



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0001391
(43) 공개일자 2016년01월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/62 (2006.01) A61K 38/28 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0079848
(22) 출원일자 2014년06월27일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
한미약품 주식회사
경기도 화성시 팔탄면 무하로 214
(72) 발명자
김대진
경기도 화성시 병점2로 103, 506동 1901호 (병점동, 안화동마을주공아파트)
정의준
대전광역시 유성구 농대로 41, 102동 104호(공동, 궁동카이스트 아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **신규한 지속형 인슐린 아날로그 결합체 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 인슐린의 생체 내 지속성 증가 및 생체 이용률 증가를 위한, 인슐린 수용체 결합력이 감소된 인슐린 아날로그 결합체, 및 이를 이용한 인슐린 지속성 제제, 상기 결합체를 포함하는 당뇨병의 예방 또는 치료용 지속성 제제, 및 상기 결합체, 인슐린 지속성 제제, 당뇨병의 예방 또는 치료용 지속성 제제를 이용한 당뇨병의 치료 방법에 관한 것이다.

(72) 발명자

박영진

경기 수원시 영통구 태장로71번길 19, 206동 1001호(망포동, 동수원자이II아파트)

김진영

서울시 강동구 양재대로 1656, 203동 306호 (명일동, 삼익그린맨션)

홍성희

경기도 수원시 영통구 태장로71번길 19, 206동 1001호 (망포동, 동수원자이II아파트)

최인영

경기도 용인시 수지구 용구대로2771번길 70, 105동 1801호 (죽전동, 벽산1단지아파트)

권세창

서울시 강남구 선릉로 221, 408동 1804호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식을 갖는 천연형 인슐린에 비해 인슐린 수용체 결합력이 감소된, 인슐린 아날로그 결합체:

X-La-F;

여기에서,

X는 천연형에 비해 인슐린 수용체 결합력이 감소된, 인슐린 아날로그이고,

L은 링커이고, a는 0 또는 자연수이며,

단 a가 2 이상일 때 각각의 L은 서로 독립적이고,

F는 폴리에틸렌 글리콜, 아미노산 중합체, 또는 이의 조합임.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 인슐린 아날로그는 천연형 인슐린에서 적어도 하나 이상의 아미노산에 치환(substitution), 추가(addition), 제거(deletion), 수식(modification) 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 변형이 일어난 것인, 결합체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 인슐린 아날로그는 하나 이상의 아미노산이 변이 또는 결실된 것인, 결합체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 인슐린 아날로그는 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 치환 또는 결실된 것으로 이루어진 군에서 선택된 것인, 결합체.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 다른 아미노산으로의 치환은 알라닌, 글루탐산, 아스파라긴, 이소루신, 발린, 글루타민, 글라이신, 라이신, 히스티딘, 시스테인, 페닐알라닌, 트립토판, 프로린, 세린, 트레오닌 및 아스파틱산으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산으로 치환되는 것인, 결합체.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 F는 폴리에틸렌 글리콜, 엘라스틴, 엘라스틴의 수용성 전구체 및 엘라스틴 단백질 서열 일부의 반복단위의 중합체로 이루어진 군에서 선택된, 결합체.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 엘라스틴 단백질 서열 일부의 반복단위는 서열번호 49의 VPGXG인, 결합체:

여기서, 상기 X는 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파틱산, 글루탐산, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 또는 발린임.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 반복단위는 VPGVG(서열번호 50), VPGAG(서열번호 51), VPGGG(서열번호 52), VPGIG(서열번호 53), VPLLG(서열번호 54), VPGFG(서열번호 55), AVGVP(서열번호 56), IPGVG(서열번호 57), LPGVG(서열번호 58), 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된, 결합체.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 결합체는 생체 내 반감기가 증가된 것인 지속성을 특징으로 하는, 결합체.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 링커는 비펩타이드성 중합체인, 결합체.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 지방산, 사카라이드(saccharide), 고분자 중합체, 저분자 화합물, 뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된, 결합체.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 고분자 중합체는 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 다당류, 텍스트란, 폴리비닐에틸테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산, 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 것인, 결합체.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜의 분자량은 10 내지 100,000Da인 것인, 결합체.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 폴리에틸렌 글리콜은 인슐린 아날로그의 N-말단 아미노산, C-말단 아미노산, 인슐린 아날로그 내부의 라이신, 시스테인, 아스파틱산 및 글루탐산으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기에 결합한 것인, 결합체.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 X와 F는 L에 의해 공유결합, 비공유결합 또는 이들의 조합에 의해 결합되는, 결합체.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 인슐린 아날로그 결합체를 포함하는, 생체 내 지속성 및 안정성이 증가된, 인슐린 지속성 제제.

청구항 17

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 인슐린 아날로그 결합체를 포함하는 당뇨병의 예방 또는 치료용 지속성 제제.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 인슐린의 생체 내 지속성 증가 및 생체 이용률 증가를 위한, 인슐린 수용체 결합력이 감소된 인슐린 아날로그 결합체, 및 이를 이용한 인슐린 지속성 제제, 상기 결합체를 포함하는 당뇨병의 예방 또는 치료용 지속성 제제, 및 상기 결합체, 인슐린 지속성 제제, 당뇨병의 예방 또는 치료용 지속성 제제를 이용한 당뇨병의 치료 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 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 않게 된다. 이에, 혈액 내의 포도당을 에너지원으로 이용하지 못하고 혈중 포도당 수준이 높은 고혈당 증세를 나타내어 결국 소변으로 당을 배출하게 되며 여러 합병증과 연계되어 있다. 따라서 인슐린 생성이 이상이 있거나(Type I), 인슐린 내성으로 인한(Type II) 당뇨병자에게는 인슐린 치료가 필수적이며, 인슐린 투여 시 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.

[0003] 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 존재하여 장기간 투여해야 하는 당뇨병 환자의 경우 투여 빈도를 획기적으로 낮추어 환자의 편의성을 증가시킨다는 목적 달성에는 한계가 있다.

[0004] Biochem J (1998) 332, 421, Endocrine Reviews (1998) 19, 608, J Am Col Nut (2003) 22, 487는 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.

[0005] 이와 관련하여 J Pharmacol Exp Ther (1998) 286: 959, Diabetes Care (1990) 13: 923, Diabetes (1990) 39: 1033 등에서 인슐린의 RMC를 피하고자 in-vitro 활성을 약화시킴으로써 혈중 농도를 증가시킬 수 있다는 여러 보고가 있으며, J. Biol. Chem.(1997) 83: 12978 및 Biomed. Res. (1984) 5: 267의 경우 인슐린의 아미노산을 변형(mutation)시킴으로써 인슐린 수용체 결합력을 감소시키는 것에 대해 보고하였다.

[0006] 하지만, 이들 수용체 결합력 감소 인슐린 아날로그의 경우 RMC를 감소시키더라도 주된 제거 메커니즘인 신장에서 제거를 피할 수 없어 혈중 반감기를 획기적으로 증가시키기에는 한계가 있다.

[0007] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 인슐린의 혈중 반감기를 증가시키기 위해 예의 노력한 결과, 인슐린 수용체

결합력이 감소 및 인슐린의 RMC(receptor mediated clearance)가 감소한 인슐린 아날로그를 이용한 결합체를, 반감기 증가 및 생체이용율의 증가 또는 지속적인 활성유지를 할 수 있는 제제로 사용시, 인슐린의 혈중 반감기가 더욱 증가된 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 하나의 목적은 인슐린의 체내 반감기 연장을 위한 목적으로 인슐린 수용체 결합력이 감소된 신규한 인슐린 아날로그 및 폴리에틸렌 글리콜 또는 아미노산 중합체, 또는 이의 조합이 연결된, 인슐린 아날로그 결합체를 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 인슐린 아날로그 결합체를 포함하는, 생체 내 지속성 및 안정성이 증가된, 인슐린 지속성 제제를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 인슐린 아날로그 결합체를 포함하는, 당뇨병의 예방 또는 치료용 지속성 제제를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 인슐린 아날로그 결합체, 인슐린 지속성 제제, 또는 당뇨병의 예방 또는 치료용 지속성 제제를, 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 인슐린 관련 질환의 치료방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하나의 양태로서 천연형 인슐린에 비해 인슐린 수용체 결합력이 감소된 인슐린 아날로그 결합체를 제공한다.
- [0013] 구체적으로, 상기 인슐린 아날로그 결합체는 하기 화학식을 갖는 천연형 인슐린에 비해 인슐린 수용체 결합력이 감소된, 인슐린 아날로그 결합체일 수 있다.
- [0014] [화학식]
- [0015] X-La-F;
- [0016] 여기에서,
- [0017] X는 천연형에 비해 인슐린 수용체 결합력이 감소된, 인슐린 아날로그이고,
- [0018] L은 링커이고, a는 0 또는 자연수이며,
- [0019] 단 a가 2 이상일 때 각각의 L은 서로 독립적이고,
- [0020] F는 폴리에틸렌 글리콜, 아미노산 중합체, 또는 이의 조합임.
- [0021] 본 발명의 인슐린 아날로그 결합체는 인슐린 수용체 결합체 감소를 통해 RMC 회피, 및 캐리어로 생체 적합성 물질인 F가 결합시, 링커 또는 캐리어의 결합에도 불구하고, 인슐린 아날로그의 인슐린 수용체 결합력 감소 및, 인슐린 자체의 기능에 영향이 없으면서도, 인슐린 아날로그 자체의 인슐린 수용체 결합력 감소에 의한 인슐린의 RMC 회피를 통해 생체 내 반감기 증가, 생체 이용율 증가 및/또는 지속적인 활성 유지, 및 인슐린 아날로그에 결합한 폴리에틸렌 글리콜 및/또는 아미노산 중합체의 생체 내 반감기 증가를 획기적으로 증가시킬 수 있는 새로운 구조임을 확인하여, 상기 인슐린 아날로그 결합체를 제공하기에 이르렀다.
- [0022] 본 발명에서 용어, "인슐린 아날로그"란 천연형 서열에서 하나 이상의 아미노산이 변형된 것을 의미한다.
- [0023] 상기 천연형 서열에서 하나 이상의 아미노산이 변형된 것이란 천연형 인슐린에서 적어도 하나 이상의 아미노산에 치환(substitution), 추가(addition), 제거(deletion), 수식(modification) 및 이들의 조합으로 이루어지는

군에서 선택된 변형이 일어난 것일 수 있다.

- [0024] 상기 인슐린 아날로그는 천연형에 비해 인슐린 역가가 감소 및/또는 인슐린 수용체 결합력이 감소된, 인슐린의 B 쇠 또는 A 쇠의 아미노산이 변이 또는 결실된 인슐린 아날로그일 수 있으며, 천연형에 비해 인슐린 역가가 감소 및/또는 인슐린 수용체 결합력이 감소된 아미노산 아날로그는 제한 없이 포함된다.
- [0025] 천연형 인슐린 아미노산 서열은 하기와 같다.
- [0026] A 쇠 :
- [0027] Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn (서열번호 61)
- [0028] B 쇠 :
- [0029] 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 62)
- [0030] 본 발명의 실시예에서 사용된 인슐린은 유전자 재조합 기술로 만든 인슐린 아날로그이지만, 본 발명은 이것에만 국한되는 것이 아니라, in-vitro 역가가 감소 및/또는 인슐린 수용체 결합력이 감소된 모든 인슐린을 포함한다. 바람직하게는 역방향 인슐린(inverted insulin), 인슐린 변이체(variants), 인슐린 단편(fragments) 등을 포함하며 제조법으로는 유전자 재조합뿐만 아니라 solid phase 방법으로도 제조할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 인슐린 아날로그는 인슐린과 동일한 생체내의 혈당 조절기능을 보유한 펩타이드로서, 이러한 펩타이드는 인슐린 아고니스트(agonist), 유도체(derivatives), 단편(fragments), 변이체(variants) 등을 포함한다.
- [0032] 본 발명의 인슐린 아고니스트는 인슐린의 구조와 상관없이 인슐린의 생체내 수용체에 결합하여 인슐린과 동일한 생물학적 활성을 나타내는 물질을 의미한다.
- [0033] 본 발명의 인슐린 아날로그는 천연형 인슐린의 A쇄, B쇄와 각각 아미노산 서열에서 상동성을 보이며, 적어도 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환(예; alpha-methylation, alpha-hydroxylation), 제거(예;deamination) 또는 수식(예; N-methylation), 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택하는 변형이 된 형태일 수 있고, 체내에서 혈당을 조절하는 기능을 보유한 펩타이드를 의미할 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 인슐린 아날로그는 천연형 인슐린과 아미노산 서열이 전혀 상동성이 없어도 인슐린 수용체와 결합하여 혈당을 조절할 수 있는 펩타이드 미믹 및 저분자 혹은 고분자 화합물을 의미할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 인슐린 단편은 인슐린에 하나 또는 그 이상 아미노산이 추가 또는 삭제된 형태를 의미하며 추가된 아미노산은 천연 상태에서 존재하지 않는 아미노산 (예; D형 아미노산) 도 가능할 수 있고, 이러한 인슐린 단편은 체내에서 혈당조절 기능을 보유한다.
- [0036] 본 발명의 인슐린 변이체는, 인슐린과 아미노산서열이 하나 이상 다른 펩타이드로서, 체내에서 혈당조절 기능을 보유한 펩타이드를 의미한다.
- [0037] 본 발명의 인슐린 아고니스트, 유도체, 단편 및 변이체에서 각각 사용된 제조방법은 독립적으로 사용될 수 있고 조합도 가능하다. 예를 들어 아미노산 서열이 하나 이상 다르고 아미노말단 아미노산 잔기에 탈아미노화(deamination) 된 체내에서 혈당조절 기능을 보유한 펩타이드도 포함된다.
- [0038] 구체적으로, 상기 인슐린 아날로그는 상기 인슐린 아날로그는 B 쇠의 1번 아미노산, 2번 아미노산, 3번 아미노산, 5번 아미노산, 8번 아미노산, 10번 아미노산, 12번 아미노산, 16번 아미노산, 23번 아미노산, 24번 아미노산, 25번 아미노산, 26번 아미노산, 27번 아미노산, 28번 아미노산, 29번 아미노산, 30번 아미노산, A쇄의 1번 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 있다. 상기 다른 아미노산으로의 치환은 그 예로, 알라닌, 글루탐산, 아스파라긴, 이소루신, 발린, 글루타민, 글라이신, 라이신, 히스티딘, 시스테인, 페닐알라닌,

트립토판, 프로린, 세린, 트레오닌 및 아스파티산으로 치환될 수 있으나, 인슐린 수용체 결합력 감소를 가져올 수 있는 치환은 제한 없이 포함된다. 또한 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.

[0039] 본 발명의 상기 인슐린 아날로그 결합체는 생체 내 반감기가 증가 및/또는 생체이용율을 증가 및/또는 지속적인 활성유지를 할 수 있는 지속적인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0040] 상기 인슐린 아날로그를 인슐린 아날로그의 반감기 증가 및 생체이용율을 증가 혹은 지속적인 활성유지를 할 수 있는 제제에 적용시 천연형 인슐린보다 우월한 반감기 증가 및 생체내 활성이 증가됨을 본 발명은 확인한 바 있다.

[0041] 본 발명에서, 상기 인슐린 아날로그 결합체의 F는 인슐린 아날로그의 반감기 증가 및 생체이용율을 증가 혹은 지속적인 활성유지를 할 수 있는 생체적합성 물질 또는 캐리어를 제한 없이 포함하는 구성일 수 있다. 그 예로 폴리에틸렌 글리콜 또는 아미노산 중합체, 또는 이의 조합일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0042] 본 발명에서 용어, "생체적합성 물질 또는 캐리어"란 인슐린 아날로그에 공유 또는 비공유 결합되어 결합체를 형성했을 때, 인슐린 아날로그의 생체 내 반감기를 증가하여 활성 지속시간을 늘려줄 수 있는 물질이다. 그 예로, 반감기 증대 및 생체이용율 및 지속적인 활성유지가 최우선 목적이므로 인슐린 수용체 결합력이 감소된 인슐린 아날로그와 결합될 수 있는 것은 다양한 생체적합성 물질, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜, 지방산, 콜레스테롤, 알부민 및 이의 단편, 알부민 결합물질, 엘라스틴, 엘라스틴의 수용성 전구체 및 엘라스틴 단백질 서열 일부의 반복단위의 중합체, 특정 아미노산 서열의 반복단위의 중합체, 항체, 항체단편, FcRn 결합물질, 생체내 결합조직, 뉴클레오 타이드, 파이브로넥틴, Transferrin, saccharide, 고분자 중합체 등을 제한 없이 포함한다. 또한 인슐린 수용체 결합력이 감소된 인슐린 아날로그와 생체 내 반감기를 연장할 수 있는 생체적합성 물질의 연결은 유전자 재조합 방법과 고분자 혹은 저분자 화합물질을 이용한 in vitro 결합 등을 포함하며 어느 결합방식에 한정되지 않는다. 상기 FcRn 결합물질은 면역글로블린 Fc 영역일 수 있다.

[0043] 폴리에틸렌 글리콜 (Polyethylene glycol, PEG)을 캐리어로 사용시 위치특이적으로 폴리에틸렌 글리콜을 부착할 수 있는 Ambrx사의 Recode기술이 포함될 수 있으며, 당쇄부위에 특이적으로 부착할 수 있는 Neose사의 glycopegylation 기술이 포함될 수 있다. 또한 생체 내에서 폴리에틸렌 글리콜이 천천히 제거되는 releasable PEG 기술이 이에 포함될 수 있으나, 이에 한정되지 않으며 PEG를 이용하여 생체내 이용율을 높인 기술들이 포함될 수 있음은 자명하다. 또한 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 다당류, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산과 같은 고분자 중합체도 포함될 수 있다.

[0044] 알부민을 캐리어로 사용할 경우 알부민 혹은 알부민 단편을 직접 인슐린 아날로그에 직접 공유결합하여 생체내 안정성을 높일 수 있는 기술이 포함될 수 있으며 알부민을 직접 결합하지 않더라도 알부민에 결합하는 물질 예를 들어 알부민 특이적 결합 항체 혹은 항체단편을 인슐린 아날로그에 결합시켜 알부민에 결합하게 하는 기술 및 알부민에 결합력을 가진 특정 펩타이드/단백질을 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.

[0045] 생체내 반감기를 증가시키기 위해 항체 혹은 항체단편을 캐리어로 사용하여 인슐린 아날로그에 결합시키는 기술도 본 발명에 포함될 수 있다. FcRn 결합 부위를 갖는 항체 혹은 항체단편일 수 있으며, Fab등 FcRn 결합부위를 포함하지 않는 어떠한 항체 단편일 수 있다. Catalytic 항체를 이용하는 CovX사의 CovX-body 기술이 이에 포함될 수 있으며 Fc 단편을 이용하여 생체내 반감기를 증가시키는 기술도 본 발명에 포함될 수 있음은 자명하다. Fc 단편을 이용할 경우 Fc 단편과 인슐린 아날로그와 결합하는 링커 및 결합방식은 펩타이드 결합 혹은 폴리에틸렌글리콜등 일 수 있으나 이에 한정되지 않으며 어떠한 화학적 결합방식일 수 있다. 또한 Fc 단편과 인슐린 아날로그의 결합비는 1:1 혹은 1:2 일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0046] 생체내 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 ELP (Elastin like polypeptide) 일수 있으며 versartis사의 인위적 폴리펩타이드 PEG인 Xten 기술

도 본 발명에 포함된다. 또한 Zealand사의 multi-Lysine을 이용하여 생체내 반감기를 증가시키는 SIP(Structure inducing probe) 기술도 이에 포함되며 Prolor사의 CTP 융합기술도 이에 포함되며, 생체내 안정성이 높다고 알려진 transferin 혹은 결합조직의 구성성분인 fibronectin등과 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. 또한 인슐린 아날로그와 펩타이드 혹은 단백질과의 결합은 공유결합이나 사용되는 링커의 종류 및 결합방식은 펩타이드 결합 혹은 폴리에틸렌글리콜등 일 수 있으나 이에 한정되지 않으며 어떠한 화학적 결합방식일 수 있다

[0047] 또한 생체내 반감기를 증가시키기 위해 사용되는 캐리어는 폴리사카라이드 (Polysaccharide) 혹은 지방산 (fatty acid)등 비펩타이드 물질일 수 있다.

[0048] 상기 폴리에틸렌 글리콜은 가지가 없는 단쇄이거나 하나 이상의 가지가 달린 형태일 수 있으며 천연형에 비해 인슐린 RMC(receptor mediated clearance)가 감소된 인슐린 아날로그에 부착될 수 있는 모든 폴리에틸렌 글리콜을 의미하며 그 크기 또한 1 Da ~ 100kDa, 또는 10Da ~100kDa 까지 제한은 없다. 또한, 상기 폴리에틸렌 글리콜은 하나 이상 결합할 수 있다.

[0049] 상기 폴리에틸렌 글리콜은 인슐린 아날로그의 N-말단 아미노산, C-말단 아미노산, 인슐린 아날로그 내부의 라이신, 시스테인, 아스파틱산 및 글루탐산으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기에 결합한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0050] 특정 아미노산 서열은 인슐린 RMC(receptor mediated clearance)가 감소된 인슐린 아날로그에 결합시 생체내 반감기를 증가시킬 수 있는 아미노산 중합체이며 엘라스틴과 같은 생체내에서 결합조직을 구성하는 단백질 일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 또한, 엘라스틴의 일부 반복단위를 인위적으로 조합한 자연계에 존재하지 않는 아미노산 폴리머일 수 있다. 엘라스틴의 경우 수용성 전구체인 인간 tropoelastin (서열번호 48) 일 수 있으며 이중 일부 서열 혹은 일부 반복단위의 중합체 일 수 있다.

[0051] 예를 들어 반복단위인 (VPGXG, 서열번호 49)_n의 반복서열일 일 수 있으며, 여기서 X는 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파틱산, 글루탐산, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 또는 발린 잔기에서 선택될 수 있다. n은 1에서 500일 수 있다.

[0052] 구체적으로, 상기 반복단위는 (VPGVG, 서열번호 50)_n, (VPGAG, 서열번호 51)_n, (VPGGG, 서열번호 52)_n, (VPGIG, 서열번호 53)_n, (VPGLG, 서열번호 54)_n, (VPGFG, 서열번호 55)_n, (AVGVP, 서열번호 56)_n, (IPGVG, 서열번호 57)_n, (LPGVG, 서열번호 58)_n 등에서 선택된 반복적인 아미노산 중합체이며, 또는 이들 반복단위의 조합으로 이루어진 중합체인 엘라스틴 유사 폴리펩타이드(Elastin Like Peptide, ELP)일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며 어떠한 서열의 반복단위의 중합체도 본 발명의 범주에 속할 수 있다 (n=1~500).

[0053] 본 명세서에서 언급된 아미노산은 IUPAC-IUB 명명법에 따라 다음과 같이 약어로 기재하였다.

[0054]	알라닌 A	아르기닌R
[0055]	아스파라긴 N	아스파틱 산 D
[0056]	시스테인 C	글루탐산 E
[0057]	글루타민 Q	글라이신 G
[0058]	히스티딘 H	이소루신 I
[0059]	루이신 L	라이신 K
[0060]	메티오닌 M	페닐알라닌 F
[0061]	프로린 P	세린 S
[0062]	트레오닌 T	트립토판 W
[0063]	티로신 Y	발린 V

[0064] 엘라스틴, 엘라스틴의 수용성 전구체 및 엘라스틴 유사 폴리펩타이드는 인간 및 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 피그 등의 동물의 생체 내에서 분리한 천연형으로부터 얻어질 수도 있고, 형질전환된 동물

세포 또는 미생물로부터 얻어진 재조합형 일 수 있다. 또한 당쇄 수식 아미노산을 첨가하여 동물세포에서 생산 시 당쇄를 부가 할 수 있다.

[0065] 본 발명에서 엘라스틴, 엘라스틴의 수용성 전구체 및 엘라스틴 유사 폴리펩타이드와 인슐린 RMC(receptor mediated clearance)가 감소된 인슐린에 결합은 유전자 재조합을 통해 펩타이드 결합으로 생산될 수 있으며, 비 펩타이드성 중합체를 통해 각각 달리 생산 후 결합될 수 있다.

[0066] 상기 인슐린 수용체와 결합력이 낮아진 인슐린 아날로그와 인슐린 아날로그의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 캐리어를 연결하는 링커는 펩타이드 또는 비펩타이드성 중합체일 수 있다.

[0067] 상기 비펩타이드성 중합체는 비공유화학 결합 혹은 공유화학결합 등 어떠한 화학적 결합일 수 있으며 그 제한은 없다.

[0068] 상기 비펩타이드성 중합체는 반복 단위가 2개 이상 결합된 생체 적합성 중합체를 의미하며, 상기 반복 단위들은 펩타이드 결합이 아닌 임의의 공유결합을 통해 서로 연결된다. 이와 같은 비펩타이드성 중합체는 양 말단 또는 세 말단을 가질 수 있다.

[0069] 본 발명에 사용가능한 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 지방산, 사카라이드(saccharide), 고분자 중합체, 저분자 화합물, 뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다.

[0070] 상기 고분자 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐 에틸 에테르, PLA(폴리락트산, polylactic acid) 및 PLGA(폴리락틱-글리콜산, polylactic-glycolic acid)와 같은 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산, 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으며, 구체적으로 폴리에틸렌 글리콜일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.

[0071] 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 범위이다.

[0072] 또한, 본 발명의 비펩타이드성 중합체를 통해 결합되는 캐리어인 상기 폴리에틸렌 글라이콜 혹은 엘라스틴 유사 펩타이드는 비펩타이드성 중합체를 통해 한 종류의 캐리어 뿐만 아니라 상이한 종류의 캐리어들의 조합이 사용될 수도 있다.

[0073] 본 발명에 사용되는 비펩타이드성 중합체는 엘라스틴 유사 펩타이드 및 단백질 약물과 결합될 수 있는 반응기를 가진다.

[0074] 상기 비 펩타이드성 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 면역글로불린과 각각 결합하는데 효과적이다. 알데히드 결합에 의한 환원성 알킬화로 생성된 최종 산물은 아마이드 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.

[0075] 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 반

용기를 갖는 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 본 발명의 단쇄 인슐린 아날로그 결합체를 제조할 수 있다.

- [0076] 이러한 본 발명의 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.
- [0077] 본 발명의 일 실시예에서는 이러한 생체내 반감기를 연장하는 캐리어와 결합시 천연형 인슐린 결합체에 비해 인슐린 수용체 결합력이 감소된 인슐린 아날로그에서 월등히 증가한 생체내 반감기를 보임을 확인하였다
- [0078] 본 발명은, 또 하나의 양태로서 상기 인슐린 아날로그 결합체를 포함하는 인슐린 지속성 제제를 제공한다. 상기 인슐린 지속성 제제는 생체 내 지속성 및 안정성이 증가된 인슐린 지속성 제제일 수 있다. 상기 지속성 제제는 당뇨병 치료용 약제학적 조성물일 수 있다.
- [0079] 본 발명은, 또 하나의 양태로서 상기 인슐린 아날로그 결합체를 포함하는, 당뇨병의 예방 또는 치료용 지속성 제제를 제공한다.
- [0080] 생체이용율을 증가 혹은 지속적인 활성유지를 할 수 있는 제제로는 PLGA, 히아루론산, 키토산등을 이용한 마이크로 파티클, 나노파티클 등에 의한 sustained release 제형이 이에 포함될 수 있다
- [0081] 또한 생체이용율을 증가 혹은 지속적인 활성유지를 할 수 있는 다른 양태의 제제로는 이식체(implant), 흡입체(inhalation), 코분사제제(nasal), 패치(patch)와 같은 제제일 수 있다.
- [0082] 본 발명에서 용어, "당뇨(Diabetes)병"은 인슐린의 분비량이 부족하거나 정상적인 기능이 이루어지지 않는 등의 대사질환 (metabolic disease)를 의미한다. 본 발명의 조성물을 개체에 병용 투여함으로써, 혈당을 조절하여 당뇨병을 치료할 수 있다.
- [0083] 본 발명에서 용어, "예방"이란 본 발명의 조성물의 병용투여로 당뇨병을 방지하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"란 본 발명의 조성물의 병용투여로 당뇨병의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 상기 당뇨병 치료는 당뇨병이 발생할 수 있는 임의의 포유 동물에 적용이 가능하며, 그 예로 인간 및 영장류뿐만 아니라, 소, 돼지, 양, 말, 개 및 고양이 등 가축을 제한없이 포함하나, 바람직하게는 인간일 수 있다.
- [0084] 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, 유허제 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.
- [0085] 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.
- [0086] 또한, 충전제, 향응집제, 유허제, 습윤제, 향료 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0087] 본 발명은 또 하나의 양태로서, 상기 인슐린 아날로그 결합체, 인슐린 지속성 제제, 또는 당뇨병의 예방 또는 치료용 지속성 제제를, 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 인슐린 관련 질환의 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [0088] 본 발명에 따른 결합체는 당뇨 치료에 유용한바, 이를 포함하는 약제학적 조성물을 투여함으로써, 상기 질환의

치료를 도모할 수 있다.

[0089] 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. 복강내 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.

[0090] 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.

발명의 효과

[0091] 본 발명의 지속형 인슐린 아날로그 결합체는 천연형에 비해 인슐린 수용체 결합력이 감소된 아날로그 및 혈중 반감기가 증가된 캐리어가 결합된 결합체로서, 생체 내 반감기 증가, 생체 이용률 증가 및/또는 지속적인 활성 유지를 할 수 있는 지속형 인슐린 제제를 제공하여, 다양한 인슐린 결합 질병 등에 있어서, 환자 편의성을 증대시키며 질병을 치료할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0092] 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.

[0093] 실시예 1: 단쇄 인슐린 아날로그 발현 벡터의 제작

[0094] 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.

[0095] 하기 표 1에 각각의 A 쇄 또는 B쇄의 아미노산의 변화 서열 및 아날로그 이름을 나타냈다. 즉, 아날로그 1의 경우 A 쇄의 1번 글리신이 알라닌으로 치환, 아날로그 4의 경우 B쇄의 8번 글리신이 알라닌으로 치환된 형태이다.

표 1

아날로그	변화서열
아날로그 1	A ¹ G → A
아날로그 2	A ² I → A
아날로그 3	A ¹⁹ Y → A
아날로그 4	B ⁸ G → A
아날로그 5	B ²³ G → A
아날로그 6	B ²⁴ F → A
아날로그 7	B ²⁸ F → A
아날로그 8	A ¹⁴ Y → E
아날로그 9	A ¹⁴ Y → N

[0096]

[0097] 인슐린 아날로그 증폭을 위한 프라이머는 하기 표 2에 나타냈다.

표 2

Analogs	서열	서열번호
Analog 1	5' GGGTCCCTGCAGAAGCGTGCATTGTGGAACAATGCTGT 3'	서열번호 1
	5' ACAGCATTGTCCACAATCGCAGCTTCTGCAGGGACCC 3'	서열번호 2
Analog 2	5' TCCCTGCAGAAGCGTGGCGGGTGAACAATGCTGTACC 3'	서열번호 3
	5' GGTACAGCATTGTCCACCGCGCCACGCTTCTGCAGGGA 3'	서열번호 4
Analog 3	5' CTCTACCAGCTGGAAAACGCGTGTAACTGAGGATCC 3'	서열번호 5
	5' GGATCCTCAGTTACACGCGTTTTCCAGCTGGTAGAG 3'	서열번호 6
Analog 4	5' GTTAAACCAACACTTGTGTGCGTCACACCTGGTGAAGCT 3'	서열번호 7
	5' AGCTTCCACCAGGTGTGACGCACACAAGTGTGGTTAAC 3'	서열번호 8
Analog 5	5' CTAGTGTGCGGGGAACGAGCGTTCTTCTACACCCCAAG 3'	서열번호 9
	5' CTTGGGTGTGTAAGAAGCCTCGTTCCCCGCACACTAG 3'	서열번호 10
Analog 6	5' GTGTGCGGGGAACGAGGCGGTTCTACACCCCAAGACC 3'	서열번호 11
	5' GGTCTTGGGTGTGTAAGAAGCGCCTCGTTCCCCGCACAC 3'	서열번호 12
Analog 7	5' TCGGGGAACGAGGCTTCGCGTACACACCCCAAGACCCGC 3'	서열번호 13
	5' GCGGGTCTTGGGTGTGTAAGCGAAGCCTCGTTCCCCGCA 3'	서열번호 14
Analog 8	5' -CCAGCATCTGCTCCCTCGAACAGCTGGAGAACTACTG-3'	서열번호 15
	5' -Cagtagttctccagctgttogagggagcagatgctg-3'	서열번호 16
Analog 9	5' -CAGCATCTGCTCCCTCAACCAGCTGGAGAACTAC-3'	서열번호 17
	5' -Gtagttctccagctggttgagggagcagatgctg-3'	서열번호 18

[0098]

[0099] 인슐린 아날로그 증폭을 위한 PCR 조건은 95℃ 30초, 55℃에서 30초, 68℃에서 6분으로 이 과정을 18회 반복하였다. 이와 같은 조건에서 얻어진 인슐린 아날로그 단편은 세포내의 봉입체 형태로 발현시키기 위하여 pET22b 벡터에 삽입되어 있으며 이렇게 얻어진 발현 벡터를 pET22b-인슐린 아날로그 1 내지 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.

[0100]

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

표 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 Ala 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
	단백질	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ala Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	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

[0101]

	단백질	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Ala Cys Asn	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 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	25
	단백질	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Ala Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	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
	단백질	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Ala Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	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 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	29

[0102]

	단백질	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Ala Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	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
	단백질	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Ala Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	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 GAG AAC TAC TGC AAC TGA	33
	단백질	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	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 Asn Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	36
--	-----	--	----

실시예 2: 재조합 인슐린 아날로그 용합 펩타이드의 발현

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. 형질 전환 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 재조합 용합 단백질의 생산을 위한 세포 스톡(cell stock)으로 사용하였다.

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

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

[0108] **실시예 3: 재조합 인슐린 아날로그의 회수 및 재접힘 (refolding)**

[0109] 상기 실시예 2에서 발현시킨 재조합 인슐린 아날로그들을 가용성 형태로 바꾸기 위해 세포를 파쇄하고 재접힘시켰다. 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℃에서 20분 원심분리하여 상층액을 버리고, 3 L 세척완충액(0.5% 트리톤 X-100 및 50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA)에 재부유하였다. 7,000 rpm으로 4℃에서 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 재조합 인슐린 아날로그 회수를 위하여 400 ml의 8 M 우레아를 추가한 후 40℃에서 1시간 교반하였다. 가용화된 재조합 인슐린 아날로그의 재접힘(refolding)을 위하여 7,000 rpm으로 4℃에서 30분간 원심분리한 후 상층액을 취한 후 여기에 7.2 L의 증류수를 연동펌프(peristaltic pump)를 이용하여 1000 ml/hr의 유속으로 넣어주면서 4℃에서 16시간 교반하였다.

[0110] **실시예 4: 양이온 결합 크로마토그래피 정제**

[0111] 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.

[0112] **실시예 5: 트립신(Trypsin)과 카복시펩티데이즈 B(Carboxypeptidase B) 처리**

[0113] 디살팅 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, 16에서 16시간 교반하였다. 반응을 종료하기 위하여 1 M 소듐 사이트레이트(pH 2.0)를 이용하여 pH를 3.5로 낮추었다.

[0114] **실시예 6: 양이온 결합 크로마토 그래피 정제**

[0115] 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.

[0116] **실시예 7: 음이온 결합 크로마토 그래피 정제**

[0117] 디살팅 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 10컬럼 용량의 선형 농도구배로 인슐린 아날로그 단백질을 용출하였다.

[0118] 정제된 인슐린 아날로그의 순도는 단백질 전기영동(SDS-PAGE) 및 고압 크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 분석하였으며, 아미노산의 변경 확인은 펩타이드맵핑과 각 피크의 분자량 분석을 통하여 확인하였다.

[0119] 그 결과, 각각의 인슐린 아날로그가 목적하는 바에 따라, 아미노산 서열이 변경이 되었음을 확인할 수 있었다.

[0120] **실시예 8: 천연형 인슐린 및 인슐린 아날로그들의 인슐린 수용체 결합력 비교**

[0121] 본 발명의 대표적인 인슐린 아날로그들의 인슐린 수용체 결합력을 측정하기 위하여, Surface plasmon resonance (SPR, BIACORE 3000, GE healthcare)를 이용하여 분석하였다. CM5칩에 인슐린 수용체를 아민 커플링 방법으로 고정화시키고, 5개 이상의 농도로 희석한 천연형 인슐린, 인슐린 아날로그를 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.

[0122] 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%의 수용체 결합력이 확인되었다(표 4). 이와 같이 본 발명의 인슐린 아날로그들은 천연형 인슐린에 비해 인슐린 수용체 결합력이 현저히 감소되었음을 확인하였다

표 4

[0123]

시험번호	물질명	k_a (1/Ms, $\times 10^5$)	k_d (1/s, $\times 10^{-3}$)	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	1.76 (100%)	10.73 (100%)	63.47 (100%)
	인슐린 아날로그(7번)	0.14 (7.8%)	8.34 (77.7%)	642.0 (9.9%)
시험 3	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%)
시험 4	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%)

[0124] 상기와 같은 결과들은, 본원발명의 인슐린 아날로그들이 생체 내의 인슐린 수용체의 결합력이 천연형 인슐린에 비해 감소하여, RMC를 회피하여 생체 내 반감기가 증가할 수 있음을 시사하는 것이다.

[0125] **실시예 9: 대표적인 인슐린 아날로그(7번)-PEG 결합체의 제조**

[0126] 인슐린 아날로그 B 쇄의 라이신 잔기에 mPEG-SBA (20kDa, Nektar, 미국)를 폐길화시키기 위하여, 인슐린 아날로그 : PEG의 몰 비를 1:2로, 인슐린 아날로그 농도를 1.5 mg/ml로 상온에서 약 1시간 반응시켰다. 이때 반응은 50 mM 소듐 보레이트(Sodium Borate) pH 9.0에서 이루어졌으며, 20.0 mM 농도의 소듐 시아노보로하이드라이드 환원제를 첨가하여 반응시켰다. 반응액은 소듐 시트레이트(pH 3.0), 45% 에탄올이 포함된 버퍼와 KCl 농도 구배를 이용한 Source15S (GE Healthcare, 미국) 컬럼을 사용하여 정제하였다.

[0127] Source15S 컬럼으로부터 정제된 인슐린 아날로그-PEG 결합체는 단백질 전기영동 (SDS-PAGE) 및 고압 크로마토그래피 (HPLC)를 사용하여 > 95 % 순도를 확인 하였다.

[0128] **실시예 10: 대표적인 인슐린 아날로그(7번)-ELP 결합체의 제조**

[0129] Elastin 결합 단백질을 만들기 위해 우선 ELP motif 발현 벡터를 제작하였다. 10개 아미노산으로 구성된 ELP motif를 만들기 위해 oligonucleotide (서열번호 37)를 제작하였고, 이를 주형으로 순방향 및 역방향 primer (서열번호 38 및 39)를 제작하였다.

[0130] ELP motif 유전자를 증폭하기 위한 PCR 조건은 95℃ 15초, 54℃에서 30초, 68℃에서 15초로 이 과정을 25회 반복하였다. 하기 표 5에 oligonucleotide 및 PCR에 사용된 primer를 나타냈다.

표 5

	서열	서열번호
Oligonucleotide	5'-cagcatctgatctgcccggatcccggggttgagtgccctggtgtagcgtcccag gcccgggtgtgcccggagcagggttccaggtgtaggtgtccctggggttgagtgcc ctggtgtaggcgtcccaggcggaggtgtgcccggagcagggtgttccaggtggagggc tgcccgggatcccgtagcatctggtcgc-3'	37
Foward Primer	5'-CAGCATCTGATCTGcgggat-3'	38
Reverse Primer	5'-GCGACCAGATGCTACGGGAT-3'	39

[0131]

[0132] PCR 증폭산물을 젤 추출 키트(Qiagen, Germany)를 이용하여 추출한 후 제한효소 BamHI으로 처리하여 삽입 절편을 제조하였다. 그 다음 pET22b 벡터(Novagen, USA)를 동일한 제한효소로 절단하고 동일한 젤 추출 키트를 이용하여 추출한 후, 삽입 절편과 벡터를 T4 ligase를 통해 연결시키고 대장균 TOP10 competent cell(Invitrogen, USA)에 형질전환하였다. 상기 형질전환체를 LB-ampicillin 배지판에 접종하고 배양하여 형성된 colony를 무작위로 선택하여, LB-ampicillin 배지에 밤새 배양한 후 plasmid DNA를 추출하였다. 상기 plasmid DNA를 제한효소 BamHI으로 절단하고 전기영동을 통하여 올바른 크기의 삽입 DNA가 존재함을 확인한 후 DNA 서열분석을 통하여 ELP motif가 올바르게 벡터에 삽입되었음을 확인하였다. 본 발명자들은 상기와 같이 제조된 ELP motif를 포함하는 벡터를 'pET22b-ELP motif'라 명명하였다.

[0133] ELP motif (50개 아미노산)가 12번 반복되어 있는 ELP 결합 단백질을 만들기 위해, ELP motif가 삽입된 벡터를 제한효소 XmaI으로 절단하여 ELP motif를 추출하였다. 추출된 ELP motif와 BamHI, XmaI 제한효소 결합 부위를 가지고 있는 double strand oligonucleotide (서열번호 40~43, 표 6)를 함께 섞은 후 T4 ligase를 통해 연결시켜 다양한 크기의 삽입 절편을 제작하였다. Double strand를 만들기 위한 anealing 조건은 oligonucleotide를 10mM Tris pH8.0, 50mM NaClm 1mM EDTA에 섞은 후 95℃ 5분 후 서서히 온도를 4℃까지 낮추었다. 이를 통해 만들어진 다양한 크기의 삽입 절편을 제한효소 BamHI으로 절단된 pET22b 벡터에 결합시킨 후 연결시키고 대장균 TOP10 competent cell에 형질전환하였다. 상기 형질전환체를 LB-ampicillin 배지판에 접종하고 배양하여 형성된 colony를 무작위로 선택하여, LB-ampicillin 배지에 밤새 배양한 후 plasmid DNA를 추출하였다. 상기 plasmid DNA를 제한효소 BamHI으로 절단하고 전기영동을 통하여 올바른 크기의 삽입 DNA가 존재함을 확인한 후 DNA 서열분석을 통하여 ELP 결합 단백질이 올바르게 벡터에 삽입되었음을 확인하였다. 본 발명자들은 상기와 같이 제조된 ELP 결합단백질을 포함하는 벡터를 'ET22b-ELP-BP'라 명명하였다.

표 6

명칭	서열	서열번호
Double strand oligonucleotide	5'-GATCCATCCATGCTACGTC-3'	40
Double strand oligonucleotide	5'-CCGGGAACGTAGCATGGATG-3'	41
Double strand oligonucleotide	5'-CCGGGTGGCCGTGACATGTCG-3'	42
Double strand oligonucleotide	5'-GATCCGACATGTCACGGCCAC-3'	43

[0134]

[0135]

실시예 11: 인슐린 아날로그-ELP-BP 융합 단백질 발현 벡터의 제작

[0136]

인슐린 아날로그의 C말단에 ELP-BP가 결합된 융합단백질을 만들기 위하여, 먼저 NdeI 제한효소 절단부위를 포함한 인슐린 N말단 primer(서열번호 44)와 ELP-BP의 N말단 서열이 포함된 인슐린 C말단 primer(서열번호 45)를 이용하여 Insulin를 PCR을 이용하여 증폭하였고, 인슐린 C말단부위를 포함한 ELP-BP N말단 primer(서열번호 46)와 BamHI 제한효소 절단 부위를 포함한 ELP-BP C말단 primer(서열번호 47)를 이용하여(표 7), ELP-BP 유전자를 PCR을 이용하여 증폭하였다. PCR 조건은 PCR 조건은 95℃ 30초, 55℃에서 30초, 68℃에서 30초, 2분으로 이 과정을 30회 반복하였다. 증폭된 유전자를 주형으로 2차 PCR을 진행하여 인슐린과 ELP-BP가 융합된 유전자를 증폭하였다. 2차 PCR조건은 95℃ 30초, 55℃에서 30초, 68℃에서 2분 30초로 이 과정을 30회 반복하였다.

[0137]

증폭된 유전자를 NdeI, BamHI으로 절단한 후 동일한 제한효소로 절단된 pET22B 벡터와 T4 ligase를 이용하여 연결시킨 후, 대장균 TOP10 competent cell(Invitrogen, USA)에 형질전환하였다. 실시예 10과 동일한 방법을 통하여 올바른 융합 단백질 서열을 확인한 후, 'pET22b-Insulin-ELPBP'라 명명하였다. 이의 DNA 및 단백질 서열을 각각 서열번호 59 및 60으로 나타냈다.

표 7

명칭	서열	서열번호
Insulin N말단 primer	5'-GAGATATACATATGATGGCAACAACATCAAC-3'	44
Insulin C말단 primer	5'- CCCCAGGGAACGTTGCAGTAGTTCTCCAG-3'	45
ELP-BP N말단 primer	5'-GAGAACTACTGCAACGttccccggggttgagtg-3'	46
ELP-BP C말단 primer	5'-CGCGGATCCGACATGTCACGGCCAC-3'	47

[0138]

[0139]

상기의 결과들은 본 발명의 인슐린 아날로그 결합체가 인슐린 수용체 결합력이 감소되어, 생체 내 RMC 회피 및, 신장에서의 제거 회피를 통한 혈중 반감기를 획기적으로 증가시켜, 인슐린 아날로그 결합체를 이용한 지속형 제제를 제공할 수 있음을 시사하는 것이다.

[0140]

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

서열 목록

<110> HANMI PHARM. CO., LTD.

<120> Novel long acting insulin analog and use thereof

<130> KPA140681-KR
 <160> 62
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 1
 gggtccctgc agaagcgtgc gattgtggaa caatgctgt 39
 <210> 2
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 2
 acagcattgt tccacaatcg cacgcttctg cagggaccc 39
 <210> 3
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 3
 tccctgcaga agcgtggcgc ggtggaacaa tgctgtacc 39
 <210> 4
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 4
 ggtacagcat tgttccaccg cgccacgett ctgcagga 39
 <210> 5
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Primer	
<400> 5	
ctctaccagc tggaaaacgc gtgtaactga ggatcc	36
<210> 6	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 6	
ggatcctcag ttacacgcgt tttccagctg gtagag	36
<210> 7	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 7	
gtaaccaac acttgtgtgc gtcacacctg gtggaagct	39
<210> 8	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 8	
agcttcacc aggtgtgacg cacacaagtg ttggttaac	39
<210> 9	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 9	
ctagtgtgcg gggaacgagc gttcttctac acaccaag	39
<210> 10	
<211> 39	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 10
 cttgggtgtg tagaagaacg ctcgttcccc gcacactag 39
 <210> 11
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 11
 gtgtgcgggg aacgaggcgc gttctacaca cccaagacc 39

 <210> 12
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 12
 ggtcttgggt gtgtagaacg cgcctcgttc cccgcacac 39
 <210> 13
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 13
 tgcggggaac gaggcttcgc gtacacacc aagacccgc 39
 <210> 14
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 14
 gcgggtcttg ggtgtgtacg cgaagcctcg ttccccgca 39

<210>	15	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	15	
	ccagcatctg ctcctcgaa cagctggaga actactg	37
<210>	16	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	16	
	cagtagttct ccagctgttc gaggagcag atgctgg	37
<210>	17	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	17	
	cagcatctgc tccctcaacc agctggagaa ctac	34
<210>	18	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	18	
	gtagttctcc agctggttga gggagcagat gctg	34
<210>	19	
<211>	258	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Analog 1	
<400>	19	

ttcgttaacc aacacttggtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60
 gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120
 caggtggagc tggcgggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180

tccctgcaga agcgtgcat tgtggaacaa tgctgtacca gcactgctc cctctaccag 240
 ctggagaact actgcaac 258

- <210> 20
- <211> 86
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Analog 1
- <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 Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg
 20 25 30

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

- <210> 21
- <211> 258
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Analog 2

<400> 21
 ttcgttaacc aacacttggtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60
 gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120
 caggtggagc tggcgggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180

tcctgcaga agcgtggcgc ggtggaacaa tgctgtacca gcacatgctc cctctaccag 240
 ctggagaact actgcaac 258

<210> 22

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 2

<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 Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

85

<210> 23

<211> 258

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 3

<400> 23

ttcgttaacc aacacttggtg tggtcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60

gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120

caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180

tcctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcacatgctc cctctaccag 240

ctggagaacg cgtgcaac 258

<210> 24

<211> 86
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Analog 3
 <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 Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg
 20 25 30
 Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
 35 40 45
 Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
 50 55 60
 Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
 65 70 75 80
 Leu Glu Asn Ala Cys Asn
 85

<210> 25
 <211> 258
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Analog 4
 <400> 25
 ttcgttaacc aacacttggtg tgcgtcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60
 gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120
 caggtggagc tgggccccggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180
 tcctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcactctctc cctctaccag 240
 ctggagaact actgcaac 258

<210> 26
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Analog 4

<400> 26
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Ala Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg
20 25 30
Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
35 40 45
Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
50 55 60
Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
65 70 75 80
Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
85

<210> 27

<211> 258

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 5

<400> 27

ttcgttaacc aacacttgtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60
gaacgagcgt tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120
caggtggagc tggcgggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180
tccctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcactctgctc cctctaccag 240
ctggagaact actgcaac 258

<210> 28

<211> 86

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> Analog 5

<400> 28

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

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

Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
 65 70 75 80
 Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 85

<210> 29

<211> 258

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 6

<400> 29

ttcgtaacc aacacttggtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60
 gaacgaggcg cgttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120
 caggtgggagc tgggccccggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180

tcctctcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcattctgctc cctctaccag 240
 ctggagaact actgcaac 258

<210> 30

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 6

<400> 30

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

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

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

85

<210> 31
 <211> 258
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Analog 7

<400> 31
 ttcgtaacc aacacttgtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60
 gaacgaggct tcgctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120
 caggtggagc tggcgggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180
 tccctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcctctgctc cctctaccag 240
 ctggagaact actgcaac 258

<210> 32
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Analog 7

<400>
 32
 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Ala Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg
 20 25 30
 Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
 35 40 45
 Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
 50 55 60

85

<210> 35

<211> 261

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 9

<400> 35

ttcgттаacc aacacttgтg тggctcacac ctggтggaag ctctctacct agтgtgcggg 60

gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggтgggg 120

caggтggagc тggcggggg ccctggтgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180

tccctgcaga agcgtggcat тtggaacaa тgctgtacca gcатctgctc cctcaaccag 240

ctggagaact actgcaactg a 261

<210> 36

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analog 9

<400> 36

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

85

<210> 37

<211> 196

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide

<400> 37

cagcatctga tctgcgggat cccggggttg gagtgcctgg ttaggcgtc ccaggcggag 60

gtgtgccggg agcaggtgtt ccaggtgtag gtgtccctgg ggttggagtg cctggtgtag 120

gcgtcccagg cggaggtgtg cccgggagcag gtgtccagg tggaggcgtg cccgggatcc 180

cgtagcatct ggtcgc 196

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Foward Primer

<400> 38

cagcatctga tctgcgggat 20

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Primer

<400> 39

gcgaccagat gctacgggat 20

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Double strand oligonucleotide

<400> 40

gatccatcca tgctacgttc 20

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Double strand oligonucleotide

<400> 41

ccgggaacgt agcatggatg

20

<210> 42

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Double strand oligonucleotide

<400> 42

ccgggtggcc gtgacatgtc g

21

<210> 43

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Double strand oligonucleotide

<400> 43

gatccgacat gtcacggcca c

21

<210> 44

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Insulin N terminal primer

<400> 44

gagatataca tatgatggca acaacatcaa c

31

<210> 45

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Insulin C terminal primer

<400> 45

ccccgggaac gttgcagtag ttctccag

28

<210> 46

<211> 33

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ELP-BP N terminal primer

<400> 46
 gagaactact gcaacgttcc cggggttgga gtg 33

<210> 47
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ELP-BP C terminal primer

<400> 47
 cgcggatccg acatgtcacg gccac 25

<210> 48
 <211> 700
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human tropoelastin
 <400> 48
 Met Ala Gly Leu Thr Ala Ala Ala Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Ser Ile Leu His Pro Ser Arg Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala
 20 25 30
 Ile Pro Gly Gly Val Pro Gly Gly Val Phe Tyr Pro Gly Ala Gly Leu
 35 40 45
 Gly Ala Leu Gly Gly Gly Ala Leu Gly Pro Gly Gly Lys Pro Leu Lys
 50 55 60
 Pro Val Pro Gly Gly Leu Ala Gly Ala Gly Leu Gly Ala Gly Leu Gly
 65 70 75 80
 Ala Phe Pro Ala Val Thr Phe Pro Gly Ala Leu Val Pro Gly Gly Val

85 90 95
 Ala Asp Ala Ala Ala Ala Tyr Lys Ala Ala Lys Ala Gly Ala Gly Leu
 100 105 110

Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Gly Leu Gly Val Ser Ala Gly Ala Val
 115 120 125
 Val Pro Gln Pro Gly Ala Gly Val Lys Pro Gly Lys Val Pro Gly Val
 130 135 140
 Gly Leu Pro Gly Val Tyr Pro Gly Gly Val Leu Pro Gly Ala Arg Phe
 145 150 155 160

 Pro Gly Val Gly Val Leu Pro Gly Val Pro Thr Gly Ala Gly Val Lys
 165 170 175
 Pro Lys Ala Pro Gly Val Gly Gly Ala Phe Ala Gly Ile Pro Gly Val
 180 185 190
 Gly Pro Phe Gly Gly Pro Gln Pro Gly Val Pro Leu Gly Tyr Pro Ile
 195 200 205
 Lys Ala Pro Lys Leu Pro Gly Gly Tyr Gly Leu Pro Tyr Thr Thr Gly
 210 215 220
 Lys Leu Pro Tyr Gly Tyr Gly Pro Gly Gly Val Ala Gly Ala Ala Gly

 225 230 235 240
 Lys Ala Gly Tyr Pro Thr Gly Thr Gly Val Gly Pro Gln Ala Ala Ala
 245 250 255
 Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Lys Phe Gly Ala Gly Ala Ala Gly
 260 265 270
 Val Leu Pro Gly Val Gly Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Ala
 275 280 285
 Ile Pro Gly Ile Gly Gly Ile Ala Gly Val Gly Thr Pro Ala Ala Ala
 290 295 300

 Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Lys Tyr Gly Ala Ala Ala
 305 310 315 320
 Gly Leu Val Pro Gly Gly Pro Gly Phe Gly Pro Gly Val Val Gly Val
 325 330 335
 Pro Gly Pro Thr Tyr Gly Val Gly Ala Gly Gly Phe Pro Gly Phe Gly
 340 345 350
 Val Gly Val Gly Gly Ile Pro Gly Val Ala Gly Val Pro Ser Val Gly
 355 360 365

Gly Val Pro Gly Val Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Ile Ser Pro Glu

370 375 380
 Ala Gln Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Lys Tyr Gly Val Gly Thr
 385 390 395 400
 Pro Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Lys Ala Ala Gln Phe Gly
 405 410 415
 Leu Val Pro Gly Val Gly Val Ala Pro Gly Val Gly Val Ala Pro Gly
 420 425 430
 Val Gly Val Ala Pro Gly Val Gly Leu Ala Pro Gly Val Gly Val Ala
 435 440 445

Pro Gly Val Gly Val Ala Pro Gly Val Gly Val Ala Pro Gly Ile Gly
 450 455 460
 Pro Gly Gly Val Ala Ala Ala Ala Lys Ser Ala Ala Lys Val Ala Ala
 465 470 475 480
 Lys Ala Gln Leu Arg Ala Ala Ala Gly Leu Gly Ala Gly Ile Pro Gly
 485 490 495
 Leu Gly Val Gly Val Gly Val Pro Gly Leu Gly Val Gly Ala Gly Val
 500 505 510
 Pro Gly Leu Gly Val Gly Ala Gly Val Pro Gly Phe Gly Ala Gly Ala

515 520 525
 Asp Glu Gly Val Arg Arg Ser Leu Ser Pro Glu Leu Arg Glu Gly Asp
 530 535 540
 Pro Ser Ser Ser Gln His Leu Pro Ser Thr Pro Ser Ser Pro Arg Val
 545 550 555 560
 Pro Gly Ala Leu Ala Ala Ala Lys Ala Ala Lys Tyr Gly Ala Ala Val
 565 570 575
 Pro Gly Val Leu Gly Gly Leu Gly Ala Leu Gly Gly Val Gly Ile Pro
 580 585 590

Gly Gly Val Val Gly Ala Gly Pro Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys
 595 600 605
 Ala Ala Ala Lys Ala Ala Gln Phe Gly Leu Val Gly Ala Ala Gly Leu

<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Repeat unit
<400> 51

Val Pro Gly Ala Gly

1 5

<210> 52
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Repeat unit

<400>

52

Val Pro Gly Gly Gly

1 5

<210> 53
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Repeat unit

<400> 53

Val Pro Gly Ile Gly

1 5

<210> 54
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Repeat unit

<400> 54

Val Pro Gly Leu Gly

1 5

<210> 55
<211> 5
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Repeat unit

<400> 55

Val Pro Gly Phe Gly

1 5

<210> 56

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Repeat unit

<400> 56

Ala Val Gly Val Pro

1 5

<210> 57

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Repeat unit

<400> 57

Ile Pro Gly Val Gly

1 5

<210> 58

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Repeat unit

<400> 58

Leu Pro Gly Val Gly

1 5

<210> 59

<211> 2109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pET22b-Insulin analog-ELPBP DNA

<400> 59

atggcaaca	catcaacagc	aactacgcgt	tttgtgaacc	aacacctgtg	cggetcacac	60
ctggtggaag	ctctctacct	agtgtgcggg	gaacgaggct	tctctacac	acccaagacc	120
cgccgggagg	cagaggacct	gcaggtgggg	caggtggagc	tgggcggggg	ccctggtgca	180
ggcagcctgc	agcccttggc	cctggagggg	tcctgcaga	agcgtggcat	tgtggaacaa	240
tgctgtacca	gcatctgctc	cctctaccag	ctggagaact	actgcaacta	ggttcccggg	300
gttggagtgc	ctggtgtagg	cgtcccaggc	ggaggtgtgc	cgggagcagg	tgttccaggt	360
gtaggtgtcc	ctggggttgg	agtccttgt	gtaggcgtcc	caggcggagg	tgtgccggga	420
gcaggtgttc	caggtggagg	cgtgcccggg	gttggagtgc	ctggtgtagg	cgtcccaggc	480
ggaggtgtgc	cgggagcagg	tgttccaggt	gtaggtgtcc	ctggggttgg	agtccttgt	540
gtaggcgtcc	caggcggagg	tgtgccggga	gcaggtgttc	caggtggagg	cgtgcccggg	600
gttggagtgc	ctggtgtagg	cgtcccaggc	ggaggtgtgc	cgggagcagg	tgttccaggt	660
gtaggtgtcc	ctggggttgg	agtccttgt	gtaggcgtcc	caggcggagg	tgtgccggga	720
gcaggtgttc	caggtggagg	cgtgcccggg	gttggagtgc	ctggtgtagg	cgtcccaggc	780
ggaggtgtgc	cgggagcagg	tgttccaggt	gtaggtgtcc	ctggggttgg	agtccttgt	840
gtaggcgtcc	caggcggagg	tgtgccggga	gcaggtgttc	caggtggagg	cgtgcccggg	900
gttggagtgc	ctggtgtagg	cgtcccaggc	ggaggtgtgc	cgggagcagg	tgttccaggt	960
gtaggtgtcc	ctggggttgg	agtccttgt	gtaggcgtcc	caggcggagg	tgtgccggga	1020
gcaggtgttc	caggtggagg	cgtgcccggg	gttggagtgc	ctggtgtagg	cgtcccaggc	1080
ggaggtgtgc	cgggagcagg	tgttccaggt	gtaggtgtcc	ctggggttgg	agtccttgt	1140
gtaggcgtcc	caggcggagg	tgtgccggga	gcaggtgttc	caggtggagg	cgtgcccggg	1200
gttggagtgc	ctggtgtagg	cgtcccaggc	ggaggtgtgc	cgggagcagg	tgttccaggt	1260
gtaggtgtcc	ctggggttgg	agtccttgt	gtaggcgtcc	caggcggagg	tgtgccggga	1320
gcaggtgttc	caggtggagg	cgtgcccggg	gttggagtgc	ctggtgtagg	cgtcccaggc	1380
ggaggtgtgc	cgggagcagg	tgttccaggt	gtaggtgtcc	ctggggttgg	agtccttgt	1440
gtaggcgtcc	caggcggagg	tgtgccggga	gcaggtgttc	caggtggagg	cgtgcccggg	1500
gttggagtgc	ctggtgtagg	cgtcccaggc	ggaggtgtgc	cgggagcagg	tgttccaggt	1560
gtaggtgtcc	ctggggttgg	agtccttgt	gtaggcgtcc	caggcggagg	tgtgccggga	1620
gcaggtgttc	caggtggagg	cgtgcccggg	gttggagtgc	ctggtgtagg	cgtcccaggc	1680
ggaggtgtgc	cgggagcagg	tgttccaggt	gtaggtgtcc	ctggggttgg	agtccttgt	1740

gtaggcgtcc caggcggagg tgtcccgga gcaggtgttc caggtggagg cgtccccggg 1800
 gttggagtgc ctggtgtagg cgtcccaggc ggaggtgtgc cgggagcagg tgttccaggt 1860
 gtaggtgtcc ctgggttgg agtgcctggt gtaggcgtcc caggcggagg tgtcccgga 1920
 gcaggtgttc caggtggagg cgtccccggg gttggagtgc ctggtgtagg cgtcccaggc 1980
 ggaggtgtgc cgggagcagg tgttccaggt gtaggtgtcc ctgggttgg agtgcctggt 2040

gtaggcgtcc caggcggagg tgtcccgga gcaggtgttc caggtggagg cgtccccggg 2100
 tggccgtga 2109

<210> 60

<211> 701

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> pET22b-Insulin analog-ELPBP Protein

<400> 60

Met Ala Thr Thr Ser Thr Ala Thr Thr Arg Phe Val Asn Gln His Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln

35 40 45

Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln

50 55 60

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

65 70 75 80

Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

85 90 95

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val

100 105 110

Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro

115 120 125

Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly

130 135 140

Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly

145 150 155 160
 Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly
 165 170 175

 Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val
 180 185 190
 Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro
 195 200 205
 Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
 210 215 220
 Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala
 225 230 235 240
 Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly

 245 250 255
 Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val
 260 265 270
 Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro
 275 280 285
 Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
 290 295 300
 Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val
 305 310 315 320

 Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly
 325 330 335
 Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val
 340 345 350
 Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro
 355 360 365
 Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
 370 375 380
 Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val

 385 390 395 400

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly
 405 410 415
 Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val
 420 425 430
 Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro
 435 440 445
 Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly
 450 455 460

 Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val
 465 470 475 480
 Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly
 485 490 495
 Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val
 500 505 510
 Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro
 515 520 525
 Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly

 530 535 540
 Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly
 545 550 555 560
 Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly
 565 570 575
 Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val
 580 585 590
 Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro
 595 600 605

 Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
 610 615 620
 Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala
 625 630 635 640
 Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly
 645 650 655

Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val
 660 665 670

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro
 675 680 685

Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Trp Pro
 690 695 700

<210> 61

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> A chain of Insulin

<400> 61

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> 62

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> B chain of Insulin

<400> 62

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