



(43) 국제공개일  
2015년 7월 23일 (23.07.2015)

- (51) 국제특허분류:  
C07K 14/62 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)  
A61K 38/28 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/000576
- (22) 국제출원일: 2015년 1월 20일 (20.01.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2014-0006938 2014년 1월 20일 (20.01.2014) KR
- (71) 출원인: 한미약품 주식회사 (HANMI PHARM. CO., LTD.) [KR/KR]; 445-958 경기도 화성시 팔탄면 무하로 214, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 정성엽 (JUNG, Sung Youb); 448-521 경기도 용인시 수지구 만현로 107, 709 동 104 호, Gyeonggi-do (KR). 황상연 (HWANG, Sang Youn); 445-855 경기도 화성시 동탄반석로 231, 154 동 601 호, Gyeonggi-do (KR). 오의림 (OH, Euh Lim); 465-807 경기도 하남시 신장로 205 번길 16, 101 동 1212 호, Gyeonggi-do (KR).

박성희 (PARK, Sung Hee); 463-959 경기도 성남시 판교원로 209, 603 동 1804 호, Gyeonggi-do (KR). 김현욱 (KIM, Hyun Uk); 600-110 부산시 중구 초량상로 13, 1302 호, Busan (KR). 임창기 (LIM, Chang Ki); 445-983 경기도 화성시 영통로 27 번길 53, 207 동 904 호, Gyeonggi-do (KR). 권세창 (KWON, Se Chang); 135-506 서울시 강남구 선릉로 221, 408 동 1804 호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 손민 (SON, Min); 135-855 서울시 강남구 양재천로 163 STX R&D 센터 6층 한얼국제특허사무소, Seoul (KR).

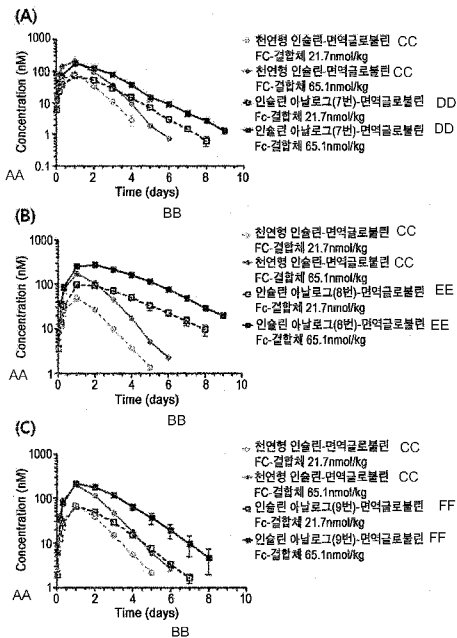
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: LONG-ACTING INSULIN AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 지속형 인슐린 및 그 용도

[Fig. 9]



(57) Abstract: The present invention relates to: an insulin analog in which the insulin receptor binding force is reduced for the purpose of increasing the half-life of insulin in the blood; a long-acting insulin using the same; a complex; and a method for preparing the long-acting insulin.

(57) 요약서: 본 발명은 인슐린의 혈중 반감기 증대를 위한 목적으로 인슐린 수용체 결합력이 감소된 인슐린 아날로그, 및 이를 이용한 지속형 인슐린, 결합체 및 지속형 인슐린을 제조하는 방법에 관한 것이다.

WO 2015/108398 A1



(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**공개:**

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

## 명세서

### 발명의 명칭: 지속형 인슐린 및 그 용도

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 인슐린의 혈중 반감기 증대를 위한 목적을 가진, 인슐린 수용체 결합력이 감소된 인슐린 아날로그 및 그를 이용한 지속형 인슐린에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [2] 인슐린은 인체의 체장에서 분비되는 혈당 조절 호르몬으로 혈액 내의 잉여 포도당을 세포로 옮겨 세포에 에너지를 공급하는 한편 혈당을 정상 수준으로 유지시켜 주는 역할을 한다. 그러나 당뇨 환자의 경우 이러한 인슐린이 부족하거나 인슐린 저항성 및 베타 세포의 기능소실로 인하여 인슐린이 정상적인 기능을 나타내지 않아 혈액 내의 포도당을 에너지원으로 이용하지 못하고 혈중 포도당 수준이 높은 고혈당 증세를 나타내어 결국 소변으로 당을 배출하게 된다. 이는 여러 합병증과 연계되어 있다. 인슐린 생성이 이상이 있거나(Type I), 인슐린 내성으로 인한(Type II) 당뇨환자에게는 인슐린 치료가 필수적이며, 인슐린 투여로 인해 정상 수준으로 혈당을 조절할 수 있다. 하지만, 인슐린의 경우 다른 단백질 및 펩타이드 호르몬과 마찬가지로 체내의 반감기가 극히 짧아 지속적으로 반복투여를 해야 한다는 단점이 있다. 이와 같은 잦은 투여는 환자에게 엄청난 고통과 불편함을 야기하게 된다. 따라서, 단백질의 생체 내 반감기를 증가시켜 투여 횟수를 줄임으로써 환자의 삶의 질을 높이기 위한 여러 단백질 제형화 연구와 화학적 결합체 등(지방산 결합체, 폴리에틸렌중합체 결합체)에 대한 연구가 진행되어 왔다. 현재 시판중인 지속형 인슐린으로 사노피-아벤티스사(Sanofi-Aventis)의 인슐린 글라진(insulin glargine, lantus, 지속시간 약 20-22시간)과 노보노디스크사(Novo Nordisk)의 인슐린 디테미르(insulin detemir, levemir, 지속시간 약 18-22시간) 및 트레시바 (degludec, tresiba, 지속시간 약 40시간)가 있다. 이들 지속성 인슐린들은 혈중 인슐린 농도의 피크가 없어 기저 인슐린으로 적합하지만, 이들 또한 반감기가 충분하게 길지 않아 매일 1회 또는 2회 투여해야 하는 불편함이 여전히 존재한다. 따라서, 장기간 투여해야 하는 당뇨병 환자에서 투여 빈도를 획기적으로 낮추어 환자의 편의성을 증가시킨다는 목적 달성에는 한계가 있다.

[3]

- [4] Authier F *et al* (Biochem J. 1998 Jun 1;332 ( Pt 2):421-30.), Duckworth WC *et al* (Endocr Rev. 1998 Oct;19(5):608-24.) 및 Valera Mora ME *et al* (J Am Coll Nutr. 2003 Dec;22(6):487-93.) 등은 체내 인슐린의 제거과정에 대해 기술해놓았다. 이를 살펴보면 50%이상의 인슐린은 신장에서 제거되며, 나머지 인슐린들은 근육, 지방, 간 등의 작용 부위(target site)에서 수용체 매개 제거 공정(receptor mediated clearance, RMC)를 통해 제거되는 것으로 알려져 있다.

[5]

[6] 이와 관련하여

[7] Lin S *et al* (J Pharmacol Exp Ther, 1998, 286(2):959-66.), Brange J *et al* (Diabetes Care. 1990 Sep;13(9):923-54), 및 Ribel U *et al* (Diabetes, 1990, 39: 1033-9.) 등에서는 인슐린의 RMC를 피하기 위해 in-vitro 활성을 약화시키는 경우, 인슐린의 혈중 농도를 증가시킬 수 있다는 내용의 보고를 하였다.

[8]

[9] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 인슐린의 혈중 반감기를 증가시키기 위해 예의 노력한 결과, 인슐린 수용체에 대한 결합력이 감소한 인슐린 아날로그를 개발하였고, 이를 포함하는 인슐린의 반감기 증가 및 생체이용율의 증가 혹은 지속적인 활성유지를 위한 제제가 인슐린의 혈중 반감기를 증가시킬 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[10]

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

[11] 본 발명의 하나의 목적은 인슐린의 체내 반감기 연장을 위한 목적을 가진, 인슐린 수용체에 대한 결합력이 감소된 신규한 인슐린 아날로그 및 그의 지속성 제형을 제공하는 것이다.

[12] 구체적으로, 본 발명의 하나의 목적은 천연형 인슐린에 비해 인슐린 수용체 결합력이 감소된, 인슐린 아날로그를 제공하는 것이다.

[13] 본 발명이 또 하나의 목적은 상기 인슐린 아날로그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 상기 발현 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 또 하나의 목적은 인슐린 아날로그에 반감기를 연장시킬 수 있는 생체적합성 물질을 결합시킨 것을 특징으로 하는, 지속형 인슐린을 제공하는 것이다.

[15] 본 발명의 또 하나의 목적은 (a) (i) 인슐린 아날로그 및 (ii) 폴리에틸렌 글리콜, 지방산, 콜레스테롤, 알부민 및 이의 단편, 알부민 결합물질, 특정 아미노산 서열의 반복단위의 중합체, 항체, 항체 단편, FcRn 결합물질, 생체 내 결합조직 혹은 그 유도체, 뉴클레오타이드, 파이브로넥틴, 트랜스페린(Transferrin), 사카라이드(saccharide) 및 고분자 중합체로 이루어진 군에서 선택된 생체적합성 물질을 각각 준비하는 단계; 및 (b) 상기 인슐린 아날로그 및 생체적합성 물질을 연결하는 단계를 포함하는, 지속형 인슐린을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[16] 본 발명의 또 하나의 목적은 하기 화학식 1을 갖는 결합체를 제공하는 것이다:

[17] [화학식 1]

[18] X-La-F;

[19] 여기에서

- [20] X는 천연형 인슐린에 비해 인슐린 수용체 결합력이 감소된, 인슐린 아날로그이고,  
 [21] L은 링커이고,  
 [22] a는 0 또는 자연수이며, 단 a가 2 이상일 때 각각의 L은 서로 독립적이고,  
 [23] F는 인슐린 아날로그의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 물질이다.  
 [24] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 결합체를 포함하는, 생체 내 지속성 및 안정성이 증가된 인슐린 지속성 제제를 제공하는 것이다.  
 [25] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 결합체를 포함하는, 당뇨병 치료용 지속성 제제를 제공하는 것이다.  
 [26] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 인슐린 아날로그 또는 인슐린 아날로그 결합체를 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 인슐린 관련 질환 치료 방법을 제공하는 것이다.

[27]

### 과제 해결 수단

- [28] 본 발명을 구현하기 위한 하나의 양태는 천연형 인슐린에 비해 인슐린 수용체 결합력이 감소된, 인슐린 아날로그를 제공하는 것이다.  
 [29] 하나의 구체예로서, 상기 인슐린 아날로그는 천연형 인슐린 대비 반감기가 10% 이상 증가함을 특징으로 한다.  
 [30] 다른 구체예로서, 상기 인슐린 아날로그는 천연형 인슐린의 하나 이상의 아미노산이 변이 또는 결실된 것을 특징으로 한다.  
 [31] 다른 구체예로서, 상기 인슐린 아날로그는 인슐린 B쇄의 1번 아미노산, 2번 아미노산, 3번 아미노산, 5번 아미노산, 8번 아미노산, 10번 아미노산, 12번 아미노산, 16번 아미노산, 23번 아미노산, 24번 아미노산, 25번 아미노산, 26번 아미노산, 27번 아미노산, 28번 아미노산, 29번 아미노산, 30번 아미노산, A쇄의 1번 아미노산, 2번 아미노산, 5번 아미노산, 8번 아미노산, 10번 아미노산, 12번 아미노산, 14번 아미노산, 16번 아미노산, 17번 아미노산, 18번 아미노산, 19번 아미노산 및 21번 아미노산으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되거나 결실된 것을 특징으로 한다.  
 [32] 다른 구체예로서, 상기 인슐린 아날로그는 B쇄의 8번 아미노산, 23번 아미노산, 24번 아미노산, 25번 아미노산, A쇄의 1번 아미노산, 2번 아미노산, 14번 아미노산 및 19번 아미노산으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것을 특징으로 한다.  
 [33] 다른 구체예로서, 상기 인슐린 아날로그의 치환된 아미노산은 알라닌, 글루탐산, 아스파라긴, 이소루신, 발린, 글루타민, 글라이신, 라이신, 히스티딘, 시스테인, 페닐알라닌, 트립토판, 프로린, 세린, 트레오닌 및 아스파틱산으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.  
 [34] 다른 구체예로서, 상기 인슐린 아날로그는 인슐린 A쇄 또는 B쇄의 하나 이상의

아미노산이 결실(deletion)되어 인슐린 수용체 결합력이 감소한 것을 특징으로 한다.

[35]

[36] 다른 구체예로서, 상기 인슐린 아날로그는 하기 일반식 1으로 표시되는 서열번호 37의 A쇄와 하기 일반식 2로 표시되는 서열번호 38의 B쇄를 포함하는 것을 특징으로 한다:

[37] [일반식 1]

[38] **Xaa1-Xaa2-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Xaa3-Gln-Leu-Glu-Asn-Xaa4-Cys-Asn** (서열번호: 37)

[39] 상기 일반식 1에서,

[40] Xaa1은 글리신 또는 알라닌이고,

[41] Xaa2는 이소류신 또는 알라닌이며,

[42] Xaa3는 타이로신, 글루탐산 또는 아스파라긴이며,

[43] Xaa4는 타이로신 또는 알라닌임.

[44]

[45] [일반식 2]

[46] **Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Xaa5-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Xaa6-Xaa7-Xaa8-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr** (서열번호: 38)

[47] 상기 일반식 2에서,

[48] Xaa5는 글리신 또는 알라닌이며,

[49] Xaa6은 글리신 또는 알라닌이며,

[50] Xaa7은 페닐알라닌 또는 알라닌이며,

[51] Xaa8은 페닐알라닌 또는 알라닌임.

[52]

[53] 다른 구체예로서, 상기 인슐린 아날로그는

[54] (i) 상기 일반식 1에서 Xaa1은 알라닌이고, Xaa2는 이소류신이며, Xaa3는 타이로신이며, Xaa4는 타이로신인 A쇄 및 상기 일반식 2에서 Xaa5는 글리신이고, Xaa6은 글리신이며, Xaa7은 페닐알라닌이며, Xaa8은 페닐알라닌인 B쇄를 포함하거나;

[55] (ii) 상기 일반식 1에서 Xaa1은 글리신이고, Xaa2는 알라닌이며, Xaa3는 타이로신이며, Xaa4는 타이로신인 A쇄 및 상기 일반식 2에서 Xaa5는 글리신이고, Xaa6은 글리신이며, Xaa7은 페닐알라닌이며, Xaa8은 페닐알라닌인 B쇄를 포함하거나;

[56] (iii) 상기 일반식 1에서 Xaa1은 글리신이고, Xaa2는 이소류신이며, Xaa3는 글루탐산 또는 아스파라긴이며, Xaa4는 타이로신인 A쇄 및 상기 일반식 2에서 Xaa5는 글리신이고, Xaa6은 글리신이며, Xaa7은 페닐알라닌이며, Xaa8은 페닐알라닌인 B쇄를 포함하거나;

[57] (iv) 상기 일반식 1에서 Xaa1은 글리신이고, Xaa2는 이소류신이며, Xaa3는

타이로신이며, Xaa4는 알라닌인 A쇄 및 상기 일반식 2에서 Xaa5는 글리신이고, Xaa6은 글리신이며, Xaa7은 페닐알라닌이며, Xaa8은 페닐알라닌인 B쇄를 포함하거나;

- [58] (v) 상기 일반식 1에서 Xaa1은 글리신이고, Xaa2는 이소류신이며, Xaa3는 타이로신이며, Xaa4는 타이로신인 A쇄 및 상기 일반식 2에서 Xaa5는 알라닌이고, Xaa6는 글리신이며, Xaa7은 페닐알라닌이며, Xaa8은 페닐알라닌인 B쇄를 포함하거나;
- [59] (vi) 상기 일반식 1에서 Xaa1은 글리신이고, Xaa2는 이소류신이며, Xaa3는 타이로신이며, Xaa4는 타이로신인 A쇄 및 상기 일반식 2에서 Xaa5는 글리신이고, Xaa6는 알라닌이며, Xaa7은 페닐알라닌이며, Xaa8은 페닐알라닌인 B쇄를 포함하거나;
- [60] (vii) 상기 일반식 1에서 Xaa1은 글리신이고, Xaa2는 이소류신이며, Xaa3는 타이로신이며, Xaa4는 타이로신인 A쇄 및 상기 일반식 2에서 Xaa5는 글리신이고, Xaa6는 글리신이며, Xaa7은 알라닌이며, Xaa8은 페닐알라닌인 B쇄를 포함하거나;
- [61] (viii) 상기 일반식 1에서 Xaa1은 글리신이고, Xaa2는 이소류신이며, Xaa3는 타이로신이며, Xaa4는 타이로신인 A쇄 및 상기 일반식 2에서 Xaa5는 글리신이고, Xaa6는 글리신이며, Xaa7은 페닐알라닌이며, Xaa8은 알라닌인 B쇄를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[62]

- [63] 본 발명의 또 하나의 양태는 상기 인슐린 아날로그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 상기 발현 벡터를 포함하는 형질전환체이다.

[64]

- [65] 본 발명의 또 하나의 양태는 인슐린 아날로그에 반감기를 연장시킬 수 있는 생체적합성 물질을 결합시킨 것을 특징으로 하는, 지속형 인슐린이다.

- [66] 하나의 구체예로서, 상기 생체적합성 물질은 폴리에틸렌 글리콜, 지방산, 콜레스테롤, 알부민 및 이의 단편, 알부민 결합물질, 특정 아미노산 서열의 반복단위의 중합체, 항체, 항체 단편, FcRn 결합물질, 생체 내 결합조직 혹은 그 유도체, 뉴클레오타이드, 파이브로넥틴, 트랜스페린(Transferrin), 사카라이드(saccharide), 및 고분자 중합체로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 한다.

- [67] 다른 구체예로서, 상기 인슐린 아날로그와 생체적합성 물질은 펩타이드 결합으로 서로 연결된 것을 특징으로 한다.

- [68] 다른 구체예로서, 상기 인슐린 아날로그와 생체적합성 물질은, 폴리에틸렌 글리콜, 지방산, 사카라이드(saccharide), 고분자 중합체, 저분자 화합물, 뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 링커를 통해 서로 연결된 것을 특징으로 한다.

- [69] 다른 구체예로서, 상기 인슐린 아날로그와 생체적합성 물질은 그 사이에 개재하는 링커를 통하여 연결되어 있고, 상기 생체적합성 물질은 FcRn 결합물질이며,
- [70] 상기 링커는 펩타이드 링커, 또는 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 다당류, 덱스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히아루론산 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 비펩타이드성 링커를 통해 연결되는 것을 특징으로 한다.
- [71] 다른 구체예로서, 상기 FcRn 결합물질은 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 폴리펩타이드인 것을 특징으로 한다.
- [72] 다른 구체예로서, 상기 비펩타이드성 링커의 각 말단이 각각 상기 생체적합성물질과 인슐린 아날로그의 아민기 또는 티올기에 결합된 것을 특징으로 한다.
- [73]
- [74] 본 발명의 또 하나의 양태는 (a) (i) 인슐린 아날로그 및 (ii) 폴리에틸렌 글리콜, 지방산, 콜레스테롤, 알부민 및 이의 단편, 알부민 결합물질, 특정 아미노산 서열의 반복단위의 중합체, 항체, 항체 단편, FcRn 결합물질, 생체 내 결합조직 혹은 그 유도체, 뉴클레오타이드, 파이브로넥틴, 트랜스페린(Transferrin), 사카라이드(saccharide) 및 고분자 중합체로 이루어진 군에서 선택된 생체적합성 물질을 각각 준비하는 단계; 및 (b) 상기 인슐린 아날로그 및 생체적합성 물질을 연결하는 단계를 포함하는, 지속형 인슐린을 제조하는 방법이다.
- [75]
- [76] 본 발명의 또 하나의 양태는 하기 화학식 1을 갖는 결합체이다:
- [77] [화학식 1]
- [78] X-La-F;
- [79] 여기에서
- [80] X는 천연형 인슐린에 비해 인슐린 수용체 결합력이 감소된, 인슐린 아날로그이고,
- [81] L은 링커이고,
- [82] a는 0 또는 자연수이며, 단 a가 2 이상일 때 각각의 L은 서로 독립적이고,
- [83] F는 인슐린 아날로그의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 물질이다.
- [84] 하나의 구체예로서, X는 천연형 인슐린에 비해 인슐린 수용체 결합력이 감소된, 인슐린의 B 쇄 또는 A 쇄의 하나 이상의 아미노산이 변이 또는 결실된 인슐린 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [85] 다른 구체예로서, 상기 인슐린 아날로그는 인슐린 B 쇄의 1번 아미노산, 2번 아미노산, 3번 아미노산, 5번 아미노산, 8번 아미노산, 10번 아미노산, 12번 아미노산, 16번 아미노산, 23번 아미노산, 24번 아미노산, 25번 아미노산, 26번 아미노산, 27번 아미노산, 28번 아미노산, 29번 아미노산, 30번 아미노산, A 쇄의



- 1번 아미노산, 2번 아미노산, 5번 아미노산, 8번 아미노산, 10번 아미노산, 12번 아미노산, 14번 아미노산, 16번 아미노산, 17번 아미노산, 18번 아미노산, 19번 아미노산 및 21번 아미노산으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되거나 결실된 것을 특징으로 한다.
- [86] 다른 구체예로서, 상기 인슐린 아날로그는 B쇄의 8번 아미노산, 23번 아미노산, 24번 아미노산, 25번 아미노산, A쇄의 1번 아미노산, 2번 아미노산, 14번 아미노산 및 19번 아미노산으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것을 특징으로 한다.
- [87] 다른 구체예로서, 상기 치환된 아미노산은 알라닌, 글루탐산, 아스파라긴, 이소루신, 발린, 글루타민, 글라이신, 라이신, 히스티딘, 시스테인, 페닐알라닌, 트립토판, 프로린, 세린, 트레오닌 및 아스파틱산으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [88] 다른 구체예로서, 상기 인슐린 아날로그의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 물질은 폴리에틸렌 글리콜, 지방산, 콜레스테롤, 알부민 및 이의 단편, 알부민 결합물질, 특정 아미노산 서열의 반복단위의 중합체, 항체, 항체 단편, FcRn 결합물질, 생체 내 결합조직, 뉴클레오타이드, 파이브로넥틴, 트랜스페린, 사카라이드 및 고분자 중합체로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 한다.
- [89] 다른 구체예로서, 상기 L은 펩타이드, 폴리에틸렌 글리콜, 지방산, 사카라이드(saccharide), 고분자 중합체, 저분자 화합물, 뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [90] 다른 구체예로서, 상기 X와 F는 공유 화학 결합, 비공유 화학 결합 또는 이들의 조합으로 L에 의해 서로 결합되는 것을 특징으로 한다.
- [91] 다른 구체예로서, 상기 고분자 중합체는 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 폴리사카라이드, 덱스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히아루론산, 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 비펩타이드성 링커인 것을 특징으로 한다.
- [92] 다른 구체예로서, 상기 F는 IgG Fc 영역인 것을 특징으로 한다.
- [93]
- [94] 본 발명의 또 하나의 양태는 상기 결합체를 포함하는, 생체 내 지속성 및 안정성이 증가된 인슐린 지속성 제제이다.
- [95]
- [96] 본 발명의 또 하나의 양태는 상기 결합체를 포함하는, 당뇨병 치료용 지속성 제제이다.
- [97]
- [98] 본 발명의 또 하나의 양태는 상기 인슐린 아날로그 또는 인슐린 아날로그 결합체를 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 인슐린 관련 질환 치료 방법이다.

[99]

**발명의 효과**

[100] 본 발명의 지속형 인슐린은 천연형 인슐린에 비해 현저히 증대된 혈중 반감기를 가지므로, 이를 사용하여 인슐린 투여를 필요로 하는 환자들의 편리성을 증대시킬 수 있다.

[101]

**도면의 간단한 설명**

[102] 도 1은 인슐린 아날로그의 순도를 단백질 전기영동으로 분석한 결과를 나타낸 도이다. 대표적인 인슐린 아날로그인 7번 아날로그에 대한 결과이다. 1번 레인: 크기 마커 (size marker), 2번 레인: 천연형 인슐린, 3번 레인: 인슐린 아날로그 (7번)

[103] 도 2는 인슐린 아날로그의 순도를 고압 크로마토그래피로 분석한 결과이다. 대표적인 인슐린 아날로그인 7번 아날로그에 대한 결과이다. (A) RP-HPLC, (B) SE-HPLC

[104] 도 3은 인슐린 아날로그의 펩타이드 맵핑 분석한 결과이다. 인슐린 아날로그는 대표적인 아날로그인 7번 아날로그에 대하여 분석하였다. (A) 천연형 인슐린, (B) 인슐린 아날로그 (7번)

[105] 도 4는 인슐린 아날로그-면역글로불린 Fc 결합체의 순도를 단백질 전기영동으로 분석한 결과이다. 대표적인 인슐린 아날로그인 7번 아날로그에 대한 결과이다. 1번 레인: 크기 마커, 2번 레인: 인슐린 아날로그 (7번)-면역글로불린 Fc 결합체

[106] 도 5는 인슐린 아날로그-면역글로불린 Fc 결합체의 순도를 고압 크로마토그래피로 분석한 결과이다. 대표적인 인슐린 아날로그인 7번 아날로그에 대한 결과이다. (A) RP-HPLC, (B) SE-HPLC, (C) IE-HPLC

[107] 도 6은 천연형 인슐린-면역글로불린 Fc 결합체 및 인슐린 아날로그-면역글로불린 Fc 결합체의 정상 랫드에서의 약동학적 분석을 나타낸 결과이다.

[108] (A) 천연형 인슐린-면역글로불린 Fc 결합체 및 인슐린 아날로그(7번)-면역글로불린 Fc 결합체, (B) 천연형 인슐린-면역글로불린 Fc 결합체 및 인슐린 아날로그(8번)-면역글로불린 Fc 결합체, (C) 천연형 인슐린-면역글로불린 Fc 결합체 및 인슐린 아날로그(9번)-면역글로불린 Fc 결합체

[109] ○: 천연형 인슐린-면역글로불린 Fc 결합체 (21.7 nmol/kg), ●: 천연형 인슐린-면역글로불린 Fc 결합체 (65.1 nmol/kg), □: 인슐린 아날로그-면역글로불린 Fc 결합체 (21.7 nmol/kg), ■: 인슐린 아날로그-면역글로불린 Fc 결합체 (65.1 nmol/kg).

[110]

## 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [111] 본 발명을 구현하기 위하여 하나의 양태로서 천연형 인슐린에 비해 인슐린 수용체 결합력이 감소된, 인슐린 아날로그를 제공한다.
- [112]
- [113] 본 발명에서 용어, "인슐린 아날로그(insulin analog)"란 인슐린과 동일한 생체 내의 혈당 조절기능을 보유한 물질을 말한다. 본 발명의 목적상 상기 인슐린 아날로그는 천연형 인슐린에 비해 인슐린 수용체 결합력이 감소된 물질인 것이 바람직하다. 또한, 상기 인슐린 아날로그는 인슐린 수용체에 대한 결합력 감소로 천연형 인슐린 대비 반감기가 10% 이상 증가한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [114]
- [115] 구체적으로, 상기 인슐린 아날로그는 천연형 인슐린에 비해 인슐린 수용체 결합력이 감소된, 인슐린의 B 쇠 또는 A 쇠의 하나 이상의 아미노산이 변이 또는 결실된 인슐린 아날로그일 수 있다. 예컨대, 천연형 인슐린의 일부 아미노산을 부가, 결실 또는 치환의 형태로 변형시켜서 천연형 인슐린에 비해 인슐린 수용체 결합력이 감소된 것일 수 있다.
- [116]
- [117] 천연형 인슐린은 췌장에서 분비되는 호르몬으로서 일반적으로 세포 내 글루코스 흡수를 촉진하고 지방의 분해를 억제하여 체내의 혈당을 조절하는 역할을 한다. 인슐린은 혈당조절 기능이 없는 프로인슐린(proinsulin) 전구체의 형태에서 프로세싱을 거쳐 혈당 조절 기능을 가지는 인슐린이 된다. 인슐린은 2개의 폴리펩티드 사슬, 즉 각각 21개 및 30개 아미노산 잔기를 포함하는 A-쇄 및 B-쇄로 구성되어 있고, 이들은 2개의 이황화 다리로 상호 연결되어 있다. 천연형 인슐린의 A-쇄 및 B-쇄는 각각 하기 서열번호: 39 및 40으로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [118]
- [119] A-쇄:
- [120] Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn (서열번호: 39)
- [121] B-쇄:
- [122] Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr (서열번호: 40)
- [123]
- [124] 본 발명의 실시예에서 사용된 인슐린 아날로그는 유전자 재조합 기술로 만든 인슐린 아날로그이지만, 본 발명은 이것에만 국한되는 것이 아니라 인슐린 수용체 결합력이 감소된 모든 인슐린 아날로그를 포함한다.
- [125] 구체적으로, 상기 인슐린 아날로그는 역방향 인슐린(inverted insulin), 인슐린

- 변이체(variants), 인슐린 단편(fragments), 인슐린 아고니스트(agonist), 유도체(derivatives) 등을 포함하며, 제조법으로는 유전자 재조합뿐만 아니라 고체상(solid phase) 방법으로도 제조할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [126] 상기 인슐린 아고니스트는 구조와 상관없이 인슐린의 생체 내 수용체에 결합하여 인슐린의 생물학적 활성을 나타내는 물질을 의미한다.
- [127] 상기 인슐린 유도체는 체내에서 혈당을 조절하는 기능을 보유하면서, 천연형 인슐린의 A-쇄 및 B-쇄의 아미노산 서열 각각에 대해 상동성을 보이며, 아미노산 한 잔기의 일부 그룹이 화학적으로 치환(예: alpha-methylation, alpha-hydroxylation), 제거(예: deamination) 또는 수식(예: N-methylation)된 형태의 펩타이드 형태를 포함한다. 또한, 인슐린 유도체에는 천연형 인슐린과 아미노산 서열에 상동성이 없어도 인슐린 수용체와 결합하여 체내에서 혈당을 조절할 수 있는 펩티드 모사체(mimic) 및 저분자 혹은 고분자 화합물 역시 포함한다.
- [128] 상기 인슐린 단편은 인슐린에 하나 이상의 아미노산이 추가 또는 삭제된 형태를 의미하며 추가된 아미노산은 천연에 존재하지 않는 아미노산(예: D형 아미노산)일 수 있고, 이러한 인슐린 단편은 체내에서 혈당을 조절하는 기능을 보유한다.
- [129] 상기 인슐린 변이체는 인슐린과 아미노산 서열이 하나 이상 다른 펩타이드로서 체내에서 혈당을 조절하는 기능을 보유한다.
- [130] 본 발명의 인슐린 아고니스트, 유도체, 단편 및 변이체에서 각각 사용된 제조방법은 독립적으로 사용될 수 있고 조합도 가능하다. 예를 들어 아미노산 서열이 하나 이상 다르고 아미노 말단 아미노산 잔기에 탈아미노화(deamination)가 도입된 것으로 체내에서 혈당을 조절하는 기능을 보유한 펩티드 역시 본 발명의 범주에 포함된다.
- [131] 구체적으로, 상기 인슐린 아날로그는 인슐린 B쇄의 1번 아미노산, 2번 아미노산, 3번 아미노산, 5번 아미노산, 8번 아미노산, 10번 아미노산, 12번 아미노산, 16번 아미노산, 23번 아미노산, 24번 아미노산, 25번 아미노산, 26번 아미노산, 27번 아미노산, 28번 아미노산, 29번 아미노산, 30번 아미노산, A쇄의 1번 아미노산, 2번 아미노산, 5번 아미노산, 8번 아미노산, 10번 아미노산, 12번 아미노산, 14번 아미노산, 16번 아미노산, 17번 아미노산, 18번 아미노산, 19번 아미노산 및 21번 아미노산으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있으며, 보다 구체적으로는 B쇄의 8번 아미노산, 23번 아미노산, 24번 아미노산, 25번 아미노산, A쇄의 1번 아미노산, 2번 아미노산, 14번 아미노산 및 19번 아미노산으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 기술한 아미노산에서 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 11 이상, 12 이상, 13 이상, 14 이상, 15 이상, 16 이상, 17 이상, 18 이상, 19 이상, 20 이상, 21 이상, 22 이상, 23 이상, 24 이상, 25 이상, 26 이상, 또는 27 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된

것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[132] 상기 기술한 위치의 아미노산 잔기들은 또한 알라닌, 글루탐산, 아스파라긴, 이소류신, 발린, 글루타민, 글라이신, 라이신, 히스티딘, 시스테인, 페닐알라닌, 트립토판, 프로린, 세린, 트레오닌 또는/및 아스파틱산으로 치환될 수 있다. 또한, 인슐린 A쇄 또는 B쇄의 하나 이상의 아미노산이 결실(deletion) 되어 인슐린 수용체 결합력이 감소한 인슐린 아날로그도 본 발명의 범주에 속하나 인슐린 수용체 결합력이 감소된 인슐린 아날로그는 제한 없이 포함될 수 있다.

[133] 본 발명에 따른 인슐린 아날로그는 천연형 인슐린의 A쇄 및 B쇄의 아미노산 서열에서 아미노산의 치환, 부가, 결실 또는 번역 후 변형(예를 들어, 메틸화, 아실화, 유비퀴틴화, 분자 내 공유결합)이 도입되어, 천연형 인슐린에 비해 감소된 인슐린 수용체 결합력을 가지는 임의의 펩티드를 포괄한다. 상기 아미노산의 치환 또는 부가 시에는 인간 단백질에서 통상적으로 관찰되는 20개의 아미노산뿐만 아니라 비정형 또는 비-자연적 발생 아미노산을 사용할 수 있다. 비정형 아미노산의 상업적 출처에는 Sigma-Aldrich, ChemPep 및 Genzyme pharmaceuticals가 포함될 수 있다. 이러한 아미노산이 포함된 펩티드와 전형적인 펩티드 서열은 상업화된 펩티드 합성 회사, 예를 들어 미국의 American peptide company, Bachem이나 한국의 Anygen을 통해 합성 및 구매가능하다.

[134] 보다 구체적으로, 상기 인슐린 아날로그는 하기 일반식 1으로 표시되는 서열번호 37의 A쇄와 하기 일반식 2로 표시되는 서열번호 38의 B쇄를 포함하는 것일 수 있다. 또한, 상기 A-쇄 및 B-쇄 서열이 이황화 결합으로 상호 연결된 형태일 수 있다. 다만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[135]

[136] [일반식 1]

[137] **Xaa1-Xaa2-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Xaa3-Gln-Leu-Glu-Asn-Xaa4-Cys-Asn** (서열번호: 37)

[138] 상기 일반식 1에서,

[139] Xaa1은 글리신 또는 알라닌이고,

[140] Xaa2는 이소류신 또는 알라닌이며,

[141] Xaa3는 타이로신, 글루탐산 또는 아스파라긴이며,

[142] Xaa4는 타이로신 또는 알라닌임.

[143]

[144] [일반식 2]

[145] **Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Xaa5-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Xaa6-Xaa7-Xaa8-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr** (서열번호: 38)

[146] 상기 일반식 2에서,

[147] Xaa5는 글리신 또는 알라닌이며,

[148] Xaa6은 글리신 또는 알라닌이며,

[149] Xaa7은 페닐알라닌 또는 알라닌이며,

- [150] Xaa8은 페닐알라닌 또는 알라닌임.
- [151]
- [152] 보다 더 구체적으로, 상기 인슐린 아날로그는
- [153] (i) 상기 일반식 1에서 Xaa1은 알라닌이고, Xaa2는 이소류신이며, Xaa3는 타이로신이며, Xaa4는 타이로신인 A쇄 및 상기 일반식 2에서 Xaa5는 글리신이고, Xaa6은 글리신이며, Xaa7은 페닐알라닌이며, Xaa8은 페닐알라닌인 B쇄를 포함하거나;
- [154] (ii) 상기 일반식 1에서 Xaa1은 글리신이고, Xaa2는 알라닌이며, Xaa3는 타이로신이며, Xaa4는 타이로신인 A쇄 및 상기 일반식 2에서 Xaa5는 글리신이고, Xaa6은 글리신이며, Xaa7은 페닐알라닌이며, Xaa8은 페닐알라닌인 B쇄를 포함하거나;
- [155] (iii) 상기 일반식 1에서 Xaa1은 글리신이고, Xaa2는 이소류신이며, Xaa3는 글루탐산 또는 아스파라긴이며, Xaa4는 타이로신인 A쇄 및 상기 일반식 2에서 Xaa5는 글리신이고, Xaa6은 글리신이며, Xaa7은 페닐알라닌이며, Xaa8은 페닐알라닌인 B쇄를 포함하거나;
- [156] (iv) 상기 일반식 1에서 Xaa1은 글리신이고, Xaa2는 이소류신이며, Xaa3는 타이로신이며, Xaa4는 알라닌인 A쇄 및 상기 일반식 2에서 Xaa5는 글리신이고, Xaa6은 글리신이며, Xaa7은 페닐알라닌이며, Xaa8은 페닐알라닌인 B쇄를 포함하거나;
- [157] (v) 상기 일반식 1에서 Xaa1은 글리신이고, Xaa2는 이소류신이며, Xaa3는 타이로신이며, Xaa4는 타이로신인 A쇄 및 상기 일반식 2에서 Xaa5는 알라닌이고, Xaa6는 글리신이며, Xaa7은 페닐알라닌이며, Xaa8은 페닐알라닌인 B쇄를 포함하거나;
- [158] (vi) 상기 일반식 1에서 Xaa1은 글리신이고, Xaa2는 이소류신이며, Xaa3는 타이로신이며, Xaa4는 타이로신인 A쇄 및 상기 일반식 2에서 Xaa5는 글리신이고, Xaa6는 알라닌이며, Xaa7은 페닐알라닌이며, Xaa8은 페닐알라닌인 B쇄를 포함하거나;
- [159] (vii) 상기 일반식 1에서 Xaa1은 글리신이고, Xaa2는 이소류신이며, Xaa3는 타이로신이며, Xaa4는 타이로신인 A쇄 및 상기 일반식 2에서 Xaa5는 글리신이고, Xaa6는 글리신이며, Xaa7은 알라닌이며, Xaa8은 페닐알라닌인 B쇄를 포함하거나;
- [160] (viii) 상기 일반식 1에서 Xaa1은 글리신이고, Xaa2는 이소류신이며, Xaa3는 타이로신이며, Xaa4는 타이로신인 A쇄 및 상기 일반식 2에서 Xaa5는 글리신이고, Xaa6는 글리신이며, Xaa7은 페닐알라닌이며, Xaa8은 알라닌인 B쇄를 포함하는 것일 수 있다. 그러나, 상기 예에 제한되는 것은 아니다. 그 예로, 상기 기술한 특징적인 아미노산 잔기를 포함하면서, 해당 인슐린 아날로그와 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상의 상동성을 가지며, 천연형 인슐린에 비하여 감소된

인슐린 수용체 결합력을 가지는 펩타이드 역시 본 발명의 범주에 포함된다.

- [161] 본 발명에서 용어, "상동성(homology)"은 천연형(wild type) 단백질의 아미노산 서열 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 본 발명의 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열과 상기와 같은 퍼센트 이상의 동일한 서열을 가지는 서열을 포함한다. 이러한 상동성은 두 서열을 육안으로 비교하여 결정할 수도 있으나, 비교대상이 되는 서열을 나란히 배열하여 상동성 정도를 분석해 주는 생물정보 알고리즘(bioinformatic algorithm)을 사용하여 결정할 수 있다. 상기 두 개의 아미노산 서열 사이의 상동성은 백분율로 표시할 수 있다. 유용한 자동화된 알고리즘은 Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group, Madison, W, USA)의 GAP, BESTFIT, FASTA와 TFASTA 컴퓨터 소프트웨어 모듈에서 이용가능하다. 상기 모듈에서 자동화된 배열 알고리즘은 Needleman & Wunsch와 Pearson & Lipman과 Smith & Waterman 서열 배열 알고리즘을 포함한다. 다른 유용한 배열에 대한 알고리즘과 상동성 결정은 FASTP, BLAST, BLAST2, PSIBLAST와 CLUSTAL W를 포함하는 소프트웨어에서 자동화되어 있다.

[162]

- [163] 본 발명의 또 하나의 양태는 상기 인슐린 아날로그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 상기 발현 벡터를 포함하는 형질전환체이다.

- [164] 상기 인슐린 아날로그에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

- [165] 상기 폴리뉴클레오티드는, 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오티드(DNA) 또는 리보뉴클레오티드(RNA)로, 게놈 DNA, cDNA 및 이로부터 전사되는 RNA를 포함하는 의미를 가지며, 기본 구성단위인 뉴클레오티드는 자연의 뉴클레오티드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다(Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York, 1980; Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, 90: 543-584, 1990). 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 표준 분자생물학 기술을 이용하여 분리 또는 제조할 수 있다. 예를 들어, 적절한 프라이머 서열을 이용하여 천연형 인슐린 유전자 서열(NM\_000207.2, NCBI)로부터 PCR(중합효소 연쇄반응)을 통해 증폭할 수 있고, 자동화된 DNA 합성기를 이용하는 표준 합성기술을 이용하여 제조할 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드는 본 발명에서 핵산과 혼용되어 사용될 수 있다.

- [166] 상기 인슐린 아날로그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 상기 기술한 A쇄 및 B쇄의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것일 수 있고, 이의 예로는, 서열번호: 19, 서열번호: 21, 서열번호: 23, 서열번호: 25, 서열번호: 27, 서열번호: 29, 서열번호: 31, 서열번호: 33, 및 서열번호: 35의 폴리뉴클레오티드를 들 수 있다. 그러나, 상기 예에 제한되지 않는다. 그 예로, 상기 기술한 폴리뉴클레오티드 서열뿐만 아니라, 상기 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는

95% 이상의 상동성을 가지며, 천연형 인슐린에 비하여 감소된 인슐린 수용체 결합력을 가지는 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 역시 본 발명의 범주에 포함된다.

- [167] 본 발명에 따른 재조합 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있고, 원핵세포 또는 진핵세포를 숙주세포로 사용하기 위한 벡터로서 구축될 수 있다.
- [168] 본 발명에서 용어, "벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 재조합 벡터로서, 핵산 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절요소를 포함하는 핵산 구조물(construct)을 의미한다. 본 발명은 인슐린 아날로그를 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터를 제조할 수 있는데, 상기 재조합 벡터를 숙주세포에 형질전환(transformation) 또는 형질감염(transfection) 시킴으로써, 본 발명의 인슐린 아날로그를 수득할 수 있다.
- [169] 본 발명에서 인슐린 아날로그를 코딩하는 핵산은 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 본 발명에서 용어, "작동 가능하게 연결된(operatively linked)"은 핵산 발현 조절서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 라이보솜 결합부위, 전사 종결서열 등)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.
- [170] 본 발명에서 용어, "프로모터"는 폴리머라제에 대한 결합 부위를 포함하고 프로모터 하위 유전자의 mRNA로의 전사 개시 활성을 가지는, 코딩 영역의 상위(upstream)의 비해독된 핵산 서열, 즉, 폴리머라제가 결합하여 유전자의 전사를 개시하도록 하는 DNA 영역을 말하며, mRNA 전사 개시부위의 5'-부위에 위치한다.
- [171] 예를 들어, 본 발명의 벡터가 재조합 벡터이고 원핵세포를 숙주로 하는 경우에, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예: tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL $\lambda$  프로모터, pR $\lambda$  프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합부위 및 전사/해독 종결서열을 포함하는 것이 일반적이다.
- [172] 또한, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHc79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈, pPICZ $\alpha$  시리즈, pUC19 등), 파지(예:  $\lambda$ gt4- $\lambda$ B,  $\lambda$ -Charon,  $\lambda$  $\Delta$ z1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.
- [173] 한편, 본 발명의 벡터가 재조합 벡터이고 진핵세포를 숙주로 하는 경우에, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터(예: 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 우두바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서



폴리아데닐화 서열(예: 소성장 호르몬 터미네이터 및 SV40 유래 폴리 아데닐화 서열)을 일반적으로 갖는다.

- [174] 또한, 본 발명의 재조합 벡터는 선택 마커로서 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 사용될 수 있다.
- [175] 본 발명의 재조합 벡터는 회수되는 목적 단백질, 즉 인슐린 아날로그의 정제를 용이하게 하기 위하여 필요에 따라 다른 서열을 추가로 포함할 수 있다. 상기 추가로 포함될 수 있는 서열은 단백질 정제용 태그 서열일 수 있으며, 예컨대, 글루타티온 S-트랜스퍼라제(Pharmacia, USA), 말토스 결합 단백질(NEB, USA), FLAG(ABI, USA) 및 6개 히스티딘(hexahistidine) 등이 있으나, 상기 예들에 의하여 목적 단백질의 정제를 위하여 필요한 서열의 종류가 제한되는 것은 아니다.
- [176] 상기와 같은 태그 서열을 포함하는 재조합 벡터에 의해 발현된 융합 단백질은 친화성 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다. 예컨대, 글루타티온-S-트랜스퍼라제가 융합된 경우에는 이 효소의 기질인 글루타티온을 이용할 수 있고, 6개 히스티딘 태그가 이용된 경우에는 Ni-NTA 칼럼을 이용하여 원하는 목적 단백질을 용이하게 회수할 수 있다.
- [177] 상기 인슐린 아날로그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 이용하여, 상기 벡터가 형질전환된 형질전환체가 구축될 수 있다.
- [178]
- [179] 본 발명에서 용어, "형질전환(transformation)"이란 DNA를 숙주세포 내로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것으로, 외부의 DNA를 세포 내로 도입하여 인위적으로 유전적인 변화를 일으키는 현상을 의미한다.
- [180] 본 발명의 형질전환 방법은 임의의 형질전환 방법이 사용될 수 있으며, 당업계의 통상적인 방법에 따라 용이하게 수행할 수 있다. 일반적으로 형질전환 방법에는  $\text{CaCl}_2$  침전법,  $\text{CaCl}_2$  침전법에 DMSO(dimethyl sulfoxide)라는 환원물질을 사용함으로써 효율을 높인 Hanahan 방법, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리아 매개 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법, 덱스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환법 등이 있다.
- [181] 본 발명에 따른 인슐린 아날로그를 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터를 형질전환시키기 위한 방법은 상기 예들에 국한되지 않으며, 당업계에서 통상적으로 사용되는 형질전환 또는 형질감염 방법이 제한 없이 사용될 수 있다.
- [182] 목적 핵산인 인슐린 아날로그를 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터를 숙주세포 내로 도입함으로써 본 발명의 형질전환체(transformant)를 획득할 수 있다.

[183] 본 발명에 적합한 숙주는 본 발명의 핵산을 발현하도록 하는 한 특별히 제한되지 않는다. 본 발명에 사용될 수 있는 숙주의 특정한 예로는 대장균(*E. coli*)과 같은 에스케리키아(*Escherichia*) 속 세균; 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같은 바실러스(*Bacillus*) 속 세균; 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)와 같은 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속 세균; 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 스키토사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*)와 같은 효모; 스포도프테라 프루기페르다(SF9)와 같은 곤충세포; 및 CHO, COS, BSC 등과 같은 동물세포가 있다. 바람직하게는, 숙주세포로 대장균을 사용한다.

[184]

[185] 본 발명의 또 하나의 양태는 인슐린 아날로그의 반감기 증가 및 생체 이용율을 증가시키거나, 지속적인 활성 유지를 가져오는 제제를 제공한다.

[186] 또한, 본 발명은 인슐린 아날로그에 반감기를 연장시킬 수 있는 생체적합성 물질을 결합시킨 것을 특징으로 하는, 지속형 인슐린을 제공한다.

[187] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1을 갖는 결합체를 제공한다.

[188] [화학식 1]

[189] X-La-F;

[190] 여기에서

[191] X는 천연형 인슐린에 비해 인슐린 수용체 결합력이 감소된, 인슐린 아날로그이고,

[192] L은 링커이고,

[193] a는 0 또는 자연수이며, 단 a가 2 이상일 때 각각의 L은 서로 독립적이고,

[194] F는 인슐린 아날로그의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 물질이다.

[195]

[196] 상기 인슐린 아날로그에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[197]

[198] 본 발명의 하나의 실시양태에 따르면, 인슐린 아날로그를 이의 반감기 증가 및 생체 이용율을 증가시키거나, 지속적인 활성 유지를 가져오는 제제에 적용하는 경우, 천연형 인슐린에 비하여 우수한 반감기 증가 및 생체 내 활성 효과를 나타낼 수 있다.

[199] 특히, 본 발명의 하나의 실시양태에 따르면, 이러한 생체 내 반감기를 연장시킬 수 있는 물질과 인슐린 아날로그를 결합하는 경우, 천연형 인슐린 결합체에 비해 월등히 증가한 생체 내 반감기를 보임을 확인하였다.

[200] 상기 인슐린 아날로그의 반감기 증가 및 생체 이용율을 증가시키거나, 지속적인 활성 유지를 가져오는 제제란, 인슐린 아날로그에 직접 공유결합하는 캐리어를 포함하는 제제나, 또는 직접적인 공유결합은 없더라도 인슐린 아날로그의 생체 내 활성 유지를 높일 수 있는 성분을 포함하는 제제를 말한다.

[201] 본 발명에서 "지속형 인슐린"이란, 인슐린 아날로그에 반감기를 연장시킬 수

있는 생체적합성 물질이 결합된 물질을 말한다. 상기 지속형 인슐린은 천연형 인슐린에 비하여 반감기가 증대된 효과를 지닌다.

- [202] 본 발명에서 "생체적합성 물질 또는 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 물질"은 인슐린 아날로그에 결합되어 이의 반감기를 연장시킬 수 있는 물질을 의미한다. 상기 반감기를 연장시킬 수 있는 생체적합성 물질은 본 발명에서 "캐리어"와 혼용되어 사용된다.
- [203] 상기 생체적합성 물질 혹은 캐리어는 인슐린 아날로그에 결합되어 이의 반감기를 연장시킬 수 있는 물질이라면 모두 포함하며, 그 예로 폴리에틸렌 글리콜, 지방산, 콜레스테롤, 알부민 및 이의 단편, 알부민 결합물질, 특정 아미노산 서열의 반복단위의 중합체, 항체, 항체 단편, FcRn 결합물질, 생체 내 결합조직 혹은 그 유도체, 뉴클레오타이드, 파이브로넥틴, 트랜스페린(Transferrin), 사카라이드(saccharide), 및 고분자 중합체로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 생체적합성 물질 혹은 캐리어는 공유 또는 비공유 결합으로 인슐린 아날로그에 결합될 수 있다.
- [204] 또한 인슐린 수용체 결합력이 감소된 인슐린 아날로그와 생체 내 반감기를 연장할 수 있는 생체적합성 물질 혹은 캐리어와의 연결은 유전자 재조합 방법과 고분자 혹은 저분자 화학물질을 이용한 *in vitro* 결합 등을 포함하며 어느 결합방식에 한정되지 않는다. 상기 FcRn 결합물질은 면역글로불린 Fc 영역일 수 있으며, 그 예로 IgG Fc일 수 있다.
- [205] 폴리에틸렌 글리콜을 캐리어로 사용시 위치특이적으로 폴리에틸렌 글리콜을 부착할 수 있는 Ambrx사의 Recode기술이 포함될 수 있으며, 당쇄부위에 특이적으로 부착할 수 있는 Neose사의 당페길화(glycopegylation) 기술이 포함될 수 있다. 또한 생체 내에서 폴리에틸렌 글리콜이 천천히 제거되는 releasable PEG 기술이 이에 포함될 수 있으나, 이에 한정되지 않으며 PEG를 이용하여 생체 내 이용율을 높인 기술들이 포함될 수 있다. 또한, 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 다당류, 덱스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산과 같은 고분자 중합체 역시 상기 기술에 의해 인슐린 아날로그에 결합될 수 있다.
- [206] 알부민을 캐리어로 사용할 경우 알부민 혹은 알부민 단편을 직접 인슐린 아날로그에 직접 공유결합하여 생체 내 안정성을 높일 수 있는 기술이 포함될 수 있으며 알부민을 직접 결합하지 않더라도 알부민에 결합하는 물질, 예를 들어 알부민 특이적 결합 항체 혹은 항체 단편을 인슐린 아날로그에 결합시켜 알부민에 결합하게 하는 기술 및 알부민에 결합력을 가진 특정 펩타이드/단백질(예를 들어, Affibody사의 albumod 기술을 이용하여 생산된 알부민 결합 펩타이드)을 인슐린 아날로그에 결합하는 기술이 포함될 수 있으며, 알부민에 결합력을 가진 지방산 등을 결합시키는 기술들이 이에 포함될 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 알부민을 이용한 생체내 안정성을 높일 수 있는

어떤 기술, 결합방식 등이 이에 포함될 수 있다.

- [207] 생체 내 반감기를 증가시키기 위해 항체 혹은 항체 단편을 캐리어로 사용하여 인슐린 아날로그에 결합시키는 기술도 본 발명에 포함될 수 있다. FcRn 결합 부위를 갖는 항체 혹은 항체 단편일 수 있으며, Fab 등 FcRn 결합부위를 포함하지 않는 어떠한 항체 단편일 수 있다. Catalytic 항체를 이용하는 CovX사의 CovX-body 기술이 이에 포함될 수 있으며, 면역글로불린 Fc 영역을 이용하여 생체 내 반감기를 증가시키는 기술도 본 발명에 포함될 수 있다.
- [208] 면역글로불린 Fc 영역을 이용할 경우 Fc 영역과 인슐린 아날로그와 결합하는 링커 및 결합방식은 펩타이드 결합 혹은 폴리에틸렌글리콜 등일 수 있으나 이에 한정되지 않으며 어떠한 화학적 결합방식일 수 있다. 또한 Fc 영역과 인슐린 아날로그의 결합비는 1:1 혹은 1:2 일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [209] 면역글로불린 Fc 영역은 생체 내에서 대사되는 생분해성의 폴리펩타이드이기 때문에, 약물의 캐리어로 사용하기에 안전하다. 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 면역글로불린 전체 분자에 비해 상대적으로 분자량이 적기 때문에 결합체의 제조, 정제 및 수율 면에서 유리할 뿐만 아니라, 아미노산 서열이 항체마다 다르기 때문에 높은 비균질성을 나타내는 Fab 부분이 제거되기 때문에 물질의 동질성이 크게 증가되고 혈중 항원성의 유발 가능성도 낮아지게 되는 효과도 기대할 수 있다
- [210] 본 발명에서, "면역글로불린 Fc 영역"은, 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역, 중쇄 불변영역 1(CH1)과 경쇄 불변영역(CL1)을 제외한, 중쇄 불변영역 2(CH2) 및 중쇄 불변영역 3(CH3) 부분을 의미하며, 중쇄 불변영역에 힌지(hinge) 부분을 포함하기도 한다. 또한 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 천연형과 실질적으로 동등하거나 향상된 효과를 갖는 한, 면역 글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역만을 제외하고, 일부 또는 전체 중쇄 불변영역 1(CH1) 및/또는 경쇄불변영역 1(CL1)을 포함하는 확장된 Fc영역일 수 있다. 또한, CH2 및/또는 CH3에 해당하는 상당히 긴 일부 아미노산 서열이 제거된 영역일 수도 있다.
- [211] 즉, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 1) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인, 2) CH1 도메인 및 CH2 도메인, 3) CH1 도메인 및 CH3 도메인, 4) CH2 도메인 및 CH3 도메인, 5) 1개 또는 2개의 이상의 도메인과 면역글로불린 힌지 영역(또는 힌지 영역의 일부)와의 조합, 6) 중쇄 불변영역 각 도메인과 경쇄 불변영역의 이량체일 수 있다.
- [212] 또한, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 천연형 아미노산 서열뿐만 아니라 이의 서열 변이체(mutant)를 포함한다. 아미노산 서열 변이체란 천연 아미노산 서열 중의 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 것을 의미한다. 예를 들면, IgG Fc의 경우 결합에 중요하다고 알려진 214 내지 238, 297 내지 299, 318 내지 322 또는 327 내지 331번 아미노산 잔기들이 변형을 위해 적당한 부위로서 이용될 수

있다.

- [213] 또한, 이황화 결합을 형성할 수 있는 부위가 제거되거나, 천연형 Fc에서 N-말단의 몇몇 아미노산이 제거되거나 또는 천연형 Fc의 N-말단에 메티오닌 잔기가 부가될 수도 있는 등 다양한 종류의 변이체가 가능하다. 또한, 이펙터 기능을 없애기 위해 보체결합부위, 예로 C1q 결합부위가 제거될 수도 있고, ADCC(antibody dependent cell mediated cytotoxicity) 부위가 제거될 수도 있다. 이러한 면역글로불린 Fc 영역의 서열 유도체를 제조하는 기술은 국제특허공개 제WO 97/34631호, 국제특허공개 제96/32478호 등에 개시되어 있다.
- [214] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩타이드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다 (H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다.
- [215] 경우에 따라서는 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화 (acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation), 아세틸화(acetylation) 및 아밀화(amidation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다.
- [216] 상기 기술한 Fc 변이체는 본 발명의 Fc 영역과 동일한 생물학적 활성을 나타내나 Fc 영역의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성을 증대시킨 변이체다.
- [217] 또한, 이러한 Fc 영역은 인간 및 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 피그 등의 동물의 생체 내에서 분리한 천연형으로부터 얻어질 수도 있고, 형질전환된 동물세포 또는 미생물로부터 얻어진 재조합형 또는 이의 유도체일 수 있다. 여기서, 천연형으로부터 획득하는 방법은 전체 면역글로불린을 인간 또는 동물의 생체로부터 분리한 후, 단백질 분해효소를 처리하여 얻을 수 있다. 파파인을 처리할 경우에는 Fab 및 Fc로 절단되고, 펩신을 처리할 경우에는 pF'c 및 F(ab)2로 절단된다. 이를 크기 배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography) 등을 이용하여 Fc 또는 pF'c를 분리할 수 있다.
- [218] 바람직하게는 인간 유래의 Fc 영역을 미생물로부터 수득한 재조합형 면역글로불린 Fc 영역이다.
- [219] 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 천연형 당쇄, 천연형에 비해 증가된 당쇄, 천연형에 비해 감소한 당쇄 또는 당쇄가 제거된 형태일 수 있다. 이러한 면역글로불린 Fc 당쇄의 증감 또는 제거에는 화학적 방법, 효소학적 방법 및 미생물을 이용한 유전 공학적 방법과 같은 통상적인 방법이 이용될 수 있다. 여기서, Fc에서 당쇄가 제거된 면역글로불린 Fc 영역은 보체(c1q)의 결합력이 현저히 저하되고, 항체-의존성 세포독성 또는 보체-의존성 세포독성이 감소 또는 제거되므로, 생체 내에서 불필요한 면역반응을 유발하지 않는다. 이런 점에서 약물의 캐리어로서의 본래의 목적에 보다 부합하는 형태는 당쇄가 제거되거나

비당쇄화된 면역글로불린 Fc 영역이라 할 것이다.

- [220] 본 발명에서 당쇄의 제거(Deglycosylation)는 효소로 당을 제거한 Fc 영역을 말하며, 비당쇄화(Aglycosylation)는 원핵동물, 바람직하게는 대장균에서 생산하여 당쇄화되지 않은 Fc 영역을 의미한다.
- [221] 한편, 면역글로불린 Fc 영역은 인간 또는 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 피그 등의 동물기원일 수 있으며, 바람직하게는 인간기원이다. 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 혼성(hybrid)에 의한 Fc 영역일 수 있다. 바람직하게는 인간 혈액에 가장 풍부한 IgG 또는 IgM 유래이며 가장 바람직하게는 리간드 결합 단백질의 반감기를 향상시키는 것으로 공지된 IgG 유래이다.
- [222] 한편, 본 발명에서 "조합"이란 이량체 또는 다량체를 형성할 때, 동일 기원 단쇄 면역글로불린 Fc 영역을 암호화하는 폴리펩타이드가 상이한 기원의 단쇄 폴리펩타이드와 결합을 형성하는 것을 의미한다. 즉, IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc 및 IgE의 Fc 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 2개 이상의 단편으로부터 이량체 또는 다량체의 제조가 가능하다.
- [223] 본 발명에서 "하이브리드(hybrid)"란 단쇄의 면역글로불린 Fc 영역 내에 2개 이상의 상이한 기원의 면역글로불린 Fc 단편에 해당하는 서열이 존재함을 의미하는 용어이다. 본 발명의 경우 여러 형태의 하이브리드가 가능하다. 즉, IgG Fc, IgM Fc, IgA Fc, IgE Fc 및 IgD Fc의 CH1, CH2, CH3 및 CH4로 이루어진 그룹으로부터 1개 내지 4개 도메인으로 이루어진 도메인의 하이브리드가 가능하며, 힌지를 포함할 수 있다.
- [224] 한편, IgG 역시 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 서브클래스로 나눌 수 있고 본 발명에서는 이들의 조합 또는 이들의 혼성화도 가능하다. 바람직하게는 IgG2 및 IgG4 서브클래스이며, 가장 바람직하게는 보체 의존적 독성(CDC, complement dependent cytotoxicity)과 같은 이펙터 기능(effector function)이 거의 없는 IgG4의 Fc 영역이다. 즉, 가장 바람직한 본 발명의 약물의 캐리어용 면역글로불린 Fc 영역은, 인간 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 영역이다. 인간 유래의 Fc 영역은 인간 생체에서 항원으로 작용하여 이에 대한 새로운 항체를 생성하는 등의 바람직하지 않은 면역 반응을 일으킬 수 있는 비-인간 유래의 Fc 영역에 비하여 바람직하다.
- [225] 생체 내 반감기를 증가시키기 위해 펩타이드 혹은 단백질 단편을 캐리어로 사용하여 인슐린 아날로그에 결합시키는 기술도 본 발명에 포함될 수 있다. 사용되는 펩타이드 혹은 단백질 단편은 특정 아미노산의 조합의 반복단위로 구성된 Elastin like polypeptide (ELP) 일수 있으며 versartis사의 인위적 폴리펩타이드 PEG인 Xten 기술도 본 발명에 포함된다. 또한 Zealand사의 multi-Lysine을 이용하여 생체 내 반감기를 증가시키는 Structure inducing probe(SIP) 기술도 이에 포함되며 Prolor사의 CTP 융합기술도 이에 포함되며,

생체 내 안정성이 높다고 알려진 트랜스페린(transferrin) 혹은 결합조직의 구성성분인 피브로넥틴(fibronectin) 등과 이의 유도체등도 포함될 수 있다. 인슐린 아날로그에 결합시키는 펩타이드 혹은 단백질은 이에 한정되지 않으며 인슐린 아날로그의 생체내 반감기를 증가시키는 어떠한 펩타이드 혹은 단백질은 본 발명의 범주에 포함된다.

- [226] 또한 생체내 반감기를 증가시키기 위해 사용되는 캐리어는 폴리사카라이드 (Polysaccharide) 혹은 지방산(fatty acid) 등 비펩타이드 물질일 수 있다.
- [227]
- [228] 상기 인슐린 수용체에 대한 결합력이 천연형에 비하여 감소한 인슐린 아날로그와 인슐린 아날로그의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 캐리어는 링커를 통하여 연결될 수 있다.
- [229] 이들을 서로 연결하는 링커는 펩타이드성 링커 또는 비펩타이드성 링커일 수 있으며, 그 예로 폴리에틸렌 글리콜, 지방산, 사카라이드(saccharide), 고분자 중합체, 저분자 화합물, 뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [230] 상기 고분자 중합체는 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 폴리사카라이드, 덱스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히아루론산, 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 비펩타이드성 링커일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 생분해성 고분자는 PLA(폴리락트산, polylactic acid) 및 PLGA(폴리락틱-글리콜산, polylactic-glycolic acid)와 같은 생분해성 고분자를 포함한다.
- [231] 상기 비펩타이드성 링커는 상기 기술한 것뿐만 아니라, 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함한다.
- [232] 상기 링커에 의한 결합은 비공유화학 결합 혹은 공유화학결합 등 어떠한 화학적 결합일 수 있으며, 그 제한은 없다.
- [233] 보다 구체적으로, 본 발명에서 비펩타이드성 중합체는 반복 단위가 2개 이상 결합된 생체적합성 중합체를 포함한다. 상기 반복 단위들은 펩타이드 결합이 아닌 임의의 공유결합을 통해 서로 연결된다. 이와 같은 비펩타이드성 중합체는 양 말단 또는 세 말단을 가질 수 있다.
- [234] 기존 인프레임 퓨전(inframe fusion) 방법으로 제조된 융합 단백질에서 사용된 펩타이드성 링커의 경우, 생체 내에서 단백질분해효소에 의해 쉽게 절단되어 캐리어에 의한 활성 약물의 혈중반감기 증가 효과를 기대만큼 얻을 수 없을 수도 있으므로, 본 발명에서는 펩타이드 링커 뿐 아니라 비펩타이드 링커를 이용하여 결합체를 제조할 수 있다. 비펩타이드 링커는 단백질분해효소에 저항성 있는 중합체를 사용하여 캐리어와 유사하게 펩타이드의 혈중반감기를 유지할 수 있다. 그러므로, 본 발명에서 사용될 수 있는 비펩타이드성 중합체는 상기와

같은 역할, 즉 생체 내 단백질분해효소에 저항성 있는 중합체이면 제한없이 사용될 수 있다. 비펩타이드성 중합체의 분자량은 1 내지 100 kDa 범위, 바람직하게는 1 내지 20 kDa 범위이나, 이에 제한되지 않는다.

[235] 또한, 상기 캐리어, 특히 면역글로블린 Fc 영역과 결합되는 본 발명의 비펩타이드성 중합체는 한 종류의 중합체뿐만 아니라 상이한 종류의 중합체들의 조합이 사용될 수도 있다.

[236]

[237] 본 발명에 사용되는 비펩타이드성 중합체는 캐리어, 특히 면역글로블린 Fc 영역, 그리고 인슐린 아날로그와 결합될 수 있는 반응기를 가질 수 있다.

[238] 상기 비펩타이드성 중합체의 양 말단 반응기는 반응 알데히드 그룹, 프로피온 알데히드 그룹, 부틸 알데히드 그룹, 말레이미드(maleimide) 그룹 및 석시니미드(succinimide) 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다. 상기에서, 석시니미드 유도체로는 석시니미딜 프로피오네이트, 히드록시 석시니미딜, 석시니미딜 카르복시메틸 또는 석시니미딜 카보네이트가 이용될 수 있다. 특히, 상기 비펩타이드성 중합체가 양 말단에 반응 알데히드 그룹의 반응기를 갖는 경우, 비특이적 반응을 최소화하고, 비펩타이드성 중합체의 양 말단에서 생리활성 폴리펩타이드 및 면역글로블린과 각각 결합하는데 효과적이다. 알데히드 결합에 의한 환원성 알킬화로 생성된 최종 산물은 아미드 결합으로 연결된 것보다 훨씬 안정적이다. 알데히드 반응기는 낮은 pH에서 N-말단에 선택적으로 반응하며, 높은 pH, 예를 들어 pH 9.0 조건에서는 라이신 잔기와 공유결합을 형성할 수 있다.

[239] 상기 비펩타이드성 중합체의 양 말단 반응기는 서로 같거나 다를 수 있다. 예를 들어, 한쪽 말단에는 말레이미드 그룹을, 다른 쪽 말단에는 알데히드 그룹, 프로피온 알데히드 그룹, 또는 부틸 알데히드 그룹을 가질 수 있다. 양쪽 말단에 히드록시 반응기를 갖는 폴리에틸렌 글리콜을 비펩타이드성 중합체로 이용하는 경우에는 공지의 화학반응에 의해 상기 히드록시기를 상기 다양한 반응기로 활성화하거나, 상업적으로 입수 가능한 변형된 반응기를 갖는 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 본 발명의 단쇄 인슐린 아날로그 결합체를 제조할 수 있다.

[240] 또한, 상기 인슐린 아날로그와 생체적합성 물질이 서로 링커를 통해 연결된 경우, 상기 비펩타이드성 링커의 각 말단이 각각 상기 생체적합성물질과 인슐린 아날로그의 아민기 또는 티올기에 결합된 것일 수 있다.

[241]

[242] 보다 구체적인 양태로서, 상기 인슐린 아날로그와 생체적합성 물질은 그 사이에 개재하는 링커를 통하여 연결되어 있고, 상기 생체적합성 물질은 FcRn 결합물질이며,

[243] 상기 링커는 펩타이드 링커, 또는 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 다당류, 덱스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질



중합체, 키틴, 히아루론산 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 비펩타이드성 링커를 통해 연결되는 형태일 수 있다.

[244]

[245] 한편, 생체이용율을 증가 혹은 지속적인 활성유지를 할 수 있는 제제로는 PLGA, 히알루론산, 키토산등을 이용한 마이크로 파티클, 나노파티클 등에 의한 서방성(sustained release) 제형이 이에 포함될 수 있다

[246] 또한, 생체 이용율을 증가 혹은 지속적인 활성유지를 할 수 있는 다른 양태의 제제로는 임플란트(implant), 흡입제(inhalation), 나зал(nasal) 제제, 패치(patch)와 같은 형태의 제제일 수 있다.

[247] 이러한 본 발명의 지속형 인슐린, 혹은 인슐린 아날로그 결합체는 에너지 대사 및 당 대사와 같은 기존의 인슐린의 생체 내 활성이 유지될 뿐만 아니라 인슐린 아날로그의 혈중 반감기 및 이로 인한 상기 펩타이드의 생체 내 효력 지속효과가 획기적으로 증가하게 하므로, 당뇨(Diabetes)의 치료에 유용하다.

[248]

[249] 본 발명의 또 하나의 양태는 (a) (i) 인슐린 아날로그 및 (ii) 폴리에틸렌 글리콜, 지방산, 콜레스테롤, 알부민 및 이의 단편, 알부민 결합물질, 특정 아미노산 서열의 반복단위의 중합체, 항체, 항체 단편, FcRn 결합물질, 생체 내 결합조직 혹은 그 유도체, 뉴클레오타이드, 파이브로넥틴, 트랜스페린(Transferrin), 사카라이드(saccharide) 및 고분자 중합체로 이루어진 군에서 선택된 생체적합성 물질을 각각 준비하는 단계; 및 (b) 상기 인슐린 아날로그 및 생체적합성 물질을 연결하는 단계를 포함하는, 지속형 인슐린을 제조하는 방법을 제공한다.

[250] 상기 인슐린 아날로그, 생체적합성 물질 및 지속성 인슐린에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[251]

[252] 본 발명의 또 하나의 양태는 상기 인슐린 아날로그 결합체를 포함하는 인슐린 지속성 제제를 제공한다. 상기 인슐린 지속성 제제는 생체 내 지속성 및 안정성이 천연형 인슐린에 비하여 증가된 인슐린 지속성 제제일 수 있다. 상기 지속성 제제는 당뇨병 치료용 약제학적 조성물일 수 있다. 다만, 이에 제한되지 않는다.

[253] 본 발명의 결합체를 포함한 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구투여시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소 및 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제 및 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제 및 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서, 서스펜션, 시럽 및 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의

경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐 및 서방형 제제 등으로 제형화 할 수 있다.

[254] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다.

[255] 또한, 충진제, 항응집제, 율활제, 습윤제, 향료 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[256]

[257] 본 발명의 또 하나의 양태는 상기 인슐린 아날로그 또는 인슐린 아날로그 결합체를 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 인슐린 관련 질환 치료 방법을 제공한다.

[258]

[259] 본 발명에 따른 결합체는 당뇨 치료에 유용한바, 이를 포함하는 약제학적 조성물을 투여함으로써, 상기 질환의 치료를 도모할 수 있다.

[260] 본 발명에서 "투여"는, 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 결합체의 투여 경로는 약물이 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강 내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장 내 투여 등이 될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 그러나 경구 투여시, 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 하는 것이 바람직하다. 바람직하게는 주사제 형태로 투여될 수 있다. 또한, 약제학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[261] 또한, 본 발명의 약제학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중 및 질환의 중등도 등의 여러 관련 인자와 함께, 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다. 본 발명의 약제학적 조성물은 생체 내 지속성 및 역가가 우수하므로, 본 발명의 약제학적 제제의 투여 횟수 및 빈도를 현저하게 감소시킬 수 있다.

[262]

### 발명의 실시를 위한 형태

[263] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.

[264]

[265] 실시예 1: 단쇄 인슐린 아날로그 발현 벡터의 제작

[266]

[267] 보유 중인 천연형 인슐린 발현 벡터를 주형으로 하여 A쇄 또는 B쇄의 아미노산을 하나씩 변형시킨 인슐린 아날로그들을 제작하기 위해 순방향 및 역방향 올리고 뉴클레오타이드를 합성한 후(표 2), PCR을 진행하여 각각의 아날로그 유전자를 증폭하였다.

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

[269] 표 1

[Table 1]

아날로그	변화서열
아날로그 1	A <sup>1</sup> G->A
아날로그 2	A <sup>2</sup> I->A
아날로그 3	A <sup>19</sup> Y->A
아날로그 4	B <sup>8</sup> G->A
아날로그 5	B <sup>23</sup> G->A
아날로그 6	B <sup>24</sup> F->A
아날로그 7	B <sup>25</sup> F->A
아날로그 8	A <sup>14</sup> Y->E
아날로그 9	A <sup>14</sup> Y->N

[270] 인슐린 아날로그 증폭을 위한 프라이머는 하기 표 2에 나타냈다.

[271]

[272] 표 2

[Table 2]

Analogs	서열	서열번호
Analog 1	5' GGGTCCCTGCAGAAGCGTGCGATTGTGGAACAATGCTGT 3' 5' ACAGCATTGTTCCACAATCGCACGCTTCTGCAGGGACCC 3'	서열번호 1 서열번호 2
Analog 2	5' TCCCTGCAGAAGCGTGGCGCGGTGGAACAATGCTGTACC 3' 5' GGTACAGCATTGTTCCACCGCGCCACGCTTCTGCAGGGA 3'	서열번호 3 서열번호 4
Analog 3	5' CTCTACCAGCTGGAAAACGCGTGTAAGTGAAGATCC 3' 5' GGATCCTCAGTTACACGCGTTTTCCAGCTGGTAGAG 3'	서열번호 5 서열번호 6
Analog 4	5' GTTAACCAACACTTGTGTGCGTCACACCTGGTGAAGCT 3' 5' AGCTTCCACCAGGTGTGACGCACACAAGTGTGGTTAAC 3'	서열번호 7 서열번호 8
Analog 5	5' CTAGTGTGCGGGGAACGAGCGTTCTTCTACACACCCAAG 3' 5' CTTGGGTGTGTAGAAGAAGCGTTCGTTCCCCGCACACTAG 3'	서열번호 9 서열번호 10
Analog 6	5' GTGTGCGGGGAACGAGGCGCGTTCTACACACCCAAGACC 3' 5' GGTCTTGGGTGTGTAGAACGCGCCTCGTTCCCCGCACAC 3'	서열번호 11 서열번호 12
Analog 7	5' TGCGGGGAACGAGGCTTCGCGTACACACCCAAGACCCGC 3' 5' GCGGGTCTTGGGTGTGTACGCGAAGCCTCGTTCCCCGCA 3'	서열번호 13 서열번호 14
Analog 8	5'-CCAGCATCTGCTCCCTCGAACAGCTGGAGAACTACTG-3' 5'-Cagtagttctccagctgttcgagggagcagatgctgg-3'	서열번호 15 서열번호 16
Analog 9	5'-CAGCATCTGCTCCCTCAACCAGCTGGAGAACTAC-3' 5'-Gtagttctccagctggttgagggagcagatgctg-3'	서열번호 17 서열번호 18

[273]

[274] 인슐린 아날로그 증폭을 위한 PCR 조건은 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 68°C에서 6분으로 이 과정을 18회 반복하였다. 이와 같은 조건에서 얻어진 인슐린 아날로그 단편을 세포 내에서 봉입체 형태로 발현시키기 위하여 pET22b 벡터에 삽입하였으며, 이렇게 얻어진 발현 벡터를 pET22b-인슐린 아날로그 1 내지 9라 명명하였다. 상기 발현 벡터는 T7 프로모터의 조절 하에 인슐린 아날로그 1 내지 9의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하며, 숙주 내에서 인슐린 아날로그 단백질을 봉입체 형태로 발현시켰다.

[275]

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

[277] 표 3

[Table 3]

아날로그	서열		서열번호
Analog 1	DNA	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GCG ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	19
	단백질	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg <b>Ala</b> Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	20

Analog 2	DNA	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC GCG GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	21
	단백 질	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly <b>Ala</b> Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	22
Analog 3	DNA	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC GCG TGC AAC	23
	단백 질	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn <b>Ala</b> Cys Asn	24
Analog 4	DNA	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GCG TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA	25

		CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	
	단백 질	Phe Val Asn Gln His Leu Cys <b>Ala</b> Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	26
Analog 5	DNA	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GCG TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	27
	단백 질	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg <b>Ala</b> Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	28
Analog 6	DNA	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC GCG TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG	29

		CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	
	단백 질	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly <b>Ala</b> Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	30
Analog 7	DNA	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC GCG TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	31
	단백 질	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe <b>Ala</b> Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	32
Analog 8	DNA	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC GAA CAG CTG	33



		GAG AAC TAC TGC AAC TGA	
	단백질	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu <b>Glu</b> Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	34
Analog 9	DNA	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC AAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC TGA	35
	단백질	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu <b>Asn</b> Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	36

[278]

[279] 실시예 2: 재조합 인슐린 아날로그 융합 펩타이드의 발현

[280]

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

제조합 융합 단백질의 생산을 위한 세포 스톡(cell stock)으로 사용하였다.

[282]

[283] 제조합 인슐린 아날로그들의 발현을 위하여, 각 세포 스톡 1 바이알을 녹여 500 ml의 2X 루리아 브로스에 접종하고 37°C에서 14~16시간 동안 진탕 배양하였다. OD<sub>600</sub>의 값이 5.0 이상을 나타내면 배양을 종료하고, 이를 종 배양액으로 사용하였다. 50 L 발효기(MSJ-U2, B.E.MARUBISHI, 일본)를 이용하여 종 배양액을 17 L의 발효 배지에 접종하고 초기 배스(bath) 발효를 시작하였다. 배양조건은 온도 37°C, 공기량 20 L/분(1 vvm), 교반 속도 500 rpm 그리고 30% 암모니아수를 사용하여 pH 6.70으로 유지시켰다. 발효 진행은 배양액 내의 영양소가 제한되었을 때, 추가배지(feeding solution)를 첨가하여 유가배양을 진행하였다. 균주의 성장은 OD 값에 의해 모니터링하며, OD 값이 100 이상에서 최종 농도 500 µM의 IPTG로 도입하였다. 배양은 도입 후 약 23~25시간까지 더 진행하며, 배양 종료 후, 원심 분리기를 사용하여 제조합 균주를 수확하여 사용 시까지 -80°C에 보관하였다.

[284]

[285] **실시예 3: 제조합 인슐린 아날로그의 회수 및 재접힘 (refolding)**

[286]

[287] 상기 실시예 2에서 발현시킨 제조합 인슐린 아날로그들을 가용성 형태로 바꾸기 위해 세포를 파쇄하고 리폴딩하였다. 세포 펠렛 100 g(wet weight)을 1 L 용해 완충액(50 mM Tris-HCl(pH 9.0), 1 mM EDTA(pH 8.0), 0.2 M NaCl 및 0.5% 트리톤 X-100)에 재부유하였다. 미세용액화(microfluidizer) 프로세서 M-110EH(AC Technology Corp. Model M1475C)를 이용하여 15,000 psi 압력으로 수행하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포 용해물을 7,000 rpm으로 4°C에서 20분 원심분리하여 상층액을 버리고, 3 L 세척완충액(0.5% 트리톤 X-100 및 50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA)에 재부유하였다. 7,000 rpm으로 4°C에서 20분 동안 원심분리하여 펠렛을 증류수에 재부유한 후, 동일한 방법으로 원심분리하였다. 펠렛을 취하여 400 ml의 완충액(1 M Glycine, 3.78 g Cysteine-HCl, pH 10.6)에 재부유하여 상온에서 1시간 동안 교반하였다. 재부유된 제조합 인슐린 아날로그 회수를 위하여 400 ml의 8 M 우레아를 추가한 후 40°C에서 1시간 교반하였다. 가용화된 제조합 인슐린 아날로그의 재접힘(refolding)을 위하여 7,000 rpm으로 4°C에서 30분간 원심분리한 후 상층액을 취한 후 여기에 7.2 L의 증류수를 연동펌프(peristaltic pump)를 이용하여 1000 ml/hr의 유속으로 넣어주면서 4°C에서 16시간 교반하였다.

[288]

[289] **실시예 4: 양이온 결합 크로마토그래피 정제**

[290]

[291] 45% 에탄올이 포함된 20 mM 소듐 사이트레이트 (pH 2.0) 완충액으로 평형화된 Source S (GE healthcare사) 컬럼에 재접힘이 끝난 시료를 결합시킨 후,

염화칼륨 0.5 M과 45% 에탄올이 포함된 20 mM 소듐 사이트레이트 (pH 2.0) 완충액을 사용하여 농도가 0%에서 100%가 되도록 10 컬럼 용량의 선형 농도구배로 인슐린 아날로그 단백질을 용출하였다.

[292]

[293] 실시예 5: 트립신(Trypsin)과 카복시펩티데이즈 B(Carboxypeptidase B) 처리

[294]

[295] 디솔팅 컬럼(Desalting column)으로 용출된 시료에서 염을 제거하고, 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 8.0)으로 교체하였다. 얻어진 시료 단백질량의 1000몰비에 해당하는 트립신과 2000몰비에 해당하는 카복시펩티데이즈 B를 첨가한 후, 16°C에서 16시간 교반하였다. 반응을 종료하기 위하여 1 M 소듐 사이트레이트(pH 2.0)를 이용하여 pH를 3.5로 낮추었다.

[296]

[297] 실시예 6: 양이온 결합 크로마토 그래피 정제

[298]

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

[300]

[301] 실시예 7: 음이온 결합 크로마토 그래피 정제

[302]

[303] 디솔팅 컬럼(Desalting column)으로 용출된 시료에서 염을 제거하고, 완충용액 10 mM Tris-HCl, pH 7.5)으로 교체하였다. 상기 실시예 6에서 얻어진 시료에서 순수한 인슐린 아날로그를 순수 분리하기 위해 10 mM 트리스 (pH 7.5) 완충액으로 평형화된 음이온 교환 컬럼 (Source Q: GE healthcare사)에 결합시킨 후, 0.5 M 소듐 크로라이드가 포함된 10 mM 트리스 (pH 7.5) 완충액을 사용하여 농도가 0%에서 100%가 되도록 10 컬럼 용량의 선형 농도구배로 인슐린 아날로그 단백질을 용출하였다.

[304] 정제된 인슐린 아날로그의 순도는 단백질 전기영동(SDS-PAGE, 도 1) 및 고압 크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 분석하였으며(도 2), 아미노산의 변경 확인은 펩타이드맵핑(도 3)과 각 피크의 분자량 분석을 통하여 확인하였다.

[305]

[306] 그 결과, 각각의 인슐린 아날로그가 목적하는 바에 따라, 아미노산 서열이 변경이 되었음을 확인할 수 있었다.

[307]

[308] 실시예 8: 인슐린 아날로그(7번) - 면역글로불린 Fc 결합체의 제조

[309]

- [310] 인슐린 아날로그 베타 체인의 N-말단에 3.4K ALD2 PEG(NOF, 일본)를 폐길화시키기 위하여, 인슐린 아날로그:PEG의 몰 비를 1:4로, 인슐린 아날로그 농도를 5 mg/ml로 4°C에서 약 2시간 반응시켰다. 이때 반응은 50 mM 소듐 사이트레이트(Sodium Citrate) pH 6.0, 45% 이소프로판올에서 이루어졌으며, 3.0 mM 농도의 소듐 시아노보로하이드라이드 환원제를 첨가하여 반응시켰다. 반응액은 소듐 사이트레이트(pH 3.0), 45% 에탄올이 포함된 버퍼와 KCl 농도 구배를 이용한 SP-HP(GE Healthcare, 미국) 컬럼을 사용하여 정제하였다.
- [311] 인슐린 아날로그-면역글로불린 Fc 단편 결합체를 제조하기 위하여, 위에서 정제된 모노 폐길화된(mono-PEGylated) 인슐린 아날로그와 면역글로불린 Fc 단편의 몰비가 1:1 - 1:2 가 되도록 하고 전체 단백질 농도를 약 20 mg/ml로 하여 25°C에서 13시간 반응시켰다. 이때 반응 완충액 조건은 100 mM HEPES, pH 8.2이며, 환원제로서 20 mM 소듐 시아노보로하이드라이드를 첨가하였다.
- [312] 반응이 종결된 후 반응액은 Q HP(GE Healthcare, 미국) 컬럼에 Tris-HCl (pH 7.5) 버퍼와 NaCl 농도 구배를 이용하여 반응하지 않은 면역글로불린 Fc 단편, 모노폐길화된 인슐린 아날로그를 분리 정제하였다.
- [313] 이후 Source 15ISO(GE Healthcare, 미국)를 2차 컬럼으로 사용하여, 잔류한 면역글로불린 Fc 단편 및 인슐린 아날로그가 면역글로불린 Fc 단편에 2개 이상 결합된 결합체를 제거하여, 인슐린 아날로그-면역글로불린 Fc 단편 결합체를 얻었다. 이때, Tris-HCl(pH 7.5)가 포함된 암모늄 설페이트(Ammonium sulfate)의 농도구배를 이용하여 용출하였으며, 용출된 인슐린 아날로그-면역글로불린 Fc 결합체는 단백질 전기영동 (SDS-PAGE, 도 4) 및 고압 크로마토그래피 (HPLC)를 사용하여 분석하였다(도 5).
- [314]
- [315] 그 결과, 거의 99%의 순도로 정제되었음을 확인할 수 있었다.
- [316]
- [317] **실시예 9: 천연형 인슐린, 인슐린 아날로그, 천연형 인슐린-면역글로불린 Fc 결합체와 인슐린 아날로그-면역글로불린 Fc 결합체들의 인슐린 수용체 결합력 비교**
- [318]
- [319] 인슐린 아날로그-면역글로불린 Fc 결합체의 인슐린 수용체 결합력을 측정하기 위하여, 표면 플라즈몬 공명(SPR, BIACORE 3000, GE healthcare)을 이용하여 분석하였다. CM5칩에 인슐린 수용체를 아민 커플링 방법으로 고정화 시키고, 5개 이상의 농도로 희석한 천연형 인슐린, 인슐린 아날로그, 천연형 인슐린-면역글로불린 Fc 결합체, 인슐린 아날로그-면역글로불린 Fc 결합체를 독립적으로 흘려주어 각각의 물질의 인슐린 수용체에 대한 결합력을 확인하였다. 각 물질의 결합력은 BIAevaluation 소프트웨어를 이용하여 산출하였으며, 이때 사용된 모델은 1:1 Langmuir binding with baseline drift를 이용하였다.

[320]

[321] 그 결과, 인간 인슐린과 대비하여 인슐린 아날로그(6번)은 14.8%, 인슐린 아날로그(7번)은 9.9%, 인슐린 아날로그(8번)은 57.1%, 인슐린 아날로그(9번)은 78.8%, 천연형 인슐린-면역글로불린 Fc 결합체는 실험 run에 따라 3.7-5.9%사이를 보였으며, 인슐린 아날로그(6번)-면역글로불린 Fc 결합체는 0.9%이하, 인슐린 아날로그(7번)-면역글로불린 Fc 결합체는 1.9%, 인슐린 아날로그(8번)-면역글로불린 Fc 결합체는 1.8%, 인슐린 아날로그(9번)-면역글로불린 Fc 결합체는 3.3%의 수용체 결합력이 확인되었다(표 4). 이와 같이 본 발명의 인슐린 아날로그들은 천연형 인슐린에 비해 인슐린 수용체 결합력이 감소되었으며, 이뿐만 아니라 인슐린 아날로그-면역글로불린 Fc 결합체들 또한 인슐린 수용체 결합력이 현저히 감소되었음을 관찰하였다.

[322] 표 4

[Table 4]

인슐린 수용체에 대한 결합력 비교

시험번호	물질명	$k_a(1/Ms, X10^5)$	$k_d(1/s, X10^{-3})$	$K_D(nM)$
시험 1	천연형 인간 인슐린	2.21(100%)	7.47(100%)	35.05(100%)
	인슐린 아날로그(6번)	0.28(12.6%)	6.60(88.4%)	237.0(14.8%)
시험 2	천연형 인간 인슐린	2.29(100%)	10.1(100%)	46.1(100%)
	천연형 인슐린-면역글로불린 Fc 결합체	0.09(3.9%)	7.8(77.2%)	781.3(5.9%)
	인슐린 아날로그(6번) 면역글로불린 Fc 결합체	0.02(0.9%)	10.1(100%)	5260.0(0.9%)
시험 3	천연형 인간 인슐린	1.76(100%)	10.73(100%)	63.47(100%)
	인슐린 아날로그(7번)	0.14(7.8%)	8.34(77.7%)	642.0(9.9%)
	천연형 인슐린-면역글로불린 Fc 결합체	0.05(2.7%)	5.85(54.5%)	1236.67(5.1%)
	인슐린 아날로그(7번) 면역글로불린 Fc 결합체	0.02(1.3%)	7.20(67.1%)	3270.0(1.9%)
시험 4	천연형 인간 인슐린	2.9(100%)	12.4(100%)	42.0(100%)
	인슐린 아날로그(8번)	1.78(60.0%)	12.9(104.6%)	73.4(57.1%)
	천연형 인슐린-면역글로불린 Fc 결합체	0.06(2.1%)	6.9(56.1%)	1140.0(3.7%)
	인슐린 아날로그(8번) 면역글로불린 Fc 결합체	0.03(0.9%)	6.4(51.6%)	2320.0(1.8%)
시험 5	천연형 인간 인슐린	2.0(100%)	9.7(100%)	50.4(100%)
	인슐린 아날로그(9번)	1.85(92.5%)	11.9(122.5%)	64.0(78.8%)
	천연형 인슐린-면역글로불린 Fc 결합체	0.09(4.3%)	7.4(76.5%)	862.0(5.9%)
	인슐린 아날로그(9번) 면역글로불린 Fc 결합체	0.05(2.4%)	7.3(75.0%)	1536.7(3.3%)

[323]

[324] 실시예 10: 천연형 인슐린-면역글로불린 Fc 결합체와 인슐린 아날로그-면역글로불린 Fc 결합체들의 *in vitro* 효력 비교

[325]

[326] 인슐린 아날로그-면역글로불린 Fc 결합체의 *in vitro* 효력을 측정하기 위하여, 지방세포로 분화시킨 마우스 유래의 3T3-L1 세포주를 이용한 글루코스 흡수능(glucose uptake, 또는 지질 합성능) 시험을 실시하였다. 3T3-L1 세포를 10% NBCS(신생 송아지 혈청)를 포함한 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco, Cat.No, 12430) 배지를 이용하여 주 2~3회 계대 배양하며 유지하였다. 3T3-L1 세포를 분화용 배지(10% FBS를 포함한 DMEM)를 이용하여 현탁한 후, 48구판에 구 당  $5 \times 10^4$ 개가 되도록 세포를 접종하여 48시간 동안 배양하였다. 지방세포로의 분화를 위하여 분화용 배지에  $1 \mu\text{g/mL}$  인간 인슐린(Sigma, Cat. No. I9278),  $0.5 \text{ mM}$  IBMX(3-isobutyl-1-methylxanthine, Sigma, Cat. No. I5879),  $1 \mu\text{M}$  Dexamethasone(Sigma, Cat. No. D4902)을 혼합하고, 기존 배지를 제거한 후 구당  $250 \mu\text{L}$ 씩 넣어주었다. 48시간 후 분화용 배지에  $1 \mu\text{g/mL}$ 의 인간 인슐린만을 첨가한 배지로 다시 교환하였다. 이후, 48시간마다  $1 \mu\text{g/mL}$ 의 인간 인슐린을 첨가한 분화용 배지로 교환하면서 7-9일 간 지방세포로의 분화가 유도되는 것을 확인하였다. 글루코스 흡수능 시험을 위하여, 분화가 끝난 세포를 무혈청 DMEM 배지로 1회 수세한 후  $250 \mu\text{L}$ 씩 넣어 4시간 동안 혈청 고갈을 유도하였다. 인간 인슐린은  $10 \mu\text{M}$ 부터  $0.01 \mu\text{M}$ 까지, 천연형 인슐린-면역글로불린 Fc 결합체와 인슐린 아날로그-면역글로불린 Fc 결합체들은 각각  $20 \mu\text{M}$ 부터  $0.02 \mu\text{M}$ 까지 무혈청 DMEM 배지로 10배씩 순차적으로 희석하여 준비하였다. 준비된 시료를 세포에 각각  $250 \mu\text{L}$ 씩 첨가한 후, 24시간 동안  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{ CO}_2$  배양기에서 배양하였다. 배양이 끝난 배지의 글루코스 잔량을 측정을 위해  $200 \mu\text{L}$ 의 배지를 취해 D-PBS로 각각 5배 희석하여 GOPOD(GOPOD Assay Kit, Megazyme, Cat. No. K-GLUC) 분석을 진행하였다. 글루코스 표준용액의 흡광도를 기준으로 배지의 잔여 글루코스 농도를 환산하고, 천연형 인슐린-면역글로불린 Fc 결합체, 인슐린 아날로그-면역글로불린 Fc 결합체들의 글루코스 흡수능에 대한  $\text{EC}_{50}$ 를 각각 산출하였다.

[327]

[328] 그 결과, 인간 인슐린과 대비하여 천연형 인슐린-면역글로불린 Fc 결합체는 11.6%, 인슐린 아날로그(6번)-면역글로불린 Fc 결합체는 0.43%, 인슐린 아날로그(7번)-면역글로불린 Fc 결합체는 1.84%, 인슐린 아날로그(8번)-면역글로불린 Fc 결합체는 16.0%, 인슐린 아날로그(9번)-면역글로불린 Fc 결합체는 15.1%의 글루코스 흡수능을 보였다(표 5).

[329]

이와 같이 본 발명의 인슐린 아날로그(6번)-면역글로불린 Fc 결합체와 인슐린 아날로그(7번)-면역글로불린 Fc 결합체의 *in vitro* 역가는 천연형

인슐린-면역글로불린 Fc 결합체와 비교하여 획기적으로 감소되었으며, 인슐린 아날로그(8번)-면역글로불린 Fc 결합체와 인슐린 아날로그(9번)-면역글로불린 Fc 결합체의 *in vitro* 역가는 천연형 인슐린-면역글로불린 Fc 결합체와 유사한 수준으로 관찰되었다.

[330] 표 5

[Table 5]

시험번호	물질명	글루코스 흡수능 (천연형 인슐린 대비 비율)
시험 1	천연형 인간 인슐린	100%
	천연형 인슐린-면역글로불린 Fc 결합체	11.6%
	인슐린 아날로그 6번-면역글로불린 Fc 결합체	0.43%
	인슐린 아날로그 7번-면역글로불린 Fc 결합체	1.84%
시험 2	천연형 인간 인슐린	100%
	천연형 인슐린-면역글로불린 Fc 결합체	15.2%
	인슐린 아날로그 8번-면역글로불린 Fc 결합체	16.0%
시험 3	천연형 인간 인슐린	100%
	천연형 인슐린-면역글로불린 Fc 결합체	11.7%
	인슐린 아날로그 9번-면역글로불린 Fc 결합체	15.1%

[331]

[332] 실시예 11: 인슐린 아날로그-면역글로불린 Fc 결합체의 약동학 (pharmacokinetics) 확인

[333]

[334] 인슐린 아날로그-면역글로불린 Fc 결합체들의 약동학을 확인하기 위하여 5일 동안 실험실에 적응한 정상 랫트(SD rat, 수컷, 6주령)에서 시간에 따른 혈중 농도 비교 시험을 진행하였다. 천연형 인슐린-면역글로불린 Fc 결합체와 인슐린 아날로그-면역글로불린 Fc 결합체들을 21.7 nmol/kg와 65.1 nmol/kg를 각각 피하 투여한 후 0, 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216시간에서 채혈하였다. 각 시간에서의 천연형 인슐린-면역글로불린 Fc 결합체 및 인슐린



아날로그-면역글로불린 Fc 결합체들의 혈중 내 잔여 농도는 효소결합 면역흡착 분석법(ELISA, enzyme linked immunosorbent assay)이 이용하여 측정하였으며, 사용된 키트는 Insulin ELISA(ALPCO, 미국)를 사용하였다. 단, 측정항체(detection antibody)로는 mouse anti-human IgG4 HRP conjugate (Alpha Diagnostic Intl, Inc, 미국)를 사용하였다.

[335]

[336] 천연형 인슐린-면역글로불린 Fc 결합체와 인슐린 아날로그-면역글로불린 Fc 결합체들의 약동학을 살펴본 결과 두 물질 모두 투여 농도에 비례하여 혈중 농도가 증가함을 알 수 있었으며, 인슐린 수용체에 대한 낮은 결합력을 보이는 인슐린 아날로그-면역글로불린 Fc 결합체들이 천연형 인슐린-Fc 결합체에 비해 매우 증가한 반감기를 보임을 알 수 있었다(도 6).

[337]

[338] 이와 같은 결과들은 인슐린 수용체 결합력이 감소하도록 변형된 본 발명의 인슐린 아날로그들이, 면역글로불린 Fc 영역과 결합된 결합체를 형성하였을 경우 실제 생체 내에서 혈중 반감기가 획기적으로 증가하여 안정적인 인슐린 제제로 제공될 수 있으며 당뇨병 치료제로 효과적으로 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.

[339]

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

## 청구범위

- [청구항 1] 천연형 인슐린에 비해 인슐린 수용체 결합력이 감소된, 인슐린 아날로그.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 천연형 인슐린 대비 반감기가 10% 이상 증가함을 특징으로 하는 인슐린 아날로그.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 인슐린 아날로그는 천연형 인슐린의 하나 이상의 아미노산이 변이 또는 결실된 것인, 인슐린 아날로그.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 인슐린 아날로그는 인슐린 B쇄의 1번 아미노산, 2번 아미노산, 3번 아미노산, 5번 아미노산, 8번 아미노산, 10번 아미노산, 12번 아미노산, 16번 아미노산, 23번 아미노산, 24번 아미노산, 25번 아미노산, 26번 아미노산, 27번 아미노산, 28번 아미노산, 29번 아미노산, 30번 아미노산, A쇄의 1번 아미노산, 2번 아미노산, 5번 아미노산, 8번 아미노산, 10번 아미노산, 12번 아미노산, 14번 아미노산, 16번 아미노산, 17번 아미노산, 18번 아미노산, 19번 아미노산 및 21번 아미노산으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되거나 결실된 것인, 인슐린 아날로그.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 인슐린 아날로그는 B쇄의 8번 아미노산, 23번 아미노산, 24번 아미노산, 25번 아미노산, A쇄의 1번 아미노산, 2번 아미노산, 14번 아미노산 및 19번 아미노산으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것인, 인슐린 아날로그.
- [청구항 6] 제4항에 있어서, 상기 치환된 아미노산은 알라닌, 글루탐산, 아스파라긴, 이소루신, 발린, 글루타민, 글라이신, 라이신, 히스티딘, 시스테인, 페닐알라닌, 트립토판, 프로린, 세린, 트레오닌 및 아스파틱산으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 인슐린 아날로그.
- [청구항 7] 제4항에 있어서, 상기 인슐린 아날로그는 인슐린 A쇄 또는 B쇄의 하나 이상의 아미노산이 결실(deletion)되어 인슐린 수용체 결합력이 감소한 것인, 인슐린 아날로그.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 인슐린 아날로그는 하기 일반식 1으로 표시되는 서열번호 37의 A쇄와 하기 일반식 2로 표시되는 서열번호 38의 B쇄를 포함하는 것인, 인슐린 아날로그:
- [일반식 1]
- Xaa1-Xaa2-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Xaa3-Gln-Leu-Glu-Asn-Xaa4-Cys-Asn** (서열번호: 37)
- 상기 일반식 1에서,

Xaa1은 글리신 또는 알라닌이고,  
 Xaa2는 이소류신 또는 알라닌이며,  
 Xaa3는 타이로신, 글루탐산 또는 아스파라긴이며,  
 Xaa4는 타이로신 또는 알라닌임.

[일반식 2]

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-**Xaa5**-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-**Xaa6**-**Xaa7**-**Xaa8**-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr  
 (서열번호: 38)

상기 일반식 2에서,

Xaa5는 글리신 또는 알라닌이며,  
 Xaa6은 글리신 또는 알라닌이며,  
 Xaa7은 페닐알라닌 또는 알라닌이며,  
 Xaa8은 페닐알라닌 또는 알라닌임.

[청구항 9]

제8항에 있어서, 상기 인슐린 아날로그는

- (i) 상기 일반식 1에서 Xaa1은 알라닌이고, Xaa2는 이소류신이며, Xaa3는 타이로신이며, Xaa4는 타이로신인 A쇄 및 상기 일반식 2에서 Xaa5는 글리신이고, Xaa6은 글리신이며, Xaa7은 페닐알라닌이며, Xaa8은 페닐알라닌인 B쇄를 포함하거나;
- (ii) 상기 일반식 1에서 Xaa1은 글리신이고, Xaa2는 알라닌이며, Xaa3는 타이로신이며, Xaa4는 타이로신인 A쇄 및 상기 일반식 2에서 Xaa5는 글리신이고, Xaa6은 글리신이며, Xaa7은 페닐알라닌이며, Xaa8은 페닐알라닌인 B쇄를 포함하거나;
- (iii) 상기 일반식 1에서 Xaa1은 글리신이고, Xaa2는 이소류신이며, Xaa3는 글루탐산 또는 아스파라긴이며, Xaa4는 타이로신인 A쇄 및 상기 일반식 2에서 Xaa5는 글리신이고, Xaa6은 글리신이며, Xaa7은 페닐알라닌이며, Xaa8은 페닐알라닌인 B쇄를 포함하거나;
- (iv) 상기 일반식 1에서 Xaa1은 글리신이고, Xaa2는 이소류신이며, Xaa3는 타이로신이며, Xaa4는 알라닌인 A쇄 및 상기 일반식 2에서 Xaa5는 글리신이고, Xaa6은 글리신이며, Xaa7은 페닐알라닌이며, Xaa8은 페닐알라닌인 B쇄를 포함하거나;
- (v) 상기 일반식 1에서 Xaa1은 글리신이고, Xaa2는 이소류신이며, Xaa3는 타이로신이며, Xaa4는 타이로신인 A쇄 및 상기 일반식 2에서 Xaa5는 알라닌이고, Xaa6는 글리신이며, Xaa7은 페닐알라닌이며, Xaa8은 페닐알라닌인 B쇄를 포함하거나;
- (vi) 상기 일반식 1에서 Xaa1은 글리신이고, Xaa2는 이소류신이며, Xaa3는 타이로신이며, Xaa4는 타이로신인 A쇄 및 상기 일반식 2에서 Xaa5는 글리신이고, Xaa6는 알라닌이며, Xaa7은 페닐알라닌이며, Xaa8은 페닐알라닌인 B쇄를 포함하거나;

- (vii) 상기 일반식 1에서 Xaa1은 글리신이고, Xaa2는 이소류신이며, Xaa3는 타이로신이며, Xaa4는 타이로신인 A쇄 및 상기 일반식 2에서 Xaa5는 글리신이고, Xaa6는 글리신이며, Xaa7은 알라닌이며, Xaa8은 페닐알라닌인 B쇄를 포함하거나;
- (viii) 상기 일반식 1에서 Xaa1은 글리신이고, Xaa2는 이소류신이며, Xaa3는 타이로신이며, Xaa4는 타이로신인 A쇄 및 상기 일반식 2에서 Xaa5는 글리신이고, Xaa6는 글리신이며, Xaa7은 페닐알라닌이며, Xaa8은 알라닌인 B쇄를 포함하는 것인, 인슐린 아날로그.
- [청구항 10] 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 인슐린 아날로그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 11] 제10항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.
- [청구항 12] 제11항의 발현 벡터를 포함하는, 인간을 제외한 형질전환체.
- [청구항 13] 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른, 인슐린 아날로그에 반감기를 연장시킬 수 있는 생체적합성 물질을 결합시킨 것을 특징으로 하는, 지속형 인슐린.
- [청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 생체적합성 물질은 폴리에틸렌 글리콜, 지방산, 콜레스테롤, 알부민 및 이의 단편, 알부민 결합물질, 특정 아미노산 서열의 반복단위의 중합체, 항체, 항체 단편, FcRn 결합물질, 생체 내 결합조직 혹은 그 유도체, 뉴클레오타이드, 파이브로넥틴, 트랜스페린(Transferrin), 사카라이드(saccharide), 및 고분자 중합체로 이루어진 군에서 선택된 것인, 지속형 인슐린.
- [청구항 15] 제13항에 있어서, 상기 인슐린 아날로그와 생체적합성 물질은 펩타이드 결합으로 서로 연결된 것인, 지속형 인슐린.
- [청구항 16] 제13항에 있어서, 상기 인슐린 아날로그와 생체적합성 물질은, 폴리에틸렌 글리콜, 지방산, 사카라이드(saccharide), 고분자 중합체, 저분자 화합물, 뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 링커를 통해 서로 연결된 것인, 지속형 인슐린.
- [청구항 17] 제13항에 있어서,  
상기 인슐린 아날로그와 생체적합성 물질은 그 사이에 개재하는 링커를 통하여 연결되어 있고, 상기 생체적합성 물질은 FcRn 결합물질이며,  
상기 링커는 펩타이드 링커, 또는 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 다당류, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히아루론산 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는

- 비펩타이드성 링커를 통해 연결되는 것인 지속형 인슐린.
- [청구항 18] 제17항에 있어서, 상기 FcRn 결합물질은 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 폴리펩타이드인, 지속형 인슐린.
- [청구항 19] 제17항에 있어서, 상기 비펩타이드성 링커의 각 말단이 각각 상기 생체적합성 물질과 인슐린 아날로그의 아민기 또는 티올기에 결합된 것인, 지속형 인슐린.
- [청구항 20] (a) (i) 인슐린 아날로그 및 (ii) 폴리에틸렌 글리콜, 지방산, 콜레스테롤, 알부민 및 이의 단편, 알부민 결합물질, 특정 아미노산 서열의 반복단위의 중합체, 항체, 항체 단편, FcRn 결합물질, 생체 내 결합조직 혹은 그 유도체, 뉴클레오타이드, 파이브로넥틴, 트랜스페린(Transferrin), 사카라이드(saccharide) 및 고분자 중합체로 이루어진 군에서 선택된 생체적합성 물질을 각각 준비하는 단계; 및  
(b) 상기 인슐린 아날로그 및 생체적합성 물질을 연결하는 단계를 포함하는, 지속형 인슐린을 제조하는 방법.
- [청구항 21] 하기 화학식 1을 갖는 결합체:  
[화학식 1]  
X-La-F;  
여기에서  
X는 천연형 인슐린에 비해 인슐린 수용체 결합력이 감소된, 인슐린 아날로그이고,  
L은 링커이고,  
a는 0 또는 자연수이며, 단 a가 2 이상일 때 각각의 L은 서로 독립적이고,  
F는 인슐린 아날로그의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 물질이다.
- [청구항 22] 제21항에 있어서,  
X는 천연형 인슐린에 비해 인슐린 수용체 결합력이 감소된, 인슐린의 B 쇠 또는 A 쇠의 하나 이상의 아미노산이 변이 또는 결실된 인슐린 아날로그인 것인, 결합체.
- [청구항 23] 제21항에 있어서,  
상기 인슐린 아날로그는 인슐린 B 쇠의 1번 아미노산, 2번 아미노산, 3번 아미노산, 5번 아미노산, 8번 아미노산, 10번 아미노산, 12번 아미노산, 16번 아미노산, 23번 아미노산, 24번 아미노산, 25번 아미노산, 26번 아미노산, 27번 아미노산, 28번 아미노산, 29번 아미노산, 30번 아미노산, A 쇠의 1번 아미노산, 2번 아미노산, 5번 아미노산, 8번 아미노산, 10번 아미노산, 12번 아미노산, 14번 아미노산, 16번 아미노산, 17번 아미노산, 18번

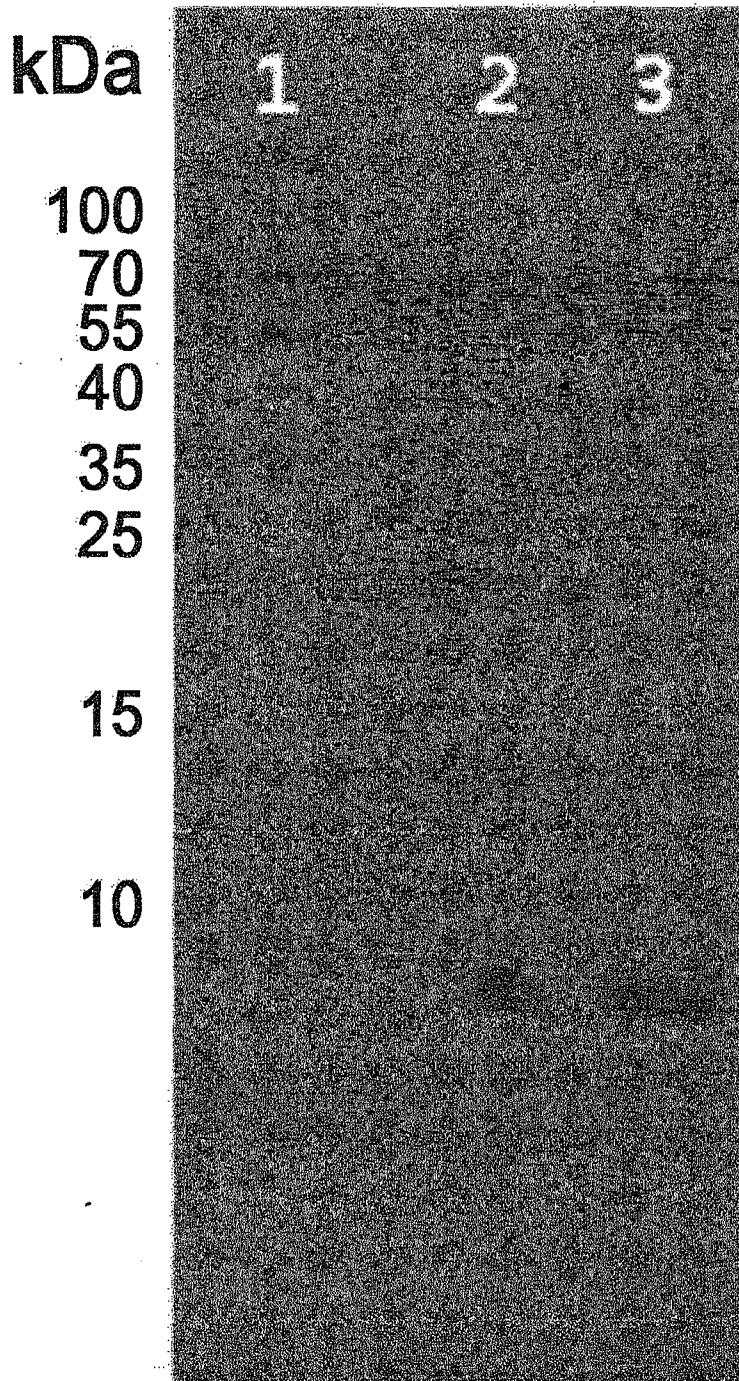
- 아미노산, 19번 아미노산 및 21번 아미노산으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되거나 결실된 것인, 결합체.
- [청구항 24] 제23항에 있어서,  
상기 인슐린 아날로그는 B쇄의 8번 아미노산, 23번 아미노산, 24번 아미노산, 25번 아미노산, A쇄의 1번 아미노산, 2번 아미노산, 14번 아미노산 및 19번 아미노산으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것인, 결합체.
- [청구항 25] 제23항에 있어서, 상기 치환된 아미노산은 알라닌, 글루탐산, 아스파라긴, 이소루신, 발린, 글루타민, 글라이신, 라이신, 히스티딘, 시스테인, 페닐알라닌, 트립토판, 프로린, 세린, 트레오닌 및 아스파틱산으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 결합체.
- [청구항 26] 제21항에 있어서,  
인슐린 아날로그의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 물질은 폴리에틸렌 글리콜, 지방산, 콜레스테롤, 알부민 및 이의 단편, 알부민 결합물질, 특정 아미노산 서열의 반복단위의 중합체, 항체, 항체 단편, FcRn 결합물질, 생체 내 결합조직, 뉴클레오타이드, 파이브로넥틴, 트랜스페린(Transferrin), 사카라이드(saccharide) 및 고분자 중합체로 이루어진 군에서 선택된 것인, 결합체.
- [청구항 27] 제21항에 있어서,  
L은 펩타이드, 폴리에틸렌 글리콜, 지방산, 사카라이드(saccharide), 고분자 중합체, 저분자 화합물, 뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 결합체.
- [청구항 28] 제21항에 있어서,  
X와 F는 공유 화학 결합, 비공유 화학 결합 또는 이들의 조합으로 L에 의해 서로 결합되는 것인, 결합체.
- [청구항 29] 제27항에 있어서,  
고분자 중합체는 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히아루론산, 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 비펩타이드성 링커인, 결합체.
- [청구항 30] 제21항에 있어서,  
F는 IgG Fc 영역인 것인, 결합체.
- [청구항 31] 제21항 내지 제30항 중 어느 한 항의 결합체를 포함하는, 생체 내

[청구항 32]

지속성 및 안정성이 증가된 인슐린 지속성 제제.

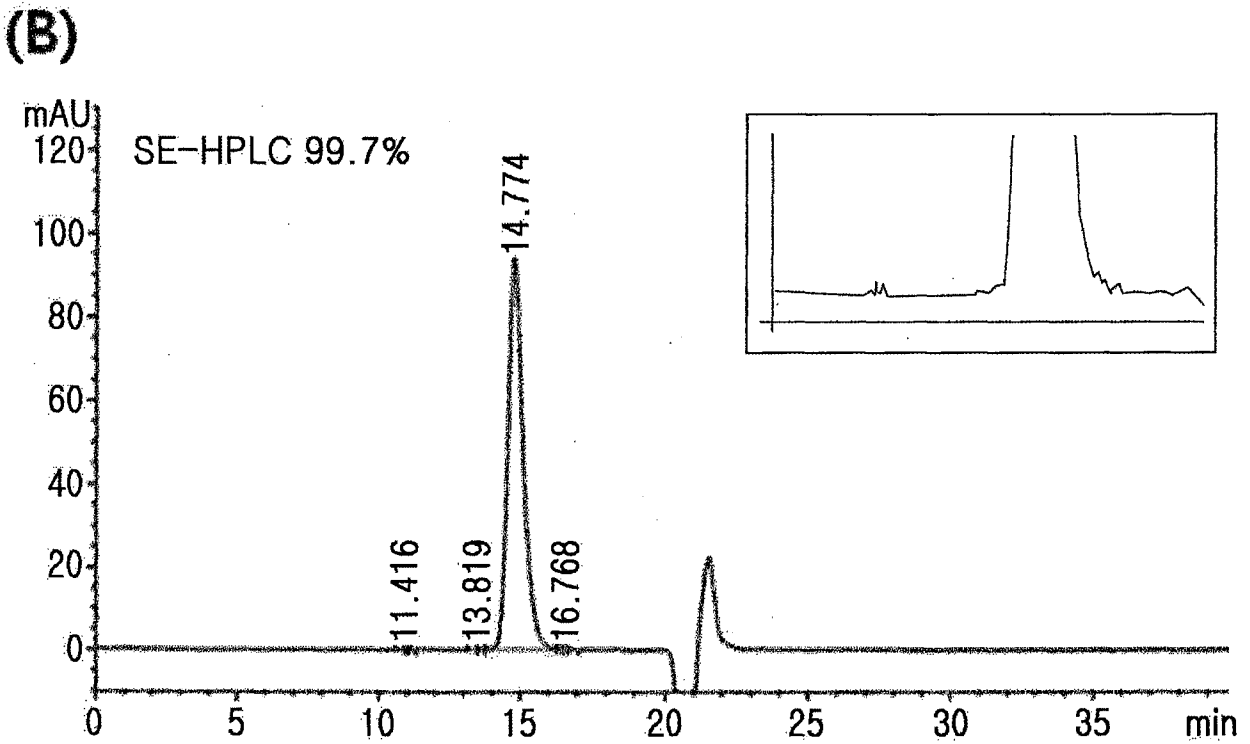
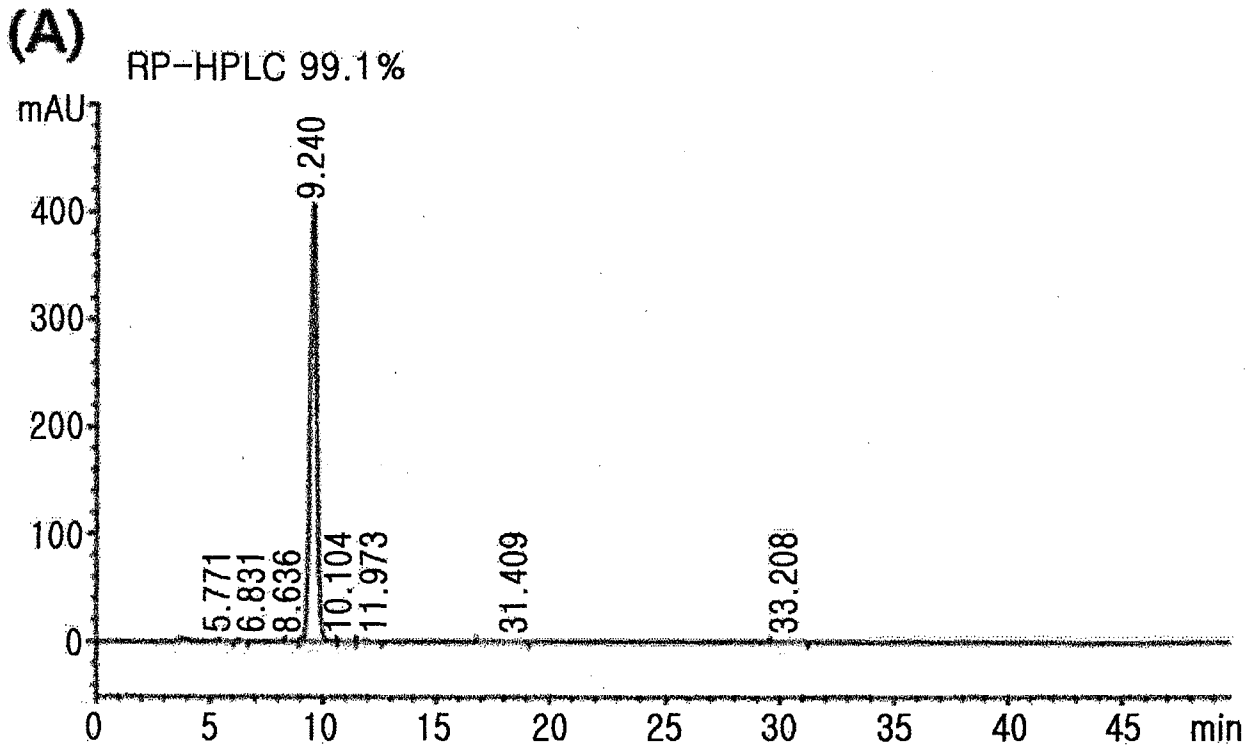
제21항 내지 제30항 중 어느 한 항의 결합체를 포함하는, 당뇨병 치료용 지속성 제제.

[Fig. 1]



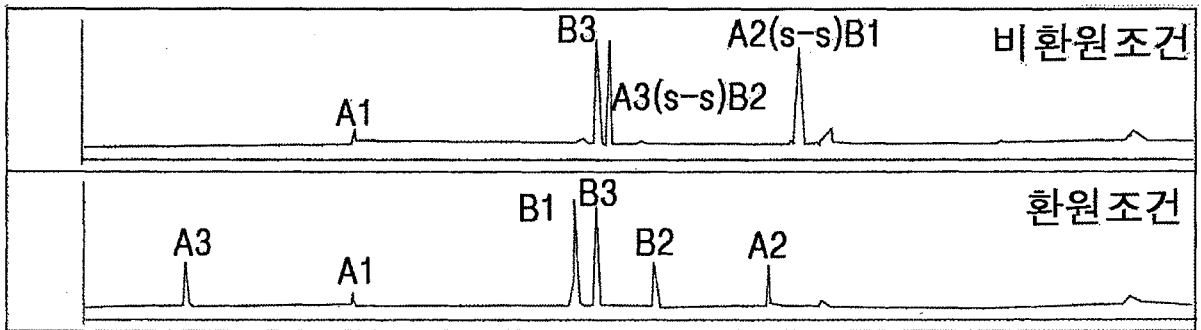
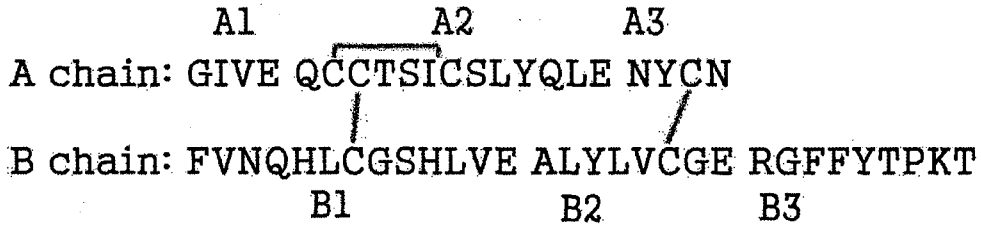


[Fig. 2]

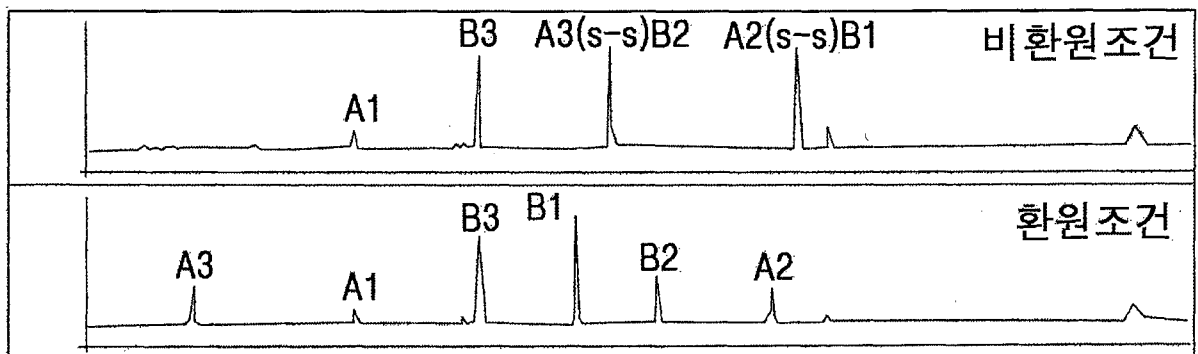
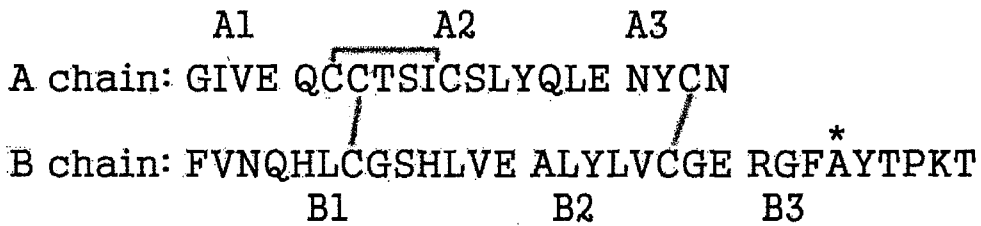


[Fig. 3]

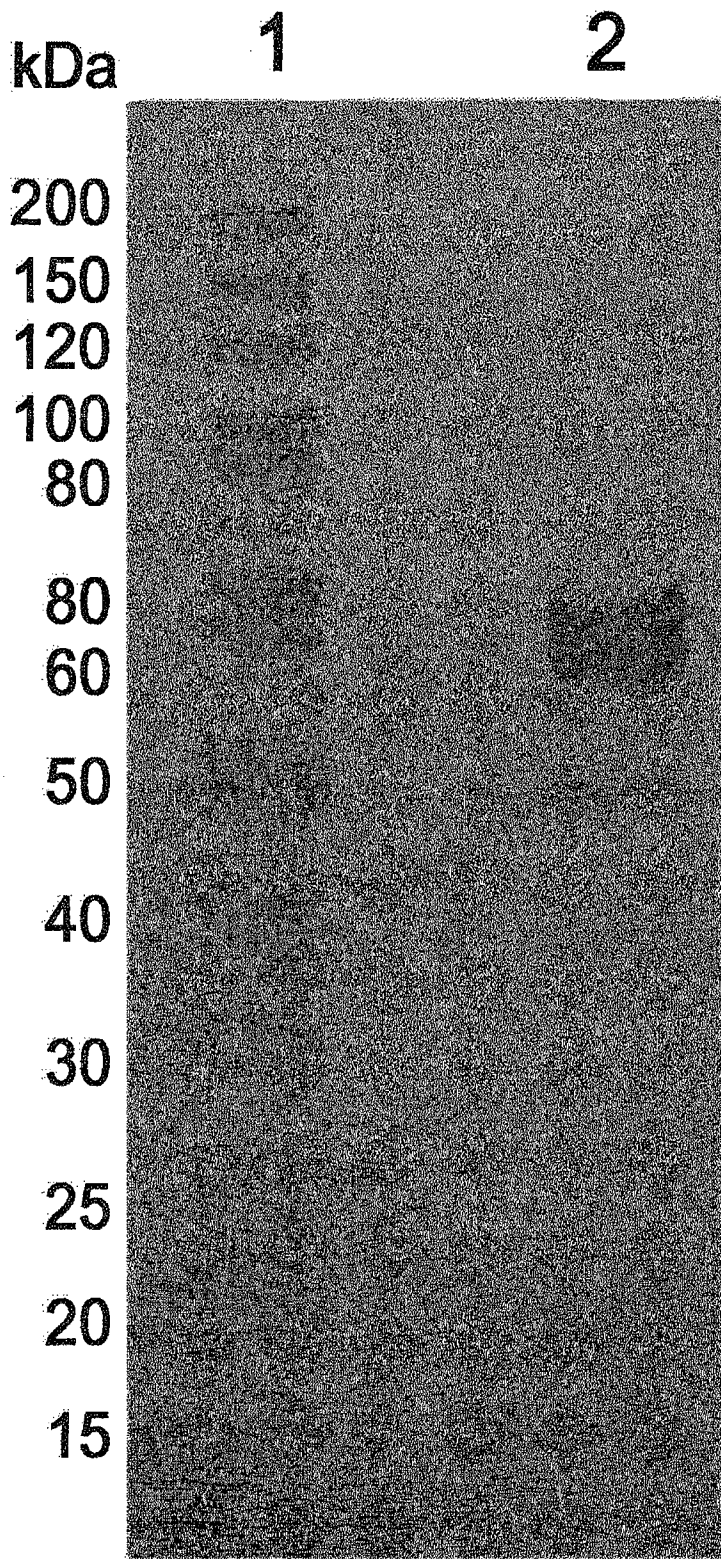
**(A) 천연형 인슐린 서열의 Glu-C 절단 단편**



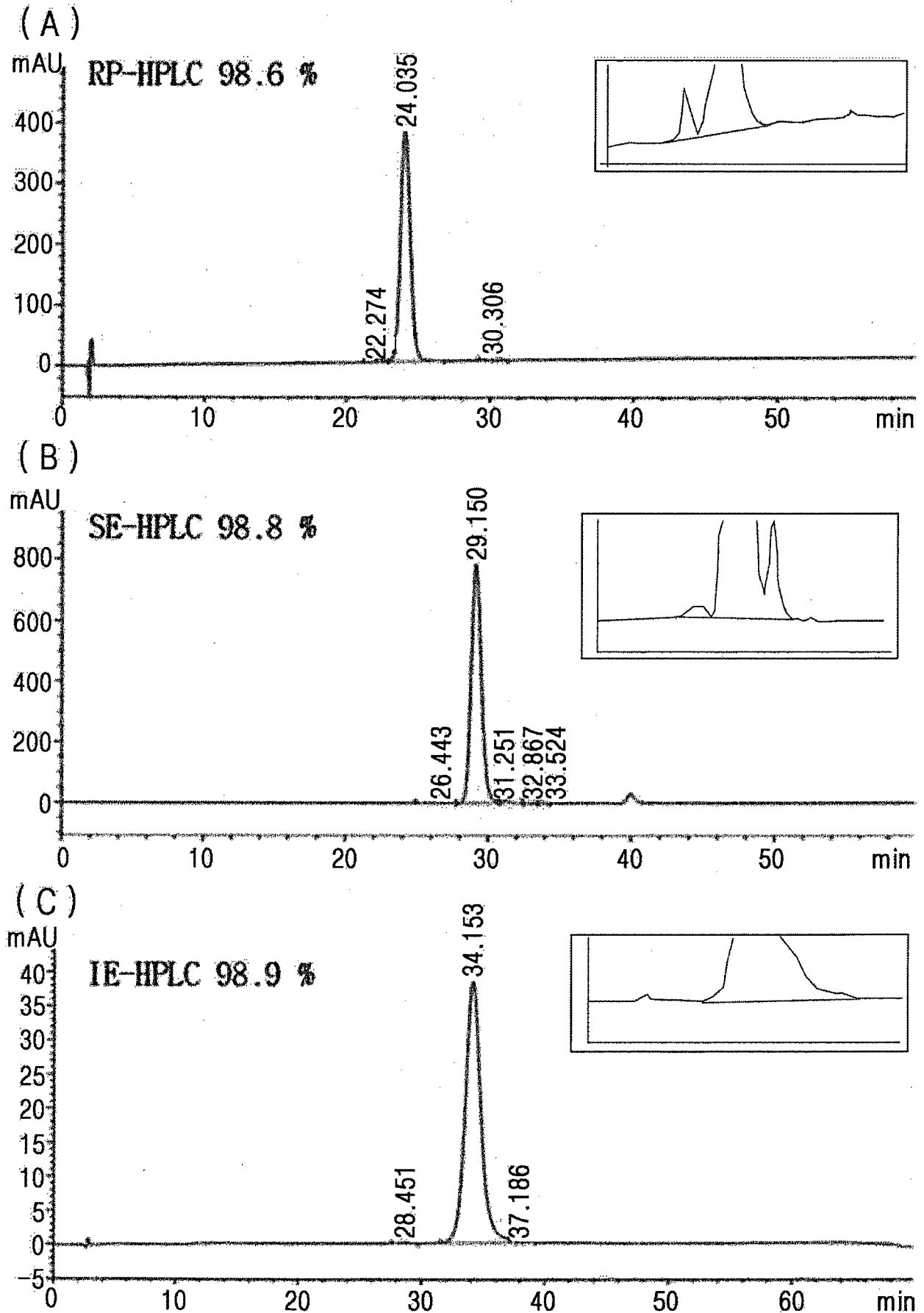
**(B) 인슐린 아날로그(7번) 서열의 Glu-C 절단 단편**



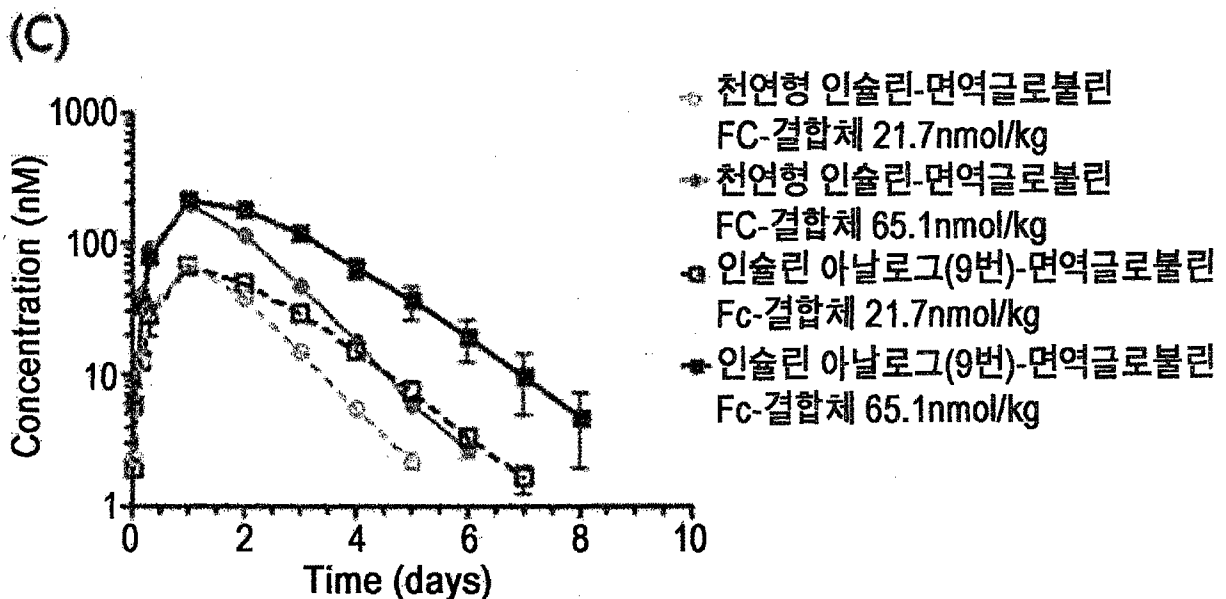
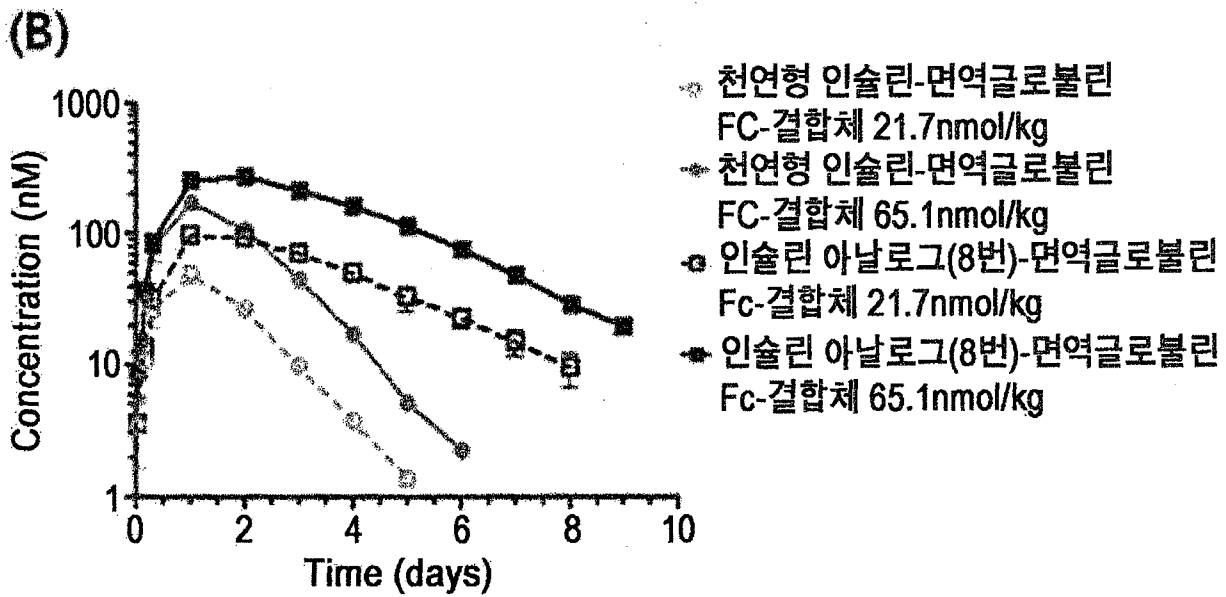
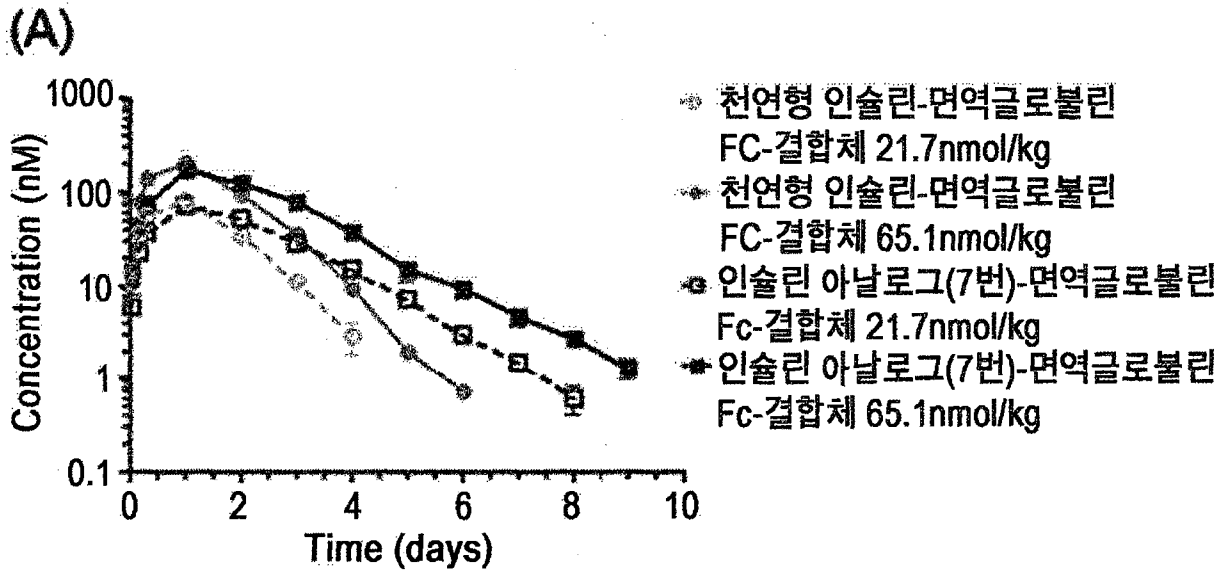
[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2015/000576**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**C07K 14/62(2006.01)i, A61K 38/28(2006.01)i, A61P 3/10(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 14/62; A61K 9/38; A61K 38/28; A61K 47/30; C12N 15/17; A61P 3/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) &amp; Keywords: long acting insulin analogue, insulin receptor coherence, half life, substitution

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2012-0184488 A1 (WEISS) 19 July 2012 See claims 16-27; paragraph [0032]; and pages 5-6.	1-12
Y		13-19,21-32
A		20
X	KR 10-2011-0134210 A (HANMI SCIENCE CO., LTD) 14 December 2011 See abstract; claims 1-18; and paragraphs [0011]-[0065].	20
Y		13-19,21-32
A	KR 10-2005-0121748 A (ELI LILLY AND COMPANY) 27 December 2005 See the entire document.	1-32
A	KR 10-2010-0111683 A (SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH) 15 October 2010 See the entire document.	1-32
A	JP 2012-062311 A (CONJUCHEM LLC) 29 March 2012 See the entire document.	1-32



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family


Date of the actual completion of the international search

13 APRIL 2015 (13.04.2015)

Date of mailing of the international search report

14 APRIL 2015 (14.04.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR


 Korean Intellectual Property Office  
 Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,  
 Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/000576

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2012-0184488 A1	19/07/2012	WO 2011-028813 A2 WO 2011-028813 A3	10/03/2011 14/07/2011
KR 10-2011-0134210 A	14/12/2011	KR 10-1330868 B1	18/11/2013
KR 10-2005-0121748 A	27/12/2005	AU 2004-234345 A1 CA 2518776 A1 EP 1620465 A2 US 2006-0217290 A1 WO 2004-096854 A2 WO 2004-096854 A3	11/11/2004 11/11/2004 01/02/2006 28/09/2006 11/11/2004 24/03/2005
KR 10-2010-0111683 A	15/10/2010	AU 2009-203810 A1 CA 2711752 A1 CN 101970476 A CN 101970476 B EP 2229406 A2 JP 2011-509269 A TW 200942257 A TW 1433681 B US 2011-0173722 A1 US 8603970 B2 US 8633156 B2 WO 2009-087082 A2 WO 2009-087082 A3	16/07/2009 16/07/2009 09/02/2011 27/08/2014 22/09/2010 24/03/2011 16/10/2009 11/04/2014 14/07/2011 10/12/2013 21/01/2014 16/07/2009 24/09/2009
JP 2012-062311 A	29/03/2012	AT 433994 T AU 2004-261319 A1 AU 2011-201278 A1 BR P10412252 A CA 2526957 A1 CA 2526957 C CN 1964989 A CN 1964989 B DE 602004021603 D1 DK 1648933 T3 EA 008433 B1 EP 1648933 A1 EP 1648933 A4 EP 1648933 B1 EP 2085406 A1 ES 2328579 T3 HK 1091843 A1 JP 2007-520441 A NO 20060888 A SI 1648933 T1 US 2006-0241019 A1 WO 2005-012346 A1	15/07/2009 10/02/2005 07/04/2011 19/09/2006 10/02/2005 12/07/2011 16/05/2007 01/02/2012 30/07/2009 07/09/2009 29/06/2007 26/04/2006 28/02/2007 17/06/2009 05/08/2009 16/11/2009 28/08/2009 26/07/2007 25/04/2006 29/01/2010 26/10/2006 10/02/2005

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**  
C07K 14/62(2006.01)i, A61K 38/28(2006.01)i, A61P 3/10(2006.01)i

**B. 조사된 분야**  
조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)  
C07K 14/62; A61K 9/38; A61K 38/28; A61K 47/30; C12N 15/17; A61P 3/10

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌  
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC  
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))  
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 지속성 인슐린 아날로그, 인슐린 수용체 결합력, 반감기, 치환

**C. 관련 문헌**

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2012-0184488 A1 (WEISS) 2012.07.19 청구항 16-27; 문단 [0032]; 및 페이지 5-6 참조.	1-12
Y		13-19, 21-32
A		20
X	KR 10-2011-0134210 A (한미홀딩스 주식회사) 2011.12.14 요약; 청구항 1-18; 및 문단 [0011]-[0065] 참조.	20
Y		13-19, 21-32
A	KR 10-2005-0121748 A (일라이 릴리 앤드 캄파니) 2005.12.27 전체 문헌 참조.	1-32
A	KR 10-2010-0111683 A (사노피-아벤티스 도이칠란트 게엠베하) 2010.10.15 전체 문헌 참조.	1-32
A	JP 2012-062311 A (CONJUCHEM LLC) 2012.03.29 전체 문헌 참조.	1-32

추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.  대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

\* 인용된 문헌의 특별 카테고리:  
 “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌  
 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌  
 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌  
 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌  
 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌  
 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌  
 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.  
 “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.  
 “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일 2015년 04월 13일 (13.04.2015)	국제조사보고서 발송일 2015년 04월 14일 (14.04.2015)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 ++82 42 472 7140	심사관 김승범 전화번호 +82-42-481-3371
--	------------------------------------



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2012-0184488 A1	2012/07/19	WO 2011-028813 A2 WO 2011-028813 A3	2011/03/10 2011/07/14
KR 10-2011-0134210 A	2011/12/14	KR 10-1330868 B1	2013/11/18
KR 10-2005-0121748 A	2005/12/27	AU 2004-234345 A1 CA 2518776 A1 EP 1620465 A2 US 2006-0217290 A1 WO 2004-096854 A2 WO 2004-096854 A3	2004/11/11 2004/11/11 2006/02/01 2006/09/28 2004/11/11 2005/03/24
KR 10-2010-0111683 A	2010/10/15	AU 2009-203810 A1 CA 2711752 A1 CN 101970476 A CN 101970476 B EP 2229406 A2 JP 2011-509269 A TW 200942257 A TW I433681 B US 2011-0173722 A1 US 8603970 B2 US 8633156 B2 WO 2009-087082 A2 WO 2009-087082 A3	2009/07/16 2009/07/16 2011/02/09 2014/08/27 2010/09/22 2011/03/24 2009/10/16 2014/04/11 2011/07/14 2013/12/10 2014/01/21 2009/07/16 2009/09/24
JP 2012-062311 A	2012/03/29	AT 433994 T AU 2004-261319 A1 AU 2011-201278 A1 BR PI0412252 A CA 2526957 A1 CA 2526957 C CN 1964989 A CN 1964989 B DE 602004021603 D1 DK 1648933 T3 EA 008433 B1 EP 1648933 A1 EP 1648933 A4 EP 1648933 B1 EP 2085406 A1 ES 2328579 T3 HK 1091843 A1 JP 2007-520441 A NO 20060888 A SI 1648933 T1 US 2006-0241019 A1 WO 2005-012346 A1	2009/07/15 2005/02/10 2011/04/07 2006/09/19 2005/02/10 2011/07/12 2007/05/16 2012/02/01 2009/07/30 2009/09/07 2007/06/29 2006/04/26 2007/02/28 2009/06/17 2009/08/05 2009/11/16 2009/08/28 2007/07/26 2006/04/25 2010/01/29 2006/10/26 2005/02/10