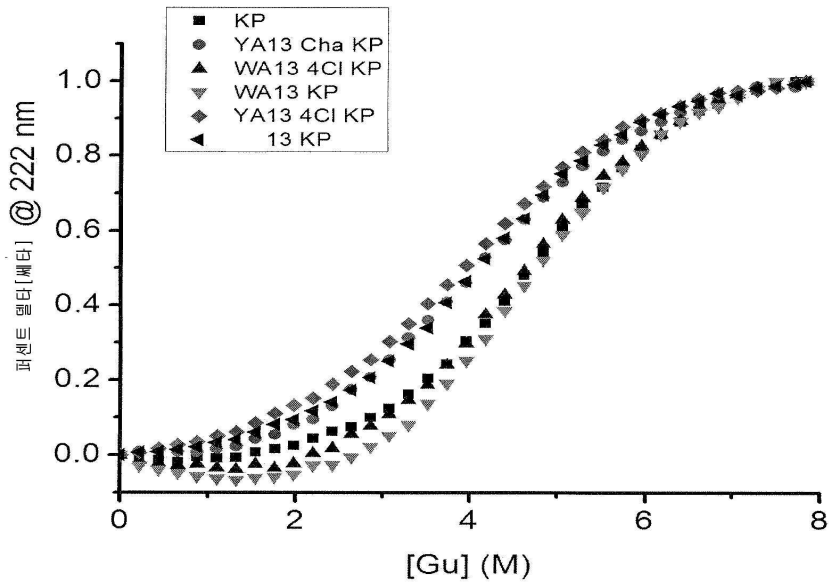
도면11c



도면12



도면13



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY

<120> SITE 2 INSULIN ANALOGUES

<130> 200512.00236

<140> PCT/US14/30387

<141> 2014-03-17

<150> 61/798,165

<151> 2013-03-15

<160> 31

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 86

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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 Tyr Cys Asn
 85

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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> 3

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
 20 25 30

<210> 4

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Xaa indicates Ala, Thr, Asp, Asn, Glu, Gln, His or Tyr.

<400> 4

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn

20

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa indicates Ala, Glu, Gln, His, or Trp.

<400> 5

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn

20

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> Xaa indicates Ala, Gln, His, Trp, or Tyr.

<400> 6

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

1 5 10 15

Xaa Asn Tyr Cys Asn

20

<210> 7

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

Xaa Asn Tyr Cys Asn

20

<210> 9

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa indicates Ala, Asp, His, or Leu.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> Xaa indicates any amino acid excluding Glycine, Tryptophan,
Phenylalanine, Tyrosine, and Cysteine.

<220><221

> MISC_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> Xaa indicates Pro, Glu or Lys.

<400> 9

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

1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Xaa Xaa Thr

20 25 30

<210> 10

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> Xaa indicates Glu, Gln, Ala, His, Trp, or Tyr.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> Xaa indicates any amino acid excluding Glycine, Tryptophan,
Phenylalanine, Tyrosine, and Cysteine.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (29)..(29)
 <223> Xaa indictes Pro, Glu, or Lys.
 <400> 10
 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15
 Xaa Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Xaa Xaa Thr
 20 25 30
 <210> 11
 <211> 30
 <212
 > PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa indicates Ala, Asp, His, or Leu.
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa indicates Gln, Glu, Ala, His, Trp, or Tyr.
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa indicates any amino acid excluding Glycine, Tryptophan,
 Phenylalanine, Tyrosine, and Cysteine.
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa indictes Pro, Glu, or Lys.
 <400> 11
 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Xaa Ala Leu Tyr
 1 5 10 15
 Xaa Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Xaa Xaa Thr
 20 25 30
 <210> 12
 <211> 62
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa indicates His or Asp.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa indicates Glu, Ala, Asp, His, or Leu.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> Xaa indicates Leu, Glu, Gln, Ala, His, Trp, or Tyr.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> Xaa indicates any amino acid excluding Glycine, Tryptophan,
Phenylalanine, Tyrosine, and Cysteine.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> Xaa indicetes Pro or Lys.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (32)..(39)

<223> Xaa indicates a polypeptide segment of length 3-8.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (49)..(49)

<223> Xaa indicetes Glu, Gln, His, Arg, Lys or Ornithine.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (53)..(53)

<223> Xaa indicates Ser, Ala, Thr, Asp, Asn, Glu, Gln, Tyr or His.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (54)..(54)

<223> Xaa indicates Leu, Ala, Glu, Gln, His, Tyr or Trp.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (55)..(55)

<223> Xaa indicates Tyr or Glu.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (58)..(58)

<223> Xaa indicates Glu, Gln, Ala, His, Trp, Tyr or Leu.

<400> 12

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

Xaa Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Xaa Xaa Thr Gly Xaa
 20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys
 35 40 45

Xaa Ser Ile Cys Xaa Xaa Xaa Gln Leu Xaa Asn Tyr Cys Asn
 50 55 60

<210> 13

<211> 62

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa indicates His or Asp.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa indictes Glu, Ala, Asp, His or Leu.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> Xaa indicates Leu, Glu, Gln, Ala, His, Trp or Tyr.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> Xaa indicates any amino acid excluding Glycine, Tryptophan,
 Phenylalanine, Tyrosine, and Cysteine.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> Xaa indictes Pro or Lys.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (33)..(39)

<223> Xaa indicates a polypeptide segment of length 2-7.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (49)..(49)

<223> Xaa indicetes Glu, Gln, His, Arg, Lys or Ornithine.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (53)..(53)

<223> Xaa indicates Ser, Ala, Thr, Asp, Asn, Glu, Gln, Tyr or His.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (54)..(54)

<223> Xaa indicates Leu, Ala, Glu, Gln, His, Tyr or Trp.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (55)..(55)

<223> Xaa indicates Tyr or Glu.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (58)..(58)

<223> Xaa indicates Glu, Gln, Ala, His, Trp, Tyr or Leu.

<400> 13

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

1 5 10 15

Xaa Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Xaa Xaa Thr Glu Glu

 20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys

 35 40 45

Xaa Ser Ile Cys Xaa Xaa Xaa Gln Leu Xaa Asn Tyr Cys Asn

 50 55 60

<210> 14

<211> 62

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa indicates His or Asp.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)
 <223> Xaa indicates Glu, Ala, Asp, His, or Leu.
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa indicates Leu, Glu, Gln, Ala, His, Trp or Tyr.
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa indicates any amino acid excluding Glycine, Tryptophan,
 Phenylalanine, Tyrosine, and Cysteine.
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa indicetes Pro or Lys.
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (32)..(39)
 <223> Xaa indicates a polypeptide segment of length 3-8.

 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (49)..(49)
 <223> Xaa indicetes Glu, Gln, His, Arg, Lys or Ornithine.
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (53)..(53)
 <223> Xaa indicates Ser, Ala, Thr, Asp, Asn, Glu, Gln, Tyr or His.
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (54)..(54)
 <223> Xaa indicates Leu, Ala, Glu, Gln, His, Tyr or Trp.
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (55)..(55)
 <223> Xaa indicates Tyr or Glu.
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (58)..(58)
 <223> Xaa indicates Glu, Gln, Ala, His, Trp, Tyr or Leu.

 <400> 14
 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser Xaa Leu Val Xaa Ala Leu Tyr
 1 5 10 15

Xaa Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Xaa Xaa Thr Glu Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys
 35 40 45
 Xaa Ser Ile Cys Xaa Xaa Xaa Gln Leu Xaa Asn Tyr Cys Asn
 50 55 60

<210> 15

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Glu Tyr Gln Leu
 1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn
 20

<210> 16

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

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

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

<210> 17

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> X = parachlorophenylalanine

<400> 17

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 Xaa Phe Tyr Thr Lys Pro Thr

 20 25 30

<210> 18

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn

 20

<210> 19

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn

 20

<210> 20

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn

 20

<210> 21

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)
 <223> X = orthofluorophenylalanine
 <400> 21
 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser Asp Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Xaa Phe Tyr Thr Lys Pro Thr
 20 25 30
 <210> 22
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400>
 > 22
 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Gln Ser Ile Cys Ser Trp Tyr Gln Leu
 1 5 10 15
 Glu Asn Tyr Cys Asn
 20
 <210> 23
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 23
 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Tyr Tyr Gln Leu
 1 5 10 15
 Glu Asn Tyr Cys Asn
 20
 <210> 24
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)

<223> X = orthochlorophenylalanine
 <400> 24
 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 Xaa Phe Tyr Thr Lys Pro Thr
 20 25 30
 <210> 25
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)
 <223> X = cyclohexylalanine
 <400> 25
 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 Xaa Phe Tyr Thr Lys Pro Thr
 20 25 30
 <210> 26
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 26
 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Ala Tyr Gln Leu
 1 5 10 15
 Glu Asn Tyr Cys Asn
 20
 <210> 27
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 27
 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr

1 5 10 15
 Glu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Lys Pro Thr

 20 25 30

<210> 28

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn

 20

<210> 29

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

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> 30

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn

 20

<210> 31

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> X = parachlorophenylalanine

<400> 31

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

1 5 10 15

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

 20 25 30