

(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷

C07K 14/62

(11) 공개번호 특2001-0041238

(43) 공개일자 2001년05월15일

| | | | |
|---------------|---|-------------|---------------|
| (21) 출원번호 | 10-2000-7009330 | | |
| (22) 출원일자 | 2000년08월23일 | | |
| 번역문제출일자 | 2000년08월23일 | | |
| (86) 국제출원번호 | PCT/US1999/03915 | (87) 국제공개번호 | WO 1999/42482 |
| (86) 국제출원출원일자 | 1999년02월23일 | (87) 국제공개일자 | 1999년08월26일 |
| (81) 지정국 | AP ARIP0특허 : 가나 감비아 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 우간다 짐바브웨 EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐스탄 울도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 사이프러스 독일 덴마크 스페인 핀란드 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투칼 스웨덴 OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디브와르 카메룬 가봉 기네 기네비쓰 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고 국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트리아 오스트레일리아 아제르바이잔 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스 캐나다 스위스 중국 쿠바 체코 독일 덴마크 에스토니아 스페인 핀란드 영국 그루지야 가나 감비아 크로아티아 인도네시아 이스라엘 아이슬란드 일본 캐나 키르기즈 북한 대한민국 카자흐스탄 세인트루시아 스리랑카 라이베리아 레소토 리투아니아 룩셈부르크 라트비아 울도바 마다가스카르 마케도니아 몽고 말라위 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 폴란드 포르투칼 루마니아 러시아 수단 스웨덴 싱가포르 슬로베니아 슬로바키아 시에라리온 타지키스탄 투르크메니스탄 터키 트리니다드토바고 우크라이나 우간다 미국 우즈베키스탄 베트남 유고슬라비아 짐바브웨 | | |

| | |
|------------|---|
| (30) 우선권주장 | 09/028,156 1998년02월23일 미국(US) |
| (71) 출원인 | 뉴로크린 바이오사이언시즈 인코퍼레이티드 미합중국 캘리포니아 92121 산 디에고 사이언스 센터 드라이브 10555 |
| (72) 발명자 | 가우르아미타브 미국캘리포니아주92129샌디에고피크루스스트리트12570 링니콜라스 미국캘리포니아주92122샌디에고블로크스트리트5324 콘론플제이 미국캘리포니아주92075솔라나비치산타도민가450 |
| (74) 대리인 | 이병호 |

심사청구 : 없음**(54) 인슐린의 펩티드 동족체를 사용하는 당뇨병의 치료 방법****요약**

본 발명은 일반적으로 천연 (B) 쇄 서열의 잔기 (9 내지 23)를 포함하는 펩티드로부터 유래된 인슐린 (B) 쇄의 펩티드 동족체에 관한 것이다. 이 동족체는 천연 서열로부터 위치(12, 13, 15) 및/또는 (16)에서 변경되고, 위치(19) 및/또는 다른 위치에서 추가로 변경될 수 있다. 이를 펩티드 동족체를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 이 펩티드 동족체는 당뇨병의 치료 및 진행 억제에 유용하다.

대표도**도1****색인어**

당뇨병, 인슐린, 펩티드 동족체

명세서

기술분야

본 발명은 일반적으로 인슐린의 펩티드 동족체에 관한 것이며, 보다 상세하게는 사람 인슐린 B 쇄의 잔기 9 내지 23으로부터 유래된 펩티드 동족체를 사용하는 당뇨병의 치료 방법에 관한 것이다.

배경기술

인슐린 의존형 진성 당뇨병(IDDM: Insulin Dependent Diabetes Mellitus)은 미국에서 거의 백만 명의 상이한 연령군의 사람들이 겪고 있는 장기 특이적인 자기면역 질병이다. 이 질병은 췌장의 랑게르ハン스 섬에서 베타 세포를 생성하는 인슐린의 과도한 파괴 및 진성 당뇨병에 이르는 글루코즈 대사의 조절결여를 특징으로 한다. IDDM의 정의된 특징은 랑게르ハン스 섬의 림프구 침윤이다. 이러한 침윤 세포들 중에서, T 세포는 자기면역 파괴의 주요 매개체중의 하나로 보인다.

제1형 당뇨병은 인슐린, GAD65, GAD67 및 ICA512를 포함하는 랑게르ハン스 섬 관련 각종 항원에 대한 항체 수준의 증가를 특징으로 한다. 이들 항체는 진성 당뇨병 이전에 많이 검출될 수 있고, 이러한 항원에 대한 면역반응은 민감한 유전자 (HLA) 하플로타입(haplotype)을 갖는 환자들에서 임박한 당뇨병에 대한 징후로서 사용될 수 있다.

일반적으로, 환자들은 정상 혈당을 유지하기 위해 인슐린 주사에 의존하고 있다. 인슐린은 21개의 아미노산 잔기로 이루어진 A와 30개의 잔기로 이루어진 B 쇄 및 2개의 디설파이드-결합 쇄로 구성된 폴리펩티드 호르몬이다. 인슐린의 투여는 당뇨병으로 고통받는 환자들에게 상당한 편익을 제공하지만, 인슐린의 짧은 혈청 반수명으로 인해 적절한 투약량을 유지하기가 곤란하다. 인슐린의 사용은 각종 저혈당성 부작용 및 중화 항체의 발생을 초래할 수도 있다.

당뇨병의 기존 치료법과 관련한 문제점에서 볼 때, 보다 효과적이고 상기와 같은 단점을 수반하지 않는 개선된 치료법이 절실히 필요하다. 본 발명은 당뇨병을 효과적으로 치료하기 위해 인슐린에 대한 T 세포 반응을 길항시키는 펩티드 동족체를 사용하여, 그밖의 관련된 이점을 추가로 제공한다.

발명의 요약

본 발명은 당뇨병을 치료 및 예방하기 위한 화합물 및 방법을 제공한다. 특정 양태에 있어서, 본 발명은, 1 내지 4개의 아미노산 위치에서의 치환으로 인해 천연 사람 인슐린 B 쇄 잔기 9 내지 23과는 서열이 상이한 사람 인슐린 B 쇄(서열 2)의 잔기 9 내지 23을 포함하는 펩티드 동족체를 제공한다. 이러한 치환은 다른 잔기들에서 추가적 치환의 존재 또는 부재하에 잔기 12, 13, 15 및 16으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 잔기에서 이루어질 수 있다. 특정 바람직한 구체예에서, 이러한 치환은 인슐린 B 쇄의 잔기 9 내지 23 내의 2개 또는 3개의 아미노산 잔기에서 발생할 수 있다. 치환은 잔기 19에서 발생할 수도 있다. 치환은 바람직하게는 비보존성이 있고, 잔기 12, 13, 15, 16 및/또는 19가 변경된 (예를 들면 알라닌으로 변경) 동족체가 바람직하다. 인슐린 B 쇄의 잔기 24를 추가로 포함하는 동족체 역시 바람직하다. 특정한 구체예에서, 펩티드 동족체는 사람 인슐린 B 쇄의 18개 이하의 잔기, 16개 이하의 잔기 또는 15개 이하의 잔기를 포함한다.

또 다른 구체예에서, 펩티드 동족체는 사람 인슐린 B 쇄(서열 2)의 잔기 9 내지 23 또는 9 내지 24를 필수적으로 포함하는 것으로서, 1 내지 4개의 아미노산 위치에서의 치환으로 인해 천연 사람 인슐린 B 쇄 잔기 9 내지 23과는 서열이 상이하고, 하나 이상의 치환이 잔기 12, 13, 15 및 16으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 잔기에서 발생한다.

추가적 양태로, 상기 펩티드 동족체를 생리학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와 함께 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

본 발명은 치료학적 유효량의 상기 약제학적 조성물을 환자에게 투여함을 특징으로 하는, 당뇨병의 치료 및/또는 진행 억제 방법을 추가로 제공한다.

본 발명의 이들 양태 및 기타 양태는 다음 상세한 설명 및 첨부된 도면을 참조함에 따라 명백해질 것이다. 또한, 특정 공정 또는 조성물을 보다 상세히 기술한 여러 참조 문헌을 아래 기술한다. 이들 참조 문헌은 각각 인용을 위해 기술되었지만, 전문이 참조로서 본 명세서에 인용된다.

도면의 간단한 설명

도 1은 사람 인슐린 B 쇄(서열 2)의 잔기 9 내지 23의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 2는 상이한 잔기들이 알라닌으로 치환된 다양한 양의 대표적인 펩티드 동족체의 존재하에 천연 인슐린 B 쇄(9 내지 23) 펩티드에 대한 NOD 마우스 T 세포 클론의 증식 반응(cpm으로 측정됨)을 나타내는 그래프이다.

도 3은 위치 16 및 19의 아미노산이 알라닌으로 치환된 대표적인 펩티드 동족체(NBI-6024; 사각형으로 나타냄)의 다양한 양의 존재하에 천연 인슐린 B 쇄(9 내지 23) 펩티드에 대한 NOD 마우스 T 세포 클론의 증식 반응(cpm으로 측정됨)을 나타내는 그래프이다. 비교를 위해, 미엘린 기본 단백질로부터 유래된 관련 없는 대조용 펩티드(NBI-5096; 원으로 나타냄)의 존재하에 증식 반응 역시 나타낸다. 그 반응은 삼중 배양의 평균 CPM \pm SEM으로서 나타낸다.

도 4 내지 6은 천연 B 쇄(9 내지 23) 펩티드 또는 대표적인 펩티드 동족체에 대한 상이한 당뇨병 환자들의 T 세포주의 증식 반응(cpm으로 측정됨)을 도시하는 도표이다. 말초 혈액 단핵 세포들을 당뇨병 환자들로부터 단리하여 인슐린 B 쇄(9 내지 23) 펩티드의 존재하에 배양한다. 인슐린 B 쇄(9 내지 23)로 3회 재자극한 후, 1×10^5 T-세포 및 7×10^4 조사된 자가조직 PBMC를 완전 배지 중의 환자 96-웰 플레이트의 각각의 웰에 가한다. 세포들을 NBI-6024(위치 16 및 19에서 알라닌으로 치환된 인슐린 B 쇄 9 내지 23), 인슐린 B 쇄(9 내지

23)와 함께 또는 배지 단독에서 5일 동안 배양한다. 4일 째, 세포들을 ^3H -티미딘으로 펄스표지화하고 추가로 18시간 동안 재배양한다. 이어서, 배양액을 수거하고, 액체 신틸레이션을 사용하여 계수하고, 그 데이터를 이중 시료 평균값의 표준 오차(sem)의 분당 평균 계수(cpm)로서 나타낸다.

도 7은 천연 B 쇄(9 내지 23) 펩티드 또는 지시된 바와 같이 알라닌 치환체를 갖는 대표적인 펩티드 동족체에 대한 당뇨병 환자의 T 세포주의 증식 반응(cpm으로 측정됨)을 도시하는 도표이다. 말초 혈액 단핵 세포들을 당뇨병 환자들로부터 단리하여 인슐린 B 쇄(9 내지 23) 펩티드의 존재하에 배양한다. 인슐린 B 쇄(9 내지 23)로 3회 재자극한 후, 1×10^5 T-세포 및 7×10^4 조사된 자가조직 PBMC를 완전 배지 중의 환자 96-웰 플레이트의 각각의 웰에 가한다. 세포들을 지시된 바와 같이 인슐린 B 쇄(9 내지 23) 동족체와 함께 또는 배지(BKG) 단독에서 5일 동안 배양한다. 4일 째, 세포들을 ^3H -티미딘으로 펄스표지화하고 추가로 18시간 동안 재배양한다. 이어서, 배양액을 수거하고, 액체 신틸레이션을 사용하여 계수하고, 그 데이터를 이중 시료 평균값의 표준 오차(sem)의 분당 평균 계수(cpm)로서 나타낸다.

도 8은 대표적인 펩티드 동족체로 9주 동안 처리한 후 당뇨병을 갖는 암컷 NOD 마우스의 백분율을 나타내는 그래프이다. 10마리의 마우스 각각에 잔기 12(빈 삼각형), 13(사각형) 또는 16(진한 삼각형)에 알라닌 치환체를 갖는 B 쇄(9 내지 23)의 펩티드 동족체를 24일 째부터 피하 투여하기 시작한다. 대조용 펩티드인 뉴로텐신(원)으로 처리한 모든 마우스는 당뇨병에 걸렸다.

도 9는 도 8에서와 동일한 데이터를 나타내지만, 대조용 펩티드(뉴로텐신)-치료군과 A13 동족체-치료군 만을 대조시킨 그래프이다.

도 10은 대표적인 펩티드 동족체로 13주 동안 처리한 후, 당뇨병을 갖는 NOD 마우스의 백분율을 나타내는 그래프이다. 10마리의 마우스에 뉴로텐신(사각형), B 쇄(9 내지 23)(다이아몬드) 또는 잔기 13에 알라닌 치환체를 갖는 B 쇄(9 내지 23)의 펩티드 동족체(삼각형) $400\mu\text{g}$ 을 24일 째에 피하 투여하기 시작한다.

도 11은 NOD 마우스에서 당뇨병의 발병률에 대한 대표적인 펩티드 동족체의 효과를 나타내는 그래프이다. 4주령의 암컷 NOD 마우스(n=9)에 12주 동안 일주 간격으로, 이어서 35주령에 달할 때까지 격주로 NBI-6024(A^{16, 19}) 20mg/kg 을 피하 투여한다. 대조군(n=10)은 미치료 동물로 구성된다. 2회 연속 시점에서 200mg/dL 이상의 혈당을 갖는 마우스들은 당뇨병을 갖는 것으로 간주된다. 그 데이터는 35주에 걸친 연구로 비당뇨병의 백분율로서 표현된다. 로그-랭크 시험을 사용하여 2개 처리군의 결과가 현저하게 상이한지 여부를 평가한다. NBI-6024(A^{16, 19})로 처리한 후 당뇨병을 갖는 NOD 마우스의 백분율은 여러 시점에서 사각형으로 나타내고, 대조군에서 당뇨병을 갖는 마우스의 백분율은 원으로 나타낸다.

도 12는 NOD 마우스에서 당뇨병의 발병률에 대한 대표적인 펩티드 동족체의 효과를 나타내는 그래프이다. 4주령의 암컷 NOD 마우스(n=13 내지 15)에 12주 동안 일주 간격으로, 이어서 35주령에 달할 때까지 격주로 NBI-6024(A^{16, 19}) 또는 NBI-6201(대조용 펩티드, 뉴로텐신) 20mg/kg 을 피하 투여한다. 추가 대조군(n=8)은 미치료 동물로 구성된다. 2회 연속 시점에서 200mg/dL 이상의 혈당을 갖는 마우스들은 당뇨병을 갖는 것으로 간주된다. 그 데이터는 35주에 걸친 연구로 비당뇨병의 백분율로서 표현된다. 로그-랭크 시험을 사용하여 2개 처리군의 결과가 현저하게 상이한지 여부를 평가한다. NBI-6024(A^{16, 19})로 처리한 후, 당뇨병을 갖는 NOD 마우스의 백분율은 여러 시점에서 사각형으로 나타내고, 뉴로텐신 펩티드로 처리한 후 당뇨병을 갖는 마우스의 백분율은 삼각형으로 나타내고, 당뇨병을 갖는 미치료 마우스의 백분율은 원으로 나타낸다.

도 13A 내지 13D는 잔기 12(도 13A), 잔기 13(도 13B), 잔기 15(도 13C) 또는 잔기 16(도 13D)에 알라닌 치환체를 갖는 B 쇄 잔기 9 내지 23을 함유하는 대표적인 펩티드 동족체의 면역원성을 도시하는 그래프이다. NOD 마우스들에게 지시된 바와 같이 펩티드 동족체 또는 천연 인슐린 B 쇄(9 내지 23) 펩티드의 다양한 농도에 대한 림프절 세포의 증식 반응을 평가하기 전에 용해된 형태의 펩티드 동족체를 2 내지 4회 피하 주사한다. 배양 기간의 완료 후에 액체 신틸레이션 계수기에서 계수하여 세포들(삼중 배양 웰의 분당 평균 계수(CPM)로서 플로팅함)에 훈입된 방사성 티미딘의 양을 측정하는 방법으로 증식 반응을 평가한다.

도 14A 내지 14F는 NOD 마우스들에서 6가지 상이한 펩티드 동족체들의 면역원성을 도시하는 그래프이다. 2가지 알라닌 치환체(지시된 바와 같이 A12, 13; A12, 15; A12, 16; A13, 15; A13, 16 및 A15, 16)를 갖는 펩티드 동족체를 NOD 마우스들에게 주사하고, 10일 후에 이들의 림프절 세포들을 상이한 농도의 면역화 펩티드를 자극 제로서 사용하는 증식 평가에 사용한다. 배양 기간의 완료 후에 액체 신틸레이션 계수기에서 계수하여 세포들(삼중 배양 웰의 분당 평균 계수(CPM)로서 플로팅함)에 훈입된 방사성 티미딘의 양을 측정하는 방법으로 증식 반응을 평가한다.

도 15A 내지 15D는 인슐린 B 쇄(9 내지 23)의 대표적인 이중 치환된 펩티드 동족체의 면역원성을 도시하는 그래프이다. 다음 펩티드들: 즉, A12, 13(도 15A); A13, 19(도 15B); A15, 19(도 15C); A16, 19(도 15D)는 NOD 마우스들에서 면역 반응을 유도하는 이들의 능력에 대해 시험된다. 배출되는 림프절 세포들의 분당 계수로서 나타낸 증식 반응은 면역화 동족체 및 천연 인슐린 B 쇄(9 내지 23) 펩티드에 대한 반응으로 도시된다.

도 16은 NOD 마우스들에게 T 세포 증식 반응을 일으키는 일련의 삼중 치환된 펩티드의 능력을 나타내는 그래프이다. 다음과 같은 조합의 치환체를 갖는 대표적인 펩티드 동족체로 각각 마우스를 면역화시킨다: A 12, 13, 19; A 12, 15, 19; A12, 16, 19; A13, 15, 19; A13, 16, 19; 또는 A15, 16, 19. 이어서 림프절 세포를 증식 분석에 사용하고, 상이한 농도에서의 면역화 펩티드 각각에 대한 반응을 도시한다.

도 17A 및 17B는 NOD 마우스들에서 면역 반응을 일으키는 이중 치환된 펩티드(A^{16, 19})의 능력을 나타내는 그래프이다. 5마리의 암컷 NOD 마우스들에게 1일, 6일 및 12일 째에 가용성 NBI-6024 20mg/kg 을 피하주사하여 면역화시킨다. 15일 째에, 마우스들을 희생시키고, 서혜부 림프절 세포를 제거하고, 다양한 농도(0 내지 $50\mu\text{M}$)의 NBI-6024(도 17A) 또는 인슐린 B 쇄(9 내지 23) 펩티드(도 17B)의 존재하에 배양한다. T-세포 증식의 한도는 ^3H -티미딘 훈입을 사용하여 측정한다. 그 반응은 삼중 배양액의 평균 CPM \pm SEM으로서 나타낸다.

도 18은 보조제의 존재 또는 부재하에 A^{16, 19} (NBI-6024) 펩티드에 의해 유도된 면역 세포들에 의해 생성된 사

이토킨들의 비교를 나타내는 도표이다. NOD 마우스 군들을 NBI-6024 단독으로 면역화시키거나 또는 CFA로 유화시킨다. 지시된 바와 같이 사이토킨 IL-2 및 IL-4를 NBI-6024 25 μ M에서 측정하고, 백그라운드를 공제한 후 pg/mL로서 나타낸다.

발명의 상세한 설명

본 발명을 기술하기 전에, 이의 이해를 돋기 위해 본 명세서에 사용된 특정 용어의 정의를 제공하는 것이 유익할 것이다.

"인슐린 B 쇄"는 인슐린을 구성하는 2개의 디설파이드-결합된 폴리펩티드 중의 하나인 30개의 아미노산 폴리펩티드를 의미한다. 사람 인슐린 B 쇄의 서열은 서열목록 서열 1에 제공되고, 사람 B 쇄의 잔기 9 내지 23의 서열은 도 1 및 서열목록 서열 2에 제공된다.

인슐린 B 쇄의 "펩티드 동족체"는 그 동족체와 천연 B 쇄 간의 아미노산 서열에서 하나 이상의 상이점을 갖는 사람 인슐린 B 쇄의 잔기 9 내지 23(서열 2)으로부터 유래된 15개 이상의 아미노산 잔기를 포함한다. 펩티드 동족체에서, 아미노산 서열에서 하나 이상의 차이는 잔기 12, 13, 15 및/또는 16에 존재한다. 또한, 잔기 19는 치환될 수 있고, 다른 변경도 가능하다. 바람직하게는, 펩티드 동족체는 다수의 치환(예, 5 또는 6)이 가능하더라도, 천연 인슐린 B 쇄(9 내지 23) 서열과 비교하여 잔기 9 내지 23내에 1 내지 4개의 치환체를 포함한다. 인슐린 B 쇄로부터 유래된 추가 잔기는 천연 B 쇄 전부의 30개 이하의 잔기, 바람직하게는 총 25개 이하의 잔기, 보다 바람직하게는 펩티드 동족체의 총 16개 또는 18개 이하의 잔기를 포함할 수 있다. 바람직한 실시예에서, 인슐린 B 쇄의 잔기 24는 펩티드 동족체에 포함되기도 한다. 인슐린 B 쇄로부터 유래되지 않은 서열은 펩티드 동족체의 아미노 및/또는 카르복시 말단에 존재할 수 있지만, 반드시 그럴 필요는 없다. 이러한 서열(들)은 예를 들면 펩티드 동족체의 합성, 정제 또는 용해를 촉진하는데 사용될 수 있다.

달리 지적하지 않는 한, 지명된 아미노산은 L-형태를 의미한다. 천연 펩티드 서열에서 L-아미노산 잔기는 단백질에서 공통적으로 발견된 20개의 L-아미노산중의 임의의 하나, 상용하는 D-아미노산 중의 임의의 하나, 희규 아미노산, 예를 들면 4-히드록시프롤린 또는 히드록시리신, 또는 비단백질 아미노산, 예를 들면 β -알라닌 또는 호모세린으로 변경될 수 있다. 본 발명의 범위에는 메틸화(예: α -메틸발린); 에틸아민, 에탄올아민 또는 에틸렌 디아민 등의 알킬아민에 의한 C-말단 아미노산의 아미드화; 및/또는 아미노산 측쇄 작용기의 아실화 또는 메틸화(예: 리신의 ϵ -아미노 그룹의 아실화) 등의 화학적 수단에 의해 변경된 아미노산을 포함하는 동족체들이 포함된다.

"잔기 12", "잔기 13", "잔기 15", "잔기 16" 및 "잔기 19"(각각 위치 12, 위치 13, 위치 15, 위치 16 및 위치 19로 칭하기도 함)는 도 1에 나타난 바와 같이 인슐린 B 쇄의 아미노산 12, 13, 15, 16 및 19를 의미한다. 보다 상세하게는, 이를 잔기에 대해 번호를 매긴 시스템은, 펩티드 동족체의 길이 또는 동족체내의 아미노산 위치와는 무관하게 천연 사람 단백질내의 아미노산 위치에 관한 것이다. 잔기 12, 13, 15 또는 16에서 알라닌 치환체를 갖는 펩티드 동족체들은 각각 A12, A13, A15 또는 A16 동족체로 지칭된다.

인슐린 B 쇄의 펩티드 동족체

상기한 바와 같이, 본 발명은 사람 인슐린 B 쇄의 잔기 9 내지 23을 적어도 포함하고, 천연적으로 존재하는 위치 12의 L-발린, 위치 13의 L-글루타메이트, 위치 15의 L-류신 및/또는 위치 16의 L-티로신이 다른 아미노산으로 변경된 펩티드 동족체를 제공한다. 일 구체예에서, 펩티드 동족체들은 인슐린 B 쇄의 위치 12, 13, 15, 16 및/또는 19에서 1 내지 3개의 L-아미노산의 추가 변경을 포함한다. 바람직하게는, 펩티드 동족체들은 2개 또는 3개의 변경을 포함하는데, 치환된 잔기들중의 하나는 위치 19에 존재한다.

인슐린 B 쇄로부터 유래된 펩티드 동족체의 부분은 전형적으로 15 내지 30개 잔기의 길이, 바람직하게는 15 내지 18개 잔기의 길이, 보다 바람직하게는 15 내지 16개 잔기의 길이이다. 특히 바람직한 펩티드 동족체들은 인슐린 B 쇄로부터 유래된 15개의 아미노산을 포함한다.

상기한 바와 같이, 상기 위치에서 임의의 아미노산 변경(들)을 포함하는 펩티드 동족체들은 본 발명의 범위에 속한다. 바람직한 펩티드 동족체들은 비보존성 치환체(즉, 전하, 극성, 소수성 및/또는 부피에 있어 차이를 갖는 아미노산으로의 변경)를 포함한다. 특히 바람직한 동족체는 하나 이상의 잔기의 알라닌으로의 변경을 포함한다.

펩티드 동족체는 자동 합성을 포함하는 표준 화학 기술에 의해 합성될 수 있다. 일반적으로, 펩티드 동족체들은, C-말단 아미드를 갖는 펩티드를 생성하기 위해 디시클로헥실카르보디이미드로 활성화시킴으로써 각각의 보호된 아미노산 잔기를 수지 지지체, 바람직하게는 4-메틸-벤즈히드릴아민 수지에 결합시킴을 포함하는 고체상 펩티드 합성 방법에 의해 제조될 수 있다. 대안으로, 클로로메틸 잔기(메리필드(Merrifield) 수지)를 사용하여 C-말단에 유리 카르복실산을 갖는 펩티드를 생성할 수 있다. 측쇄 작용성 그룹들은 다음과 같이, 즉, 세린 및 트레오닌의 경우 벤질로; 글루탐산 및 아스파르트산의 경우 시클로헥실로; 히스티딘 및 아르기닌의 경우 토실로; 리신의 경우 2-클로로벤질옥시카르보닐로; 및 티로신의 경우 2-브로모벤질옥시카르보닐로 보호될 수 있다. 결합 후, 부가된 아미노산의 α -아미노 작용기에 대한 t-부틸옥시카르보닐 보호 그룹은 트리플루오로아세트산으로 처리하고, 이어서 디-이소프로필에틸아민으로 중화시킴으로써 제거될 수 있다. 이어서, 다음으로 보호된 잔기를 유리 아미노기 상에 결합시키고 펩티드 쇄를 연장시킨다. 최종 잔기가 결합된 후, 보호된 펩티드-수지를 불화수소로 처리하여 이 수지로부터 펩티드를 잘라내고, 측쇄 작용성 그룹들을 탈보호시킨다. 조생성물을 익히 공지된 공정을 사용하여 겔 여과, HPLC, 분배 크로마토그래피 또는 이온-교환 크로마토그래피에 의해 추가로 정제할 수 있다.

본 발명의 펩티드 동족체들은 (a) 천연 인슐린 B 쇄(9 내지 23) 펩티드(서열 2)에 대해 특이적인 NOD 마우스 T 세포 클론을 자극하지 않아야 하거나, 또는 천연 펩티드에 의해 자극된 수준 보다 낮은 수준으로 이러한 클론을 자극해야 하고; (b) 인슐린 B 쇄(9 내지 23)에 특이적인 환자들로부터의 사람 T 세포를 자극하지 않아야 하고; (c) NOD 마우스에서 면역원성이어야 하고; (d) NOD 마우스에서 당뇨병의 발병을 감소시켜야 하고, (e) 천연 인슐린 B 쇄(9 내지 23) 펩티드(서열 2)에 특이적인 T 세포 클론의 반응을 억제할 수 있다. 따라서, 후보 펩티드 동족체들은, T 세포 증식, NOD 마우스에서의 면역원성 및 NOD 마우스에서 질병 발병에 대한 효과를 측정하는 분석을 통해 이들의 당뇨병 치료능에 대해 스크리닝될 수 있다. 후보 펩티드 동족체를 평가하는

데 사용되는 특정 대표적인 평가분석법은 이후 보다 상세히 고찰한다. 상기 기준을 만족시키는 동족체들은 유용한 치료제이다.

특정 펩티드 동족체들은 먼저 (클로날 세포주로부터 또는 환자로부터 단리된) 천연 인슐린 B 쇄(9 내지 23) 펩티드(서열 2)에 특이적인 T 세포를 자극하는 능력에 대해 시험받을 수 있다. 이러한 시험은 환자들로부터 단리된 천연 B 쇄(9 내지 23) 반응성 T 세포주 또는 T 세포들이 표적 세포로서 사용되는 직접적인 증식 평가분석을 사용하여 수행될 수 있다. T 세포주들은 일반적으로 익히 공지된 기술 의해 B 쇄(9 내지 23)가 주입된 래트들로부터 취한 림프절로부터 확립될 수 있다. 림프절 세포들을 단리시켜 B 쇄(9 내지 23) 및 IL-2와 함께 5 내지 8일 동안 배양시킬 수 있다. 생존 세포들을 회수하고, 성장 인자의 공급원으로서 조사된 비세포 및 B 쇄(9 내지 23)를 사용하여 두번째 자극을 수행할 수 있다. 이러한 방식으로 5 내지 6회 계대배양한 후, 각각의 세포주의 증식 잠재력을 측정한다. 증식 평가분석을 수행하기 위해, B 쇄(9 내지 23) 반응성 T 세포주를 다양한 농도의 펩티드 동족체 및 조사된 자가조직 비세포와 함께 3일 동안 배양시킬 수 있다. 3일 후, $0.5\text{--}1.0 \mu\text{Ci}$ 의 ^{3}H -티미딘을 12 내지 16시간 동안 가한다. 이어서, 배양액을 수거하고, 흡입된 계수를 측정한다. 평균 CPM 및 평균값의 표준 오차를 삼중 배양으로부터 계산한다. 필적하는 농도의 B 쇄(9 내지 23)에 의한 평균 반응의 3회 미만의 표준 편차인 결과를 나타내는 펩티드 동족체는 비자극성인 것으로 간주된다. 20 내지 $50 \mu\text{M}$ 이하의 농도에서 증식을 자극하지 않는 펩티드 동족체는 추가 스크리닝에 적절하다.

B 쇄(9 내지 23) 특이적 T 세포를 자극하지 않고, 바람직하게는 시험관내에서 상기 T 세포의 반응을 억제하는 후보 펩티드들이 NOD 마우스에서 이들의 면역원성에 대해 추가로 시험된다. 간단히 말하자면, NOD 마우스 군들을, 10 내지 15일의 기간 내에 만니톨 아세테이트 완충액 중의 후보 펩티드 100 내지 $400 \mu\text{g}$ 을 피하 주사하여 면역화시킬 수 있다. 최종 면역화 후, 림프절 세포들 및/또는 비장 세포들을, 상이한 농도의 면역화 펩티드를 3 내지 4일 동안 세포들과 함께 배양하는 증식 평가분석에 사용할 수 있고, 여기서 최종 18시간의 배양을 삼중수소화된 티미딘과 함께 수행할 수 있다. 이어서 세포들을 수거하고 신틸레이션 계수기로 계수하고, 증식 반응을 CPM \pm SEM으로 나타낼 수 있다. $25 \mu\text{M}$ 의 펩티드에서 백그라운드(항원 없음)보다 2배 이상 높은 증식을 유도하는 후보 펩티드들이 면역원성인 것으로 고려된다. 대안으로, 완전 프로인트 보조액에서 NOD 마우스를 면역화한 후 증식성 반응을 유도하는 경우 후보 펩티드 동족체는 면역원성인 것으로 고려된다. 유출되는 림프절 세포 또는 비장 세포들은, 면역화 동족체의 존재하에 배양될 때, $25 \mu\text{M}$ 의 펩티드에서 백그라운드(항원 없음)보다 2배 이상 높은 증식을 유도해야 한다.

B 쇄(9 내지 23)로 증식을 억제할 수 있는 후보 펩티드들은 NOD 마우스에서 당뇨병의 발병을 감소시키는 능력에 대해 추가로 시험된다. 간단히 말하자면, 펩티드는 가용성 형태로 또는 예를 들면 불완전 프로인트 보조액(IFA)로 유화되어 NOD 마우스에게 투여될 수 있다. 통상적으로, 약 $400 \mu\text{g}$ 의 펩티드를 일주마다 투여하는 것으로 충분하다. 미처리된 또는 대조군 마우스에서 뿐만 아니라 처리된 마우스에서 당뇨병의 발병은 혈당 수준을 주마다 모니터링함으로써 평가된다. 2회 연속 경우에 200mg/dl 이상의 혈당 값이 일반적으로 당뇨병의 징후를 나타내는 것으로 고려된다. 펩티드 동족체들은 약 25주 이하의 모니터링 기간 내에 당뇨병이 걸린 NOD 마우스의 백분율에서 통계학적으로 유의적인 감소를 초래해야 한다.

상기한 바와 같이, 펩티드 동족체들은 시험관내에서 B 쇄(9 내지 23) 특이적 사람 T 세포의 반응을 억제할 수도 있다. 이러한 억제는, 후보 펩티드 동족체들을 천연 B 쇄(9 내지 23) (서열 2)에 의해 유도된 T 세포 증식을 억제하는 능력에 대해 시험하는 경쟁 평가분석에 의해 측정될 수 있다. 이러한 분석에서, 항원-제공세포들이 먼저 조사되고, 이어서 경쟁적인 펩티드 동족체 및 천연 B 쇄(9 내지 23) 펩티드를 함께 항온처리한다. 이어서, T 세포들을 배양액에 가한다. 각종 농도의 후보 펩티드 동족체들을 총 4일 동안 항온처리될 수 있는 배양액에 포함시킨다. 항온처리 기간 후, 각각의 배양액을, 예를 들면 추가로 12 내지 18시간 동안 $1 \mu\text{Ci}$ 의 ^{3}H -티미딘으로 펄스 표지화한다. 이어서, 배양액을 유리섬유 필터 상에서 수거하고 상기한 바와 같이 계수한다. 평균 CPM 및 평균값의 표준 오차가 삼중 배양에서 측정된 데이터로부터 계산될 수 있다. 20 내지 $50 \mu\text{M}$ 농도에서 25% 이상 증식을 감소시키는 펩티드 동족체들이 바람직하다.

당뇨병의 치료 및 예방

상기한 바와 같이, 본 발명은 치료학적 유효량의 본 명세서에 기술된 바와 같은 인슐린 B 쇄의 펩티드 동족체를 환자에게 투여함으로써 제1형 당뇨병을 치료 및 예방하는 방법을 제공한다. 이러한 치료에 적절한 당뇨병 환자들은 임상학적으로 명확한 당뇨병의 진단을 정립하기 위해 당업계에서 허용되는 기준에 의해 식별될 수 있다. 이러한 기준에는 정맥내 글루코즈 내성 시험(IVGTT) 후의 낮은(대조군의 제10 또는 제1 백분위수 미만) 제1상 인슐린 분비, 또는 인슐린, GAD65 및/또는 ICA512 등의 항개르한스 썸 항원에 대한 고역가 항체의 영속 등이 포함되지만 이들에 제한되지 않는다.

예방 치료에 유리할 수 있는 임상학적으로 명확한 당뇨병을 갖지 않는 환자들은 일반적으로 당업계에 허용되는 임의의 예측 기준에 의해 식별될 수 있다. 진성 당뇨병을 갖지 않는 환자들은 하기 기준을 기초로하여 도래하는 수년(1 내지 5년) 내에 당뇨병이 발현될 것으로 예측될 수 있다: i) 가족력 - 1촌 친척들은 이들이 보호 HLA 대립유전자 형질을 갖지 않는 한 자동으로 고위험군에 속함; ii) 유전자 구조 - 즉, 고위험률의 당뇨병과 연관된 HLA 대립유전자 형질(예: DR3/4: DQ8)의 존재 또는 부재; iii) 항원[인슐린, GAD65 및/또는 ICA512] 전부 또는 일부에 대한 혈액중 고역가의 자기항체의 존재 또는 부재; 및 iv) 정맥내 글루코즈 내성 시험(IVGTT): 통상의 대조군의 제10 또는 제1 백분위수 이하로서 정의되고, 전형적으로 1 내지 5년 내에 제1형 당뇨병의 발병에 선행하는 낮은 제1상 인슐린 분비. 일반적으로, 여러 가지 상기 기준이 고려될 수 있다. 예를 들면, 당뇨병을 갖는 개개인의 1촌 친척에 대해 5년 내에 당뇨병이 발병될 가능은 상기 3개의 자기항체 모두를 갖는 친척의 경우 100%; 2개의 항체를 갖는 친척의 경우 44%; 하나의 항체를 갖는 친척의 경우 15%; 및 어떠한 항체도 갖지 않는 친척의 경우 0.5%인 것으로 추정된다. 당뇨병의 발병에 이어 제1형 당뇨병의 환자들의 50명의 1촌 친척들 중에서, 49/50명이 상기 자기항체중 하나 이상을 나타냈다.

당뇨병의 효과적인 치료법은 여러 가지 상이한 방식으로 결정될 수 있다. 하기 기준중 어느하나 또는 당업계에 허용되는 다른 기준을 만족시키는 것이 효과적인 치료법에 틀림없다. 그 기준에는 진성 저혈당증의 발병의 지연, 저혈당증 발병 빈도의 저하 및/또는 환자들의 혈액 중의 C-펩티드의 정상 수준의 연장이 포함될 수 있지만, 이들로만 제한되지 않는다.

본 발명의 펩티드 동족체는 단독으로, 또는 약제학적 조성물로서 투여될 수 있다. 간단히 말하자면, 본 발명의 약제학적 조성물은 본 명세서에 기술된 하나 이상의 펩티드 동족체를 하나 이상의 약제학적 또는 생리학적으로 허용되는 담체, 희석액 또는 부형제와 함께 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 완충액(예: 중성 완충 염수, 인산염 완충 염수), 탄수화물(예: 글루코즈, 만노즈, 수크로즈 또는 텍스트란), 만니톨, 단백질, 폴리펩티드 또는 아미노산(예: 글리신), 산화방지제, 퀼레이트화제(예: EDTA 또는 글루타티온), 보조제(예: 수산화 암모늄) 및 방부제를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 약제학적 조성물은 하나 이상의 추가 활성 성분, 예를 들면 지속적 전달 시스템 또는 기타 면역강화제를 포함할 수도 있다.

본 발명의 조성물은 예를 들면 경구 투여, 비내 투여, 정맥 투여, 두개내 투여, 복막내 투여, 피하투여 또는 근육내 투여를 포함하는 지시된 투여 방식에 맞게 제형화될 수 있다. 본 발명의 다른 구체예에서, 본 명세서에 기술된 조성물은 서방성 이식편의 일부로서 투여될 수 있다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 조성물은 동결건조제로서 안정성을 제공하는 적절한 부형제를 이용하고/하거나 재수화시킴으로써, 동결건조제로서 제형화될 수 있다.

본 발명의 약제학적 조성물은 치료할(또는 예방할) 질병의 환자에 적절한 방식으로 투여될 수 있다. 투여량 및 빈도는 환자의 상태, 환자의 질병의 유형 및 중증도 등의 인자에 의해 결정될 것이다. 본 발명의 특정한 바람직한 구체예에서, 펩티드 동족체는 적절한 복용량이 임상 시험에 의해 결정될 수 있더라도 0.1 내지 100mg/kg 범위의 복용량으로 투여될 수 있다. 진성 당뇨병으로의 진행의 자연 및 상기한 바의 정상 혈당을 유지하기 위한 인슐린의 지속적인 사용을 통해 치료 효과에 대해 환자들을 모니터링한다.

다음 실시예들은 예시의 목적으로 제공된 것이지, 제한시키고자 함이 아니다.

실시예

실시예 1

펩티드의 제조

이 실시예는 대표적인 펩티드 동족체의 합성을 예시한다.

펩티드들을 펩티드 합성기(Beckman) 모델 990) 상에서 고체상 방법으로 합성한다. 아미드화 카르복실-말단을 갖는 펩티드를 p-메틸벤즈하이드릴아민 잔기(MBHA 수지)로 제조하고; 유리 카르복실 말단을 갖는 펩티드의 경우, 적절히 보호된 아미노산과 결합된 메리필드 수지를 사용한다. 두 수지는 모두 바켐 파인 케미칼스(Bachem Fine Chemicals: 캘리포니아주 토랜스 소재)로부터 입수한다. 합성에 사용된 유도화 아미노산(바켐 파인 케미칼스)은 달리 명시하지 않는 한 L-형태이고, N- α -아미노 작용기는 t-부틸옥시카르보닐기로 배타적으로 보호된다. 촉촉 작용성 그룹들은 다음과 같이, 즉, 세린 및 트레오닌의 경우 벤질로; 글루탐산 및 아스파르트산의 경우 시클로헥실로; 히스티딘 및 아르기닌의 경우 토실로; 리신의 경우 2-클로로벤질옥시카르보닐로; 및 티로신의 경우 2-브로모벤질옥시카르보닐로 보호될 수 있다. MBHA 수지에 대한 카르복실-말단 아미노산의 결합은 디클로로헥실카르보디이미드를 사용하여 수행하고, 후속 아미노산을 링(Ling) 등의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:4302, 1984]에 따라 디시클로헥실카르보디이미드로 결합시킨다. 최종 아미노산을 도입한 후, t-부틸옥시카르보닐 보호 그룹을 제거하고, 펩티드-수지 공액체를, -20°C에서 0.5 시간 동안 및 0°C에서 0.5 시간 동안 수지 공액체 그램당 불화수소산(HF) 14mL, 아니솔 1.4mL 및 황화메틸에틸 0.28mL의 혼합물을 처리한다. HF를 0°C에서 진공 중에 제거하고, 생성된 펩티드 및 수지 혼합물을 디에틸 에테르로 2회 세척하고 클로로포름 및 디에틸 에테르로 교대로 2회 세척한다. 펩티드를 2M 아세트산으로 5회 추출하고, 추출물을 동결건조시킨다. 동결건조된 생성물을 먼저 30% 아세트산 중에서 전개된 세파덱스 G-25 파인(뉴저지주 피스케어웨이 소재의 파마시아-LKB) 컬럼 상에서 정제하여, 절두된(truncated) 단편 및 무기 염을 제거한다(링 등, 1984). 다음으로, 펩티드를 CM-32 카르복시메틸셀룰로스 양이온-교환 크로마토그래피로 추가로 정제한다(링 등, 1984). 최종 정제를 세파덱스 G-25 파인 상에서 분별 크로마토그래피로 수행한다(링 등, 1984). 대안으로, 조 펩티드를 Biotage KP-100 구배 시스템 상에서 예비 HPLC로 정제할 수 있다. 합성된 생성물의 특성을 아미노산 분석, 질량 분광 분석 및 역상 HPLC에 의해 결정한다.

실시예 2

장기간의 T 세포주

이 실시예는 장기간의 인슐린-특이적 NOD T 세포주의 제조를 예시한다.

인슐린 특이적 NOD T 세포주를, 항원-제공 세포로서 조사된 NOD 비장 세포 및 사이토kin의 존재 하에 조사된 NOD 랑게르한스섬 세포 및 25 μ g/ml의 돼지 인슐린을 사용한 시험관내 자극에 의한 섬-침윤 집단으로부터 단리된 림프구를 배양하는 방법으로 확립한다. 침윤 림프구를 수득하기 위해 다음 공정을 수행한다(Wegmann et al., Eur. J. Immunol. 24:1853, 1994): 즉, NOD 마우스들로부터의 체장을 콜라게나제로 분해시키고, 각각의 랑게르한스 섬을 수동으로 단리시킨다. 상기 섬을 티립신으로 약하게 분해하여 침윤 림프구를 수득한다. 인슐린 특이적 T 세포주 또는 클론을, NOD 비장 세포, 돼지 인슐린 및 항원-제공 세포의 존재 하에 B 쇄(9 내지 23) 특이적 T 세포주의 한계희석으로 수득한다. 한계희석 후 세포의 성장 집단을 갖는 웰을 적절한 배지중에서 확장시키고, 1주기의 성장 후, 증식 반응을 평가하는 방법으로 인슐린의 B 쇄(9 내지 23) 펩티드에 대한 반응성을 시험한다.

실시예 3

인슐린-특이적 NOD T 세포 클론의 증식에 대한 펩티드 동족체의 효과

이 실시예는 T 세포 증식에 대한 대표적인 펩티드 동족체의 효과를 예시한다.

인슐린 B 쇄(9 내지 23)(서열 2) 특이적 마우스 (NOD) T 세포 클론을 실시예 2에 기술된 바와 같이 침윤된 섬으로부터 단리시킨다. 단일 알라닌 치환체를 갖는 펩티드 동족체를 실시예 1에 기술된 바와 같이 제조한다. T 세포 증식에 대한 각각의 동족체의 효과를 96-웰 평저 미세역가 플레이트에서 수행된 분석을 사용하여 평가한다[Daniel et al., Eur. J. Immunol. 25: 1056, 1995]. 간단히 말하자면, 1백만개의 조사된 NOD 비장

세포과 함께 25,000개의 T 세포 클론을, 삼중 셋트로 아래 열거된 알라닌 치환된 펩티드 중 임의의 것 또는 인슐린 B 쇄 9 내지 23 펩티드 50 μ g/ml의 존재하에 배양한다. 플레이트를 7% 이산화탄소 분위기에서 총 72시간 동안 항온처리하면서, 최종 6 내지 8시간의 배양 동안 삼중수소화된 티미딘 1 μ Ci/웰로 필스표지화 한다. 세포들을 유리 섬유 필터 상에서 수거하고, 흔입된 방사성을 액체 신틸레이션 계수기로 계수한다. 결과를 삼중 웰의 분당 평균 계수로서 나타낸다.

5개의 각각의 T 세포 클론으로부터 얻은 데이터는 다음과 같은 알라닌 치환된 동족체, 즉, A12, A13, A15, A16, A17 및 A18의 존재하에 증식의 결여 또는 증식의 현저한 감소(인슐린 B 쇄의 9 내지 23 천연 펩티드(서열 2)에 상대적임)을 나타낸다. 이를 데이터는 아래 표 1 및 2에 제시된다.

[표 1]

인슐린 특이적 NOD T 세포 클론의 반응(cpm)

| 변경된 위치 | 천연 잔기 | 치환 | 세포 클론 | |
|------------|-------|----|---------|-----------|
| | | | PD6-4.3 | PD12-2.40 |
| 9 | S | A | 12861 | 42234 |
| 10 | H | A | 12507 | 1409 |
| 11 | L | A | 14148 | 2594 |
| 12 | V | A | 8292 | 671 |
| 13 | E | A | 142 | 519 |
| 14 | A | 없음 | | |
| 15 | L | A | 161 | 1422 |
| 16 | Y | A | 98 | 539 |
| 17 | L | A | 553 | 19321 |
| 18 | V | A | 234 | 44785 |
| 19 | C | A | 7678 | 34212 |
| 20 | G | A | 2440 | 38685 |
| 21 | E | A | 91 | 39087 |
| 22 | R | A | 6555 | 51722 |
| 23 | G | A | 14304 | 75441 |
| | | | | |
| 항원 없음 | | | 163 | 682 |
| 천연 9 내지 23 | | | 10463 | 32221 |

[표 2]

인슐린 특이적 마우스 NOD T 세포 클론의 반응(cpm)

| 변경된 위치 | 천연 잔기 | 치환 | 세포 클론 | | |
|------------|-------|----|----------|-----------|-----------|
| | | | PD12-4.4 | PD12-4.29 | PD12-4.34 |
| 9 | S | A | 1000 | 18422 | 259 |
| 10 | H | A | 823 | 15484 | 356 |
| 11 | L | A | 474 | 18416 | 190 |
| 12 | V | A | 1129 | 15041 | 194 |
| 13 | E | A | 373 | 891 | 179 |
| 14 | A | 없음 | | | |
| 15 | L | A | 675 | 809 | 191 |
| 16 | Y | A | 779 | 636 | 202 |
| 17 | L | A | 332 | 1460 | 4360 |
| 18 | V | A | 225 | 1193 | 721 |
| 19 | C | A | 4295 | 6054 | 689 |
| 20 | G | A | 1323 | 13736 | 466 |
| 21 | E | A | 7900 | 4904 | 773 |
| 22 | R | A | 1313 | 12635 | 1555 |
| 23 | G | A | 3228 | 18422 | 791 |
| | | | | | |
| 항원 없음 | | | 350 | 789 | 231 |
| 천연 9 내지 23 | | | 10000 | 14820 | 3614 |

표 3은 이중 알라닌 치환된 펩티드 동족체 A16, A19(NBI-6024; 16Y>A/19C>A)에 대한 4가지 상이한 NOD

유래된 T 세포 클론의 반응을 나타낸다. NOD T 세포 클론을 50 μ M의 천연 B 쇄(9 내지 23) 펩티드 또는 NBI-6024의 존재하에 배양한다. 표 3의 데이터는 삼중 시료의 평균±평균값의 표준 오차를 나타낸다. 표 3에서, S.I.(자극 지수)는 펩티드 존재하의 증식(cpm)/배지 단독중에서의 증식(cpm)이다. 이들 데이터는, 세포들을 천연 B 쇄(9 내지 23) 펩티드와 함께 배양하는 경우 현저한 반응을 나타내지만, NBI-6024의 존재하의 배지 단독(백그라운드)에서는 증식이 거의 없거나 또는 전혀 없음을 나타낸다.

[표 3]

50 μ M의 B 쇄(9 내지 23) 또는 동족체 A^{16,19}(NBI-6024)에 대한 인슐린 B 쇄(9 내지 23) 특이적 마우스 T 세포 클론의 증식 반응

| T 세포 클론 | 실험 번호 | 배지 단독 | 인슐린 B 쇄(9 내지 23) | | NBI-6024(A ^{16,19}) | |
|-----------|-------|-------------|------------------|--------|-------------------------------|------|
| | | | 평균 cpm±sem | S.I. | 평균 cpm±sem | S.I. |
| PD12-2.35 | 1 | 688±227 | 120,886±1,171 | 175.7 | 841±88 | 1.22 |
| | 2 | 493±20 | 100,521±1,581 | 203.89 | 452±179 | 0.91 |
| PD12-2.40 | 1 | 170±8 | 16,730±3,835 | 98.4 | 272±34 | 1.16 |
| | 2 | 1,834±638 | 176,359±36,306 | 96.16 | 1,863±451 | 1.01 |
| PD12-4.1 | 1 | 215±17 | 28,593±4664 | 132.99 | 566±30 | 2.63 |
| PD12-4.9 | 1 | 9,111±1,889 | 45,541±5,222 | 4.99 | 12,313±1,372 | 1.35 |
| | 2 | 7,202±2,773 | 65,624±4,979 | 9.1 | 6,171±725 | 0.85 |

실시예 4

T 세포 증식 평가분석의 길항작용

이 실시예는 대표적인 펩티드 동족체에 의한 인슐린 B 쇄(9 내지 23) 펩티드에 대한 B 쇄(9 내지 23) 특이적 마우스 T 세포 클론의 반응 억제를 예시한다.

잔기 12, 13, 15 또는 16에 알라닌 치환체를 갖는 B 쇄(9 내지 23)의 펩티드 동족체, 또는 위치 16 및 19에서 이중 치환된 펩티드(A^{16,19}; NBI-6024)를 실시예 1에 기술된 바와 같이 제조한다. T 세포 길항작용은 천연 B 쇄(9 내지 23)(서열 2)에 의해 유도된 T 세포 증식을 억제하는 펩티드 동족체의 능력을 평가함으로써 검출된다. 이러한 분석에서, 항원-제공 세포들을 먼저 조사하고, 이어서 경쟁적 펩티드 동족체 및 천연 B 쇄(9 내지 23) 펩티드와 함께 배양한다. 이어서, T 세포들을 배양액에 가한다. 다양한 농도의 후보 펩티드 동족체를 넣은 배양액을 총 4일 동안 배양한다. 이러한 배양 기간 후, 각각의 배양액을 추가로 12 내지 18시간 동안 1 μ Ci의 [³H]-티미딘으로 펄스 표지화한다. 이어서, 배양액을 유리 섬유 필터상에서 수거하고, 상기한 바와 같이 계수한다. 평균 CPM 및 평균값의 표준 오차를 삼중 배양에서 측정된 데이터로부터 계산한다. 도 2에 나타낸 결과는 잔기 12, 13 또는 16에 알라닌 치환체를 갖는 펩티드 동족체가 병원성 인슐린 B 쇄(9 내지 23) T 세포의 반응을 감소시킬 수 있음을 나타낸다.

이중으로 치환된 펩티드가 T 세포에 의한 인슐린-의존형 증식을 억제시키는 능력을 표 4 및 도 3에 나타낸다. 표 4에서, 대조용 펩티드인 NBI-5096은 미엘린 기본 단백질로부터 얻은 무관한 펩티드이다. 억제율을 (1-실험에 의한 cpm/인슐린 펩티드 cpm) x 100%로서 계산한다.

[표 4]

펩티드 동족체에 의한 2개의 마우스 NOD T 세포 클론에서 인슐린 B 쇄(9 내지 23) 펩티드 반응의 억제

| 클론 | 조건 | CPM±SEM | 억제% |
|-----------|---|--------------|------|
| PD12-2.35 | 배지 단독 | 213±17 | |
| | B(9-23) 5 μ M | 7,840±528 | |
| | B(9-23) 5 μ M + 10 μ M NBI-6024 | 4,441±626 | 43.0 |
| | B(9-23) 5 μ M + 50 μ M NBI-6024 | 1,389±218 | 82.0 |
| | B(9-23) 5 μ M + 10 μ M NBI-5096 | 10,089±1,113 | N/A |
| | B(9-23) 5 μ M + 50 μ M NBI-5096 | 10,125±887 | N/A |
| PD12-2.40 | 배지 단독 | 305±13 | |
| | B(9-23) 5 μ M | 9,149±1,062 | |
| | B(9-23) 5 μ M + 10 μ M NBI-6024 | 6,379±1,485 | 30.0 |
| | B(9-23) 5 μ M + 50 μ M NBI-6024 | 4,305±941 | 52.9 |
| | B(9-23) 5 μ M + 10 μ M NBI-5096 | 12,336±1,556 | N/A |
| | B(9-23) 5 μ M + 50 μ M NBI-5096 | 17,988±584 | N/A |

N/A = 어떠한 억제도 관찰되지 않았으므로 적용될 수 없음

NOD 유래된 T 클론에서 B 쇄(9 내지 23) 펩티드-유도된 자극을 차단하는 NBI-6024의 능력이 제시하는 바는, 천연 인슐린 B 쇄(9 내지 23) 펩티드의 위치 16 및 19에서의 변경이 병원성 T 세포들에 의해 인식될 동족체

의 능력을 변경시키지 않는다는 것이다. 더욱이, 이들 결과가 나타내는 바와 같이, 동족체는 인슐린 B 쇄(9 내지 23)-특이적 T 세포에 의한 인식을 허용하기에 충분한 친화성으로 MHC에 결합된다.

실시예 5

당뇨병 환자들로부터의 T 세포주 및 클론의 증식에 대한 펩티드 동족체의 효과

이 실시예는 대표적인 펩티드 동족체에 의한 당뇨병 환자들로부터 유래된 T 세포주 및 클론의 자극 결여를 예시한다.

잔기 13, 15, 16 또는 17에 알라닌 치환체를 갖는 B 쇄(9 내지 23)의 펩티드 동족체 또는 이중 치환된 알라닌 동족체 A^{16,19} (NBI-6024)를 실시예 1에 기술된 바와 같이 제조한다. 당뇨병 환자들로부터의 T 세포주를, 혈액을 밀도 구배 분리에 적용시켜 환자의 혈액으로부터 림프구를 단리시키는 방법으로 제조한다. 이어서 단리된 림프구들을, 배양 배지중의 조사된 자가조직 말초 혈액 림프구 및 5 내지 10%의 자가조직 혈청의 존재하에, 재조합 사람 IL-2 및 인슐린 B 쇄(9 내지 23) 펩티드(10 μM)의 존재하에 배양한다. 4 내지 5일 후, 세포들을 수거하고, 2 또는 3회 주기를 반복한다.

천연 B 쇄(9 내지 23) 펩티드(서열 2) 또는 펩티드 동족체에 반응하는 T 세포주 증식을, 삼중 배양액 중에서 상이한 농도의 인슐린 B 쇄(9 내지 23) 펩티드 또는 펩티드 동족체 및 50,000 내지 200,000개의 조사된 자가조직 PBL의 존재하에 25,000 내지 100,000개의 T 세포를 배양시킴으로써 측정한다. 방사성 티미딘으로 최종적으로 18시간 동안 배양시키는 것을 포함하여 4 내지 5일간의 배양 후, 세포들을 수거하고, 흡입된 방사성은 액체 신틸레이션 계수기로 계수한다. 결과를 시험된 펩티드 동족체 각각에 대한 분당 평균 계수로서 나타낸다.

도 4 내지 7에 나타낸 결과는, 천연 인슐린 B 쇄(9 내지 23) 펩티드(서열 2)에 반응하여 증식하는 T 세포주 및 클론이 펩티드 동족체에 의해 자극되지 않음을 나타낸다. 이들 환자 및 다른 환자들로부터의 결과는 표 5에 요약되어 있다.

[표 5]

천연 인슐린 펩티드 또는 동족체 NBI-6024에 대한 환자 PBL의 증식 반응

| 환자 번호 | 환자 ID | 자극 지수* | |
|-------|-------|------------------------|---------------------|
| | | 인슐린 B(9-23) [50 μM] | NBI-6024 [50 μM] |
| 1 | 100 | 9.9 | 0.9 |
| 2 | 200 | 5.3 | 1.2 |
| 3 | 400 | 7.8 | 1.0 |
| 4 | 500 | 2.1 | 0.9 |
| 5 | 600 | 5.8 | 1.6 |
| 6 | 700 | 3.2 | 1.5 |
| 7 | 900 | 2.6 | 0.9 |
| 8 | 1100 | 3.7 | 0.8 |

*자극 지수 - 항원을 갖는 경우의 CPM/배지 단독(항원 없음) 경우의 CPM

이 결과는, 인슐린 B 쇄(9 내지 23) 펩티드에 반응하는 당뇨병 환자들로부터 얻은 세포들이 위치 16 및 19에 치환체를 갖는 변경된 펩티드 리간드 NBI-6024에 반응하지 않음을 분명히 나타낸다. 또한, 본 발명자들은 APL NBI-6024가 DQ8 항원에 유사한 친화성으로 결합하는 것을 측정한다. 따라서, NBI-6024에 의한 당뇨병 환자의 T 세포의 자극의 부재는 제공성(presenting) MHC 분자와 펩티드의 부적합성에 기인하는 것이 아니라, B 쇄(9 내지 23)-특이적 T 세포에 의한 변경된 인식으로 인한 것이다.

실시예 6

NOD 마우스에서 당뇨병 발병의 감소

이 실시예는 NOD 마우스에서 당뇨병을 예방하는 대표적인 펩티드 동족체의 능력을 예시한다.

NOD 마우스들은 약 3월령부터 자연적으로 당뇨병이 진행되기 시작한다[Makino et al. in Current Topics in Clinical and Experimental Aspects of Diabetes Mellitus, Sakamoto et al., p 25-32(Elsevier, Amsterdam, 1985)]. 이 질병은 1월령에 시작하는 췌장 T 세포로의 세포 침윤에 선행된다. 잔기 12, 13 또는 16에 알라닌 치환체를 갖는 B 쇄(9 내지 23)의 가용성 펩티드 동족체를 일주 간격으로 NOD 마우스에게 피하 투여한다. 각각의 펩티드 400μg을 10마리의 마우스에 각각의 처리시에 투여한다. 9회의 처리 후, 당뇨병을 갖는 각각의 처리군에서 마우스의 백분율을 일주 간격으로 글루코미터를 사용하여 혈당 수준을 측정하는 방법으로 평가한다. 2회 연속 관찰시에 200mg/dl 초과의 혈당 판독치는 진성 당뇨병을 나타내는 것으로 여겨진다.

도 8에 도시된 바와 같이, 각각의 알라닌-치환된 동족체로 처리함으로써 당뇨병 발병이 현저히 감소된다. A13 치환된 동족체에 대한 데이터를 도 9에 역시 나타낸다.

다른 실험에서, B 쇄(9 내지 23), A13 치환된 동족체 또는 뉴로텐신(대조용)을 일주 간격으로 NOD 마우스에 피하 투여한다. 각각의 펩티드 400μg을 10마리의 마우스에게 각각의 처리시에 투여한다. 13회 처리 후, 당

뇨병을 갖는 각각의 처리군의 마우스의 백분율을 상기한 바와 같이 평가한다. 도 10에 나타낸 바와 같이, B 쇄(9 내지 23) 펩티드는 당뇨병의 발병을 감소시킨다. 이러한 감소는 A 13 치환된 동족체 경우에 더 많은 것으로 밝혀졌다.

NOD 마우스에서 당뇨병의 진행을 억제하는 이중 치환된 A^{16,19} (NBI-6024)의 능력을 측정하기 위해, 펩티드를 초기에 마우스에 투여한다. 따라서, 암컷 마우스(n=9, 약 4주령)에 12주 동안, 이어서 35주까지 격주로 20mg/kg(400 μ g/마우스)의 NBI-6024를 피하 투여한다. 9 내지 10주령부터, 마우스들을 저혈당증에 대해 일주마다 모니터링하기 시작하고, 혈당 수준을 측정한다. 대조용으로, 10마리의 암컷 마우스 군을 미처리 상태로 방치한다. 이 실험 결과를 도 11에 나타낸다. 도시된 바와 같이, NBI-6024로 처리하는 경우 미치료군에 비해 약 60 내지 70% 만큼 당뇨병의 발병이 현저하게 감소된다($p<0.004$).

이어서, 관찰을 확인하고, 2차 실험을 계속한다. 여기서, 마우스(n=13 내지 15)을 NBI-6024 또는 상기한 바와 같이 관련 없는 펩티드인 뉴로텐신, NBI-6021로 처리한다. 추가군(n=8)을 미처리 상태로 방치한다. 도 12에 나타낸 바와 같이, 20mg/kg의 변경된 펩티드 NBI-6024로 처리하는 경우 뉴로텐신-처리군 또는 미처리 군에 비해 당뇨병의 발병이 감소된다.

이들 결과는, 인슐린 B 쇄(9 내지 23) 펩티드와 유사하게 설계된 변경된 펩티드 리간드 NBI-6024가 자연적으로 당뇨병이 진행될 위험이 있는 마우스를 보호할 수 있음을 나타낸다. 다른 체장 항원을 인식하는 T 세포들이 이들 마우스에 제공되지만, 이들은 너무 자주 나타나 인슐린 APL에 의해 조절될 수 없다. 투여 시기는 대략적으로 자기반응성 림프구들이 체장을 침윤시키고 파괴 과정을 개시하기 시작하는 것과 동시적이다. 이들 결과는, 이러한 APL에 의한 조기 개입이 사람들의 제I형 당뇨병의 발병을 지연 또는 예방하는데 유용함을 입증해줄 수 있다는 희망을 제공한다.

실시예 7

대표적인 펩티드 동족체의 면역원성

이 실시예는 NOD 마우스에서 대표적인 펩티드 동족체의 면역원성을 예시한다.

3 내지 4 NOD 마우스군을, 10 내지 15일의 기간내에 만니톨 아세테이트 완충액 중의 100 내지 400 μ g의 펩티드 동족체를 3회 피하 주사하여 면역화시킨다. 최종 면역화 후, 림프절 세포 및/또는 비장 세포를 상이한 농도의 면역화 펩티드를 3 내지 4일 동안 세포과 함께 배양하는 증식 평가분석에 사용한다. 배양의 최종 18시간 동안 삼중수소화된 티미딘을 포함시킨다. 세포들을 수거하고 신틸레이션 계수기로 계수하고 그 반응을 CPM \pm SEM으로 나타낸다. 도 13 내지 16에 도시된 이들 결과는, 이들 대표적인 펩티드 동족체가 마우스의 MHC 분자에 결합되고, 상응하는 T 세포에 의해 인식되는 능력을 가짐을 나타낸다.

다음, NOD 마우스에서 세포 면역 반응을 유도하는 이중 치환된 펩티드 NBI-6024(A^{16,19})의 능력을 측정한다. 2마리의 암컷 NOD 마우스를, 수성 혼탁액 상태로서 또는 대조용인 완전 프로인트 보조제(CFA) 중에 유화된 상태로서 10mg/kg NBI-6024를 사용하여 면역화시킨다. 8일 째에, 최종 주사한지 3일 후, 마우스를 희생시키고, 비장 및 서혜부 림프절 세포를 제거하고 수집하여, 단일-세포 혼탁액을 제조한다. 세포들을 다양한 농도(0 내지 25 μ M)의 NBI-6024의 존재하에 배양시킨다. NBI-6024에 반응하여 증식하는 이들 림프성 세포의 능력을 [³H]-티미딘 흔입에 의해 시험관내에서 측정한다.

그 결과는, 반응을 삼중 배양의 평균 CPM \pm SEM으로 나타낸 표 6에 제시된다. CFA 중의 동족체로 면역화한 마우스로부터 단리된 림프절 세포는 복용량 의존 방식으로 면역화한 동족체에 의한 항원투여(challenge)에 대해 강한 증식 반응을 나타낸다(표 6). 이들 결과가 나타내는 바와 같이 위치 16 및 19에서 천연 인슐린 B 쇄(9 내지 23) 서열내에 이루어진 변경이 NOD 질환 관련 MHC 하플로타입 분자에 결합하는 펩티드의 능력에 영향을 미치지 않고, 보다 중요하게는 T 세포에 의한 인식을 방해하지 않는다.

[표 6]

CFA 중의 NBI-6024로 면역화한 NOD 마우스로부터 NBI-6024에 대한 림프절 세포의 증식 반응

| NBI-6024 (μ M) | 증식 반응 (CPM \pm SEM) |
|------------------------|--------------------------|
| 0 | 2,445 \pm 137 |
| 1 | 140,061 \pm 7,289 |
| 5 | 187,711 \pm 2,548 |
| 25 | 218,149 \pm 4,462 |

또한, 가용성의 투여된 펩티드로부터 단리된 비장 및 서혜부 림프절 세포 모두가, NBI-6024에 의해 시험관내 항원투여 경우, APL에 대해 강한 증식 반응을 나타낸다(표 7 및 도 17A 및 17B). 보다 인상적인 것은 가용성 펩티드로 면역화한 마우스로부터 얻은 NBI-6024-유래된 림프구들이 인슐린 B 쇄(9 내지 23)에 역시 반응한다는 발견이다. 이러한 교차 반응성은 CFA-유화된 펩티드에서는 나타나지 않는다. 병원성 표적 조직으로 보호적 NBI-6024-특이적 T 세포들을 결집시키는데 유용하기 때문에, 교차 반응성 반응을 유도하는 가용성 펩티드의 이러한 능력은 당뇨병을 억제하는데 바람직 할 수 있다.

[표 7]

가용성 NBI-6024로 면역화한 NOD 마우스로부터 T 세포의 천연 인슐린 B-쇄(9 내지 23) 또는 NBI-6024에 대한 증식 반응

| NBI-6024 유도된 T 세포주 | 펩티드 농도 [μ M] | CPM±SEM NBI-6024 | CPM±SEM 인슐린 B(9-23) |
|--------------------|-------------------|---------------------|------------------------|
| 마우스 #1 | 0 | 19,130±2191 | 19,130±2191 |
| | 1 | 48,319±1918 | 16,870±4469 |
| | 5 | 160,673±2269 | 21,292±3216 |
| | 25 | 268,005±11198 | 33,317±3619 |
| 마우스 #2 | 0 | 21,588±2326 | 21,588±2326 |
| | 1 | 54,519±5666 | 17,262±602 |
| | 5 | 126,123±13851 | 19,648±2169 |
| | 25 | 202,707±8125 | 30,612±3557 |
| 마우스 #3 | 0 | 24,006±2803 | 24,006±2803 |
| | 1 | 64,239±9493 | 25,825±3841 |
| | 5 | 140,836±11778 | 58,567±2737 |
| | 25 | 240,278±15015 | 113,366±515 |

가용성 NBI-6024의 투여 후 생성된 T 세포들의 유형을 결정하기 위해, 면역 림프성 세포들로부터의 배양 상청액을 배양을 개시한 지 48시간 후에 제거하고, 각종 사이토kin 수준을 표준 ELISA 기술을 사용하여 측정한다. 엄격히 말하자면, 가용성 NBI-6024로 면역화한 마우스로부터의 T 세포의 사이토kin 생성 프로필에 따르면, Th2 사이토kin, 인터류킨-4(도 18) 및 인터류킨-5(표 8)은 생성되지만, Th1-유래된 인터류킨-2는 생성되지 않는다. 표 8에서, 값들은 삼중 평균±SEM으로서 pg/ml로 나타낸다. 대조용으로서, CFA로 유화된 NBI-6024는 시험관내 자극시 면역 T 세포로부터 기대되는 Th1-사이토kin 프로필(IL-2)을 유도한다.

[표 8]

NBI-6024와 함께 배양된 가용성 NBI-6024 유도된 T 세포의 사이토kin 반응

| IL-4 | IL-5 |
|------------|------------|
| 1/134±0 | |
| 1/684±92 | 9.999±503 |
| 1/1,653±51 | 23,496±684 |
| 25 | 2,102±85 |
| | 28,062±141 |

Th2-유사 세포를 유도하는 가용성 NBI-6024의 피하 투여능은 바람직한 특징이고, 이러한 세포들은 당뇨병 및 기타 장기-특이적 자기면역 질병으로부터의 회복과 연관이 있다[Sarvetnick, J. Exp. Med. 184:1597-1600, 1996; Shaw et al., 1997; Balasa et al., J. Exp. Med. 186:385-391, 1997]. 이들 Th2-유래된 사이토kin은, 질병을 매개하는 예비-염증성(pro-inflammatory) 사이토kin-분비 자기반응성 Th1 세포들의 발현을 억제하는 강한 소염 활성을 갖는다.

상기한 바로부터, 본 발명의 특정 구체예들이 본 발명을 예시할 목적으로 본 명세서에 기술되었더라도, 본 발명의 취지 및 범위에서 벗어나지 않는 각종 변형이 이루어질 수 있음이 명백하다. 따라서, 본 발명은 첨부된 특허청구의 범위에 의한 것을 제외하고 제한되지 않는다.

- <110> Neurocrine Biosciences, Inc.
- <120> Methods for treatment of diabetes using peptide analogues of insulin
- <130> 5-1998-106136-4
- <150> US 09/028,156
- <151> 1998-02-23
- <160> 2
- <170> KOPATIN 1.5
- <210> 1
- <211> 30
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>

<223> Human Insulin B Chain

<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

| | | |
|----|----|----|
| 20 | 25 | 30 |
|----|----|----|

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Residues 9-23 human Insulin B Chain

<400> 2

Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly

| | | | |
|---|---|----|----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
|---|---|----|----|

(57) 청구의 범위

청구항 1

1 내지 4개의 아미노산 위치에서의 치환으로 인해 천연 사람 인슐린 B 쇄 잔기 9 내지 23과는 서열이 상이하고, 하나 이상의 치환이 잔기 12, 13, 15 및 16으로 이루어진 그룹으로 부터 선택된 잔기에서 발생하는, 사람 인슐린 B 쇄의 잔기 9 내지 23을 포함하는 펩티드 동족체.

청구항 2

제1항에 있어서, 천연 사람 인슐린 B 쇄와 2개의 아미노산 잔기에서 상이한 서열을 갖는 펩티드 동족체.

청구항 3

제1항에 있어서, 천연 사람 인슐린 B 쇄와 3개의 아미노산 잔기에서 상이한 서열을 갖는 펩티드 동족체.

청구항 4

제1항에 있어서, 아미노산 치환이 잔기 19에서 발생하는 펩티드 동족체.

청구항 5

제1항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 치환이 비보존성인 펩티드 동족체.

청구항 6

제1항에 있어서, 잔기 12가 치환된 펩티드 동족체.

청구항 7

제6항에 있어서, 잔기 12가 알라닌 잔기인 펩티드 동족체.

청구항 8

제1항에 있어서, 잔기 130이 치환된 펩티드 동족체.

청구항 9

제8항에 있어서, 잔기 130이 알라닌 잔기인 펩티드 동족체.

청구항 10

제1항에 있어서, 잔기 15가 치환된 펩티드 동족체.

청구항 11

제10항에 있어서, 잔기 15가 알라닌 잔기인 펩티드 동족체.

청구항 12

제1항에 있어서, 잔기 160이 치환된 펩티드 동족체.

청구항 13

제12항에 있어서, 잔기 160이 알라닌 잔기인 펩티드 동족체.

청구항 14

제6항 내지 제13항중 어느 한 항에 있어서, 잔기 19가 치환된 펩티드 동족체.

청구항 15

제14항에 있어서, 잔기 19가 알라닌 잔기인 펩티드 동족체.

청구항 16

제1항에 있어서, 사람 인슐린 B 쇄의 잔기 24를 추가로 포함하는 펩티드 동족체.

청구항 17

제1항에 있어서, 사람 인슐린 B 쇄의 18개 이하의 잔기를 포함하는 펩티드 동족체.

청구항 18

제1항에 있어서, 사람 인슐린 B 쇄의 16개 이하의 잔기를 포함하는 펩티드 동족체.

청구항 19

제1항에 있어서, 사람 인슐린 B 쇄의 15개 이하의 잔기를 포함하는 펩티드 동족체.

청구항 20

1 내지 4개의 아미노산 위치에서의 치환으로 인해 천연 사람 인슐린 B 쇄 잔기 9 내지 23과는 서열이 상이하고, 하나 이상의 치환이 잔기 12, 13, 15 및 16으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 잔기에서 발생하는, 사람 인슐린 B 쇄의 잔기 9 내지 23을 필수적으로 포함하는 펩티드 동족체.

청구항 21

1 내지 4개의 아미노산 위치에서의 치환으로 인해 천연 사람 인슐린 B 쇄 잔기 9 내지 23과는 서열이 상이하고, 하나 이상의 치환이 잔기 12, 13, 15 및 16으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 잔기에서 발생하는, 사람 인슐린 B 쇄의 잔기 9 내지 24을 필수적으로 포함하는 펩티드 동족체.

청구항 22

제1항 내지 제19항중 어느 한 항에 따른 펩티드 동족체를 생리학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와 함께 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 23

치료학적 유효량의 제22항에 따른 약제학적 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 당뇨병의 진행 억제 방법.

청구항 24

치료학적 유효량의 제22항에 따른 약제학적 조성물을 환자에게 투여함을 특징으로 하는, 당뇨병의 치료 방법.

청구항 25

잔기 16 및 19에서의 치환으로 인해 천연 사람 인슐린 B 쇄 잔기 9 내지 23과는 서열이 상이한 사람 인슐린 B 쇄의 잔기 9 내지 23을 포함하는 펩티드 동족체.

청구항 26

제25항에 따른 펩티드 동족체를 생리학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와 함께 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 27

치료학적 유효량의 제26항에 따른 약제학적 조성물을 환자에게 투여함을 특징으로 하는, 당뇨병의 진행 억제 방법.

도면

도면1

인슐린 B 9 내지 23

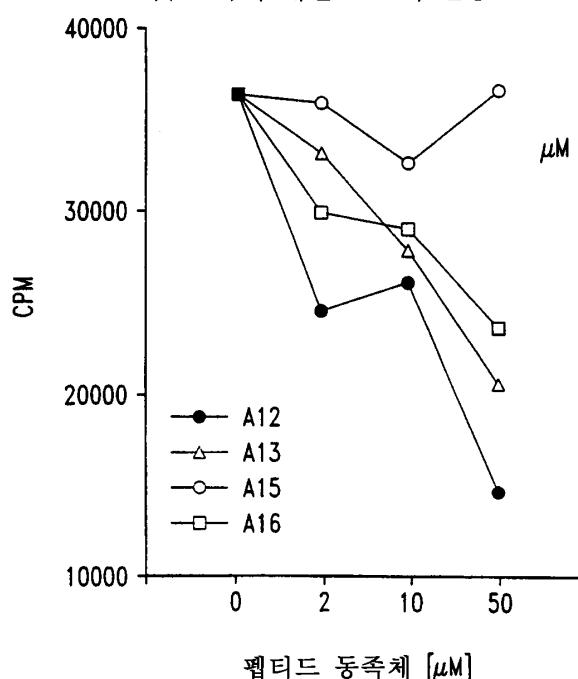
TCR

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 |
| S | H | L | V | E | A | L | Y | L | V | C | G | E | R | G |

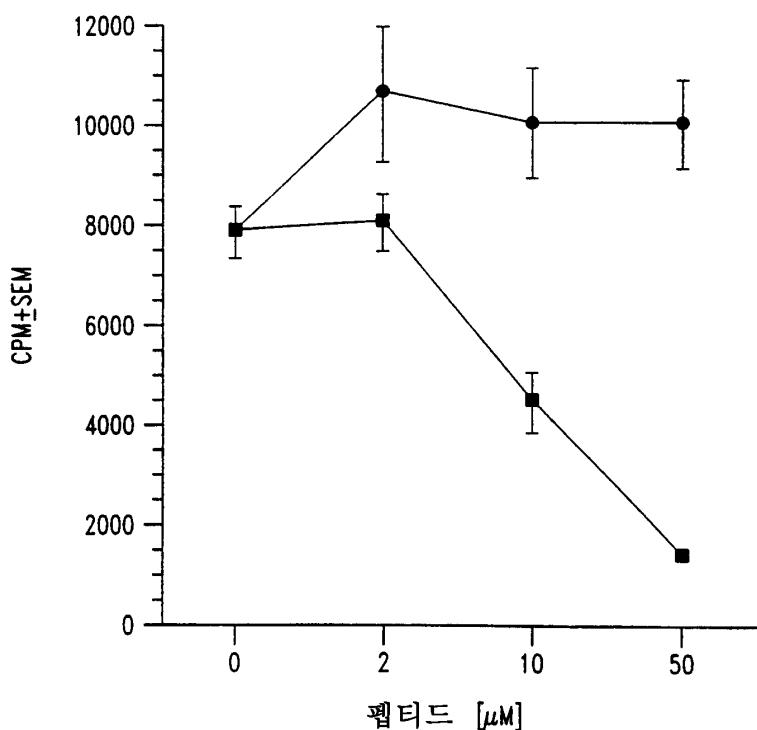
 $|-\text{A}^{97}$

도면2

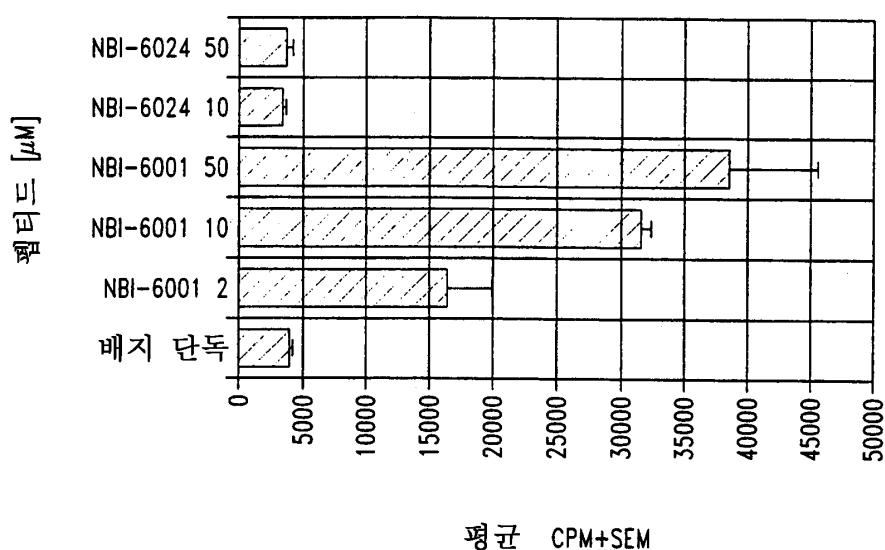
상이한 동족체들의 존재하에 2,4 내지 12.5 μM
쐐(9-23)에 대한 클론의 반응



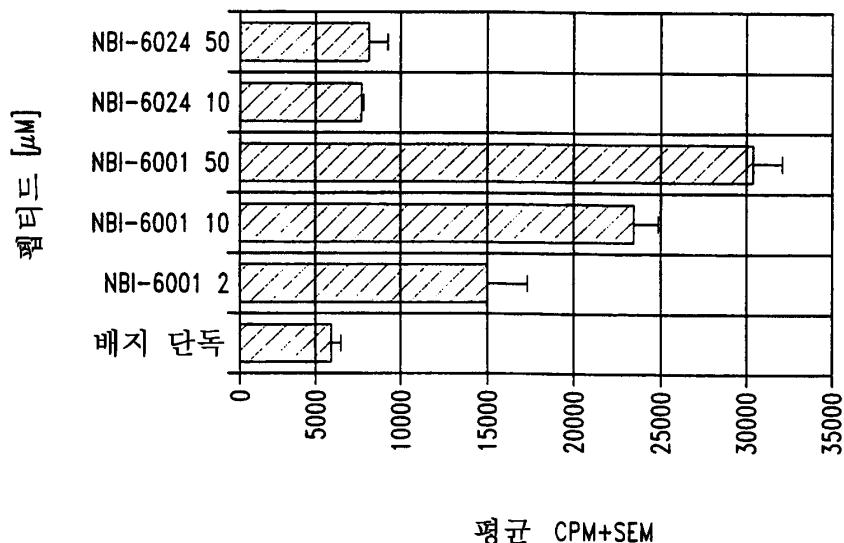
도면3



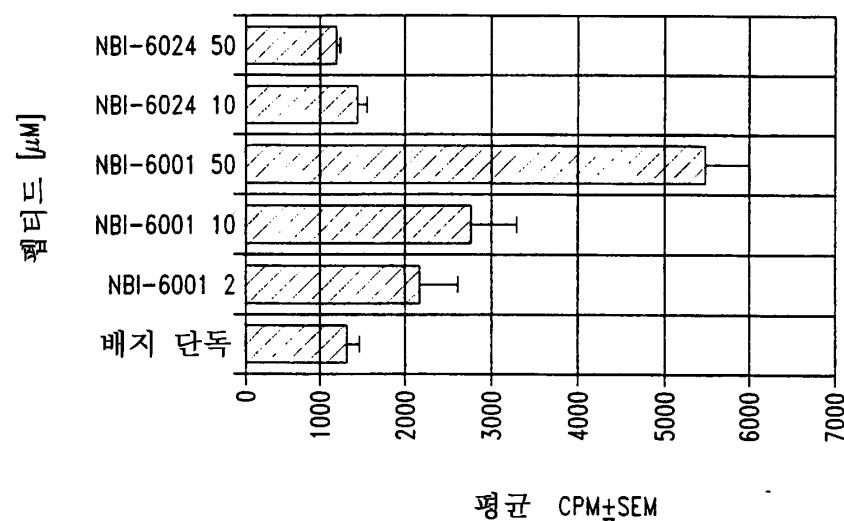
도면4



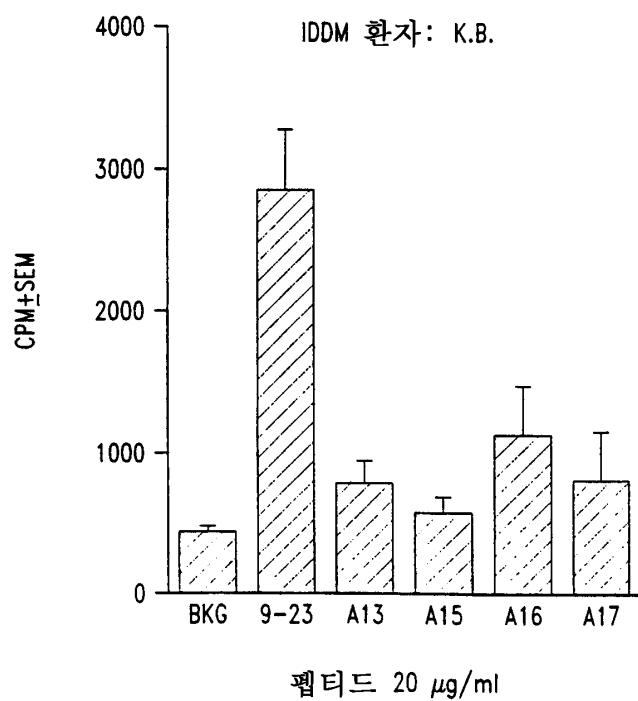
도면5



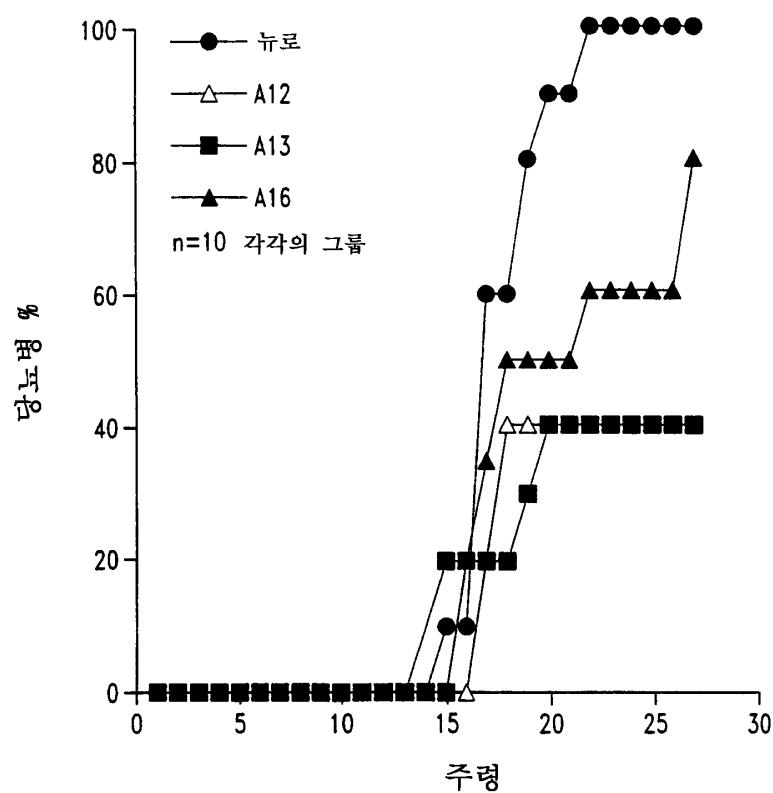
도면6



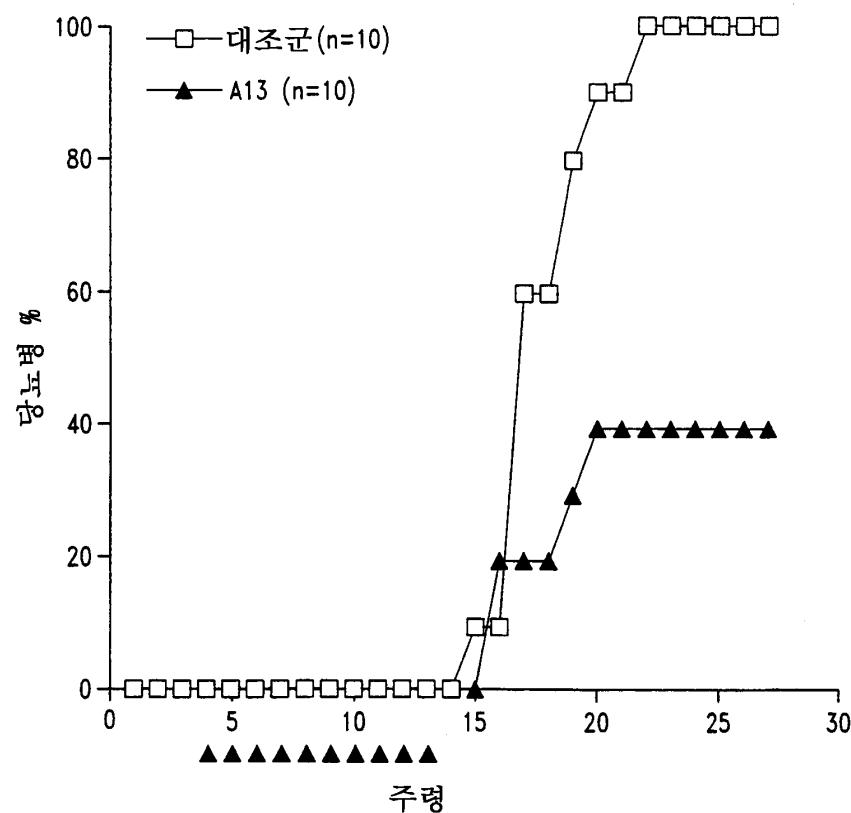
도면7



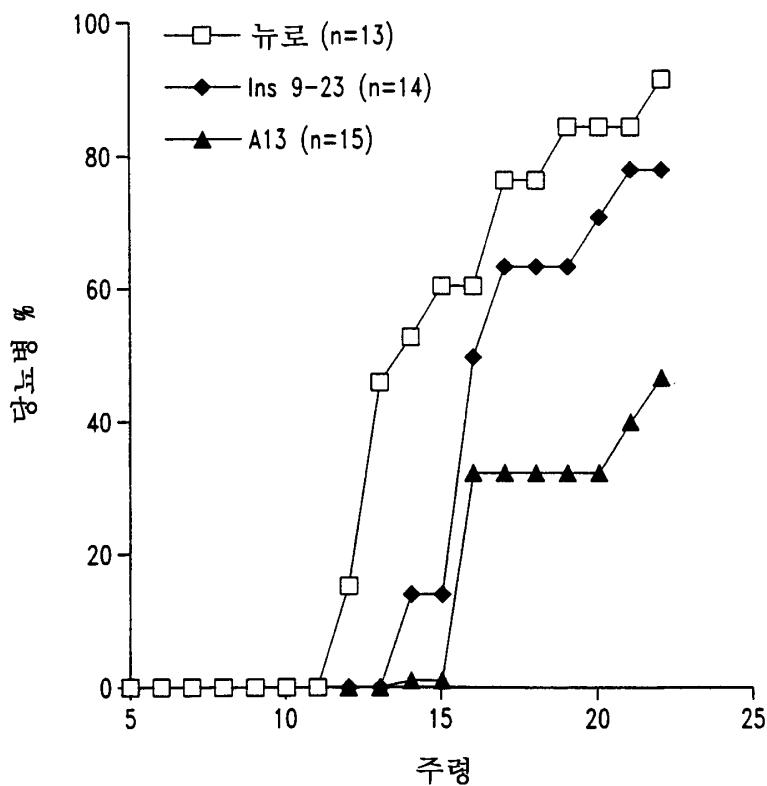
도면8



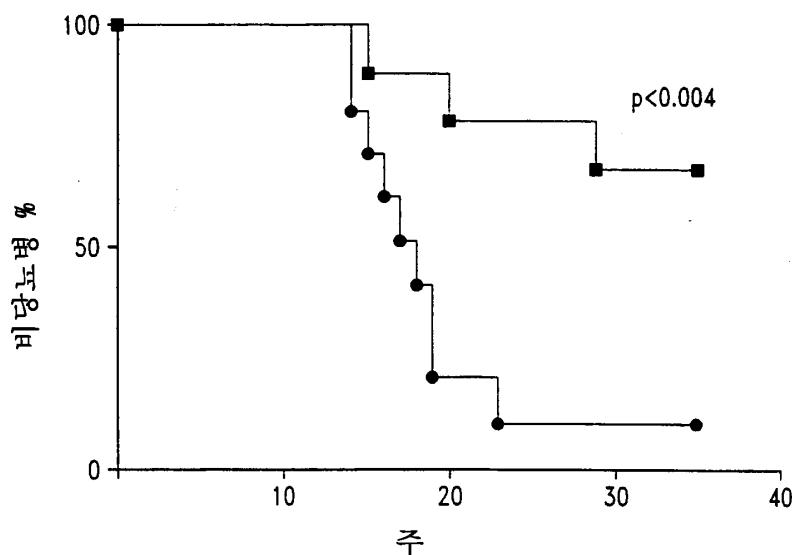
도면9



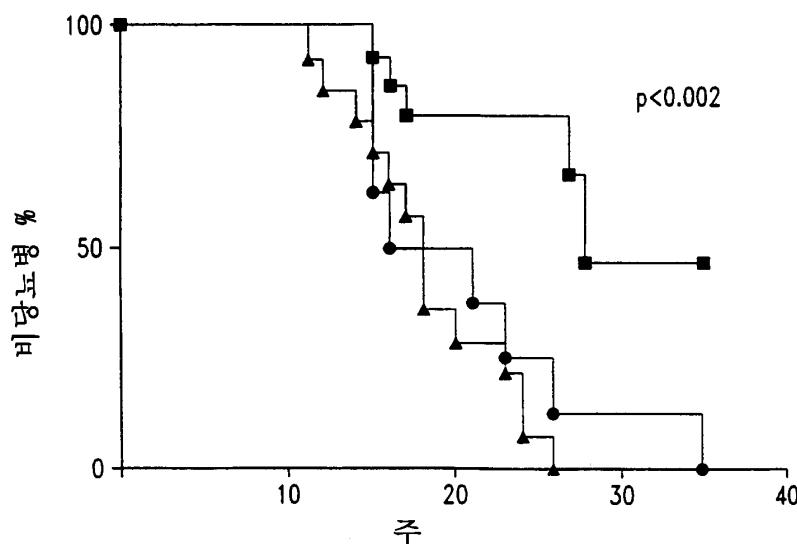
도면10



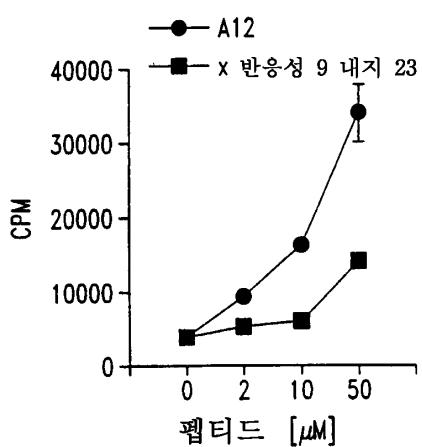
도면11



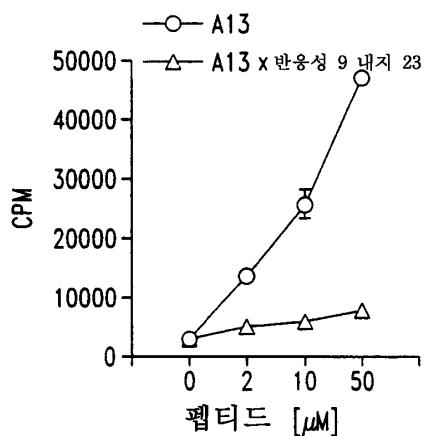
도면12



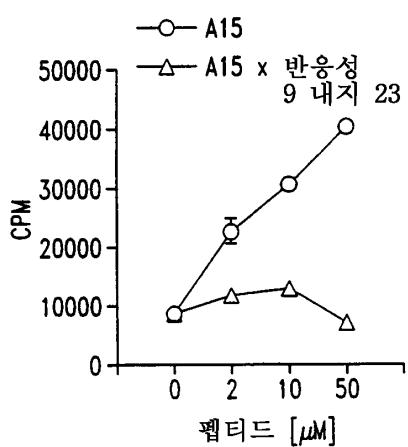
도면13A



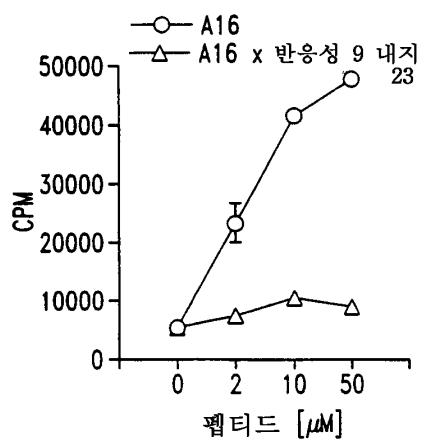
도면 13B



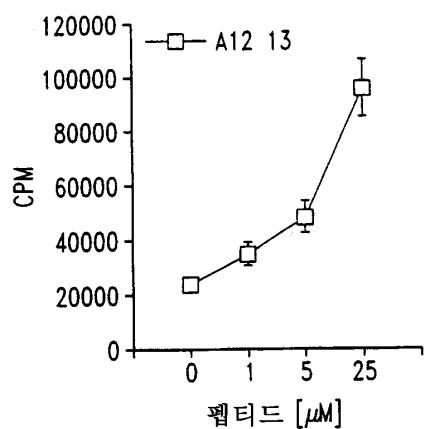
도면 13C



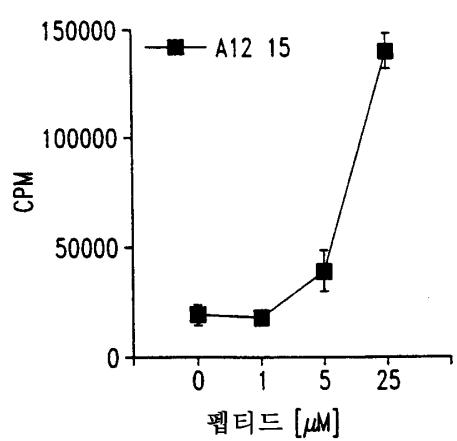
도면 13D



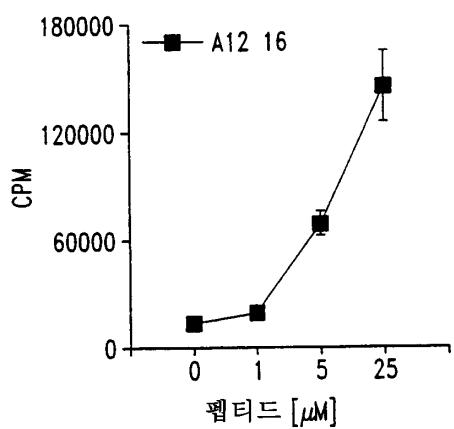
도면14A



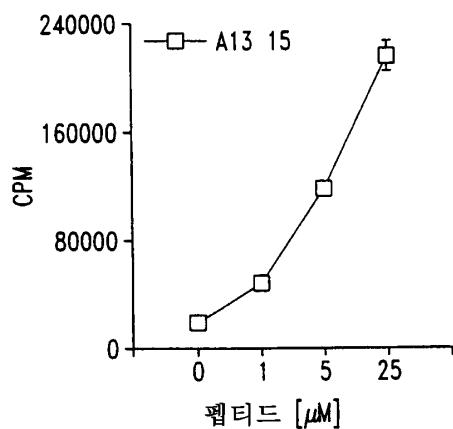
도면14B



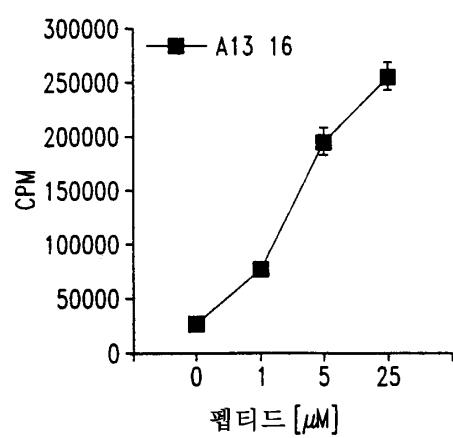
도면14C



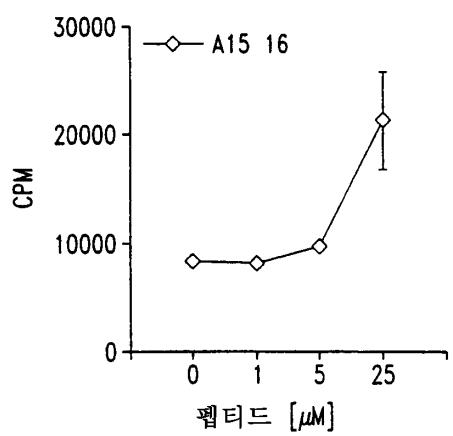
도면14D



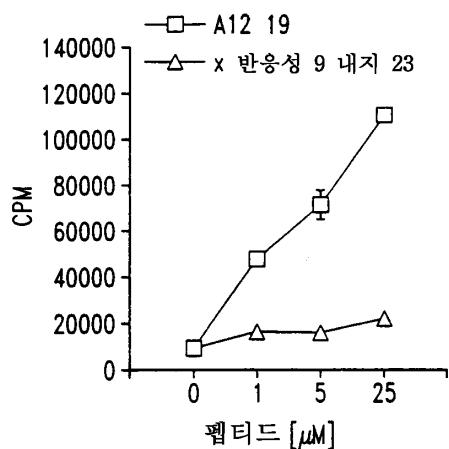
도면14E



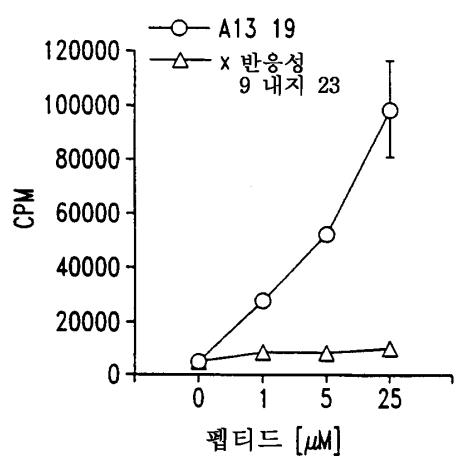
도면14F



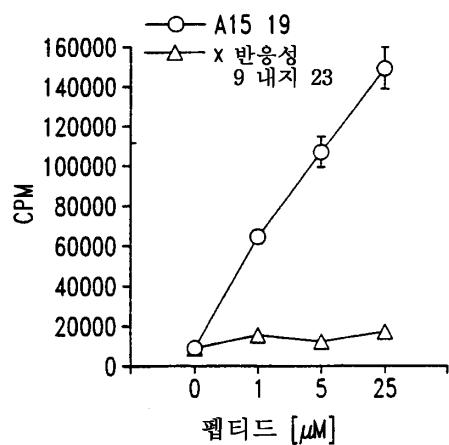
도면 15A



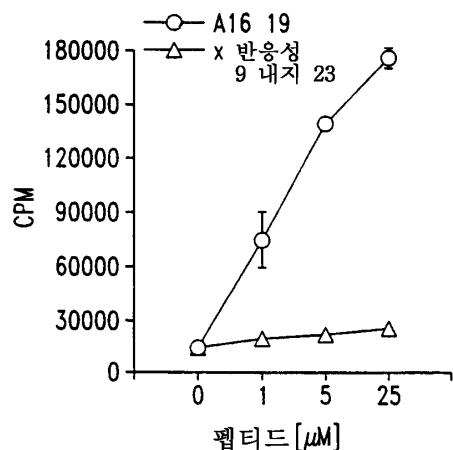
도면 15B



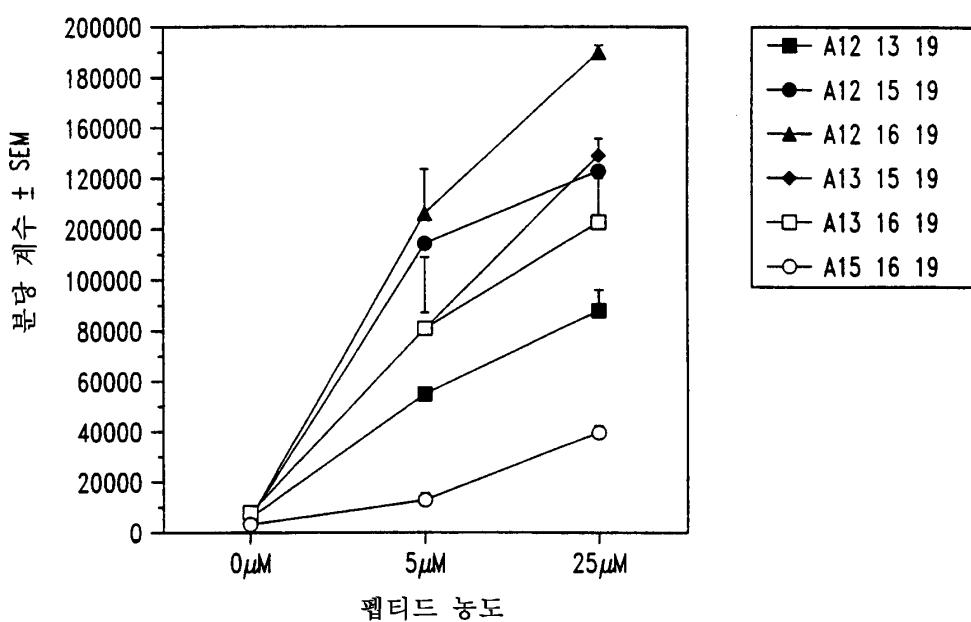
도면 15C



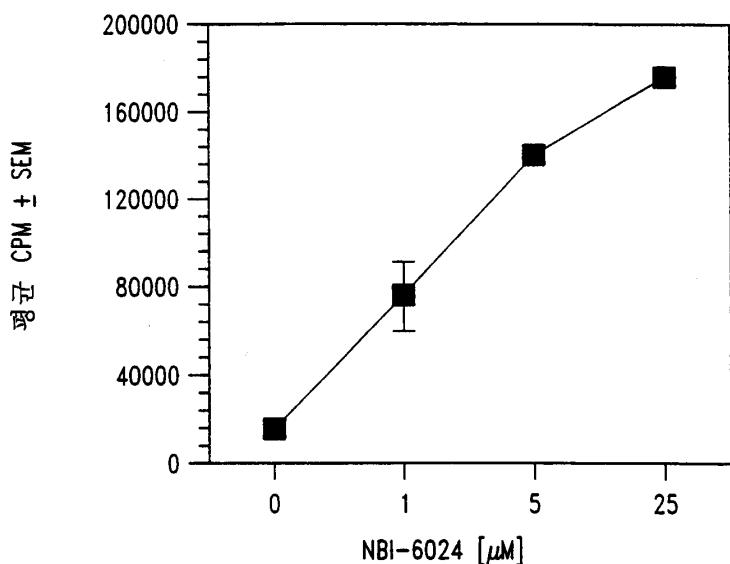
도면 150



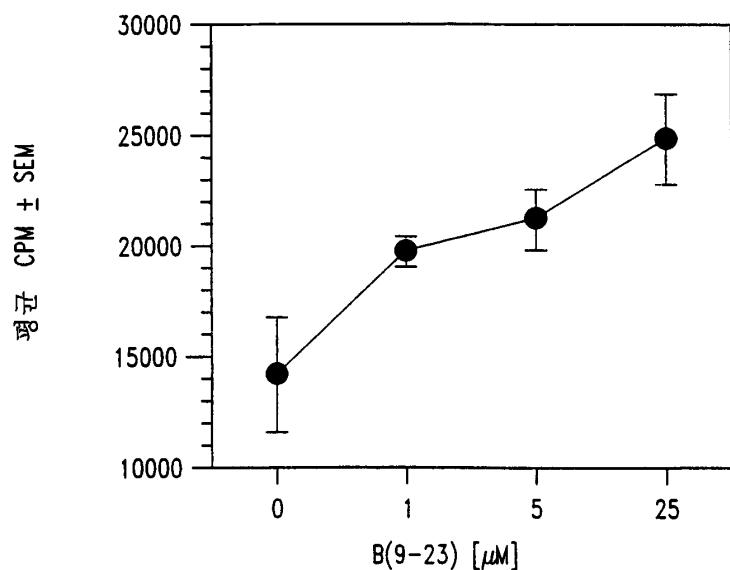
도면 16



도면 17A



도면17B



도면18

