



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0102347
(43) 공개일자 2021년08월19일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/62 (2006.01) A61K 38/28 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07K 14/62 (2013.01)
A61K 38/28 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2021-7021396</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2019년12월10일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2021년07월08일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2019/084427</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2020/120477
국제공개일자 2020년06월18일</p> <p>(30) 우선권주장
18306657.0 2018년12월11일
유럽특허청(EPO)(EP)
(뒷면에 계속)</p> | <p>(71) 출원인
사노피
프랑스 75008 파리 튀 라 보에티에 54</p> <p>(72) 발명자
뵈메, 토마스
독일 65926 프랑크푸르트 암 마인 사노피-아벤티스
스 도이칠란트 게엠베하 내</p> <p>귀스레젠, 스테판
독일 65926 프랑크푸르트 암 마인 사노피-아벤티스
스 도이칠란트 게엠베하 내
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
양영준, 이윤기</p> |
|---|---|

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 인슐린 수용체 결합 친화성이 감소된 인슐린 유사체

(57) 요약

모 인슐린에 비해 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 인슐린 유사체가 본원에서 제공되며, 여기서, 인슐린 유사체는 소수성 아미노산으로 치환된 위치 B16에서의 돌연변이 및/또는 소수성 아미노산으로 치환된 위치 B25에서의 돌연변이를 포함한다.

(52) CPC특허분류

A61P 3/10 (2018.01)

(72) 발명자

코른, 마르쿠스 헤르만

독일 65926 프랑크푸르트 암 마인 사노피-아벤티스
도이칠란트 게엠베하 내

빌, 마르틴

독일 65926 프랑크푸르트 암 마인 사노피-아벤티스
도이칠란트 게엠베하 내

(30) 우선권주장

18306658.8 2018년12월11일

유럽특허청(EPO)(EP)

18306659.6 2018년12월11일

유럽특허청(EPO)(EP)

명세서

청구범위

청구항 1

모 인슐린에 비해 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 인슐린 유사체로서, 인슐린 유사체는 분지쇄 아미노산으로 치환된 위치 B16에서의 돌연변이 및/또는 분지쇄 아미노산으로 치환된 위치 B25에서의 돌연변이를 포함하는, 인슐린 유사체.

청구항 2

제1항에 있어서, 모 인슐린은 인간 인슐린, 돼지 인슐린 또는 소 인슐린인, 인슐린 유사체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 분지쇄 아미노산은 발린(Val), 이소류신(Ile) 및 류신(Leu)으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 인슐린 유사체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 글루탐산(Glu), 아스파르트산(Asp) 및 히스티딘(His)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산으로 치환된 위치 A14에서의 돌연변이를 추가로 포함하는, 인슐린 유사체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 위치 B30에서의 돌연변이를 추가로 포함하는, 인슐린 유사체.

청구항 6

제5항에 있어서, 위치 B30에서의 돌연변이는 모 인슐린의 위치 B30에서의 아미노산의 결실(Des(B30)-돌연변이)인, 인슐린 유사체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 글루탐산(Glu)으로 치환된 위치 B3에서의 돌연변이를 추가로 포함하는, 인슐린 유사체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인슐린은 글리신(Gly)으로 치환된 위치 A21에서의 돌연변이를 추가로 포함하는, 인슐린 유사체.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 인슐린 유사체의 B 사슬은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진, 인슐린 유사체:

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFLYTEPK (서열 번호 22)

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFIYTEPK (서열 번호 44)

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTEPK (서열 번호 48)

FVEQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTEPK (서열 번호 50)

FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYTEPK (서열 번호 58)

FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYTEPK (서열 번호 60)

FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFVYTEPK (서열 번호 64)

FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFVYTEPK (서열 번호 66)

FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFIYTPK (서열 번호 70)
 FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPK (서열 번호 76)
 FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPK (서열 번호 78)
 FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPK (서열 번호 80)
 FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFLYTPKT (서열 번호 85)
 FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPKT (서열 번호 86)
 FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFIYTPKT (서열 번호 87)
 FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPKT (서열 번호 88)
 FVEQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPKT (서열 번호 89)
 FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYTPKT (서열 번호 90)
 FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYTPKT (서열 번호 91)
 FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFVYTPKT (서열 번호 92)
 FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFVYTPKT (서열 번호 93)
 FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFIYTPKT (서열 번호 94)
 FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPKT (서열 번호 95)
 FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPKT (서열 번호 96), 및
 FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPKT (서열 번호 97).

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 다음을 포함하는, 인슐린 유사체:

- (a) 서열 번호 43에 나타난 아미노산 서열(GIVEQCCTSICSLEQLNYCN)을 갖는 A 사슬 및 서열 번호 44에 나타난 아미노산 서열(FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFIYTPK)을 갖는 B 사슬,
- (b) 서열 번호 47에 나타난 아미노산 서열(GIVEQCCTSICSLEQLNYCN)을 갖는 A 사슬 및 서열 번호 48에 나타난 아미노산 서열(FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPK)을 갖는 B 사슬, 또는
- (c) 서열 번호 77에 나타난 아미노산 서열(GIVEQCCTSICSLEQLNYCN)을 갖는 A 사슬 및 서열 번호 78에 나타난 아미노산 서열(FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPK)을 갖는 B 사슬.

청구항 11

다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 인슐린 유사체:

Leu(B16)-인간 인슐린,
 Val(B16)-인간 인슐린,
 Ile(B16)-인간 인슐린,
 Leu(B16)Des(B30)-인간 인슐린,
 Val(B16)Des(B30)-인간 인슐린,
 Ile(B16)Des(B30)-인간 인슐린,
 Leu(B25)-인간 인슐린,
 Val(B25)-인간 인슐린,
 Ile(B25)-인간 인슐린,

Leu(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
 Val(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
 Ile(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
 Glu(A14)Leu(B16)Des(B30)-인간 인슐린,
 Glu(A14)Ile(B16)Des(B30)-인간 인슐린,
 Glu(A14)Val(B16)Des(B30)-인간 인슐린,
 Glu(A14)Leu(B16)-인간 인슐린,
 Glu(A14)Ile(B16)-인간 인슐린,
 Glu(A14)Val(B16)-인간 인슐린,
 Glu(A14)Leu(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
 Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
 Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
 Glu(A14)Leu(B25)-인간 인슐린,
 Glu(A14)Ile(B25)-인간 인슐린,
 Glu(A14)Val(B25)-인간 인슐린,
 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
 Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
 Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
 Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
 Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
 Glu(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
 Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)-인간 인슐린,
 Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)-인간 인슐린,
 Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)-인간 인슐린,
 Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)-인간 인슐린,
 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)-인간 인슐린,
 Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)-인간 인슐린,
 Glu(A14)Val(B16)Val(B25)-인간 인슐린,
 Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-인간 인슐린, 및
 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-인간 인슐린.

청구항 12

모 인슐린의 B 사슬에 비해 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 인슐린 B 사슬로서, B 사슬은 분지쇄 아미노산으로 치환된 위치 B16에서의 돌연변이 및/또는 분지쇄 아미노산으로 치환된 위치 B25에서의 돌연변이를 포함하며,

선택적으로, 상기 인슐린 B 사슬은 위치 B30에서의 돌연변이를 추가로 포함하고, 위치 B30에서의 돌연변이는 모 인슐린의 위치 B30에서의 트레오닌의 결실(Des(B30)-돌연변이)인, 인슐린 B 사슬.

청구항 13

인슐린 A 사슬 및 인슐린 B 사슬을 포함하는 프로인슐린으로서, 인슐린 B 사슬은 모 인슐린의 B 사슬에 비해 하나의 돌연변이를 포함하며, B 사슬은 분지쇄 아미노산으로 치환된 위치 B16에서의 돌연변이 및/또는 분지쇄 아미노산으로 치환된 위치 B25에서의 돌연변이를 포함하고, 선택적으로, 상기 프로인슐린의 인슐린 A 사슬은 글루탐산(Glu), 아스파르트산(Asp) 및 히스티딘(His)으로부터 선택되는 아미노산으로 치환된 위치 A14에서의 돌연변이를 포함하는, 프로인슐린.

청구항 14

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 인슐린 유사체, 제12항의 인슐린 B 사슬, 및/또는 제13항의 프로인슐린을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 15

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 인슐린 유사체, 제12항의 인슐린 B 사슬, 제13항의 프로인슐린 및/또는 제14항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포.

발명의 설명

기술 분야

배경 기술

- [0001] 설명
- [0002] 모 인슐린에 비해 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 인슐린 유사체가 또한 본원에서 제공되며, 여기서, 인슐린 유사체는 소수성 아미노산으로 치환된 위치 B16에서의 돌연변이 및/또는 소수성 아미노산으로 치환된 위치 B25에서의 돌연변이를 포함한다.
- [0003] 배경기술
- [0004] 전 세계적으로, 4억명이 넘는 사람들이 제1형 또는 제2형 진성 당뇨병을 앓고 있다. 제1형 당뇨병은 인슐린 치환으로 치료된다. 제1형 당뇨병과는 대조적으로, 기본적으로 제2형 당뇨병에서는 인슐린 결핍이 없지만, 많은 사례에서, 특히 진행된 병기에서 제2형 당뇨병 환자는 인슐린으로 치료를 받는다.
- [0005] 건강한 사람에서, 췌장에 의한 인슐린의 분비는 혈당 농도에 엄격하게 연계된다. 이와 같은 상승된 혈당 수준은 식사 후에 일어나며, 상응하는 인슐린 분비 증가에 의해 신속하게 보상된다. 공복 상태에서, 혈장 인슐린 수준은 밤중에 간의 포도당 생산을 낮게 유지하고 인슐린-감응성 기관 및 조직에 포도당을 계속 공급하는 것을 보장하기에 적절한 기저 값까지 떨어진다. 종종, 외인성 인슐린에 의한, 주로 인슐린의 피하 투여에 의한 내인성 인슐린 분비의 대체는 상기에 기술된 혈당의 생리적 조절의 품질을 달성하지 못한다. 혈당의 상향 또는 하향 편차가 일어날 수 있고, 이는 가장 심한 형태에서는 생명을 위협할 수 있다. 당뇨병의 개선된 치료법이 일차적으로 혈당을 가능한 한 생리적 범위에 가깝게 유지하는 것을 목표로 하는 것은 이로부터 비롯된다.
- [0006] 인간 인슐린은 51개 아미노산의 폴리펩티드이며, 이는 2개의 아미노산 사슬, 즉, 21개의 아미노산을 갖는 A 사슬 및 30개의 아미노산을 갖는 B 사슬로 나뉘어진다. 상기 사슬들은 2개의 디설피드 가교체에 의해 서로 연결된다. 제3 디설피드 가교체는 A 사슬의 위치 6 및 11에서의 시스테인들 사이에 존재한다. 진성 당뇨병 치료를 위해 현재 사용 중인 일부 제품은 인슐린 유사체, 즉, A 사슬 및/또는 B 사슬에서의 하나 이상의 아미노산 치환에 의해 인간 인슐린과 서열이 다른 인슐린 변이체이다.
- [0007] 다른 많은 펩티드 호르몬과 마찬가지로 인간 인슐린은 생체 내 반감기가 짧다. 따라서 이것은 빈번하게 투여되며, 이는 환자의 불편함과 결부된다. 따라서, 증가된 생체 내 반감기 및 이에 따른 장기적 작용 지속 기간을 갖는 인슐린 유사체가 요구된다.

- [0008] 현재 인슐린의 반감기를 연장하기 위한 여러 가지 접근법이 있다.
- [0009] 하나의 접근법은 낮은 pH에서 가용성인 제형의 개발을 기반으로 하지만 이는 생리학적 pH에서 천연 인슐린에 비해 용해도가 감소된다. 상기 인슐린 유사체의 등전점은 B 사슬의 C-말단에 2개의 아르기닌을 부가함으로써 증가된다. A21(인슐린 글라진)에서 글리신 치환과 조합된 2개의 아르기닌의 부가는 작용 지속 기간이 연장된 인슐린을 제공한다. 상기 인슐린 유사체는 피하 부위에 주사할 때 아연의 존재 하에 침전되고 서서히 용해되어 인슐린 글라진이 지속적으로 존재하게 된다.
- [0010] 또 다른 접근법에서, 장쇄 지방산 기가 인슐린의 LysB29의 앵실론 아미노 기에 콘주게이션된다. 이 기의 존재는 비공유, 가역성 결합에 의해 인슐린이 혈청 알부민에 부착되도록 한다. 결과적으로, 이 인슐린 유사체는 인간 인슐린에 비해 유의하게 연장된 시간-작용 프로파일을 갖는다(예를 들어, 문헌[Mayer et al., Inc. Biopolymers (Pept Sci) 88: 687-713, 2007]; 또는 WO 2009/115469 참조).
- [0011] WO 2016/006963에는 인간 인슐린과 비교하여 감소된 인슐린 수용체-매개 제거율을 갖는 인슐린 유사체가 개시되어 있다.
- [0012] WO 2018/056764에는 인간 인슐린과 비교하여 감소된 인슐린 수용체-매개 제거율을 갖는 인슐린 유사체가 개시되어 있다.
- [0013] WO 2008/034881에는 프로테아제 안정화 인슐린 유사체가 개시되어 있다.
- [0014] 약물의 작용 지속 기간을 증가시키기 위해서는 반감기가 중요한 역할을 한다. 반감기($t_{1/2}$)는 분배 부피를 제거율로 나눈 것에 비례한다. 인간 인슐린의 경우, 제거는 주로 인슐린 수용체에 대한 결합, 내재화 및 후속 분해에 의해 주도된다.
- [0015] 따라서, 인슐린 수용체 결합 활성이 감소하여 수용체 매개 제거율이 감소되지만 신호 전달 활성은 갖고, 생체 내에서 혈당 수준을 충분히 낮출 수 있는 인슐린 유사체가 필요하다.

발명의 내용

- [0016] 여전히 높은 신호 전달성을 유지하면서 매우 낮은 결합 친화도(따라서 더 낮은 제거율)를 갖는 지속성 인슐린 유사체가 본원에서 제공된다.
- [0017] 놀랍게도, 인간 인슐린의 위치 B16 및/또는 B25에서 소수성 아미노산(예컨대 류신, 이소류신, 발린, 알라닌 및 트립토판)으로의 치환이 인슐린 수용체 결합 활성의 감소를 초래함(모 인슐린의 인슐린 수용체 결합 활성과 비교하여(실시에 참조))이 본 발명의 기저를 이루는 연구의 맥락에서 밝혀졌다. 인슐린 수용체 결합 활성에 대한 가장 강력한 효과는 분지쇄 아미노산(류신, 이소류신 및 발린)으로의 치환에서 관찰되었다. 흥미롭게도, 이들 위치(예컨대 위치 B25)에서 이러한 치환을 갖는 인슐린 유사체는 인슐린 수용체 이소형 B(IR-B) 결합 친화도를 기반으로 하여 예상되는 것보다 최대 6배의 신호 전달 향상을 나타냈다(실시에 참조). 또한, 일부 테스트된 인슐린 유사체는 α -키모트립신, 카텝신 D 및 인슐린 분해 효소에 대해 개선된 단백질 분해 안정성을 나타냈다(실시에 참조).
- [0018] 따라서, 모 인슐린에 비해 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 인슐린 유사체가 또한 본원에서 제공되며, 여기서, 인슐린 유사체는 소수성 아미노산으로 치환된 위치 B16에서의 돌연변이 및/또는 소수성 아미노산으로 치환된 위치 B25에서의 돌연변이를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 모 인슐린에 비해 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 인슐린 유사체가 제공되며, 여기서, 인슐린 유사체는 분지쇄 아미노산으로 치환된 위치 B16에서의 돌연변이 및/또는 분지쇄 아미노산으로 치환된 위치 B25에서의 돌연변이를 포함한다.
- [0019] 본원에서 사용되는 바와 같이, 표현 "인슐린 유사체"는 자연 발생 인슐린에서 나타나는 적어도 하나의 아미노산 잔기를 결실시키고/시키거나 치환함으로써 및/또는 적어도 하나의 아미노산 잔기를 부가함으로써 자연 발생 인슐린(본원에서 "모 인슐린"으로도 지칭됨, 예를 들어 인간 인슐린)의 구조로부터 공식적으로 유도될 수 있는 분자 구조를 갖는 펩티드를 지칭한다. 부가된 및/또는 교환된 아미노산 잔기는 코딩가능 아미노산 잔기 또는 기타 자연 발생 잔기 또는 순수 합성 아미노산 잔기일 수 있다. 본원에서 언급되는 바와 같은 유사체는 생체 내에서, 예컨대 인간 대상체에서 혈당 수준을 저하시킬 수 있다.
- [0020] 일부 실시 형태에서, 본원에서 제공되는 인슐린 유사체는 2개의 펩티드 사슬, A-사슬 및 B-사슬을 포함한다. 전형적으로, 상기 두 사슬은 시스테인 잔기들 사이의 디설피드 가교체로 연결된다. 예를 들어, 일부 실시 형태에서, 본원에서 제공된 인슐린 유사체는 다음의 3개의 디설피드 가교체를 포함한다: 위치 A6 및 A11에서의 시스테인

인들 사이의 하나의 디숄퍼드 가교체, A-사슬의 위치 A7에서의 시스테인과 B-사슬의 위치 B7에서의 시스테인 사이의 하나의 디숄퍼드 가교체, A-사슬의 위치 A20에서의 시스테인과 B-사슬의 위치 B19에서의 시스테인 사이의 하나. 따라서, 본원에서 제공된 인슐린 유사체는 위치 A6, A7, A11, A20, B7 및 B19에서 시스테인 잔기를 포함할 수 있다.

[0021] 본원에서 제공된 일부 실시 형태에서, 인슐린 유사체는 단일-사슬 인슐린이다. 단일-사슬 인슐린은 인슐린 B-사슬이 비절단 연결 펩티드를 통하여 인슐린 A-사슬과 인접하게 연결된 단일 폴리펩티드 사슬이다.

[0022] 본원에서 인슐린의 돌연변이, 즉, 모 인슐린의 돌연변이는 사슬, 즉 유사체의 A-사슬 또는 B-사슬, A- 또는 B-사슬에서의 돌연변이된 아미노산 잔기의 위치(예컨대 A14, B16 및 B25) 및 모 인슐린의 천연 아미노산을 치환하는 아미노산의 3문자 코드에 의해 표시된다. 용어 "desB30"은 모 인슐린으로부터 B30 아미노산이 결여된 유사체를 지칭한다(즉, 위치 B30에서의 아미노산이 부재함). 예를 들어, Glu(A14)Ile(B16)desB30 인간 인슐린은 인간 인슐린의 A-사슬의 위치 14(A14)에서의 아미노산 잔기가 글루탐산으로 치환되고, B-사슬의 위치 16(B16)에서의 아미노산 잔기가 이소류신으로 치환되고, B-사슬의 위치 30에서의 아미노산이 결실된(즉, 부재하는) 인간 인슐린의 유사체이다.

[0023] 본원에서 제공된 인솔린 유사체는 모 인솔린에 비해 하나 이상의 돌연변이(아미노산의 치환, 결실 또는 부가)를 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "적어도 하나"는 하나 또는 하나 초과, 예컨대 "적어도 2", "적어도 3", "적어도 4", "적어도 5" 등을 의미한다. 일부 실시 형태에서 본원에서 제공된 인솔린 유사체는 B-사슬에서 적어도 하나의 돌연변이 및 A-사슬에서 적어도 하나의 돌연변이를 포함한다. 추가 실시 형태에서, 본원에서 제공된 인솔린 유사체는 B-사슬에서 적어도 2개의 돌연변이 및 A-사슬에서 적어도 하나의 돌연변이를 포함한다. 예를 들어, 인솔린 유사체는 위치 B16에서의 치환, 위치 B30에서의 결실 및 위치 A14에서의 치환을 포함할 수 있다. 대안적으로, 인솔린 유사체는 위치 B25에서의 치환, 위치 B30에서의 결실 및 위치 A14에서의 치환을 포함할 수 있다. 또한, 인솔린 유사체는 위치 B16에서의 치환, 위치 B25에서의 치환, 위치 B30에서의 결실 및 위치 A14에서의 치환을 포함할 수 있다.

[0024] 본원에서 제공된 인술린 유사체는 상기 돌연변이 외의 돌연변이를 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이의 수는 특정 수를 초과하지 않는다. 일부 실시 형태에서, 인술린 유사체는 모 인술린에 비해 12개 미만의 돌연변이(즉, 결실, 치환, 부가)를 포함한다. 또 다른 실시 형태에서, 유사체는 모 인술린에 비해 10개 미만의 돌연변이를 포함한다. 또 다른 실시 형태에서, 유사체는 모 인술린에 비해 8개 미만의 돌연변이를 포함한다. 또 다른 실시 형태에서, 유사체는 모 인술린에 비해 7개 미만의 돌연변이를 포함한다. 또 다른 실시 형태에서, 유사체는 모 인술린에 비해 6개 미만의 돌연변이를 포함한다. 또 다른 실시 형태에서, 유사체는 모 인술린에 비해 5개 미만의 돌연변이를 포함한다. 또 다른 실시 형태에서, 유사체는 모 인술린에 비해 4개 미만의 돌연변이를 포함한다. 또 다른 실시 형태에서, 유사체는 모 인술린에 비해 3개 미만의 돌연변이를 포함한다.

[0025] 본원에서 사용되는 바와 같이, 표현 "모 인슐린"은 자연 발생 인슐린, 즉 돌연변이되지 않은 야생형 인슐린을 지칭한다. 일부 실시 형태에서, 모 인슐린은 포유 동물 인슐린과 같은 동물 인슐린이다. 예를 들어, 모 인슐린은 인간 인슐린, 돼지 인슐린 또는 소 인슐린일 수 있다.

[0026] 일부 실시 형태에서, 모 인슐린은 인간 인슐린이다. 인간 인슐린의 서열은 당업계에서 잘 알려져 있으며, 실시예 섹션의 표 1에 예시되어 있다. 인간 인슐린은 서열 번호 1에 나타난 아미노산 서열(GIVEQCCTSI~~CS~~LYQLENYCN)을 갖는 A 사슬 및 서열 번호 2에 나타난 아미노산 서열(FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT)을 갖는 B 사슬을 포함한다.

[0027] 또 다른 실시 형태에서, 모 인슐린은 소 인슐린이다. 소 인슐린의 서열은 당업계에서 잘 알려져 있다. 소 인슐린은 서열 번호 81에 나타난 아미노산 서열(GIVEQCCASVCSLYQLNYCN)을 갖는 A 사슬 및 서열 번호 82에 나타난 아미노산 서열(FVNQHLGSHLVEALYLVC-GERGFFYTPKA)을 갖는 B 사슬을 포함한다.

[0028] 또 다른 실시 형태에서, 모 인슐린은 돼지 인슐린이다. 돼지 인슐린의 서열은 당업계에서 잘 알려져 있다. 돼지 인슐린은 서열 번호 83에 나타난 아미노산 서열(GIVEQCCTSICSLYQLENYCN)을 갖는 A 사슬 및 서열 번호 84에 나타난 아미노산 서열(FVNQHLCGSHLVEALYLVC GERGFFYYTPKA)을 갖는 B 사슬을 포함한다.

[0029] 인간, 소, 및 돼지 인슐린은 다음의 3개의 디설피드 가교체를 포함한다: 위치 A6 및 A11에서의 시스테인들 사이의 하나의 디설피드 가교체, A-사슬의 위치 A7에서의 시스테인과 B-사슬의 위치 B7에서의 시스테인 사이의 하나의 디설피드 가교체, 및 A-사슬의 위치 A20에서의 시스테인과 B-사슬의 위치 B19에서의 시스테인 사이의 하나.

[0030] 본원에서 제공되는 인슐린 유사체는 상응하는 모 인슐린, 예를 들어 인간 인슐린의 인슐린 수용체 결합 친화도

와 비교하여 감소된 인슐린 수용체 결합 친화도를 갖는다.

- [0031] 인슐린 수용체는 소, 돼지 또는 인간 인슐린 수용체와 같은 임의의 포유 동물 인슐린 수용체일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 인슐린 수용체는 인간 인슐린 수용체, 예를 들어 인간 인슐린 수용체 이소형 A 또는 인간 인슐린 수용체 이소형 B(실시에 섹션에서 사용됨)이다.
- [0032] 유리하게는, 본원에서 제공되는 인간 인슐린 유사체는 인간 인슐린 수용체에 대한 인간 인슐린의 결합 친화도와 비교하여 인간 인슐린 수용체에 대한 결합 친화도가 상당히 감소된다(실시에 참조). 따라서 인슐린 유사체는 매우 낮은 제거율, 즉 매우 낮은 인슐린 수용체 매개 제거율을 갖는다.
- [0033] 일부 실시 형태에서, 인슐린 유사체는 모 인슐린과 비교하여 상응하는 인슐린 수용체에 대하여 20% 미만의 결합 친화도를 갖는다(즉, 나타낸다). 또 다른 실시 형태에서, 본원에서 제공되는 인슐린 유사체는 그의 모 인슐린과 비교하여 상응하는 인슐린 수용체에 대하여 10% 미만의 결합 친화도를 갖는다. 또 다른 실시 형태에서, 본원에서 제공되는 인슐린 유사체는 그의 모 인슐린과 비교하여 상응하는 인슐린 수용체에 대하여 5% 미만의 결합 친화도, 예컨대 그의 모 인슐린과 비교하여 3% 미만의 결합 친화도를 갖는다. 예를 들어, 본원에서 제공되는 인슐린 유사체는 그의 모 인슐린과 비교하여 상응하는 인슐린 수용체에 대하여 0.1% 내지 10%, 예컨대 0.3% 내지 5%의 결합 친화도를 가질 수 있다. 또한, 본원에서 제공되는 인슐린 유사체는 그의 모 인슐린과 비교하여 상응하는 인슐린 수용체에 대하여 0.5% 내지 3%, 예컨대 0.5% 내지 2%의 결합 친화도를 가질 수 있다.
- [0034] 인슐린 수용체에 대한 인슐린 유사체의 결합 친화도의 결정 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 인슐린 수용체 결합 친화도는 인슐린 수용체에 대한 [125I]-표지 모 인슐린, 예컨대 [125I]-표지 인간 인슐린과 (비표지) 인슐린 유사체 사이의 경쟁적 결합의 평가를 기반으로 한 신틸레이션 근접성 분석에 의해 결정될 수 있다. 인슐린 수용체는 세포, 예를 들어 CHO(중국 햄스터 난소) 세포(이는 재조합 인슐린 수용체를 과다발현함)의 막에 존재할 수 있다. 일 실시 형태에서, 인슐린 수용체 결합 친화도는 실시에 섹션에 기술된 바와 같이 결정된다.
- [0035] 자연 발생 인슐린 또는 인슐린 유사체가 인슐린 수용체에 결합하면 인슐린 신호 전달 경로가 활성화된다. 인슐린 수용체는 티로신 키나아제 활성을 갖고 있다. 인슐린이 그의 수용체에 결합하면 티로신 잔기에서의 수용체의 자가인산화를 자극하는 형태 변화가 유도된다. 인슐린 수용체의 자가인산화는 신호 전달과 관련된 세포내 기질에 대한 상기 수용체의 티로신 키나아제 활성을 자극한다. 따라서 인슐린 유사체에 의한 인슐린 수용체의 자가인산화는 상기 유사체에 의해 야기되는 신호 전달을 위한 척도로 간주된다.
- [0036] 실시에 섹션의 표 1의 인슐린 유사체가 자가인산화 분석에 적용되었다. 흥미롭게도, 위치 B16 및 B25에서 지방족 치환을 갖는 인슐린 유사체는 인슐린 수용체 결합 친화도를 기반으로 하면 예상보다 더 높은 인슐린 수용체 자가인산화를 야기하였다. 따라서, 본원에서 제공되는 인슐린 유사체는 낮은 결합 활성 및 결과적으로 더 낮은 수용체-매개 제거율을 갖지만 그럼에도 불구하고 비교적 높은 신호 전달을 야기할 수 있다. 따라서, 본원에서 제공되는 인슐린 유사체는 지속성 인슐린으로 사용될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 본원에서 제공되는 인슐린 유사체는 모 인슐린(예컨대 인간 인슐린)에 비해 1 내지 10%, 예컨대 2 내지 8%의 인슐린 수용체 자가인산화의 유도가 가능하다. 또한, 일부 실시 형태에서, 본원에서 제공되는 인슐린 유사체는 모 인슐린(예컨대 인간 인슐린)에 비해 3 내지 7%, 예컨대 5 내지 7%의 인슐린 수용체 자가인산화의 유도가 가능하다. 모 인슐린에 대한 인슐린 수용체 자가인산화는 실시에 섹션에 기술된 바와 같이 결정될 수 있다.
- [0037] 본원에서 제공되는 인슐린 유사체를 프로테아제 안정성 분석에 적용하였다. 표 3에 나타낸 바와 같이, 본원에서 제공되는 인슐린 유사체는 인간 인슐린과 비교하여 테스트된 프로테아제 중 적어도 일부에 대해 더 높은 안정성을 가졌다. α -키모트립신, 카텝신 D 및 인슐린 분해 효소(IDE)에 대해 개선된 단백질 분해 안정성이 관찰되었다. 따라서, 본원에서 제공되는 인슐린 유사체는 전형적으로 단백질 분해적으로 안정한 인슐린 유사체이다. 따라서, 이것은 모 인슐린에 비해 프로테아제에 의해 더 느리게 분해된다. 일부 실시 형태에서, 본원에서 제공되는 인슐린 유사체는 모 인슐린과 비교하여 α -키모트립신, 카텝신 D 및 인슐린 분해 효소(IDE)에 의한 분해에 대해 안정화된다.
- [0038] 상기 기재된 바와 같이, 인슐린 유사체는 모 인슐린과 비교하여 적어도 하나의 돌연변이를 포함한다.
- [0039] 일부 실시 형태에서, 본원에서 제공되는 인슐린 유사체는 소수성 아미노산으로 치환된 위치 B16에서의 돌연변이를 포함한다. 따라서 위치 B16에서의 아미노산(인간, 소 및 돼지 인슐린에서 티로신)은 소수성 아미노산으로 대체된다.
- [0040] 또 다른 실시 형태에서, 본원에서 제공되는 인슐린 유사체는 소수성 아미노산으로 치환된 위치 B25에서의 돌연

변이를 포함한다. 따라서 위치 B25에서의 아미노산(인간, 소 및 돼지 인슐린에서 페닐알라닌)은 소수성 아미노산으로 대체된다.

- [0041] 또 다른 실시 형태에서, 본원에서 제공되는 인슐린 유사체는 소수성 아미노산으로 치환된 위치 B16에서의 돌연변이 및 소수성 아미노산으로 치환된 위치 B25에서의 돌연변이를 포함한다.
- [0042] 소수성 아미노산은 임의의 소수성 아미노산일 수 있다. 예를 들어, 소수성 아미노산은 분지쇄 아미노산과 같은 지방족 아미노산일 수 있다.
- [0043] 본원에서 제공되는 인슐린 유사체의 일부 실시 형태에서, 위치 B16 및/또는 B25에서의 치환에 사용되는 소수성 아미노산은 이소류신, 발린, 류신, 알라닌, 트립토판, 메티오닌, 프롤린, 글리신, 페닐알라닌 또는 티로신(또는 전술한 아미노산의 유도체)이다.
- [0044] 몇몇 모 인슐린, 예컨대 인간, 소 및 돼지 인슐린은 위치 B16에서의 티로신 및 위치 B25에서의 페닐알라닌을 포함한다. 따라서, 모 인슐린의 위치 B16에서의 아미노산은 이소류신, 발린, 류신, 알라닌, 트립토판, 메티오닌, 프롤린, 글리신 또는 페닐알라닌(또는 전술한 아미노산의 유도체)으로 치환될 수 있다. 또한, 모 인슐린의 위치 B25에서의 아미노산은 이소류신, 발린, 류신, 알라닌, 트립토판, 메티오닌, 프롤린, 글리신 또는 티로신(또는 전술한 아미노산의 유도체)으로 치환될 수 있다.
- [0045] 전술한 아미노산의 유도체는 당업계에 공지되어 있다.
- [0046] 류신의 유도체는 호모-류신 및 tert-류신을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 따라서, 위치 B16 및/또는 B25에서의 아미노산은 호모-류신 또는 tert-류신으로 치환될 수 있다.
- [0047] 발린의 유도체는 예를 들어 3-에틸 노르발린이다. 따라서, 위치 B16 및/또는 B25에서의 아미노산은 3-에틸 노르발린으로 치환될 수 있다.
- [0048] 글리신의 유도체는 시클로헥실-글리신 시클로프로필글리신 및 트리플루오르에틸글리신을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.
- [0049] 알라닌의 유도체는 베타-t-부틸알라닌, 시클로부틸-알라닌, 시클로프로필-알라닌 및 호모-시클로헥실알라닌을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.
- [0050] 일부 실시 형태에서, 위치 B16 및/또는 B25에서의 치환에 사용되는 소수성 아미노산은 이소류신, 발린, 류신, 알라닌 또는 트립토판이다.
- [0051] 일부 실시 형태에서, 지방족 아미노산은 알라닌이 아니다. 따라서, 위치 B16 및/또는 B25에서의 치환에 사용되는 소수성 아미노산은 이소류신, 발린, 류신 또는 트립토판일 수 있다.
- [0052] 일부 실시 형태에서, 위치 B16 및/또는 B25에서의 치환에 사용되는 소수성 아미노산은 이소류신, 발린 또는 류신이다.
- [0053] 일부 실시 형태에서, 본원에서 언급된 아미노산은 L-아미노산(예컨대 L-이소류신, L-발린 또는 L-류신)이다. 따라서, 예를 들어 위치 B16, B25 및/또는 A14에서의 치환에 사용되는 아미노산(또는 이의 유도체)은 전형적으로 L-아미노산이다.
- [0054] 일부 실시 형태에서, 소수성 아미노산은 지방족 아미노산이다. 따라서, 본원에서 제공되는 인슐린 유사체는 지방족 아미노산으로 치환된 위치 B16에서의 돌연변이 및 지방족 아미노산으로 치환된 위치 B25에서의 돌연변이(및 선택적으로 Des(B30) 및 Glu(A14)를 포함하지만 이에 한정되지 않는 추가 돌연변이)를 포함한다.
- [0055] 지방족 아미노산은 지방족 측쇄 작용기를 포함하는 비극성 및 소수성 아미노산이다. 탄화수소 사슬의 탄소 원자 수가 증가하면 소수성이 증가한다. 지방족의 소수성의 척도는 예를 들어 문헌[Kyte J. *et al.* Journal of Molecular Biology. 1982 157 (1): 105-32]에 개시된 바와 같이 결정될 수 있는 카이트(Kyte) 및 둘리틀(Doolittle) 척도에 따른 소수성 지표이다. 일부 실시 형태에서, 지방족 아미노산은 2.0 초과, 예컨대 3.0 초과 또는 3.5 초과인 소수성 지표(카이트 및 둘리틀 척도에 따름)를 갖는 지방족 아미노산이다.
- [0056] 지방족 아미노산은 이소류신, 발린, 류신, 알라닌 및 글리신을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 지방족 아미노산은 이소류신, 발린, 류신 및 글리신으로부터 선택되는 아미노산, 예컨대 이소류신, 발린 및 류신으로부터 선택되는 아미노산일 수 있다.
- [0057] 이소류신, 발린 및 류신은 분지쇄 아미노산(BCAA로 약칭됨)이다. 따라서, 지방족 아미노산은 분지쇄 아미노산일

수 있다. 일부 실시 형태에서, 본원에서 제공되는 인슐린 유사체는 분지쇄 아미노산으로 치환된 위치 B16에서의 돌연변이 및 분지쇄 아미노산으로 치환된 위치 B25에서의 돌연변이(및 선택적으로 Des(B30) 및 Glu(A14)를 포함하지만 이에 한정되지 않는 추가 돌연변이)를 포함한다.

- [0058] BCAA는 이소류신, 발린 및 류신과 같은 아미노산이며, 비선형인 지방족 측쇄를 갖는 아미노산이며, 즉, 분지쇄 아미노산은 분지(중심 탄소 원자가 3개 이상의 탄소 원자에 결합됨)가 있는 지방족 측쇄를 갖는 아미노산이다.
- [0059] 분지쇄 아미노산은 단백질 생성 BCAA, 즉 번역 동안 단백질 내에 생합성적으로 혼입되는 아미노산, 또는 단백질 비생성 BCAA, 즉 자연적으로는 코딩되지 않거나 임의의 유기체의 유전자 암호에서 발견되지 않는 아미노산일 수 있다. 예를 들어, 단백질 생성 BCAA는 류신, 이소류신 및 발린이다. 따라서, 소수성/지방족 아미노산 분지쇄 아미노산은 류신, 이소류신 또는 발린(또는 류신, 이소류신 또는 발린의 유도체, 예컨대 상기 기재된 류신 또는 발린의 유도체)일 수 있다.
- [0060] 일부 실시 형태에서, 분지쇄 아미노산은 이소류신이다.
- [0061] 일부 실시 형태에서, 분지쇄 아미노산은 발린이다.
- [0062] 일부 실시 형태에서, 분지쇄 아미노산은 류신이다.
- [0063] 상기에 기술된 바와 같은 위치 B16에서의 돌연변이 및/또는 위치 B25에서의 돌연변이에 더하여, 본원에서 제공되는 인슐린 유사체는 모 인슐린에 대하여 추가 돌연변이를 포함할 수 있다.
- [0064] 예를 들어, 인슐린 유사체는 위치 A14에서의 돌연변이를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 돌연변이는 프로테아제 안정성을 증가시키는 것으로 알려져 있다(예를 들어 WO 2008/034881 참조). 일부 실시 형태에서, 위치 A14에서의 아미노산은 글루탐산(Glu)으로 치환된다. 일부 실시 형태에서, 위치 A14에서의 아미노산은 아스파르트산(Asp)으로 치환된다. 일부 실시 형태에서, 위치 A14에서의 아미노산은 히스티딘(His)으로 치환된다.
- [0065] 또한, 본원에 제공된 인슐린 유사체는 위치 B30에서의 돌연변이를 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 위치 B30에서의 돌연변이는 모 인슐린의 위치 B30에서의 트레오닌의 결실(Des(B30)-돌연변이로도 지칭됨)이다.
- [0066] 또한, 본 발명의 인슐린 유사체는 글루탐산(Glu)으로 치환된 위치 B3에서의 돌연변이 및/또는 글리신(Gly)으로 치환된 위치 A21에서의 돌연변이를 추가로 포함할 수 있다.
- [0067] 일 실시 형태에서, 본 발명의 인슐린 유사체의 B 사슬은 서열 번호 22에 나타난 아미노산 서열 (FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFLYTEPK)을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0068] 또 다른 실시 형태에서, 본 발명의 인슐린 유사체의 B 사슬은 서열 번호 24에 나타난 아미노산 서열 (FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTEPK)을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0069] 또 다른 실시 형태에서, 본 발명의 인슐린 유사체의 B 사슬은 서열 번호 44에 나타난 아미노산 서열 (FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFITYTEPK)을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0070] 또 다른 실시 형태에서, 본 발명의 인슐린 유사체의 B 사슬은 서열 번호 48에 나타난 아미노산 서열 (FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTEPK)을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0071] 또 다른 실시 형태에서, 본 발명의 인슐린 유사체의 B 사슬은 서열 번호 50에 나타난 아미노산 서열 (FVEQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTEPK)을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0072] 또 다른 실시 형태에서, 본 발명의 인슐린 유사체의 B 사슬은 서열 번호 58에 나타난 아미노산 서열 (FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFITYTEPK)을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0073] 또 다른 실시 형태에서, 본 발명의 인슐린 유사체의 B 사슬은 서열 번호 60에 나타난 아미노산 서열 (FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFITYTEPK)을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0074] 또 다른 실시 형태에서, 본 발명의 인슐린 유사체의 B 사슬은 서열 번호 64에 나타난 아미노산 서열 (FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFVYTEPK)을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0075] 또 다른 실시 형태에서, 본 발명의 인슐린 유사체의 B 사슬은 서열 번호 66에 나타난 아미노산 서열 (FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFVYTEPK)을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0076] 또 다른 실시 형태에서, 본 발명의 인슐린 유사체의 B 사슬은 서열 번호 70에 나타난 아미노산 서열 (FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFITYTEPK)을 포함하거나 이로 이루어진다.

- [0077] 또 다른 실시 형태에서, 본 발명의 인슐린 유사체의 B 사슬은 서열 번호 78에 나타난 아미노산 서열 (FVEQHLCGSHLVEALVLCGERGFVYTPK)을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0078] 또 다른 실시 형태에서, 본 발명의 인슐린 유사체의 B 사슬은 서열 번호 80에 나타난 아미노산 서열 (FVEQHLCGSHLVEALVLCGERGFVYTPK)을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0079] 상기에 요약된 B 사슬은 Des(B30) 돌연변이를 포함한다. 따라서 모 인슐린의 위치 B30에 존재하는 아미노산(인간 인슐린의 트레오닌, 돼지 및 소 인슐린의 알라닌)이 결실된다(즉, 존재하지 않는다). 그러나, 본 발명의 유사체의 B 사슬은 이러한 돌연변이를 포함하지 않을 것으로(즉, 위치 30에서 트레오닌을 포함할 것으로) 또한 예상된다. 따라서, 본 발명의 인슐린 유사체의 B 사슬은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다:
- [0080] · FVNQHLCGSHLVEALVLCGERGFYTPKT (서열 번호 85)
 - [0081] · FVNQHLCGSHLVEALVLCGERGFVYTPKT (서열 번호 86)
 - [0082] · FVNQHLCGSHLVEALVLCGERGFYTPKT (서열 번호 87)
 - [0083] · FVNQHLCGSHLVEALVLCGERGFVYTPKT (서열 번호 88)
 - [0084] · FVEQHLCGSHLVEALVLCGERGFVYTPKT (서열 번호 89)
 - [0085] · FVNQHLCGSHLVEALILVLCGERGFYTPKT (서열 번호 90)
 - [0086] · FVEQHLCGSHLVEALILVLCGERGFYTPKT (서열 번호 91)
 - [0087] · FVNQHLCGSHLVEALILVLCGERGFVYTPKT (서열 번호 92)
 - [0088] · FVEQHLCGSHLVEALILVLCGERGFVYTPKT (서열 번호 93)
 - [0089] · FVNQHLCGSHLVEALVLCGERGFYTPKT (서열 번호 94)
 - [0090] · FVNQHLCGSHLVEALVLCGERGFVYTPKT (서열 번호 95)
 - [0091] · FVEQHLCGSHLVEALVLCGERGFVYTPKT (서열 번호 96)
 - [0092] · FVEQHLCGSHLVEALVLCGERGFVYTPKT (서열 번호 97)
- [0093] 일 실시 형태에서, 본 발명의 인슐린 유사체의 A 사슬은 서열 번호 1에 나타난 아미노산 서열 (GIVEQCCTSICSLYQLENYCN)을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0094] 또 다른 실시 형태에서, 본 발명의 인슐린 유사체의 A 사슬은 서열 번호 43에 나타난 아미노산 서열 (GIVEQCCTSICSLYQLENYCN)을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0095] 또 다른 실시 형태에서, 본 발명의 인슐린 유사체의 A 사슬은 서열 번호 45에 나타난 아미노산 서열 (GIVEQCCTSICSLYQLENYCG)을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0096] 전형적으로, 본 발명의 인슐린 유사체는 위에 기재된 바와 같이 A-사슬 및 B-사슬을 포함한다.
- [0097] 예를 들어, 본 발명의 인슐린 유사체는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:
- [0098] Leu(B16)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린, 즉 Leu(B16)-인간 인슐린),
 - [0099] Val(B16)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린, 즉 Val(B16)-인간 인슐린),
 - [0100] Ile(B16)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
 - [0101] Leu(B16)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
 - [0102] Val(B16)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
 - [0103] Ile(B16)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
 - [0104] Leu(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
 - [0105] Val(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),

- [0106] Ile(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0107] Leu(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0108] Val(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0109] Ile(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0110] Glu(A14)Leu(B16)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0111] Glu(A14)Ile(B16)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0112] Glu(A14)Val(B16)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0113] Glu(A14)Leu(B16)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0114] Glu(A14)Ile(B16)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0115] Glu(A14)Val(B16)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0116] Glu(A14)Leu(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0117] Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0118] Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0119] Glu(A14)Leu(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0120] Glu(A14)Ile(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0121] Glu(A14)Val(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0122] Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0123] Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0124] Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0125] Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0126] Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0127] Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0128] Glu(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0129] Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0130] Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0131] Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0132] Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0133] Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0134] Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0135] Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0136] Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0137] Glu(A14)Val(B16)Val(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0138] Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린), 및
- [0139] Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린).
- [0140] 또 다른 실시 형태에서, 본원에서 제공되는 인슐린 유사체는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:
- [0141] Asp(A14)Leu(B16)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린, 즉 Asp(A14)Leu(B16)Des(B30)-인간 인슐린),

- [0142] Asp(A14)Ile(B16)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0143] Asp(A14)Val(B16)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0144] Asp(A14)Leu(B16)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0145] Asp(A14)Ile(B16)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0146] Asp(A14)Val(B16)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0147] Asp(A14)Leu(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0148] Asp(A14)Ile(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0149] Asp(A14)Val(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0150] Asp(A14)Leu(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0151] Asp(A14)Ile(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0152] Asp(A14)Val(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0153] Asp(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0154] Asp(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0155] Asp(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0156] Asp(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0157] Asp(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0158] Asp(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0159] Asp(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0160] Asp(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0161] Asp(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0162] Asp(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0163] Asp(A14)Ile(B16)Ile(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0164] Asp(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0165] Asp(A14)Ile(B16)Val(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0166] Asp(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0167] Asp(A14)Val(B16)Ile(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0168] Asp(A14)Val(B16)Val(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0169] Asp(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린), 및
- [0170] Asp(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린).
- [0171] 또 다른 실시 형태에서, 본원에서 제공되는 인슐린 유사체는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:
- [0172] His(A14)Leu(B16)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0173] His(A14)Ile(B16)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0174] His(A14)Val(B16)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0175] His(A14)Leu(B16)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0176] His(A14)Ile(B16)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0177] His(A14)Val(B16)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),

- [0178] His(A14)Leu(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0179] His(A14)Ile(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0180] His(A14)Val(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0181] His(A14)Leu(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0182] His(A14)Ile(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0183] His(A14)Val(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0184] His(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0185] His(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0186] His(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0187] His(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0188] His(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0189] His(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0190] His(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0191] His(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0192] His(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0193] His(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0194] His(A14)Ile(B16)Ile(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0195] His(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0196] His(A14)Ile(B16)Val(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0197] His(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0198] His(A14)Val(B16)Ile(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0199] His(A14)Val(B16)Val(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린),
- [0200] His(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린), 및
- [0201] His(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-인슐린(예를 들어 인간 인슐린).
- [0202] 또 다른 실시 형태에서, 인슐린 유사체는 Leu(B25)Des(B30)-인슐린(예컨대 Leu(B25)Des(B30)-인간 인슐린)이다. 이 유사체의 서열을 예를 들어 실시예 섹션의 표 1에 나타낸다(유사체 11 참조). 예를 들어, Leu(B25)Des(B30)-인슐린은 서열 번호 21에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열(GIVEQCCTSICSLSYQLENYCN)을 갖는 A 사슬 및 서열 번호 22에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열(FVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFLYTPK)을 갖는 B 사슬을 포함한다.
- [0203] 또 다른 실시 형태에서, 인슐린 유사체는 Val(B25)Des(B30)-인슐린(예컨대 Val(B25)Des(B30)-인간 인슐린)이다. 이 유사체의 서열을 예를 들어 실시예 섹션의 표 1에 나타낸다(유사체 12 참조). 예를 들어, Val(B25)Des(B30)-인슐린은 서열 번호 23에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열(GIVEQCCTSICSLSYQLENYCN)을 갖는 A 사슬 및 서열 번호 24에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열(FVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFVYTPK)을 갖는 B 사슬을 포함한다.
- [0204] 또 다른 실시 형태에서, 인슐린 유사체는 Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-인슐린(예컨대 Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-인간 인슐린)이다. 이 유사체의 서열을 예를 들어 실시예 섹션의 표 1에 나타낸다(유사체 22 참조). 예를 들어, Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-인슐린은 서열 번호 43에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열(GIVEQCCTSICSLSLEQLENYCN)을 갖는 A 사슬 및 서열 번호 44에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열(FVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFYTPK)을 갖는 B 사슬을 포함한다.

- [0205] 또 다른 실시 형태에서, 인슐린 유사체는 Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-인슐린(예컨대 Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-인간 인슐린)이다. 이 유사체의 서열을 예를 들어 실시예 섹션의 표 1에 나타낸다(유사체 24 참조). 예를 들어, Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-인슐린은 서열 번호 47에 나타난 바와 같은 아미노산 서열(GIVEQCCTSICSLEQLENYCN)을 갖는 A 사슬 및 서열 번호 48에 나타난 바와 같은 아미노산 서열(FVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFVYTPK)을 갖는 B 사슬을 포함한다.
- [0206] 또 다른 실시 형태에서, 인슐린 유사체는 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)Des(B30)-인슐린(예컨대 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)Des(B30)-인간 인슐린)이다. 이 유사체의 서열을 예를 들어 실시예 섹션의 표 1에 나타낸다(유사체 25 참조). 예를 들어, Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)Des(B30)-인슐린은 서열 번호 49에 나타난 바와 같은 아미노산 서열(GIVEQCCTSICSLEQLENYCG)을 갖는 A 사슬 및 서열 번호 50에 나타난 바와 같은 아미노산 서열(FVEQHLGSHLVEALYLVCGERGFFVYTPK)을 갖는 B 사슬을 포함한다.
- [0207] 또 다른 실시 형태에서, 인슐린 유사체는 Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-인슐린(예컨대 Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-인간 인슐린)이다. 이 유사체의 서열을 예를 들어 실시예 섹션의 표 1에 나타낸다(유사체 29 참조). 예를 들어, Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-인슐린은 서열 번호 57에 나타난 바와 같은 아미노산 서열(GIVEQCCTSICSLEQLENYCN)을 갖는 A 사슬 및 서열 번호 58에 나타난 바와 같은 아미노산 서열(FVNQHLGSHLVEALILVCGERGFIYTPK)을 갖는 B 사슬을 포함한다.
- [0208] 또 다른 실시 형태에서, 인슐린 유사체는 Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-인슐린(예컨대 Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-인간 인슐린)이다. 이 유사체의 서열을 예를 들어 실시예 섹션의 표 1에 나타낸다(유사체 30 참조). 예를 들어, Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-인슐린은 서열 번호 56에 나타난 바와 같은 아미노산 서열(GIVEQCCTSICSLEQLENYCN)을 갖는 A 사슬 및 서열 번호 60에 나타난 바와 같은 아미노산 서열(FVEQHLGSHLVEALILVCGERGFIYTPK)을 갖는 B 사슬을 포함한다.
- [0209] 또 다른 실시 형태에서, 인슐린 유사체는 Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-인슐린(예컨대 Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-인간 인슐린)이다. 이 유사체의 서열을 예를 들어 실시예 섹션의 표 1에 나타낸다(유사체 32 참조). 예를 들어, Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-인슐린은 서열 번호 63에 나타난 바와 같은 아미노산 서열(GIVEQCCTSICSLEQLENYCN)을 갖는 A 사슬 및 서열 번호 64에 나타난 바와 같은 아미노산 서열(FVNQHLGSHLVEALILVCGERGFFVYTPK)을 갖는 B 사슬을 포함한다.
- [0210] 또 다른 실시 형태에서, 인슐린 유사체는 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-인슐린(예컨대 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-인간 인슐린)이다. 이 유사체의 서열을 예를 들어 실시예 섹션의 표 1에 나타낸다(유사체 33 참조). 예를 들어, Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-인슐린은 서열 번호 65에 나타난 바와 같은 아미노산 서열(GIVEQCCTSICSLEQLENYCG)을 갖는 A 사슬 및 서열 번호 66에 나타난 바와 같은 아미노산 서열(FVEQHLGSHLVEALILVCGERGFFVYTPK)을 갖는 B 사슬을 포함한다.
- [0211] 또 다른 실시 형태에서, 인슐린 유사체는 Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)-인슐린(예컨대 Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)-인간 인슐린)이다. 이 유사체의 서열을 예를 들어 실시예 섹션의 표 1에 나타낸다(유사체 35 참조). 예를 들어, Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)-인슐린은 서열 번호 69에 나타난 바와 같은 아미노산 서열(GIVEQCCTSICSLEQLENYCN)을 갖는 A 사슬 및 서열 번호 70에 나타난 바와 같은 아미노산 서열(FVNQHLGSHLVEALVLVCGERGFIYTPK)을 갖는 B 사슬을 포함한다.
- [0212] 또 다른 실시 형태에서, 인슐린 유사체는 Glu(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-인슐린(예컨대 Glu(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-인간 인슐린)이다. 이 유사체의 서열을 예를 들어 실시예 섹션의 표 1에 나타낸다(유사체 38 참조). 예를 들어, Glu(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-인슐린은 서열 번호 75에 나타난 바와 같은 아미노산 서열(GIVEQCCTSICSLEQLENYCN)을 갖는 A 사슬 및 서열 번호 76에 나타난 바와 같은 아미노산 서열(FVNQHLGSHLVEALVLVCGERGFFVYTPK)을 갖는 B 사슬을 포함한다.
- [0213] 또 다른 실시 형태에서, 인슐린 유사체는 Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-인슐린(예컨대 Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-인간 인슐린)이다. 이 유사체의 서열을 예를 들어 실시예 섹션의 표 1에 나타낸다(유사체 39 참조). 예를 들어, Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-인슐린은 서열 번호 77에 나타난 바와 같은 아미노산 서열(GIVEQCCTSICSLEQLENYCN)을 갖는 A 사슬 및 서열 번호 78에 나타난 바와 같은 아미노산 서열(FVEQHLGSHLVEALVLVCGERGFFVYTPK)을 갖는 B 사슬을 포함한다.
- [0214] 또 다른 실시 형태에서, 인슐린 유사체는 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-인슐린(예컨대 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-인간 인슐린)이다. 이 유사체의 서열을 예를 들어 실시예

섹션의 표 1에 나타낸다(유사체 40 참조). 예를 들어, Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-인슐린은 서열 번호 79에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열(GIVEQCCTICSLEQLNYCG)을 갖는 A 사슬 및 서열 번호 80에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열(FVEQHLGSHLVEALVLVGGERGFVYTPK)을 갖는 B 사슬을 포함한다.

- [0215] 인슐린 유사체는 적절한 것으로 간주되는 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 인슐린 유사체는 재조합 방법 또는 고체상 합성에 의해 제조될 수 있다.
- [0216] 상기에 본원에 주어진 정의 및 설명은 하기의 것에 준용된다.
- [0217] 본원에서 제공된 인슐린 유사체의 B 사슬과 관련하여 상기 본원에 정의된 바와 같은 인슐린 B 사슬, 즉 인슐린 B 사슬 펩티드가 본원에서 제공된다. 따라서, 모 인슐린의 인슐린 B 사슬에 비해 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 인슐린 B 사슬이 본원에서 제공되며, 여기서, B 사슬은 소수성 아미노산으로 치환된 위치 B16에서의 돌연변이 및/또는 소수성 아미노산으로 치환된 위치 B25에서의 돌연변이를 포함한다. 인슐린 B 사슬은 des(B30) 결실과 같은 상기 본원에 기술된 바와 같은 추가 돌연변이를 포함할 수 있다.
- [0218] 본원에서 제공된 인슐린 유사체의 인슐린 A 사슬 및/또는 인슐린 B 사슬을 포함하는 프로인슐린이 또한 본원에서 제공된다. B 사슬은 본원에서 제공된 인슐린 유사체에 대해 상기 본원에 정의된 바와 같은 임의의 B 사슬일 수 있다. 예를 들어, 인슐린 A 사슬 및 인슐린 B 사슬을 포함하는 프로인슐린이 본원에서 제공되며, 여기서, 상기 B 사슬은 모 인슐린의 B 사슬에 비해 하나 이상의 돌연변이를 포함하며, 돌연변이는 소수성 아미노산으로 치환된 위치 B16에 있고/있거나 돌연변이는 소수성 아미노산으로 치환된 위치 B25에 있다. 인슐린 B 사슬은 B 사슬에 대하여 상기 본원에 기술된 바와 같은 추가 돌연변이를 포함할 수 있다.
- [0219] 본원에서 제공된 프로인슐린이 포함하는 A 사슬은 본원에서 제공된 인슐린 유사체에 대해 상기 본원에 정의된 바와 같은 임의의 A 사슬일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 상기 프로인슐린의 A 사슬은 글루탐산(Glu), 아스파르트산(Asp) 및 히스티딘(His)으로부터 선택되는 아미노산으로 치환된 위치 A14에서의 돌연변이를 포함한다.
- [0220] 인슐린 A 사슬 및/또는 인슐린 B 사슬에 더하여, 본원에서 제공된 프로인슐린은 리더 서열 또는 C-펩티드와 같은 추가 요소를 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 프로인슐린은 인슐린 B 사슬과 인슐린 A 사슬 사이에 위치하는 C-펩티드를 추가로 포함할 수 있다. C-펩티드는 4~10개의 아미노산의 길이, 예컨대 4~9개의 아미노산의 길이를 가질 수 있다. 배향은 다음과 같을 수 있다(N 말단에서 C 말단으로): B 사슬, C-펩티드, A 사슬.
- [0221] 본원에서 제공된 인슐린 유사체, 인슐린 B 사슬 및 프로인슐린을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 본원에서 제공된다. 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 폴리뉴클레오티드의 발현을 허용하는 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 프로모터는 상기 폴리뉴클레오티드에 대해 이중성이다. 일부 실시 형태에서, 프로모터는 구성적 프로모터이다. 또 다른 실시 형태에서, 프로모터는 유도성 프로모터이다.
- [0222] 추가로, 본원에서 제공된 인슐린 유사체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 본원에서 제공된다. 일부 실시 형태에서, 상기 벡터는 발현 벡터이다.
- [0223] 본원에서 제공된 인슐린 유사체, 인슐린 B 사슬 및 프로인슐린을 코딩하는 핵산, 폴리뉴클레오티드 및/또는 벡터를 포함하는 숙주 세포가 본원에서 제공된다. 일부 실시 형태에서, 숙주 세포는 박테리아 세포, 예컨대 에스케리키아(*Escherichia*) 속에 속하는 세포, 예를 들어, 이. 콜라이(*E. Coli*)) 세포이다. 또 다른 실시 형태에서, 숙주 세포는 효모 세포, 예컨대 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 세포 또는 클리베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*) 세포이다.
- [0224] 본원에서 제공된 인슐린 유사체의 제약적 유효량 및 제약상 허용가능한 부형제를 포함하는 제약 조성물이 본원에서 제공된다.
- [0225] 본원에서 제공된 하나 이상의 인슐린 유사체 또는 이의 제약 조성물의 제약적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 질환의 치료 방법이 본원에서 제공된다.
- [0226] 일부 실시 형태에서, 질환은 진성 당뇨병, 예컨대 제II형 진성 당뇨병이다.
- [0227] 약에서 사용하기 위한 인슐린 유사체 또는 이의 제약 조성물이 본원에서 제공된다.
- [0228] 진성 당뇨병, 예컨대 제II형 진성 당뇨병의 치료에 사용하기 위한 인슐린 유사체 또는 이의 제약 조성물이 본원에서 제공된다.
- [0229] 마지막으로, 진성 당뇨병, 예컨대 제II형 진성 당뇨병의 치료를 위한 의약 또는 약물의 제조를 위한 본원에서

제공된 인슐린 유사체 또는 이의 제약 조성물의 용도가 본원에서 제공된다.

- [0230] 인슐린 유사체, 인슐린 B 사슬, 프로인슐린, 및 용도는 각각의 의존성 및 역참조에 의해 지시되는 바와 같이 하기 실시 형태 및 실시 형태들의 조합에 의해 추가로 예시된다. 상기에 본원에 주어진 정의 및 설명은 하기 실시 형태에 준용된다.
- [0231] 1. 모 인슐린에 비해 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 인슐린 유사체로서, 인슐린 유사체는 소수성 아미노산으로 치환된 위치 B16에서의 돌연변이 및/또는 소수성 아미노산으로 치환된 위치 B25에서의 돌연변이를 포함하는, 인슐린 유사체.
- [0232] 2. 모 인슐린은 인간 인슐린, 돼지 인슐린 또는 소 인슐린인, 실시 형태 1의 인슐린 유사체.
- [0233] 3. 위치 B16 및/또는 위치 B25에서의 소수성 아미노산은 지방족 아미노산인, 실시 형태 1 및 2의 인슐린 유사체.
- [0234] 4. 위치 B16 및/또는 위치 B25에서의 상기 지방족 아미노산은 분지쇄 아미노산, 예컨대 발린(Val), 이소류신(Ile) 및 류신(Leu)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 분지쇄 아미노산인 실시 형태 1 내지 3 중 어느 하나의 인슐린 유사체.
- [0235] 5. 상기 인슐린 유사체는 글루탐산(Glu), 아스파르트산(Asp) 및 히스티딘(His)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산으로 치환된 위치 A14에서의 돌연변이를 추가로 포함하는, 실시 형태 1 내지 3 중 어느 하나의 인슐린 유사체.
- [0236] 6. 상기 인슐린 유사체는 위치 B30에서의 돌연변이를 추가로 포함하며, 예를 들어 위치 B30에서의 돌연변이는 모 인슐린의 위치 B30에서의 아미노산의 결실(Des(B30)-돌연변이)인, 실시 형태 1 내지 5 중 어느 하나의 인슐린 유사체.
- [0237] 7. 상기 인슐린 유사체는 글루탐산(Glu)으로 치환된 위치 B3에서의 돌연변이를 추가로 포함하는, 실시 형태 1 내지 6 중 어느 하나의 인슐린 유사체.
- [0238] 8. 상기 인슐린은 글리신(Gly)으로 치환된 위치 A21에서의 돌연변이를 추가로 포함하는, 실시 형태 1 내지 7 중 어느 하나의 인슐린 유사체.
- [0239] 9. 인슐린 유사체의 B 사슬은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진, 실시 형태 1 내지 8 중 어느 하나의 인슐린 유사체:
- [0240] FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFLYTEPK (서열 번호 22)
- [0241] FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFIYTEPK (서열 번호 44)
- [0242] FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTEPK (서열 번호 48)
- [0243] FVEQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTEPK (서열 번호 50)
- [0244] FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYTEPK (서열 번호 58)
- [0245] FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYTEPK (서열 번호 60)
- [0246] FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFVYTEPK (서열 번호 64)
- [0247] FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFVYTEPK (서열 번호 66)
- [0248] FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFIYTEPK (서열 번호 70)
- [0249] FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTEPK (서열 번호 76)
- [0250] FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTEPK (서열 번호 78)
- [0251] FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTEPK (서열 번호 80)
- [0252] FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFLYTEPKT (서열 번호 85)
- [0253] FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTEPKT (서열 번호 86)
- [0254] FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFIYTEPKT (서열 번호 87)

- [0255] FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFVYTPKT (서열 번호 88)
- [0256] FVEQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFVYTPKT (서열 번호 89)
- [0257] FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYTPKT (서열 번호 90)
- [0258] FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYTPKT (서열 번호 91)
- [0259] FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFFVYTPKT (서열 번호 92)
- [0260] FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFFVYTPKT (서열 번호 93)
- [0261] FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFIYTPKT (서열 번호 94)
- [0262] FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFFVYTPKT (서열 번호 95)
- [0263] FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFFVYTPKT (서열 번호 96), 및
- [0264] FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFFVYTPKT (서열 번호 97).
- [0265] 10. 다음을 포함하는, 실시 형태 1 내지 9 중 어느 하나의 인슐린 유사체:
- [0266] (a) 서열 번호 43에 나타낸 아미노산 서열(GIVEQCCTSICSLEQLENYCN)을 갖는 A 사슬 및 서열 번호 44에 나타낸 아미노산 서열(FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFIYTPK)을 갖는 B 사슬,
- [0267] (b) 서열 번호 47에 나타낸 아미노산 서열(GIVEQCCTSICSLEQLENYCN)을 갖는 A 사슬 및 서열 번호 48에 나타낸 아미노산 서열(FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFVYTPK)을 갖는 B 사슬, 또는
- [0268] (c) 서열 번호 77에 나타낸 아미노산 서열(GIVEQCCTSICSLEQLENYCN)을 갖는 A 사슬 및 서열 번호 78에 나타낸 아미노산 서열(FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFFVYTPK)을 갖는 B 사슬.
- [0269] 11. 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 인슐린 유사체:
- [0270] Leu(B16)-인간 인슐린,
- [0271] Val(B16)-인간 인슐린,
- [0272] Ile(B16)-인간 인슐린,
- [0273] Leu(B16)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0274] Val(B16)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0275] Ile(B16)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0276] Leu(B25)-인간 인슐린,
- [0277] Val(B25)-인간 인슐린,
- [0278] Ile(B25)-인간 인슐린,
- [0279] Leu(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0280] Val(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0281] Ile(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0282] Glu(A14)Leu(B16)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0283] Glu(A14)Ile(B16)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0284] Glu(A14)Val(B16)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0285] Glu(A14)Leu(B16)-인간 인슐린,
- [0286] Glu(A14)Ile(B16)-인간 인슐린,
- [0287] Glu(A14)Val(B16)-인간 인슐린,

- [0288] Glu(A14)Leu(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0289] Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0290] Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0291] Glu(A14)Leu(B25)-인간 인슐린,
- [0292] Glu(A14)Ile(B25)-인간 인슐린,
- [0293] Glu(A14)Val(B25)-인간 인슐린,
- [0294] Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0295] Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0296] Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0297] Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0298] Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0299] Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0300] Glu(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0301] Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0302] Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0303] Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)-인간 인슐린,
- [0304] Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)-인간 인슐린,
- [0305] Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)-인간 인슐린,
- [0306] Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)-인간 인슐린,
- [0307] Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)-인간 인슐린,
- [0308] Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)-인간 인슐린,
- [0309] Glu(A14)Val(B16)Val(B25)-인간 인슐린,
- [0310] Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-인간 인슐린, 및
- [0311] Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-인간 인슐린.
- [0312] 12. 모 인슐린의 B 사슬에 비해 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 인슐린 B 사슬로서, 상기 B 사슬은 소수성 아미노산으로 치환된 위치 B16에서의 돌연변이 및/또는 소수성 아미노산으로 치환된 위치 B25에서의 돌연변이를 포함하는, 인슐린 B 사슬.
- [0313] 13. 모 인슐린은 인간 인슐린, 돼지 인슐린 또는 소 인슐린인, 실시 형태 12에 따른 인슐린 B 사슬.
- [0314] 14. 위치 B16 및/또는 위치 B25에서의 소수성 아미노산은 지방족 아미노산인, 실시 형태 12 및 13에 따른 인슐린 B 사슬.
- [0315] 15. 상기 지방족 아미노산은 분지쇄 아미노산, 예컨대 발린(Val), 이소류신(Ile) 및 류신(Leu)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 분지쇄 아미노산인, 실시 형태 12 내지 14 중 어느 하나에 따른 인슐린 B 사슬.
- [0316] 16. 상기 인슐린 B 사슬은 글루탐산(Glu)으로 치환된 위치 B3에서의 돌연변이를 추가로 포함하는, 실시 형태 12 내지 15 중 어느 하나에 따른 인슐린 B 사슬.
- [0317] 17. 상기 인슐린 B 사슬은 위치 B30에서의 돌연변이를 추가로 포함하며, 위치 B30에서의 돌연변이는 모 인슐린의 위치 B30에서의 아미노산의 결실(Des(B30)-돌연변이)인, 실시 형태 12 내지 16 중 어느 하나에 따른 인슐린 B 사슬.
- [0318] 18. 인슐린 A 사슬 및 인슐린 B 사슬을 포함하는 프로인슐린으로서, 인슐린 B 사슬은 모 인슐린의 B 사슬에 비

해 하나 이상의 돌연변이를 포함하며, 상기 B 사슬은 소수성 아미노산으로 치환된 위치 B16에서의 돌연변이 및/또는 소수성 아미노산으로 치환된 위치 B25에서의 돌연변이를 포함하는, 프로인슐린.

- [0319] 19. 상기 프로인슐린의 인슐린 A 사슬은 글루탐산(Glu), 아스파르트산(Asp) 및 히스티딘(His)으로부터 선택되는 아미노산으로 치환된 위치 A14에서의 돌연변이를 포함하는, 실시 형태 18의 프로인슐린.
- [0320] 20. 모 인슐린은 인간 인슐린, 돼지 인슐린 또는 소 인슐린인, 실시 형태 18 및 19에 따른 프로인슐린.
- [0321] 21. 위치 B16 및/또는 위치 B25에서의 소수성 아미노산은 지방족 아미노산인, 실시 형태 18 내지 20 중 어느 하나에 따른 프로인슐린.
- [0322] 22. 상기 지방족 아미노산은 분지쇄 아미노산, 예컨대 발린(Val), 이소류신(Ile) 및 류신(Leu)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 분지쇄 아미노산인, 실시 형태 18 내지 21 중 어느 하나에 따른 프로인슐린.
- [0323] 23. 상기 프로인슐린은 글루탐산(Glu)으로 치환된 위치 B3에서의 돌연변이를 추가로 포함하는, 실시 형태 18 내지 22 중 어느 하나에 따른 프로인슐린.
- [0324] 24. 상기 프로인슐린은 위치 B30에서의 돌연변이를 추가로 포함하며, 위치 B30에서의 돌연변이는 모 인슐린의 위치 B30에서의 아미노산의 결실(Des(B30)-돌연변이)인, 실시 형태 18 내지 23 중 어느 하나에 따른 프로인슐린.
- [0325] 25. 실시 형태 1 내지 11 중 어느 하나의 인슐린 유사체, 실시 형태 12 내지 17 중 어느 하나의 인슐린 B 사슬, 및/또는 실시 형태 18 내지 24 중 어느 하나의 프로인슐린을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [0326] 26. 실시 형태 25의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.
- [0327] 27. 실시 형태 1 내지 11 중 어느 하나의 인슐린 유사체, 실시 형태 12 내지 17 중 어느 하나의 인슐린 B 사슬, 실시 형태 18 내지 24 중 어느 하나의 프로인슐린, 실시 형태 25의 폴리뉴클레오티드, 및/또는 실시 형태 26의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.
- [0328] 28. 실시 형태 1 내지 11 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 하나 이상의 인슐린 유사체를 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 진성 당뇨병 환자의 치료 방법.
- [0329] 29. 진성 당뇨병의 치료에 사용하기 위한 실시 형태 1 내지 11 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 인슐린 유사체.
- [0330] 본 명세서에 인용된 모든 참고 문헌은 전체 개시 내용 및 본 명세서에서 구체적으로 언급된 개시 내용과 관련하여 본 명세서에 참고로 포함된다.
- [0331] **실시예 1: 인간 인슐린 및 인슐린 유사체의 생산**
- [0332] 인간 인슐린과, 인슐린 유사체를 재조합적으로 생산하였다. 프리-프로(pre-pro)-인슐린을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 Genart®에서 주문하였다. 설계된 폴리뉴클레오티드는 효모에서의 발현을 위해 최적화되었다. 이것은 클리베로마이세스 락티스 K에서 기능적 발현 및 분비를 가능하게 하는 고전적인 제한효소 클로닝에 의해 발현 벡터에 삽입하였다. 분비 리더로서 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)의 알파 교배 인자 신호를 코딩하는 DNA 서열에 상기 유전자를 C-말단 융합시켰다. 재조합 유전자 발현은 락토스 유도성 케이. 락티스(*K. lactis*) 프로모터에 의해 제어되었다.
- [0333] 인간 인슐린과, 인슐린 유사체는 프리-프로-인슐린으로 제조되었다. 유전적으로 융합된 N-말단 프리-서열을 사용하여 발현 및 분비 수율을 향상시키고 배양 브로쓰에서 펩티드를 안정화하였다. 매우 다양한 서열들을 이 목적을 위해 사용할 수 있으며, 효율에 대하여 테스트하였다. 프로인슐린 그 자체는 B-사슬이 C-펩티드에 융합되고 이어서 C-말단 A-사슬이 뒤따르는 것으로 이루어진다. C-펩티드로서 다양한 아미노산 조합이 기술된다. 1~10 개 아미노산의 짧은 펩티드가 C-서열로 잘 작동하는 것으로 나타났다. 인슐린의 이후 프로세싱을 위하여, 이의 절제를 가능하게 하는, C-펩티드의 측면에 있는 특정 프로테아제에 대한 인식 부위가 중요하다.
- [0334] 케이. 락티스 세포를 화학적 수단에 의해 적격성으로 만들었다. 후속적으로, 각각의 프리-프로-인슐린을 코딩하는 발현 플라스미드로 상기 세포를 형질전환시켰다. 플라스미드 삽입 후, 세포를 제네티신을 함유하는 선발 한천 플레이트 상에 플레이팅하였다. 성장시킨 콜로니를 단리하고 재조합 유전자 발현에 대해 테스트하였다. 세포를 제네티신이 보충된 효모 펩톤 텍스트로스 배지에서 충분히 높은 세포 밀도까지 성장시켰다. 초기 성장기 후, 락토스가 보충된 제네티신을 포함하는 염 완충 효모 추출물 배지를 배양물에 첨가하여 재조합 유전자의 발현을

유도하였다. 배양물을 며칠 동안 성장시키고, 원심분리에 의해 상청액을 수확하였다.

- [0335] 기능성 인슐린 또는 인슐린 유사체의 정제를 여과 절차에 의해 시작하였다. 초기 크로마토그래피 포착 절차는 이온 교환 수지로 이루어졌다. 프리-프로인슐린에서 인슐린으로의 절단은 매우 특이적인 프로테아제를 사용하여 수행하였다. 숙주 세포 단백질, 프리-서열 및 생성물과 관련된 생성물의 고갈은 2개의 추가 크로마토그래피 단계의 캐스케이드에 의해 이루어졌다. 소수성 상호작용 크로마토그래피 다음으로, 이 목표를 달성하기 위해 또 다른 이온 교환 절차를 적용하였다. 최종 폴리싱은 역상 크로마토그래피에 의해 이루어졌다. 여과, 침전 및 동결 건조를 사용하여 인슐린 분자의 생산 공정을 완료하였다.
- [0336] 활성화 카르복실산 유도체와의 커플링 반응 후, 콘쥬게이션된 인슐린 분자를 포함하는 용액을 여과시켰다. 최종 정제는 역상 크로마토그래피에 의해 이루어졌다. 여과, 침전 및 동결 건조를 사용하여 표적 분자의 합성을 완료하였다.
- [0337] 예를 들어 위치 B16, B25 및/또는 A14에서의 돌연변이를 포함하는 다양한 인슐린 유사체를 생성하였다. 표 1는 생성된 인슐린의 개요를 제공한다.

[0338]

[표 1]

생성된 인간 인슐린 유사체

유사체	클릭	A14	B1	B25	사슬 A의 아미노산 서열	서열 번호 (A-사슬)	사슬 B의 아미노산 서열	서열 번호 (B-사슬)
WT	인간 인슐린(야생형)	Tyr	Tyr	Phe	GIVEQCCT- SICSLYQLE- NYCN	1	FVNQHLCGSHLVEA- LYLVCGERGFYTPKT	2
2	Glu(A14)Des(B30)-인슐린	Glu	Tyr	Phe	GIVEQCCT- SICSLYQLE- NYCN	3	FVNQHLCGSHLVEA- LYLVCGERGFYTPK	4
3	Leu(B16)Des(B30)-인슐린	Tyr	Leu	Phe	GIVEQCCT- SICSLYQLE- NYCN	5	FVNQHLCGSHLVEALL- VCGERGFYTPK	6
4	Gly(A21)Trp(B16)Des(B30)-인슐린	Tyr	Trp	Phe	GIVEQCCT- SICSLYQLE- NYCG	7	FVNQHLCGSHL- VEALWLVCGERGFYTPK	8
5	His(B16)Des(B30)-인슐린	Tyr	His	Phe	GIVEQCCT- SICSLYQLE- NYCN	9	FVNQHLCGSHLVEALHL- VCGERGFYTPK	10
6	Val(B16)Des(B30)-인슐린	Tyr	Val	Phe	GIVEQCCT- SICSLYQLE- NYCN	11	FVNQHLCGSHLVEAL- VLVCGERGFYTPK	12
7	Ala(B25)-인슐린	Tyr	Tyr	Ala	GIVEQCCT- SICSLYQLE- NYCN	13	FVNQHLCGSHLVEA- LYLVCGERGFYTPKT	14
8	Ala(B25)Des(B30)-인슐린	Tyr	Tyr	Ala	GIVEQCCT-	15	FVNQHLCGSHLVEA-	16

[0339]

						SICSLYQLE- NYCN				LYLVCGERGFAYPEK	
9	Glu(B25)Des(B30)-인슐린	Tyr	Tyr	Glu	GIVEQCCT- SICSLYQLE- NYCN	17				FVNQHLGSHLVEA- LYLVCGERGFEYTPK	18
10	His(B25)Des(B30)-인슐린	Tyr	Tyr	His	GIVEQCCT- SICSLYQLE- NYCN	19				FVNQHLGSHLVEA- LYLVCGERGFEYTPK	20
11	Leu(B25)Des(B30)-인슐린	Tyr	Tyr	Leu	GIVEQCCT- SICSLYQLE- NYCN	21				FVNQHLGSHLVEA- LYLVCGERGFLYTPK	22
12	Val(B25)Des(B30)-인슐린	Tyr	Tyr	Val	GIVEQCCT- SICSLYQLE- NYCN	23				FVNQHLGSHLVEA- LYLVCGERGFEYTPK	24
13	His(B16)His(B25)Des(B30)- 인슐린	Tyr	His	His	GIVEQCCT- SICSLYQLE- NYCN	25				FVNQHLGSHLVEALHL- VCGERGFEYTPK	26
14	Gly(A21)Trp(B16)His(B25) Des(B30)-인슐린	Tyr	Trp	His	GIVEQCCT- SICSLYQLE- NYCG	27				FVNQHLGSHL- VEALWLVCGERGFEYTPK	28
15	Gly(A21)Trp(B16)Trp(B25) Des(B30)-인슐린	Tyr	Trp	Trp	GIVEQCCT- SICSLYQLE- NYCG	29				FVNQHLGSHL- VEALWLVCGERG- FWYTPK	30
16	Glu(A14)His(B16)Des(B30)- 인슐린	Glu	His	Phe	GIVEQCCT- SICSLYQLE- NYCN	31				FVNQHLGSHLVEALHL- VCGERGFEYTPK	32

[0340]

17	Glu(A14)Gly(A21)Trp(B16) Des(B30)-인슐린	Glu	Trp	Phe	NYCN	33	FVNQHLGSHL- VEALWLCGERGFFYTPK	34
18	Glu(A14)Ile(B16)Des(B30)- 인슐린	Glu	Ile	Phe	GIVEQCCT- SICSLEQLE- NYCG	35	FVNQHLGSHLVEALIL- VCGERGFFYTPK	36
19	Glu(A14)Val(B16)Des(B30) -인슐린	Glu	Val	Phe	GIVEQCCT- SICSLEQLE- NYCN	37	FVNQHLGSHLVEAL- VLVCGERGFFYTPK	38
20	Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)D es(B30)-인슐린	Glu	Val	Phe	GIVEQCCT- SICSLEQLE- NYCN	39	FVEQHLGSHLVEAL- VLVCGERGFFYTPK	40
21	Glu(A14)His(B25)Des(B30) -인슐린	Glu	Tyr	His	GIVEQCCT- SICSLEQLE- NYCN	41	FVNQHLGSHLVEA- LYLVCGERGFFYTPK	42
22	Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)- 인슐린	Glu	Tyr	Ile	GIVEQCCT- SICSLEQLE- NYCN	43	FVNQHLGSHLVEA- LYLVCGERGFFYTPK	44
23	Glu(A14)Gly(A21)Trp(B25) Des(B30)-인슐린	Glu	Tyr	Trp	GIVEQCCT- SICSLEQLE- NYCG	45	FVNQHLGSHLVEA- LYLVCGERGFWYTPK	46
24	Glu(A14)Val(B25)Des(B30) -인슐린	Glu	Tyr	Val	GIVEQCCT- SICSLEQLE- NYCN	47	FVNQHLGSHLVEA- LYLVCGERGFFYTPK	48

[0341]

25	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)Des(B30)-인슐린	Glu	Tyr	Val	GIVEQCCT-SICSLEQLE-NYCG	49	FVEQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFVYTPK	50
26	Glu(A14)Glu(B16)His(B25)Des(B30)-인슐린	Glu	Glu	His	GIVEQCCT-SICSLEQLE-NYCN	51	FVNQHLCGSHLVEALHLVCGERGFHYTPK	52
27	Glu(A14)His(B16)Ala(B25)Des(B30)-인슐린	Glu	His	Ala	GIVEQCCT-SICSLEQLE-NYCN	53	FVNQHLCGSHLVEALHLVCGERGFAYTPK	54
28	Glu(A14)His(B16)His(B25)Des(B30)-인슐린	Glu	His	His	GIVEQCCT-SICSLEQLE-NYCN	55	FVNQHLCGSHLVEALHLVCGERGFHYTPK	56
29	Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-인슐린	Glu	Ile	Ile	GIVEQCCT-SICSLEQLE-NYCN	57	FVNQHLCGSHLVEALHLVCGERGFYTPK	58
30	Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-인슐린	Glu	Ile	Ile	GIVEQCCT-SICSLEQLE-NYCN	59	FVEQHLCGSHLVEALHLVCGERGFYTPK	60
31	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Trp(B25)Des(B30)-인슐린	Glu	Ile	Trp	GIVEQCCT-SICSLEQLE-NYCG	61	FVEQHLCGSHLVEALHLVCGERGFWYTPK	62
32	Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-인슐린	Glu	Ile	Val	GIVEQCCT-SICSLEQLE-NYCN	63	FVNQHLCGSHLVEALHLVCGERGFVYTPK	64
33	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile	Glu	Ile	Val	GIVEQCCT-	65	FVEQHLCGSHLVEALHL-	66

[0342]

					SICSEQLE- NYCG				VCGERGFVYTPK	
34	e(B16)Val(B25)Des(B30)- 인슐린	Glu	Leu	Ala	GIVEQCCT- SICSEQLE- NYCN	67	FVNQHLCGSHLVEALL- VCGERGFAYTPK	68		
35	Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)- 인슐린	Glu	Val	Ile	GIVEQCCT- SICSEQLE- NYCN	69	FVNQHLCGSHLVEAL- VLVCGERGFYTPK	70		
36	Glu(A14)Gly(A21)Val(B16)Trp(B25)Des(B30)- 인슐린	Glu	Val	Trp	GIVEQCCT- SICSEQLE- NYCG	71	FVNQHLCGSHLVEAL- VLVCGERGFWYTPK	72		
37	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Trp(B25)Des(B30)- 인슐린	Glu	Val	Trp	GIVEQCCT- SICSEQLE- NYCG	73	FVEQHLCGSHLVEAL- VLVCGERGFWYTPK	74		
38	Glu(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)- 인슐린	Glu	Val	Val	GIVEQCCT- SICSEQLE- NYCN	75	FVNQHLCGSHLVEAL- VLVCGERGFVYTPK	76		
39	Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)- 인슐린	Glu	Val	Val	GIVEQCCT- SICSEQLE- NYCN	77	FVEQHLCGSHLVEAL- VLVCGERGFVYTPK	78		
40	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)- 인슐린	Glu	Val	Val	GIVEQCCT- SICSEQLE- NYCG	79	FVEQHLCGSHLVEAL- VLVCGERGFVYTPK	80		

[0343]

[0344]

[0345]

[0346]

[0347]

실시예 2: 인슐린 수용체 결합 친화성 분석/인슐린 수용체 자가인산화 분석

다양한 생성된 인슐린 유사체의 인슐린 결합 및 신호 전달을 결합 분석 및 수용체 자가인산화 분석에 의해 결정하였다.

A) 인슐린 수용체 결합 친화성 분석

표 1에 열거된 유사체의 인슐린 수용체 결합 친화도를 문헌[Hartmann et al., Effect of the long-acting insulin analogs glargine and degludec on cardiomyocyte cell signaling and function. Cardiovasc Diabetol. 2016;15:96]에 기술된 바와 같이 결정하였다. 인슐린 수용체 내장형 원형질막(M-IR)의 단리 및 경쟁 결합 실험을 이전에 기술된 바와 같이 수행하였다(문헌[Sommerfeld et al., PLoS One. 2010; 5(3): e9540]). 간략하게는, IR을 과다발현하는 CHO 세포를 수집하고, 빙냉 2.25 STM 완충액(2.25 M 수크로스, 5 mM 트리스-HCl pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 완전 프로테아제 억제제)에 재현탁하고, Dounce 균질화기, 이어서 초음파 처리를 사용하여 파괴하였다. 상기 균질액을 0.8 STM 완충액(0.8 M 수크로스, 5 mM 트리스-HCl pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 완전 프로테

아제 억제제)으로 덮고, 100,000 g에서 90분 동안 초원심분리하였다. 계면의 원형질막을 수집하고, 인산염 완충 염수(PBS)로 2회 세척하였다. 최종 펠렛을 희석 완충액(50 mM 트리스-HCl pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 완전 프로테아제 억제제)에 재현탁하고, 다시 Dounce 균질화기로 균질화하였다. 경쟁 결합 실험을 96웰 마이크로플레이트에서 결합 완충액(50 mM 트리스-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% BSA, 완전 프로테아제 억제제, pH 7.8로 조정)에서 수행하였다. 각각의 웰에서 2 µg의 단리된 막을 0.25 mg 밀 배아 응집소 폴리비닐톨루엔 폴리에틸렌이민 신틸레이션 근접성 분석(SPA) 비드와 함께 인큐베이션하였다. 일정한 농도의 [125I]-표지 인간 인슐린(100 pM) 및 다양한 농도의 각각의 비표지 인슐린(0.001~1000 nM)을 실온(23℃)에서 12시간 동안 첨가하였다. 방사능을 마이크로플레이트 신틸레이션 카운터(Wallac Microbeta, 독일 프라이부르크 소재)에서 평형 상태에서 측정하였다.

[0348] 인간 인슐린에 대한 테스트된 유사체의 인슐린 수용체 결합 친화성 분석의 결과를 표 2에 나타낸다.

[0349] B) 인슐린 수용체 자가인산화 분석(신호 전달에 대한 척도로서)

[0350] 인슐린 수용체 B에 결합하는 인슐린 유사체의 신호 전달을 결정하기 위해 자가인산화를 시험관 내에서 측정하였다.

[0351] 인간 인슐린 수용체 이소형 B(IR-B)를 발현하는 CHO 세포는 이전에 기술된 바와 같이 세포 내 웨스턴(In-Cell Western) 기술을 사용하여 IR 자가인산화 분석에 사용하였다(문헌[Sommerfeld *et al.*, PLoS One. 2010; 5(3): e9540]). IGF1R 자가인산화의 분석을 위해, 상기 수용체를 IGF1R 테트라사이클린-조절성 발현 플라스미드로 안정적으로 형질감염된 마우스 배아 섬유아세포 3T3 Tet 오프(off) 세포주(BD Bioscience, 독일 하이델베르크 소재)에서 과다발현시켰다. 수용체 티로신 인산화 수준을 결정하기 위해 세포를 96웰 플레이트에 접종하고 44시간 동안 성장시켰다. 세포는 무혈청 배지인 Ham's F12 배지(Life Technologies, 독일 다름슈타트 소재)로 2시간 동안 혈청이 결핍되었다. 후속적으로, 세포를 37℃에서 20분 동안 증가하는 농도의 인간 인슐린 또는 인슐린 유사체로 처리하였다. 인큐베이션 후 배지를 버리고, 세포를 3.75%의 신선하게 제조한 파라-포름알데히드에서 20분 동안 고정시켰다. 세포를 PBS 중 0.1% 트리톤(Triton) X-100으로 20분 동안 투과시켰다. Odyssey 차단 완충제(LICOR, 독일 바트 훔부르크 소재)로 실온에서 1시간 동안 차단을 수행하였다. 항-pTyr 4G10(Millipore, 독일 슈탈바흐 소재)을 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 상기 일차 항체의 인큐베이션 후, 세포를 PBS + 0.1% 트윈(Tween) 20(Sigma-Aldrich, 미국 미주리주 세인트 루이스 소재)으로 세척하였다. 이차 항마우스-IgG-800-CW 항체(LICOR, 독일 바트 훔부르크 소재)를 1시간 동안 인큐베이션하였다. TO-PRO3 염료(Invitrogen, 독일 칼스루에 소재)로 DNA를 정량화하여 결과를 정규화하였다. 데이터를 상대 단위(RU)로 얻었다.

[0352] 인간 인슐린에 대한 테스트된 유사체에 대한 인슐린 수용체 자가인산화 분석의 결과를 표 2에 나타낸다.

[0353] [표 2]

테스트된 인간 인슐린 유사체의 상대적인 인슐린 수용체 결합 친화도 및 자가인산화 활성
(서열은 표 1 참조).

유사체	골격	A14	B16	B25	인슐린-수용체 결합 친화도*	자가인산화 활성*
WT	인간 인슐린(야생형)	Tyr	Tyr	Phe	1	1
2	Glu(A14)Des(B30)-인슐린	Glu	Tyr	Phe	1.05	0.87
3	Leu(B16)Des(B30)-인슐린	Tyr	Leu	Phe	0.24	0.34
4	Gly(A21)Trp(B16)Des(B30)-인슐린	Tyr	Trp	Phe	0.57	0.4
5	His(B16)Des(B30)-인슐린	Tyr	His	Phe	nd	nd
6	Val(B16)Des(B30)-인슐린	Tyr	Val	Phe	nd	0.32
7	Ala(B25)-인슐린	Tyr	Tyr	Ala	0.05	0.2
8	Ala(B25)Des(B30)-인슐린	Tyr	Tyr	Ala	nd	0.17
9	Glu(B25)Des(B30)-인슐린	Tyr	Tyr	Glu	nd	nd
10	His(B25)Des(B30)-인슐린	Tyr	Tyr	His	0.37	0.31
11	Leu(B25)Des(B30)-인슐린	Tyr	Tyr	Leu	0.01	0.06

12	Val(B25)Des(B30)-인슐린	Tyr	Tyr	Val	0.01	0.06
13	His(B16)His(B25)Des(B30)-인슐린	Tyr	His	His	0.11	0.1
14	Gly(A21)Trp(B16)His(B25)Des(B30)-인슐린	Tyr	Trp	His	0.4	0.35
15	Gly(A21)Trp(B16)Trp(B25)Des(B30)-인슐린	Tyr	Trp	Trp	0.43	0.38
16	Glu(A14)His(B16)Des(B30)-인슐린	Glu	His	Phe	0.36	0.29
17	Glu(A14)Gly(A21)Trp(B16)Des(B30)-인슐린	Glu	Trp	Phe	0.63	0.38
18	Glu(A14)Ile(B16)Des(B30)-인슐린	Glu	Ile	Phe	0.23	0.18
19	Glu(A14)Val(B16)Des(B30)-인슐린	Glu	Val	Phe	nd	0.32
20	Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Des(B30)-인슐린	Glu	Val	Phe	0.4	0.28
21	Glu(A14)His(B25)Des(B30)-인슐린	Glu	Tyr	His	nd	nd
22	Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-인슐린	Glu	Tyr	Ile	0.01	0.04
23	Glu(A14)Gly(A21)Trp(B25)Des(B30)-인슐린	Glu	Tyr	Trp	0.56	0.37
24	Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-인슐린	Glu	Tyr	Val	0.01	0.04
25	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)Des(B30)-인슐린	Glu	Tyr	Val	0.02	0.03
26	Glu(A14)Glu(B16)His(B25)Des(B30)-인슐린	Glu	Glu	His	0.01	0.07
27	Glu(A14)His(B16)Ala(B25)Des(B30)-인슐린	Glu	His	Ala		0.11
28	Glu(A14)His(B16)His(B25)Des(B30)-인슐린	Glu	His	His	0.12	0.11
29	Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-인슐린	Glu	Ile	Ile		0.01
30	Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-인슐린	Glu	Ile	Ile	0**	0.01
31	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Trp(B25)Des(B30)-인슐린	Glu	Ile	Trp	0.12	0.13
32	Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-인슐린	Glu	Ile	Val	0	0.04
33	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-인슐린	Glu	Ile	Val	0.01	0.02
34	Glu(A14)Leu(B16)Ala(B25)Des(B30)-	Glu	Leu	Ala	0.01	0.04

[0355]

	인슐린					
35	Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)-인슐린	Glu	Val	Ile	0	0.01
36	Glu(A14)Gly(A21)Val(B16)Trp(B25)Des(B30)-인슐린	Glu	Val	Trp	0.17	0.23
37	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Trp(B25)Des(B30)-인슐린	Glu	Val	Trp	0.21	0.19
38	Glu(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-인슐린	Glu	Val	Val	0	0.03
39	Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-인슐린	Glu	Val	Val	0	0.02
40	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-인슐린	Glu	Val	Val	0.01	0.01

* 인간 인슐린에 대하여, *nd*: 결정되지 않음

** 0 의 값은 결합 친화도가 검출 한계 미만임을 의미함

C) 결론

표 2로부터 유도될 수 있는 바와 같이, 위치 B16 및/또는 B25에서의 다양한 소수성 치환이 테스트되었다(트립토판, 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신). 비록 다른 정도이기는 하지만, 이들 위치에서 소수성 치환을 갖는 테스트된 모든 인슐린 유사체는 인슐린 수용체 결합 활성의 감소를 나타냈다. Trp 치환(예를 들어 유사체 4, 15 및 23 참조)과 비교하여 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신과 같은 지방족 아미노산에 의한 치환은 인슐린 수용체 결합 활성에 더 강한 영향을 주었다. 가장 강한 효과는 분지쇄 아미노산인 발린, 류신 및 이소류신에서 관찰되었다. 이소류신, 발린 및 류신에 의한 치환은 인슐린 수용체 결합 활성을 상당히 감소시켰다. 흥미롭게도 B25 위치에서 이러한 치환을 가진 인슐린 유사체(예컨대 B25에서 발린, 류신 또는 이소류신 치환, 유사체 11, 12, 22, 24, 25, 29, 30, 32, 33, 35 38, 39, 40)는 그의 IR-B 결합 친화도를 기반으로 예상보다 최대 6배 더 큰 신호 전달 향상을 나타냈다. 구체적으로, Leu(B25)Des(B30)-인슐린 및 Val(B25)Des(B30)-인슐린(각각 유사체 11 및 12)은 인간 인슐린에 비하여 단지 1%의, 인슐린 수용체 B에 대한 결합 및 6%의 자가인산화를 나타냈다. 이와 유사하게, 위치 B16에서의 단일 류신 치환(유사체 3)도 약간 더 낮은 정도이기는 하지만 신호 전달의 유사한 향상을 나타냈다. 그에 비해, 유사체 26을 제외하고, 히스티딘 B25 치환을 갖는 유사체(유사체 10, 13, 14, 21, 28)도 수용체 결합 감소를 나타냈지만, 이는 자가인산화 감소를 수반하였다.

일부 경우(유사체 30, 32, 35, 38, 39), 인슐린 수용체 결합은 0%인 한편 자가인산화 분석에서는 여전히 활성을 나타냈다. 모든 이러한 유사체는 공통적으로 위치 B16 및 B25에서 발린 및/또는 이소류신 치환의 조합을 가지며, 이는 상기 조합이 인슐린 수용체 결합의 추가 저하에 대한 책임이 있음을 시사한다. 위치 B25에 치환이 없고 위치 B16에 교환이 있는 인슐린은 자가인산화 값에 비해 약간 더 높은 결합 친화도를 나타냈다(유사체 3, 4, 16, 17, 18, 19, 20).

위치 B25의 알라닌은 발린, 류신 또는 이소류신 치환(유사체 11, 12, 22)과 유사한 효과를 나타내지만 그 정도는 더 낮다. 발린, 류신 또는 이소류신 치환을 갖는 유사체의 수용체 결합 친화성 및 자가인산화 활성은 알라닌 치환을 갖는 유사체보다 더 낮다.

실시예 3: 여러 가지 재조합 프로테아제 및 모의 위액에서의 시험관 내 안정성의 측정

인슐린 유사체를 단백질 분해 안정성(α -키모트립신, 카텝신 D, 인슐린 분해 효소(IDE) 및 모의 위액)에 대하여 테스트하였다.

[0363] A) 분석 조건

프로테아제	분석에서의 최종 프로테아제 농도[$\mu\text{g/ml}$]	사용한 완충제 시스템
트립신	2	0.1 M 중탄산암모늄, pH 8.3
α -키모트립신	0.5	0.1 M 중탄산암모늄, pH 8.3
카르복시펩티다아제 A	0.1	TCNB 완충제, Assay Tris-Buffer 7.5 에서 트립신으로 사전 활성화(60 분)
카르복시펩티다아제 B	0.1	TCNB 완충제, Assay Tris-Buffer 7.5 에서 트립신으로 사전 활성화(30 분)
카텝신 D	2	아세테이트 완충제, pH 4.5
IDE	2	트리스 완충제, pH 7.5

[0364]

[0365] B) 모의 위액의 제조

[0366] 2 g의 염화나트륨 및 3.2 g의 정제된 펩신(돼지 위 점막으로부터, 이때 활성은 단백질 1 mg당 800 내지 2500 단위임)을 7.0 ml의 염산에 용해시켰다. 부피를 1000 ml까지 물로 조정하였다. 생성된 용액을 0.2 N 수산화나트륨 또는 0.2 N 염산과 혼합하여 pH 1.2 ± 0.1 로 조정하였다.

[0367] C) 일반 분석 절차

[0368] 안정성 결정은 적절한 시점(SIF 및 SGF의 경우 15, 30, 60, 120 및 240분; 프로테아제의 경우 15, 30, 60 및 120분)을 사용하여 수행하였다. 인큐베이션을 37°C에서 수행하고, 잔존 모 화합물의 %를 T0 시점을 기준으로 계산하였다.

[0369] 모 화합물의 측정을 위해, 에탄올(1 당량(v/v)) 및 원심분리 단계를 사용한 단백질 침전 후 상청액을 사용하여 적절한 생물분석적 LC-MS/MS 또는 LC-HRMS 방법을 사용하였다.

[0370] D) 샘플의 제조

[0371] 화합물을 40 μM 의 최종 농도로 묶은 염산에 용해시켰다. 분석에서 화합물 농도는 2 μM 이었다. 작용 용액의 1:20 희석을 프로테아제 완충액으로 수행하고, 그 후 샘플을 교반 하에 37°C에서 인큐베이션하였다. 적절한 시점에서 분취물을 취하고, 반응물을 에탄올(1 당량(v/v))로 켄칭하고, 그 후 원심분리하였다. 상청액을 분석하였다.

[0372] E) 결론

[0373] 특히, B-사슬의 위치 16 및 25에서의 발린 및 이소류신과 같은 친유성 아미노산의 치환을 조사하였다. 테스트된 유사체(2, 7, 11, 12, 14, 16, 19, 22, 23, 24 및 38) 중에서, 인간 인슐린에 비해 프로테아제 트립신, 카르복시펩티다아제 A 및 카르복시펩티다아제 B에 대하여 안정성의 사소한 차이만이 관찰되었다(데이터는 나타내지 않음). 일반적으로 A14 및 B25(유사체 22, 24, 38) 치환을 포함하는 모든 유사체는 α -키모트립신, 카텝신 D 및 인슐린 분해 효소(IDE)에 대해 향상된 단백질 분해 안정성을 나타냈다. 예를 들어, α -키모트립신의 경우 인간 인슐린은 2시간 내에 완전히 분해되며, 반면에 유사체 22는 거의 완전히 저항성이었다. 이와 유사하게, 테스트된 모든 B25-치환 유사체들은 카텝신 D에 대하여 향상된 안정성을 나타냈지만, 유사체 38(B16/B25 변이체)은 다른 B25 변이체와 비교하여 탁월한 안정성을 나타냈다.

[0374] 하나의 주목할만한 예외가 IDE의 경우에 관찰되었으며, 여기서, A14/B16 치환을 갖는 유사체 19가 B25 변이체와 비교하여 향상된 성능을 나타냈다. 그러나 이 데이터는 여기에서 테스트한, 글루탐산에 의한 A14에서의 치환이 안정성 증가에 중요함을 시사한다. 다음의 다른 치환도 안정성 증가에 유의한 것으로 나타났다. 예컨대 위치 B16 및 위치 B25에서의 치환. 예를 들어, 위치 B25에서의 아미노산 교환을 포함하는 유사체 7은 불안정성 증가를 초래한다.

[0375] [표 3]

4 가지의 상이한 프로테아제들과 함께 30 분 또는 120 분 동안 상이한 인슐린 유사체들을 인큐베이션한 후 잔존 인슐린 유사체의 퍼센트(테스트된 유사체의 서열은 표 1 참조).

유사체	골격	A14	B1 6	B2 5	위액 (30 분) [%]	α -키모 트립신 (120 분) [%]	카텝신 D (30 분) [%]	인슐린 분해 효소, IDE (30 분) [%]
WT	인슐린	Tyr	Tyr	Ph e	0	5	0	38
2	Glu(A14)Des(B30)-인슐린	Glu	Tyr	Ph e	0	35	0	81
7	Ala(B25)-인슐린	Tyr	Tyr	Ala	30	58	52	2
11	Leu(B25)Des(B30)-인슐린	Tyr	Tyr	Le u	nd	nd	nd	12
12	Val(B25)Des(B30)-인슐린	Tyr	Tyr	Val	44	31	43	11
14	Gly(A21)Trp(B16)His(B25)Des(B30)-인슐린	Tyr	Trp	His	nd	nd	nd	41
16	Glu(A14)His(B16)Des(B30)-인슐린	Glu	His	Ph e	nd	nd	nd	88
19	Glu(A14)Val(B16)Des(B30)-인슐린	Glu	Val	Ph e	0	30	0	98
22	Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-인슐린	Glu	Tyr	Ile	52	99	20	77
23	Glu(A14)Gly(A21)Trp(B25)Des(B30)-인슐린	Glu	Tyr	Trp	nd	nd	nd	80
24	Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-인슐린	Glu	Tyr	Val	52	40	59	86
38	Glu(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-인슐린	Glu	Val	Val	36	34	62	86

nd: 결정되지 않음

[0376]

[0377]

항목

[0378]

하기 항목은 설명의 일부이다:

[0379]

1. 모 인슐린에 비해 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 인슐린 유사체로서, 인슐린 유사체는 분지쇄 아미노산으로 치환된 위치 B16에서의 돌연변이 및/또는 분지쇄 아미노산으로 치환된 위치 B25에서의 돌연변이를 포함하는, 인슐린 유사체.

[0380]

2. 모 인슐린은 인간 인슐린, 돼지 인슐린 또는 소 인슐린인, 항목 1의 인슐린 유사체.

[0381]

3. 분지쇄 아미노산은 발린(Val), 이소류신(Ile) 및 류신(Leu)으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항목 1 및 2의 인슐린 유사체.

[0382]

4. 상기 인슐린 유사체는 글루탐산(Glu), 아스파르트산(Asp) 및 히스티딘(His)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산으로 치환된 위치 A14에서의 돌연변이를 추가로 포함하는, 항목 1 내지 3 중 어느 하나의 인슐린 유사체.

[0383]

5. 상기 인슐린 유사체는 위치 B30에서의 돌연변이를 추가로 포함하는, 항목 1 내지 4 중 어느 하나의 인슐린

유사체.

- [0384] 6. 위치 B30에서의 돌연변이는 모 인슐린의 위치 B30에서의 아미노산의 결실(Des(B30)-돌연변이)인, 항목 5의 인슐린 유사체.
- [0385] 7. 상기 인슐린 유사체는 글루탐산(Glu)으로 치환된 위치 B3에서의 돌연변이를 추가로 포함하는, 항목 1 내지 6 중 어느 하나의 인슐린 유사체.
- [0386] 8. 상기 인슐린은 글리신(Gly)으로 치환된 위치 A21에서의 돌연변이를 추가로 포함하는, 항목 1 내지 7 중 어느 하나의 인슐린 유사체.
- [0387] 9. 인슐린 유사체의 B 사슬은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진, 항목 1 내지 8 중 어느 하나의 인슐린 유사체:
- [0388] FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFLYTEPK (서열 번호 22)
- [0389] FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFIYTEPK (서열 번호 44)
- [0390] FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTEPK (서열 번호 48)
- [0391] FVEQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTEPK (서열 번호 50)
- [0392] FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYTEPK (서열 번호 58)
- [0393] FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYTEPK (서열 번호 60)
- [0394] FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFVYTEPK (서열 번호 64)
- [0395] FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFVYTEPK (서열 번호 66)
- [0396] FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFIYTEPK (서열 번호 70)
- [0397] FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTEPK (서열 번호 76)
- [0398] FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTEPK (서열 번호 78)
- [0399] FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTEPK (서열 번호 80)
- [0400] FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFLYTEPKT (서열 번호 85)
- [0401] FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTEPKT (서열 번호 86)
- [0402] FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFIYTEPKT (서열 번호 87)
- [0403] FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTEPKT (서열 번호 88)
- [0404] FVEQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTEPKT (서열 번호 89)
- [0405] FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYTEPKT (서열 번호 90)
- [0406] FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYTEPKT (서열 번호 91)
- [0407] FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFVYTEPKT (서열 번호 92)
- [0408] FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFVYTEPKT (서열 번호 93)
- [0409] FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFIYTEPKT (서열 번호 94)
- [0410] FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTEPKT (서열 번호 95)
- [0411] FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTEPKT (서열 번호 96), 및
- [0412] FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTEPKT (서열 번호 97).
- [0413] 10. 다음을 포함하는, 항목 1 내지 9 중 어느 하나의 인슐린 유사체:
- [0414] (a) 서열 번호 43에 나타낸 아미노산 서열(GIVEQCCTSIQSLEQLNYCN)을 갖는 A 사슬 및 서열 번호 44에 나타낸 아미노산 서열(FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFIYTEPK)을 갖는 B 사슬,

- [0415] (b) 서열 번호 47에 나타낸 아미노산 서열(GIVEQCCTSICSLEQLENYCN)을 갖는 A 사슬 및 서열 번호 48에 나타낸 아미노산 서열(FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFVTPK)을 갖는 B 사슬, 또는
- [0416] (c) 서열 번호 77에 나타낸 아미노산 서열(GIVEQCCTSICSLEQLENYCN)을 갖는 A 사슬 및 서열 번호 78에 나타낸 아미노산 서열(FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFFVTPK)을 갖는 B 사슬.
- [0417] 11. 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 인슐린 유사체:
- [0418] Leu(B16)-인간 인슐린,
- [0419] Val(B16)-인간 인슐린,
- [0420] Ile(B16)-인간 인슐린,
- [0421] Leu(B16)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0422] Val(B16)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0423] Ile(B16)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0424] Leu(B25)-인간 인슐린,
- [0425] Val(B25)-인간 인슐린,
- [0426] Ile(B25)-인간 인슐린,
- [0427] Leu(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0428] Val(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0429] Ile(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0430] Glu(A14)Leu(B16)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0431] Glu(A14)Ile(B16)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0432] Glu(A14)Val(B16)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0433] Glu(A14)Leu(B16)-인간 인슐린,
- [0434] Glu(A14)Ile(B16)-인간 인슐린,
- [0435] Glu(A14)Val(B16)-인간 인슐린,
- [0436] Glu(A14)Leu(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0437] Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0438] Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0439] Glu(A14)Leu(B25)-인간 인슐린,
- [0440] Glu(A14)Ile(B25)-인간 인슐린,
- [0441] Glu(A14)Val(B25)-인간 인슐린,
- [0442] Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0443] Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0444] Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0445] Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0446] Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0447] Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0448] Glu(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-인간 인슐린,

- [0449] Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0450] Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-인간 인슐린,
- [0451] Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)-인간 인슐린,
- [0452] Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)-인간 인슐린,
- [0453] Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)-인간 인슐린,
- [0454] Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)-인간 인슐린,
- [0455] Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)-인간 인슐린,
- [0456] Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)-인간 인슐린,
- [0457] Glu(A14)Val(B16)Val(B25)-인간 인슐린,
- [0458] Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-인간 인슐린, 및
- [0459] Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-인간 인슐린.
- [0460] 12. 모 인슐린의 B 사슬에 비해 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 인슐린 B 사슬로서, B 사슬은 분지쇄 아미노산으로 치환된 위치 B16에서의 돌연변이 및/또는 분지쇄 아미노산으로 치환된 위치 B25에서의 돌연변이를 포함하며, 선택적으로, 상기 인슐린 B 사슬은 위치 B30에서의 돌연변이를 추가로 포함하고, 위치 B30에서의 돌연변이는 모 인슐린의 위치 B30에서의 트레오닌의 결실(Des(B30)-돌연변이)인, 인슐린 B 사슬.
- [0461] 13. 인슐린 A 사슬 및 인슐린 B 사슬을 포함하는 프로인슐린으로서, 인슐린 B 사슬은 모 인슐린의 B 사슬에 비해 하나의 돌연변이를 포함하며, B 사슬은 분지쇄 아미노산으로 치환된 위치 B16에서의 돌연변이 및/또는 분지쇄 아미노산으로 치환된 위치 B25에서의 돌연변이를 포함하고, 선택적으로, 상기 프로인슐린의 인슐린 A 사슬은 글루탐산(Glu), 아스파르트산(Asp) 및 히스티딘(His)으로부터 선택되는 아미노산으로 치환된 위치 A14에서의 돌연변이를 포함하는, 프로인슐린.
- [0462] 14. 항목 1 내지 11 중 어느 하나의 인슐린 유사체, 항목 12의 인슐린 B 사슬, 및/또는 항목 13의 프로인슐린을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [0463] 15. 항목 1 내지 11 중 어느 하나의 인슐린 유사체, 항목 12의 인슐린 B 사슬, 항목 13의 프로인슐린, 및/또는 항목 14의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포.

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Sanofi

<120> Insulin analogs having reduced insulin receptor binding affinity

<130> DE2018/059

<150> EP 18 306 657.0

<151> 2018-12-11

<150> EP 18 306 658.8

<151> 2018-12-11

<150> EP 18 306 659.6

<151> 2018-12-11

<160> 97

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Chain A

<400> 1

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn

20

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Chain B

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 3

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 3

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn

20

<210> 4

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

>

<223> Chain A

<400> 5

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> 6

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 7

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 7

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Gly

20

<210> 8

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 8

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

1 5 10 15

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

20

25

<210> 9

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 9

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> 10

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 10

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 11

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 11

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> 12

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 13

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 13

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> 14

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 14

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 15

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 15

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> 16

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<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 Ala Tyr Thr Pro Lys

20 25

<210> 17

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 17

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> 18

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 18

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 19

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 19

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> 20

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 20

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 His Tyr Thr Pro Lys

20

25

<210> 21

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 21

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> 22

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 22

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 Leu Tyr Thr Pro Lys

20 25

<210> 23

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 23

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> 24

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<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 Phe Val Tyr Thr Pro Lys

20 25

<210> 25

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 25

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> 26

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 26

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 27

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 27

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Gly

20

<210> 28

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 29

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<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 Gly

20

<210> 30

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 30

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 31

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 31

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn

20

<210> 32

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 32

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

1 5 10 15

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

20

25

<210> 33

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 33

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Gly

20

<210> 34

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 34

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 35

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 35

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn

20

<210> 36

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 36

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 37

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 37

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn

20

<210> 38

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 38

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

1 5 10 15

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

20

25

<210> 39

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 39

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn

20

<210> 40

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 40

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 41

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 41

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn

20

<210> 42

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 42

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 His Tyr Thr Pro Lys

20 25

<210> 43

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 43

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn

20

<210> 44

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 44

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 Ile Tyr Thr Pro Lys

20

25

<210> 45

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 45

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Gly

20

<210> 46

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 46

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 Trp Tyr Thr Pro Lys

20 25

<210> 47

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 47

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn

20

<210> 48

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 48

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 Val Tyr Thr Pro Lys

20 25

<210> 49

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 49

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Gly

20

<210> 50

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 50

Phe Val Glu 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 Val Tyr Thr Pro Lys

20

25

<210> 51

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 51

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn

20

<210> 52

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 52

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 53

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 53

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn

20

<210> 54

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 54

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 55

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 55

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn

20

<210> 56

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 56

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 57

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 57

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn

20

<210> 58

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 58

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 59

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 59

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn

20

<210> 60

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 60

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 61

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 61

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Gly

20

<210> 62

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 62

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

1 5 10 15

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

20

25

<210> 63

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 63

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn

20

<210> 64

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 64

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

1 5 10 15

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

20

25

<210> 65

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 65

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Gly

20

<210> 66

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 66

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

1 5 10 15

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

20

25

<210> 67

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 67

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn

20

<210> 68

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 68

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 69

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 69

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn

20

<210> 70

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 70

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 71

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 71

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Gly

20

<210> 72

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 72

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 73

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 73

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Gly

20

<210> 74

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 74

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

1 5 10 15

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

20

25

<210> 75

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 75

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn

20

<210> 76

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 76

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

<210> 77

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 77

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
 1 5 10 15
 Glu Asn Tyr Cys Asn
 20

<210> 78

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 78

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

<210> 79

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain A

<400> 79

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Gly

20

<210> 80

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 80

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 81

<211> 21

<212> PRT

<213> Bos

<220>

<223> Chain A

<400> 81

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

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn

20

<210> 82

<211> 30

<212> PRT

<213> Bos

<220>

<223> Chain B

<400> 82

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 Ala

20 25 30

<210> 83

<211> 21

<212> PRT

<213> Sus

<220>

<223> Chain A

<400> 83

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> 84

<211> 30

<212> PRT

<213> Sus

<220>

<223> Chain B

<400> 84

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 Ala

20 25 30

<210> 85

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 85

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 Leu Tyr Thr Pro Lys

20 25

<210> 86

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 86

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 Val Tyr Thr Pro Lys

20 25

<210> 87

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 87

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 Ile Tyr Thr Pro Lys

20 25

<210> 88

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 88

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 Val Tyr Thr Pro Lys
 20 25

<210> 89

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 89

Phe Val Glu 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 Val Tyr Thr Pro Lys
 20 25

<210> 90

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 90

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

<210> 91

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 91

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

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

<210> 92

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

>

<223> Chain B

<400> 92

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

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

<210> 93

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 93

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

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

<210> 94

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 94

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 95

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 95

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 96

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 96

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 97

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chain B

<400> 97

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