

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-531075

(P2019-531075A)

(43) 公表日 令和1年10月31日(2019.10.31)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/17 (2006.01)	C12N 15/17 ZNA	4B064
C12N 15/63 (2006.01)	C12N 15/63 Z	4B065
C07K 14/62 (2006.01)	C07K 14/62	4C084
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4C086
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4C087

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-515862 (P2019-515862)  
 (86) (22) 出願日 平成29年9月22日 (2017. 9. 22)  
 (85) 翻訳文提出日 平成31年4月17日 (2019. 4. 17)  
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2017/010504  
 (87) 国際公開番号 WO2018/056764  
 (87) 国際公開日 平成30年3月29日 (2018. 3. 29)  
 (31) 優先権主張番号 10-2016-0122484  
 (32) 優先日 平成28年9月23日 (2016. 9. 23)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 韓国 (KR)

(71) 出願人 515022445  
 ハンミ ファーマシューティカル カンパ  
 ニー リミテッド  
 大韓民国 445-958 キョンギード  
 ファソーンシ パルタンーミョン ムハ  
 ーロ 214  
 (71) 出願人 397056695  
 サノフィーアベンティス・ドイチュラント  
 ・ゲゼルシャフト・ミット・ベシユレンク  
 テル・ハフツング  
 ドイツ65926フランクフルト・アム・  
 マイン、ブリューニングシュトラーセ50  
 番  
 (74) 代理人 100127926  
 弁理士 結田 純次

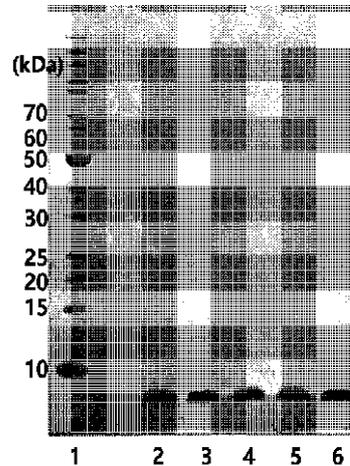
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インスリン受容体との結合力が減少された、インスリンアナログ及びその用途

(57) 【要約】

本発明は、新規なインスリンアナログ、その用途及び前記アナログを製造する方法に関するものである。

【選択図】 図1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

天然型インスリン B 鎖の 16 番目のアミノ酸、B 鎖の 25 番目のアミノ酸、A 鎖の 14 番目のアミノ酸及び A 鎖の 19 番目のアミノ酸からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸の変異を含む、インスリンアナログ。

## 【請求項 2】

前記変異が、天然型インスリン B 鎖の 16 番目のアミノ酸であるチロシンのグルタミン酸、セリン、トレオニン、またはアスパラギン酸への変異；天然型インスリン B 鎖の 25 番目のアミノ酸であるフェニルアラニンのアスパラギン酸またはグルタミン酸への変異；天然型インスリン A 鎖の 14 番目のアミノ酸であるチロシンのヒスチジン、リジン、アラニン、またはアスパラギン酸への変異；または天然型インスリン A 鎖の 19 番目のアミノ酸であるチロシンのグルタミン酸、セリン、またはトレオニンへの変異である、請求項 1 に記載のインスリンアナログ。

10

## 【請求項 3】

前記インスリンアナログが、

下記一般式 (1) で表される配列番号：55 の A 鎖と下記一般式 (2) で表される配列番号：56 の B 鎖を含むインスリンアナログ (ただし、前記インスリンアナログのうち、その A 鎖が配列番号：53 と一致しながら、同時に、B 鎖が配列番号：54 と一致するものは除く。)：

一般式 (1)

20

## 【化 1】

X a a 1 - I l e - V a l - G l u - X a a 5 - C y s - C y s - T h r - S e  
 r - I l e - C y s - X a a 1 2 - L e u - X a a 1 4 - G l n - X a a 1 6 - G  
 l u - A s n - X a a 1 9 - C y s - X a a 2 1 (配列番号：55)

前記一般式 (1) において、

X a a 1 が、アラニン、グリシン、グルタミン、ヒスチジン、グルタミン酸またはアスパラギンであり、

30

X a a 5 が、アラニン、グルタミン酸、グルタミン、ヒスチジン、またはアスパラギンであり、

X a a 1 2 が、アラニン、セリン、グルタミン、グルタミン酸、ヒスチジン、またはアスパラギンであり、

X a a 1 4 が、チロシン、ヒスチジン、リジン、アラニン、またはアスパラギン酸であり、

X a a 1 6 が、アラニン、ロイシン、チロシン、ヒスチジン、グルタミン酸またはアスパラギンであり、

X a a 1 9 が、チロシン、グルタミン酸、セリン、またはトレオニンであり、

40

X a a 2 1 が、アスパラギン、グリシン、ヒスチジン、またはアラニンである。

一般式 (2)

## 【化2】

P h e - V a l - A s n - G l n - H i s - L e u - C y s - G l y - S e r -  
 H i s - L e u - V a l - G l u - A l a - L e u - X a a 1 6 - L e u - V a l  
 - C y s - G l y - G l u - A r g - G l y - P h e - X a a 2 5 - T y r - X a  
 a 2 7 - X a a 2 8 - L y s - T h r (配列番号：56)

10

前記一般式(2)において、

X a a 1 6 が、チロシン、グルタミン酸、セリン、トレオニン、またはアスパラギン酸であり、

X a a 2 5 が、フェニルアラニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、

X a a 2 7 が、トレオニンであるか、不存在であり、

X a a 2 8 が、プロリン、グルタミン酸、またはアスパラギン酸であるか、不存在である。

## 【請求項4】

前記インスリンアナログが

前記一般式(1)で表される配列番号：55のA鎖と配列番号：54のB鎖を含む、  
 請求項3に記載のインスリンアナログ。

20

## 【請求項5】

前記インスリンアナログが、

前記配列番号：53のA鎖と一般式(2)で表される配列番号：56のB鎖を含む、  
 請求項3に記載のインスリンアナログ。

## 【請求項6】

前記一般式(1)において、

X a a 1 はグリシンであり、X a a 5 はグルタミンであり、X a a 1 2 はセリンであり、  
 X a a 1 4 はチロシン、ヒスチジン、リジン、アラニン、またはアスパラギン酸であり、  
 X a a 1 6 はロイシンであり、X a a 1 9 はチロシン、グルタミン酸、セリン、または  
 トレオニンであり、X a a 2 1 はアスパラギンであり、

30

前記一般式(2)において、

X a a 1 6 はチロシン、グルタミン酸、セリン、トレオニン、またはアスパラギン酸で  
 あり、X a a 2 5 はフェニルアラニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、X  
 a a 2 7 はトレオニンであり、X a a 2 8 はプロリンである、  
 請求項3に記載のインスリンアナログ。

## 【請求項7】

前記一般式(1)において、

X a a 1 はグリシンであり、X a a 5 はグルタミンであり、X a a 1 2 はセリンであり  
 、X a a 1 4 はチロシンであり、X a a 1 6 はロイシンであり、X a a 1 9 はチロシン、  
 グルタミン酸、またはセリンであり、X a a 2 1 はアスパラギンであり、

40

前記一般式(2)において、

X a a 1 6 はチロシン、グルタミン酸、セリン、またはアスパラギン酸であり、X a a  
 2 5 はフェニルアラニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、X a a 2 7 はト  
 レオニンであり、X a a 2 8 はプロリンである、  
 請求項3に記載のインスリンアナログ。

## 【請求項8】

前記インスリンアナログが、

(1)前記一般式(1)において、X a a 1 はグリシンであり、X a a 5 はグルタミン  
 であり、X a a 1 2 はセリンであり、X a a 1 4 はヒスチジンであり、X a a 1 6 はロイ

50



シンであり、X a a 1 9 はチロシンであり、X a a 2 1 はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、X a a 1 6 はアスパラギン酸であり、X a a 2 5 はフェニルアラニンであり、X a a 2 7 はトレオニンであり、X a a 2 8 はプロリンである、または；

(12) 前記一般式(1)において、X a a 1 はグリシンであり、X a a 5 はグルタミンであり、X a a 1 2 はセリンであり、X a a 1 4 はチロシンであり、X a a 1 6 はロイシンであり、X a a 1 9 はチロシンであり、X a a 2 1 はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、X a a 1 6 はチロシンであり、X a a 2 5 はアスパラギン酸であり、X a a 2 7 はトレオニンであり、X a a 2 8 はプロリンである、または；

(13) 前記一般式(1)において、X a a 1 はグリシンであり、X a a 5 はグルタミンであり、X a a 1 2 はセリンであり、X a a 1 4 はチロシンであり、X a a 1 6 はロイシンであり、X a a 1 9 はチロシンであり、X a a 2 1 はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、X a a 1 6 はチロシンであり、X a a 2 5 はグルタミン酸であり、X a a 2 7 はトレオニンであり、X a a 2 8 はプロリンである、  
請求項3に記載のインスリンアナログ。

【請求項9】

前記インスリンアナログは、配列番号：28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、及び52からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、  
請求項1に記載のインスリンアナログ。

【請求項10】

前記一般式(1)において、X a a 1 はグリシンであり、X a a 5 はグルタミンであり、X a a 1 2 はセリンであり、X a a 1 4 はチロシンであり、X a a 1 6 はロイシンであり、X a a 1 9 はグルタミン酸であり、X a a 2 1 はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、X a a 1 6 はチロシンであり、X a a 2 5 はフェニルアラニンであり、X a a 2 7 はトレオニンであり、X a a 2 8 はプロリンである、  
請求項3に記載のインスリンアナログ。

【請求項11】

前記一般式(1)において、X a a 1 はグリシンであり、X a a 5 はグルタミンであり、X a a 1 2 はセリンであり、X a a 1 4 はチロシンであり、X a a 1 6 はロイシンであり、X a a 1 9 はセリンであり、X a a 2 1 はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、X a a 1 6 はチロシンであり、X a a 2 5 はフェニルアラニンであり、X a a 2 7 はトレオニンであり、X a a 2 8 はプロリンである、  
請求項3に記載のインスリンアナログ。

【請求項12】

前記一般式(1)において、X a a 1 はグリシンであり、X a a 5 はグルタミンであり、X a a 1 2 はセリンであり、X a a 1 4 はチロシンであり、X a a 1 6 はロイシンであり、X a a 1 9 はトレオニンであり、X a a 2 1 はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、X a a 1 6 はチロシンであり、X a a 2 5 はフェニルアラニンであり、X a a 2 7 はトレオニンであり、X a a 2 8 はプロリンである、  
請求項3に記載のインスリンアナログ。

【請求項13】

前記一般式(1)において、X a a 1 はグリシンであり、X a a 5 はグルタミンであり、X a a 1 2 はセリンであり、X a a 1 4 はアスパラギン酸であり、X a a 1 6 はロイシンであり、X a a 1 9 はチロシンであり、X a a 2 1 はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、X a a 1 6 はチロシンであり、X a a 2 5 はフェニルアラニンであり、X a a 2 7 はトレオニンであり、X a a 2 8 はプロリンである、  
請求項3に記載のインスリンアナログ。

【請求項14】

前記一般式(1)において、X a a 1 はグリシンであり、X a a 5 はグルタミンであり、X a a 1 2 はセリンであり、X a a 1 4 はチロシンであり、X a a 1 6 はロイシンであ

10

20

30

40

50

り、X a a 1 9 はチロシンであり、X a a 2 1 はアスパラギンであり、前記一般式 ( 2 ) において、X a a 1 6 はチロシンであり、X a a 2 5 はアスパラギン酸であり、X a a 2 7 はトレオニンであり、X a a 2 8 はプロリンである、  
請求項 3 に記載のインスリンアナログ。

【請求項 1 5】

前記一般式 ( 1 ) において、X a a 1 はグリシンであり、X a a 5 はグルタミンであり、X a a 1 2 はセリンであり、X a a 1 4 はチロシンであり、X a a 1 6 はロイシンであり、X a a 1 9 はチロシンであり、X a a 2 1 はアスパラギンであり、前記一般式 ( 2 ) において、X a a 1 6 はチロシンであり、X a a 2 5 はグルタミン酸であり、X a a 2 7 はトレオニンであり、X a a 2 8 はプロリンである、請求項 3 に記載のインスリンアナログ。

10

【請求項 1 6】

請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載のインスリンアナログをコードする分離された核酸。

【請求項 1 7】

請求項 1 6 に記載の核酸を含む、組換え発現ベクター。

【請求項 1 8】

請求項 1 7 に記載の組換え発現ベクターを含む、形質転換体。

【請求項 1 9】

前記形質転換体が大腸菌である、請求項 1 8 に記載の形質転換体。

20

【請求項 2 0】

下記段階を含む請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載のインスリンアナログを製造する方法：

- a ) 請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載のインスリンアナログをコードする核酸を含む形質転換体を培養して、インスリンアナログを発現させる段階；及び
- b ) 発現されたインスリンアナログを分離及び精製する段階。

【請求項 2 1】

前記分離及び精製が、

- b 1 ) 前記 a ) 段階の培養液から形質転換体を収穫して破碎する段階；
- b 2 ) 破碎された細胞溶解物から発現されたインスリンアナログを回収してリフォールディング ( refolding ) する段階；
- b 3 ) リフォールディングされたインスリンアナログを陽イオン交換クロマトグラフィーで精製する段階；
- b 4 ) 精製されたインスリンアナログをトリプシン及びカルボキシペプチダーゼ B で処理する段階；
- b 5 ) 処理されたインスリンアナログを陽イオン交換クロマトグラフィー及び陰イオン交換クロマトグラフィーまたは逆相クロマトグラフィーで順次精製する段階を含む、請求項 2 0 に記載の方法。

30

【請求項 2 2】

有効成分として請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載のインスリンアナログを含む、糖尿病治療用薬学的組成物。

40

【請求項 2 3】

有効成分として請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載のインスリンアナログを含む、組成物。

【請求項 2 4】

請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載のインスリンアナログまたはこれを含む組成物をこれを必要とする個体に投与する段階を含む、糖尿病を治療する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

50

本発明は新規なインスリンアナログ、その用途及び前記アナログを製造する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

生体内のタンパク質は血中のタンパク質分解酵素によって分解されたり、腎臓を介して排泄もしくは受容体により除去されるなど、いくつかの経路を経て除去されることが知られている。そこで、前記のようなタンパク質除去機序を回避して生理活性タンパク質の半減期を増加させて治療的効能を高めようとする様々な試みが行われている。

【0003】

一方、インスリンは、人体の膵臓から分泌される血糖調節ホルモンであって、血液内の余剰ブドウ糖を細胞に移して細胞にエネルギー源を供給する一方、血糖を正常なレベルに維持させてくれる役割をする。しかし、糖尿病患者の場合、これらのインスリンが不足したり、インスリン抵抗性及びベータ細胞の機能消失によりインスリンが正常な機能を行っていない。そのため、糖尿病患者は血液内のブドウ糖をエネルギー源として用いることなく血液中のブドウ糖のレベルが高い高血糖症状を示して、結局、尿に糖を排出するようになり、これはさまざまな合併症の原因となっている。したがって、インスリンの生成に異常があったり（Type I）、インスリン抵抗性による（Type II）糖尿病患者はインスリン治療が必要であり、インスリンを投与することによって血糖を正常レベルに調節することができる。

10

【0004】

しかし、インスリンの場合、他のタンパク質やペプチドホルモンのように生体内半減期が極めて短く、継続的な治療効果を示さず、効果を発揮するためには継続的に反復投与をしなければならないという欠点がある。このような頻繁な投与は、患者に多大な苦痛や不便さを引き起こすことになるので、患者の順応性、安全性及び利便性の面で改善が求められている。

20

【0005】

よって、インスリンのようなタンパク質薬物の生体内の半減期を増加させて投与回数を減らすことにより、患者の生活の質と治療的効果を高めるための様々なタンパク質の剤形化研究と化学的な結合体（例えば、脂肪酸結合体）などに対する研究が進められている。既存の報告によると、50%以上のインスリンは腎臓から除去され、残りのインスリンは

30

【0006】

これに関連して、非特許文献1～3などでインスリンのRMCを避けるためにインビトロ活性を弱めることにより、血中の濃度を増加させるなどのいくつかの報告があるが、非特許文献1及び2の場合、提示されたインスリンアナログは2つ以上のアミノ酸を置換したり、具体的な結果を提示しておらず、非特許文献3の場合、インスリンアナログは受容体結合力で変化がないことや、インスリン受容体に直接関与するアミノ酸を置換して活性が減少したことが報告された。

【0007】

本明細書では、インスリン受容体結合に直接的に関与しないアミノ酸を置換して、インスリン受容体の結合力を減少させるアナログを開発し、インスリン受容体との結合の減少を示すことを確認して、本発明を完成した。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】J Pharmacol Exp Ther (1998) 286: 959

【非特許文献2】Diabetes Care (1990) 13: 923

【非特許文献3】Diabetes (1990) 39: 1033

【非特許文献4】Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York, 1980; Uhlman

50

【非特許文献 5】Peyman, Chemical Reviews, 90: 543-584, 1990

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の一つの目的は、新規なインスリンアナログを提供することにある。

【0010】

本発明の他の目的は、前記インスリンアナログをコードする分離された核酸、それを含む組換え発現ベクター、及び前記発現ベクターを含む形質転換体を提供することにある。

【0011】

本発明のもう一つの目的は、前記インスリンアナログを製造する方法を提供することにある。

10

【0012】

本発明のもう一つの目的は、前記インスリンアナログを有効成分として含む組成物、例えば、薬学的組成物を提供することにある。

【0013】

本発明のもう一つの目的は、前記インスリンアナログを有効成分として含むインスリン関連疾患、例えば、糖尿病の治療用薬学的組成物を提供することにある。

【0014】

本発明のもう一つの目的は、前記インスリンアナログまたはこれを有効成分として含む薬学的組成物を、これを必要とする個体に投与する段階を含む、インスリン関連疾患、例えば、糖尿病を治療する方法を提供することにある。

20

【0015】

本発明のもう一つの目的は、薬剤の製造において、前記インスリンアナログの用途を提供することにある。

【0016】

本発明のもう一つの目的は、インスリン関連疾患、具体的に糖尿病の治療において、前記インスリンアナログの用途を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0017】

前記課題を解決するための本発明の一つの様態は、新規なインスリンアナログ、具体的には、天然型インスリン B 鎖の 16 番目のアミノ酸、B 鎖の 25 番目のアミノ酸、A 鎖の 14 番目のアミノ酸及び A 鎖の 19 番目のアミノ酸からなる群から選択された一つ以上のアミノ酸の変異を含む、インスリンアナログである。

30

【0018】

一つ具体例として、前記変異は、天然型インスリン B 鎖の 16 番目のアミノ酸であるチロシンのグルタミン酸、セリン、トレオニン、またはアスパラギン酸への変異；天然型インスリン B 鎖の 25 番目のアミノ酸であるフェニルアラニンのアスパラギン酸またはグルタミン酸への変異；天然型インスリン A 鎖の 14 番目のアミノ酸であるチロシンのヒスチジン、リジン、アラニン、またはアスパラギン酸への変異；または天然型インスリン A 鎖の 19 番目のアミノ酸であるチロシンのグルタミン酸、セリン、またはトレオニンへの変異であることを特徴とする。

40

【0019】

他の具体例として、前記インスリンアナログは、下記一般式(1)で表される配列番号：55のA鎖と下記一般式(2)で表される配列番号：56のB鎖のすべての組み合わせを含むインスリンアナログであって、天然型インスリンを除くもの、すなわちA鎖が配列番号：53と一致しながら、同時に、B鎖も配列番号：54と一致するペプチドを除くものである。

【0020】

一般式(1)

## 【化1】

X a a 1 - I l e - V a l - G l u - X a a 5 - C y s - C y s - T h r - S e  
 r - I l e - C y s - X a a 1 2 - L e u - X a a 1 4 - G l n - X a a 1 6 - G  
 l u - A s n - X a a 1 9 - C y s - X a a 2 1 (配列番号：55)

## 【0021】

前記一般式(1)において、

10

X a a 1 が、アラニン、グリシン、グルタミン、ヒスチジン、グルタミン酸またはアスパラギンであり、

X a a 5 が、アラニン、グルタミン酸、グルタミン、ヒスチジン、またはアスパラギンであり、

X a a 1 2 が、アラニン、セリン、グルタミン、グルタミン酸、ヒスチジン、またはアスパラギンであり、

X a a 1 4 が、チロシン、ヒスチジン、リジン、アラニン、またはアスパラギン酸であり、

X a a 1 6 が、アラニン、ロイシン、チロシン、ヒスチジン、グルタミン酸またはアスパラギンであり、

20

X a a 1 9 が、チロシン、グルタミン酸、セリン、またはトレオニンであり、

X a a 2 1 が、アスパラギン、グリシン、ヒスチジン、またはアラニンである。

## 【0022】

一般式(2)

## 【化2】

P h e - V a l - A s n - G l n - H i s - L e u - C y s - G l y - S e r -  
 H i s - L e u - V a l - G l u - A l a - L e u - X a a 1 6 - L e u - V a l  
 - C y s - G l y - G l u - A r g - G l y - P h e - X a a 2 5 - T y r - X a  
 a 2 7 - X a a 2 8 - L y s - T h r (配列番号：56)

30

## 【0023】

前記一般式(2)において、

X a a 1 6 が、チロシン、グルタミン酸、セリン、トレオニン、またはアスパラギン酸であり、

X a a 2 5 が、フェニルアラニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、

X a a 2 7 が、トレオニンであるか、不存在であり、

40

X a a 2 8 が、プロリン、グルタミン酸、またはアスパラギン酸であるか、不存在である。

## 【0024】

他の具体例として、前記インスリンアナログは、

前記一般式(1)で表される配列番号：55のA鎖と、配列番号：54のB鎖を含む、インスリンアナログであることを特徴とする。

## 【0025】

他の具体例として、前記インスリンアナログは、前記配列番号：53のA鎖と一般式(2)で表される配列番号：56のB鎖を含む、インスリンアナログであることを特徴とする。

50

## 【 0 0 2 6 】

他の具体例として、

前記一般式(1)において、X a a 1はグリシンであり、X a a 5はグルタミンであり、X a a 1 2はセリンであり、X a a 1 4はチロシン、ヒスチジン、リジン、アラニン、またはアスパラギン酸であり、X a a 1 6はロイシンであり、X a a 1 9はチロシン、グルタミン酸、セリン、またはトレオニンであり、X a a 2 1はアスパラギンであり、

前記一般式(2)において、X a a 1 6はチロシン、グルタミン酸、セリン、トレオニン、またはアスパラギン酸であり、X a a 2 5はフェニルアラニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、X a a 2 7はトレオニンであり、X a a 2 8はプロリンである、インスリンアナログであることを特徴とする。

10

## 【 0 0 2 7 】

他の具体例として、

前記一般式(1)において、

X a a 1はグリシンであり、X a a 5はグルタミンであり、X a a 1 2はセリンであり、X a a 1 4はチロシンであり、X a a 1 6はロイシンであり、X a a 1 9はチロシン、グルタミン酸、またはセリンであり、X a a 2 1はアスパラギンであり、

前記一般式(2)において、

X a a 1 6はチロシン、グルタミン酸、セリン、またはアスパラギン酸であり、X a a 2 5はフェニルアラニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、X a a 2 7はトレオニンであり、X a a 2 8はプロリンである、インスリンアナログであることを特徴とする。

20

## 【 0 0 2 8 】

他の具体例として、

前記インスリンアナログは、

(1)前記一般式(1)において、X a a 1はグリシンであり、X a a 5はグルタミンであり、X a a 1 2はセリンであり、X a a 1 4はヒスチジンであり、X a a 1 6はロイシンであり、X a a 1 9はチロシンであり、X a a 2 1はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、X a a 1 6はチロシンであり、X a a 2 5はフェニルアラニンであり、X a a 2 7はトレオニンであり、X a a 2 8はプロリンである、または；

(2)前記一般式(1)において、X a a 1はグリシンであり、X a a 5はグルタミンであり、X a a 1 2はセリンであり、X a a 1 4はリジンであり、X a a 1 6はロイシンであり、X a a 1 9はチロシンであり、X a a 2 1はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、X a a 1 6はチロシンであり、X a a 2 5はフェニルアラニンであり、X a a 2 7はトレオニンであり、X a a 2 8はプロリンである、または；

30

(3)前記一般式(1)において、X a a 1はグリシンであり、X a a 5はグルタミンであり、X a a 1 2はセリンであり、X a a 1 4はチロシンであり、X a a 1 6はロイシンであり、X a a 1 9はグルタミン酸であり、X a a 2 1はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、X a a 1 6はチロシンであり、X a a 2 5はフェニルアラニンであり、X a a 2 7はトレオニンであり、X a a 2 8はプロリンである、または；

(4)前記一般式(1)において、X a a 1はグリシンであり、X a a 5はグルタミンであり、X a a 1 2はセリンであり、X a a 1 4はチロシンであり、X a a 1 6はロイシンであり、X a a 1 9はセリンであり、X a a 2 1はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、X a a 1 6はチロシンであり、X a a 2 5はフェニルアラニンであり、X a a 2 7はトレオニンであり、X a a 2 8はプロリンである、または；

40

(5)前記一般式(1)において、X a a 1はグリシンであり、X a a 5はグルタミンであり、X a a 1 2はセリンであり、X a a 1 4はチロシンであり、X a a 1 6はロイシンであり、X a a 1 9はトレオニンであり、X a a 2 1はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、X a a 1 6はチロシンであり、X a a 2 5はフェニルアラニンであり、X a a 2 7はトレオニンであり、X a a 2 8はプロリンである、または；

(6)前記一般式(1)において、X a a 1はグリシンであり、X a a 5はグルタミン

50

であり、X a a 1 2 はセリンであり、X a a 1 4 はチロシンであり、X a a 1 6 はロイシンであり、X a a 1 9 はチロシンであり、X a a 2 1 はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、X a a 1 6 はグルタミン酸であり、X a a 2 5 はフェニルアラニンであり、X a a 2 7 はトレオニンであり、X a a 2 8 はプロリンである、または；

(7) 前記一般式(1)において、X a a 1 はグリシンであり、X a a 5 はグルタミンであり、X a a 1 2 はセリンであり、X a a 1 4 はチロシンであり、X a a 1 6 はロイシンであり、X a a 1 9 はチロシンであり、X a a 2 1 はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、X a a 1 6 はセリンであり、X a a 2 5 はフェニルアラニンであり、X a a 2 7 はトレオニンであり、X a a 2 8 はプロリンである、または；

(8) 前記一般式(1)において、X a a 1 はグリシンであり、X a a 5 はグルタミンであり、X a a 1 2 はセリンであり、X a a 1 4 はチロシンであり、X a a 1 6 はロイシンであり、X a a 1 9 はチロシンであり、X a a 2 1 はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、X a a 1 6 はトレオニンであり、X a a 2 5 はフェニルアラニンであり、X a a 2 7 はトレオニンであり、X a a 2 8 はプロリンである、または；

(9) 前記一般式(1)において、X a a 1 はグリシンであり、X a a 5 はグルタミンであり、X a a 1 2 はセリンであり、X a a 1 4 はアラニンであり、X a a 1 6 はロイシンであり、X a a 1 9 はチロシンであり、X a a 2 1 はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、X a a 1 6 はチロシンであり、X a a 2 5 はフェニルアラニンであり、X a a 2 7 はトレオニンであり、X a a 2 8 はプロリンである、または；

(10) 前記一般式(1)において、X a a 1 はグリシンであり、X a a 5 はグルタミンであり、X a a 1 2 はセリンであり、X a a 1 4 はアスパラギン酸であり、X a a 1 6 はロイシンであり、X a a 1 9 はチロシンであり、X a a 2 1 はアスパラギンであり、前記一般式(2)で、X a a 1 6 はチロシンであり、X a a 2 5 はフェニルアラニンであり、X a a 2 7 はトレオニンであり、X a a 2 8 はプロリンである、または；

(11) 前記一般式(1)において、X a a 1 はグリシンであり、X a a 5 はグルタミンであり、X a a 1 2 はセリンであり、X a a 1 4 はチロシンであり、X a a 1 6 はロイシンであり、X a a 1 9 はチロシンであり、X a a 2 1 はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、X a a 1 6 はアスパラギン酸であり、X a a 2 5 はフェニルアラニンであり、X a a 2 7 はトレオニンであり、X a a 2 8 はプロリンである、または；

(12) 前記一般式(1)において、X a a 1 はグリシンであり、X a a 5 はグルタミンであり、X a a 1 2 はセリンであり、X a a 1 4 はチロシンであり、X a a 1 6 はロイシンであり、X a a 1 9 はチロシンであり、X a a 2 1 はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、X a a 1 6 はチロシンであり、X a a 2 5 はアスパラギン酸であり、X a a 2 7 はトレオニンであり、X a a 2 8 はプロリンである、または；

(13) 前記一般式(1)において、X a a 1 はグリシンであり、X a a 5 はグルタミンであり、X a a 1 2 はセリンであり、X a a 1 4 はチロシンであり、X a a 1 6 はロイシンであり、X a a 1 9 はチロシンであり、X a a 2 1 はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、X a a 1 6 はチロシンであり、X a a 2 5 はグルタミン酸であり、X a a 2 7 はトレオニンであり、X a a 2 8 はプロリンである、インスリンアナログであることを特徴とする。

【0029】

他の具体例として、前記インスリンアナログは、配列番号：28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、及び52からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むインスリンアナログであることを特徴とする。

【0030】

本発明を具現するための他の様態は、前記インスリンアナログをコードする分離された核酸である。

【0031】

本発明を具現するための他の様態は、前記核酸を含む、組換え発現ベクターである。

【0032】

10

20

30

40

50

本発明を具現するための他の様態は、前記組換え発現ベクターを含む、形質転換体である。

【0033】

一つの実例として、前記形質転換体が大腸菌であることを特徴とする。

【0034】

本発明を具現するための他の様態は、下記段階を含む前記インスリンアナログを製造する方法である：

a) 前記インスリンアナログをコードする核酸を含む形質転換体を培養して、インスリンアナログを発現させる段階；及び

b) 発現されたインスリンアナログを分離及び精製する段階。

10

【0035】

一つの実例として、

前記分離及び精製が、

b 1) 前記 a) 段階の培養液から形質転換体を収穫して破碎する段階；

b 2) 破碎された細胞溶解物から発現されたインスリンアナログを回収してリフォーミングする段階；

b 3) リフォーミングされたインスリンアナログを、陽イオン交換クロマトグラフィーで精製する段階；

b 4) 精製されたインスリンアナログをトリプシン及びカルボキシペプチダーゼ B で処理する段階；

20

b 5) 処理されたインスリンアナログを陽イオン交換クロマトグラフィー及び陰イオン交換クロマトグラフィーまたは逆相クロマトグラフィーで順次精製する段階を含むことを特徴とする。

【0036】

本発明を具現するための他の様態は、有効成分として前記インスリンアナログを含む組成物、例えば、薬学的組成物である。

【0037】

本発明を具現するための他の様態は、有効成分として前記インスリンアナログを含むインスリン関連疾患、例えば、糖尿病の治療用薬学的組成物である。

【0038】

本発明を具現するための他の様態は、前記インスリンアナログまたはこれを有効成分として含む薬学的組成物を、これを必要とする個体に投与する段階を含む、インスリン関連疾患、例えば、糖尿病を治療する方法である。

30

【0039】

本発明を具現するための他の一つの様態は、薬剤の製造において、前記インスリンアナログの用途である。

【0040】

一つの様態として、前記薬剤はインスリン関連疾患の予防または治療用であることを特徴とする。

【0041】

他の様態としては、糖尿病の予防または治療用であることを特徴とする。

40

【0042】

本発明を具現するための他の一つの様態は、インスリン関連疾患、具体的に糖尿病の治療において、前記インスリンアナログの用途である。

【発明の効果】

【0043】

本発明の非天然型インスリンアナログは、インスリン投与を必要とする患者の利便性を増大させることができる。

【図面の簡単な説明】

【0044】

50

【図 1】インスリンアナログの純度をタンパク質電気泳動で分析した結果を示した。代表として、インスリンアナログである 9、10、11、12 番のアナログに対する結果である。1 番レーン：サイズマーカー、2 番レーン：天然型インスリン、3 番レーン：インスリンアナログ 9 番、4 番レーン：インスリンアナログ 10 番、5 番レーン：インスリンアナログ 11 番、6 番レーン：インスリンアナログ 12 番

【図 2 a】インスリンアナログの純度を高圧クロマトグラフィーで分析した結果である。代表として、インスリンアナログ 9、10、11、12 番のアナログに対する結果を示した。各図面で、上から順番に RP HPLC (C18)、RP HPLC (C4) 及び SE HPLC の結果を示す。

【図 2 b】インスリンアナログの純度を高圧クロマトグラフィーで分析した結果である。代表として、インスリンアナログ 9、10、11、12 番のアナログに対する結果を示した。各図面で、上から順番に RP HPLC (C18)、RP HPLC (C4) 及び SE HPLC の結果を示す。

【図 2 c】インスリンアナログの純度を高圧クロマトグラフィーで分析した結果である。代表として、インスリンアナログ 9、10、11、12 番のアナログに対する結果を示した。各図面で、上から順番に RP HPLC (C18)、RP HPLC (C4) 及び SE HPLC の結果を示す。

【図 2 d】インスリンアナログの純度を高圧クロマトグラフィーで分析した結果である。代表として、インスリンアナログ 9、10、11、12 番のアナログに対する結果を示した。各図面で、上から順番に RP HPLC (C18)、RP HPLC (C4) 及び SE HPLC の結果を示す。

【図 3】ヒトインスリンとインスリンアナログ 10 のグルコース吸収能を確認した実験結果を示す。

【図 4】ヒトインスリンとインスリンアナログ 10 の細胞の安定性を確認した実験結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0045】

以下では、本発明をさらに詳細に説明する。

【0046】

一方、本願で開示された各説明及び実施様態は、それぞれの他の説明及び実施様態にも適用されてもよい。つまり、本願で開示された様々な要素のすべての組み合わせが本発明の範疇に属する。また、下記記述される具体的な叙述によって、本発明の範疇が限定されることはない。

【0047】

また、当該技術分野の通常の知識を有する者は、通常の実験のみを使用して本出願に記載された本発明の特定の様態に対する多数の等価物を認知するか、確認することができる。さらに、これらの同等物は、本発明に含まれるものと意図される。

【0048】

本明細書全般を通じて、アミノ酸に対する通常の 1 文字及び 3 文字コードが用いられる。また、本明細書で略語で言及されたアミノ酸は、IUPAC IUB 命名法に基づいて記載された。

【0049】

本発明を具現するための一つの様態は、新規なインスリンアナログ、具体的には、天然型インスリン B 鎖の 16 番目のアミノ酸、B 鎖の 25 番目のアミノ酸、A 鎖の 14 番目のアミノ酸及び A 鎖の 19 番目のアミノ酸からなる群から選択された一つ以上のアミノ酸の変異を含むインスリンアナログを提供する。

【0050】

本発明において、用語、「インスリンアナログ (insulin analog)」とは、天然型インスリンとは異なる非天然型インスリンを意味する。前記インスリンアナログは、天然型ヒトインスリンとは異なる非天然型ヒトインスリンを含む。

10

20

30

40

50

## 【0051】

これらのインスリンアナログは、天然型インスリンの一部のアミノ酸を付加、欠失または置換の形態に変形させたアナログを含む。

## 【0052】

具体的には、本発明のインスリンアナログは、天然型インスリン配列と配列同一性を比較したとき、少なくとも60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、または95%以上の配列同一性を有するものであってもよい。また、本発明のインスリンアナログは、天然型インスリン配列と前記の配列同一性を有しながら、天然型インスリンに比べて受容体結合能力が低下されたものであってもよい。また、前記インスリンアナログは、天然型インスリンのようにグルコース吸収能を有するものであってもよい、または/あってもよく、生体内で血中グルコースを降下させる能力を保有してもよい。

10

## 【0053】

より具体的には、本発明のインスリンアナログは、天然型インスリンのインスリン受容体結合能力(100%)と比較して約99%またはそれ以下、約95%またはそれ以下、約90%またはそれ以下、約85%またはそれ以下、約80%またはそれ以下、約75%またはそれ以下、約70%またはそれ以下、約65%またはそれ以下、約60%またはそれ以下、約55%またはそれ以下、約50%またはそれ以下、約45%またはそれ以下、約40%またはそれ以下、約35%またはそれ以下、約30%またはそれ以下、約25%またはそれ以下、約20%またはそれ以下、約15%またはそれ以下、約10%またはそれ以下、約9%またはそれ以下、約8%またはそれ以下、約7%またはそれ以下、約6%またはそれ以下、約5%またはそれ以下、約4%またはそれ以下、約3%またはそれ以下、約2%またはそれ以下、約1%またはそれ以下、または約0.1%またはそれ以下のインスリン受容体の結合能力を示しうる(ただし、本発明のインスリンアナログは、インスリン受容体に対する結合能力が0%には該当しない)。

20

## 【0054】

インスリンアナログの受容体結合能力は、組換えヒトインスリン受容体を過発現する細胞膜でのインスリンアナログとヨウ素125が結合されたインスリン間の競争反応を利用するSPA(Scintillation Proximity Assay)法を用いて評価しうる。これらの方法は、また、インスリンアナログの受容体結合能力の評価に用いてもよい。前記方法の具体的な例として、実施例8で用いられた方法が用いられる。

30

## 【0055】

本発明において、用語、「約」は、 $\pm 0.5$ 、 $\pm 0.4$ 、 $\pm 0.3$ 、 $\pm 0.2$ 、 $\pm 0.1$ などをすべて含む範囲であり、約という用語の後に出てくる数値と同等または類似の範囲の数値をすべて含むが、これに制限されない。

## 【0056】

また、本発明のインスリンアナログは、天然型インスリンのようにグルコース吸収能を保有することができる。

## 【0057】

具体的には、本発明に係るインスリンアナログは、天然型インスリンのグルコース吸収能(100%)に比べ、約10%以上、約20%以上、約30%以上、約40%以上、約50%以上、約55%以上、約60%以上、約65%以上、約70%以上、約75%以上、約80%以上、約85%以上、約90%以上、約95%以上、約100%以上、約110%以上、約120%以上、約130%以上、約140%以上、約150%以上、約160%以上、約170%以上、約180%以上、約190%以上、または約200%以上のグルコース吸収能を有するものであってもよい。

40

## 【0058】

グルコース吸収能の測定は、当業界に公知された様々なグルコース吸収能の測定方法を用いて達成することができ、その例として、実施例9に記載されたグルコース吸収能の測定方法を介して測定することができる。しかし、これに制限されるものではない。

50

## 【0059】

具体的には、前記インスリンアナログは短鎖であるか、二重鎖（two polypeptide chains）の形態であってもよく、より好ましくは、二重鎖の形態であるが、特にこれに限定されない。

## 【0060】

前記二重鎖形態であるインスリンアナログは、天然型インスリンのA鎖に対応するポリペプチドと天然型インスリンのB鎖に対応するポリペプチド、2つのポリペプチドで構成されるものであってもよい。ここで、前記天然型インスリンのA鎖もしくはB鎖に対応するということは、前記の二重鎖のポリペプチドのいずれか一つの鎖を天然型インスリンのA鎖またはB鎖と配列同一性を比較したとき、少なくとも60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、または95%以上の配列同一性を有する場合を挙げることができ、特にこれに制限されず、二重鎖を構成する配列と天然型インスリンのA鎖もしくはB鎖の配列との比較を通じて、当業者が容易に把握することができる。

10

## 【0061】

天然型インスリンは、膵臓から分泌されるホルモンで、一般的に細胞内グルコースの吸収を促進し、脂肪の分解を抑制して体内の血糖を調節する役割をする。インスリンは血糖の調節機能がないプロインスリン（proinsulin）前駆体の形態でプロセッシングを経て、血糖の調節機能を有するインスリンになる。インスリンは、2つのポリペプチド鎖、すなわち、それぞれ21個及び30個のアミノ酸残基を含むA鎖及びB鎖から構成されており、これらは2つのジスルフィド橋で相互連結されている。天然型インスリンのA鎖及びB鎖は、それぞれに配列番号：53及び54で表されるアミノ酸配列を含む。

20

## 【0062】

A鎖：

G l y I l e V a l G l u G l n C y s C y s T h r S e r I l e  
C y s S e r L e u T y r G l n L e u G l u A s n T y r C y s  
A s n（配列番号：53）

B鎖：

P h e V a l A s n G l n H i s L e u C y s G l y S e r H i s  
L e u V a l G l u A l a L e u T y r L e u V a l C y s G l y  
G l u A r g G l y P h e P h e T y r T h r P r o L y s T h r

30

(配列番号：54)

## 【0063】

本発明の一実施形態によれば、本願に記述されたインスリンアナログは、天然型インスリンのように、生体内で血糖の調節機能を保有しながら、受容体結合能力が低下されたものであってもよい。より具体的には、前記インスリンアナログは、生体内での血中グルコースを降下させる能力を保有することができる。

## 【0064】

また、本発明の一実施形態において、前記インスリンアナログは低受容体媒介内在化（receptor-mediated internalization）または受容体媒介クリアランス（receptor-mediated clearance）を示すことができれば、特にその種類及びサイズに制限されなくてもよい。これにより、本発明のインスリンアナログは、天然型インスリンに比べて増加された血中半減期を示すことができる。

40

## 【0065】

本発明のインスリンアナログは、逆方向インスリン、天然型インスリンの誘導体、天然型インスリンの断片などを含む。このようなインスリンアナログは、遺伝子組換え法だけでなく、固相（solid phase）方法でも製造することができ、これに制限されるものではない。

## 【0066】

本発明において、用語、「天然型インスリンの誘導体」は、天然型インスリンに比べて

50

アミノ酸配列に1つ以上の違いがあるペプチド、天然型インスリン配列を改質(modification)を介して変形させたペプチド、天然型インスリンのように生体内血糖の調節機能を調節する天然型インスリンの模倣体を含む。このような天然型インスリンの誘導体は、生体内血糖の調節機能を有するものであってもよい。

【0067】

具体的には、天然型インスリンの誘導体は天然型インスリンの一部のアミノ酸が置換(substitution)、追加(addition)、削除(deletion)及び修飾(modification)のいずれかの方法またはこれらの方法の組み合わせを介して変形させることができる。

【0068】

具体的には、天然型インスリンのA鎖、B鎖と、それぞれ少なくとも80%以上のアミノ酸配列から相同性を示すものであってもよく/よい、または、インスリンのアミノ酸残基の一部のグループが、化学的に置換(例えば、アルファメチル化、アルファヒドロキシル化)、削除(例えば、脱アミノ化)または修飾(例えばN-メチル化)された形態であってよいが、これに制限されるものではない。

【0069】

誘導体の製造のためのいくつかの方法の組み合わせで、本発明に適用される天然型インスリンの誘導体を製造することができる。

【0070】

また、天然型インスリンの誘導体の製造のためのこれらの変形は、L型またはD型アミノ酸、及び/または非天然型アミノ酸を用いた変形;及び/または天然型配列を改質あるいは翻訳後の変形(例えば、メチル化、アシル化、ユビキチン化、分子内共有結合など)することにより、変形するものをすべて含む。

【0071】

また、天然型インスリンのアミノ及び/またはカルボキシ末端に1つまたはそれ以上のアミノ酸が追加されたものをすべて含む。

【0072】

前記置換または追加されたアミノ酸は、ヒトタンパク質で通常観察される20個のアミノ酸だけでなく、非定型または非自然発生アミノ酸を使用してもよい。非定型アミノ酸の商業源はSigma Aldrich、ChemPepとGenzyme pharmaceuticalsが含まれる。これらのアミノ酸が含まれているペプチドと定型的なペプチド配列は、商業化されたペプチド合成会社、例えば、米国のAmerican peptide companyやBachem、または韓国のAnygenを通じて合成及び購入できるが、特にこれに制限されない。

【0073】

本発明において、用語、「天然型インスリンもしくは天然型インスリンの誘導体の断片」は、天然型インスリンもしくは天然型インスリンの誘導体のアミノ末端もしくはカルボキシ末端に1つまたはそれ以上のアミノ酸が除去された形態をいう。このようなインスリン断片は、体内で血糖調節機能を保有しうる。

【0074】

また、本発明のインスリンアナログは、前記天然型インスリンの誘導体及び断片の製造に用いられたそれぞれの製造方法が、独立的に用いられたり、組み合わせられて用いられて製造されてもよい。

【0075】

具体的には、本発明に係るインスリンアナログは、前記のような天然型インスリンのA鎖及びB鎖で特定のアミノ酸残基の変形を含むもので、具体的には、天然型インスリンのA鎖の特定のアミノ酸残基が変形されて/したり、B鎖の特定のアミノ酸残基が変形されたものであってもよい。

【0076】

具体的には、前記インスリンアナログは、天然型インスリンB鎖の16番目のアミノ酸、B鎖の25番目のアミノ酸、A鎖の14番目のアミノ酸、及びA鎖の19番目のアミノ

10

20

30

40

50

酸からなる群から選択された1つまたはそれ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されたものであってもよく、具体的には、グルタミン酸、セリン、トレオニン、アスパラギン酸、ヒスチジン、リジン、またはアラニンに置換されたものであってもよいが、これに制限されるものではない。

【0077】

具体的には、前記記述されたアミノ酸のうち1以上、2以上、3以上、または4つが本来のアミノ酸以外のアミノ酸に置換されたものであってもよい。

【0078】

具体的には、前記変異は、インスリンB鎖の16番目のアミノ酸であるチロシンのグルタミン酸、セリン、トレオニン、またはアスパラギン酸への変異；インスリンB鎖の25番目のアミノ酸であるフェニルアラニンのアスパラギン酸またはグルタミン酸への変異；インスリンA鎖の14番目のアミノ酸であるチロシンのヒスチジン、リジン、アラニン、またはアスパラギン酸への変異；またはインスリンA鎖の19番目のアミノ酸であるチロシンのグルタミン酸、セリン、またはトレオニンへの変異であってもよい。

10

【0079】

したがって、前記インスリンアナログは、天然型インスリンB鎖の16番目のアミノ酸であるチロシンのグルタミン酸、セリン、トレオニン、またはアスパラギン酸への変異；及び/または天然型インスリンB鎖の25番目のアミノ酸であるフェニルアラニンのアスパラギン酸またはグルタミン酸への変異；及び/または天然型インスリンA鎖の14番目のアミノ酸であるチロシンのヒスチジン、リジン、アラニン、またはアスパラギン酸への変異；及び/または天然型インスリンA鎖の19番目のアミノ酸であるチロシンのグルタミン酸、セリン、またはトレオニンへの変異を含んでもよい。しかし、これに制限されるものではない。

20

【0080】

より具体的には、前記インスリンアナログは、下記一般式(1)で表される配列番号：55のA鎖と下記一般式(2)で表される配列番号：56のB鎖を含むインスリンアナログであってもよい。このようなインスリンアナログは、A鎖とB鎖の配列がジスルフィド結合で相互連結された形態であるか、プロインスリンの形態であってもよいが、これに制限されるものではない。

【0081】

一般式(1)

30

【化3】

X a a 1 - I l e - V a l - G l u - X a a 5 - C y s - C y s - T h r - S e  
r - I l e - C y s - X a a 1 2 - L e u - X a a 1 4 - G l n - X a a 1 6 - G  
l u - A s n - X a a 1 9 - C y s - X a a 2 1 (配列番号：55)

【0082】

前記一般式(1)において、

X a a 1 が、アラニン、グリシン、グルタミン、ヒスチジン、グルタミン酸またはアスパラギンであり、

X a a 5 が、アラニン、グルタミン酸、グルタミン、ヒスチジン、またはアスパラギンであり、

X a a 1 2 が、アラニン、セリン、グルタミン、グルタミン酸、ヒスチジン、またはアスパラギンであり、

X a a 1 4 が、チロシン、ヒスチジン、リジン、アラニン、またはアスパラギン酸であり、

X a a 1 6 が、アラニン、ロイシン、チロシン、ヒスチジン、グルタミン酸またはアス

40

50

パラギンであり、

X a a 1 9 が、チロシン、グルタミン酸、セリン、またはトレオニンであり、  
X a a 2 1 が、アスパラギン、グリシン、ヒスチジン、またはアラニンである。

【 0 0 8 3 】

一般式 ( 2 )

【 化 4 】

P h e - V a l - A s n - G l n - H i s - L e u - C y s - G l y - S e r -  
H i s - L e u - V a l - G l u - A l a - L e u - X a a 1 6 - L e u - V a l  
- C y s - G l y - G l u - A r g - G l y - P h e - X a a 2 5 - T y r - X a  
a 2 7 - X a a 2 8 - L y s - T h r (配列番号 : 5 6)

10

【 0 0 8 4 】

前記一般式 ( 2 ) において、

X a a 1 6 が、チロシン、グルタミン酸、セリン、トレオニン、またはアスパラギン酸  
であり、

X a a 2 5 が、フェニルアラニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、

20

X a a 2 7 が、トレオニンであるか、不存在であり、

X a a 2 8 が、プロリン、グルタミン酸、またはアスパラギン酸であるか、不存在であ  
る。

【 0 0 8 5 】

ここで、配列番号 : 5 3 の A 鎖及び配列番号 : 5 4 の B 鎖を含むペプチドは、除外され  
てもよい。

【 0 0 8 6 】

また、前記記述した特徴的なアミノ酸残基、特に A 鎖の 1 4 番目のアミノ酸、及び/ま  
たは 1 9 番目のアミノ酸及び/または B 鎖の 1 6 番目のアミノ酸及び/または 2 5 番目のアミ  
ノ酸に対する特徴的な変異 (すなわち、天然型インスリンに存在しないアミノ酸残基) を  
含みつつ、前記一般式 ( 1 ) の A 鎖及び一般式 ( 2 ) の B 鎖を含むインスリンアナログと  
7 0 % 以上、具体的には、8 0 % 以上、より具体的には、9 0 % 以上、より具体的には、  
9 5 % 以上の相同性を有し、天然型インスリンに比べて受容体結合能力が減少したペプチ  
ドも本発明の範疇に含まれる。

30

【 0 0 8 7 】

本発明において、用語、「相同性 (homology)」は、天然型 (wild type) タンパク質  
のアミノ酸配列またはそれをコードするポリヌクレオチド配列との類似度を示すためのも  
のであり、本発明のアミノ酸配列またはポリヌクレオチド配列と前記のようなパーセント  
以上の同一配列を有する配列を含む。このような相同性は 2 つの配列を肉眼で比較して決  
定してもよいが、比較対象となる配列を並べて相同性の程度を分析してくれる生物情報ア  
ルゴリズム (bioinformatic algorithm) を用いて決定してもよい。前記 2 つのアミノ酸  
配列間の相同性はパーセントで示すことができる。便利な自動化されたアルゴリズムは、  
W i s c o n s i n G e n e t i c s S o f t w a r e P a c k a g e (Genetics Co  
mputer Group, Madison, W, USA) の G A P、B E S T F I T、F A S T A と T F A S T  
A コンピュータソフトウェアモジュールで利用可能である。前記モジュールの自動化され  
た配列アルゴリズムは、N e e d l e m a n & W u n s c h と P e a r s o n & L i p m  
a n 及び S m i t h & W a t e r m a n 配列アルゴリズムを含む。他の有用な配列に対す  
るアルゴリズムと相同性の決定は、F A S T P、B L A S T、B L A S T 2、P S I B L  
A S T と C L U S T A L W を含むソフトウェアで自動化されている。

40

【 0 0 8 8 】

50

具体的な一つの様態において、前記インスリンアナログは、前記一般式(1)で表される配列番号：55のA鎖と、配列番号：54のB鎖を含むものであってよく、前記配列番号：53のA鎖と一般式(2)で表される配列番号：56のB鎖を含む、インスリンアナログであってもよいが、特にこれに制限されるものではない。

【0089】

より具体的には、前記一般式(1)において、Xaa1はグリシンであり、Xaa5はグルタミンであり、Xaa12はセリンであり、Xaa14はチロシン、ヒスチジン、リジン、アラニン、またはアスパラギン酸であり、Xaa16はロイシンであり、Xaa19はチロシン、グルタミン酸、セリン、またはトレオニンであり、Xaa21はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、Xaa16はチロシン、グルタミン酸、セリン、トレオニン、またはアスパラギン酸であり、Xaa25はフェニルアラニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、Xaa27はトレオニンであり、Xaa28はプロリンであるインスリンアナログであってもよいが、これに制限されるものではない。

10

【0090】

より具体的には、前記一般式(1)において、Xaa1はグリシンであり、Xaa5はグルタミンであり、Xaa12はセリンであり、Xaa14はチロシンであり、Xaa16はロイシンであり、Xaa19はチロシン、グルタミン酸、またはセリンであり、Xaa21はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、Xaa16はチロシン、グルタミン酸、セリン、またはアスパラギン酸であり、Xaa25はフェニルアラニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、Xaa27はトレオニンであり、Xaa28はプロリンであってもよいが、これに制限されるものではない。

20

【0091】

より具体的には、前記一般式(1)において、Xaa1はグリシンであり、Xaa5はグルタミンであり、Xaa12はセリンであり、Xaa14はチロシンまたはアスパラギン酸であり、Xaa16はロイシンであり、Xaa19はチロシン、グルタミン酸、セリン、またはトレオニンであり、Xaa21はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、Xaa16はチロシンであり、Xaa25はフェニルアラニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、Xaa27はトレオニンであり、Xaa28はプロリンであってもよいが、これに制限されるものではない。

30

【0092】

具体的な一実施様態によれば、本発明に係るインスリンアナログは、下記に該当してもよい：

(1) 前記一般式(1)において、Xaa1はグリシンであり、Xaa5はグルタミンであり、Xaa12はセリンであり、Xaa14はヒスチジンであり、Xaa16はロイシンであり、Xaa19はチロシンであり、Xaa21はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、Xaa16はチロシンであり、Xaa25はフェニルアラニンであり、Xaa27はトレオニンであり、Xaa28はプロリンである、または；

(2) 前記一般式(1)において、Xaa1はグリシンであり、Xaa5はグルタミンであり、Xaa12はセリンであり、Xaa14はリジンであり、Xaa16はロイシンであり、Xaa19はチロシンであり、Xaa21はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、Xaa16はチロシンであり、Xaa25はフェニルアラニンであり、Xaa27はトレオニンであり、Xaa28はプロリンである、または；

40

(3) 前記一般式(1)において、Xaa1はグリシンであり、Xaa5はグルタミンであり、Xaa12はセリンであり、Xaa14はチロシンであり、Xaa16はロイシンであり、Xaa19はグルタミン酸であり、Xaa21はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、Xaa16はチロシンであり、Xaa25はフェニルアラニンであり、Xaa27はトレオニンであり、Xaa28はプロリンである、または；

(4) 前記一般式(1)において、Xaa1はグリシンであり、Xaa5はグルタミンであり、Xaa12はセリンであり、Xaa14はチロシンであり、Xaa16はロイシンであり、Xaa19はセリンであり、Xaa21はアスパラギンであり、前記一般式(

50

2)において、X a a 1 6はチロシンであり、X a a 2 5はフェニルアラニンであり、X a a 2 7はトレオニンであり、X a a 2 8はプロリンである、または；

(5)前記一般式(1)において、X a a 1はグリシンであり、X a a 5はグルタミンであり、X a a 1 2はセリンであり、X a a 1 4はチロシンであり、X a a 1 6はロイシンであり、X a a 1 9はトレオニンであり、X a a 2 1はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、X a a 1 6はチロシンであり、X a a 2 5はフェニルアラニンであり、X a a 2 7はトレオニンであり、X a a 2 8はプロリンである、または；

(6)前記一般式(1)において、X a a 1はグリシンであり、X a a 5はグルタミンであり、X a a 1 2はセリンであり、X a a 1 4はチロシンであり、X a a 1 6はロイシンであり、X a a 1 9はチロシンであり、X a a 2 1はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、X a a 1 6はグルタミン酸であり、X a a 2 5はフェニルアラニンであり、X a a 2 7はトレオニンであり、X a a 2 8はプロリンである、または；

(7)前記一般式(1)において、X a a 1はグリシンであり、X a a 5はグルタミンであり、X a a 1 2はセリンであり、X a a 1 4はチロシンであり、X a a 1 6はロイシンであり、X a a 1 9はチロシンであり、X a a 2 1はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、X a a 1 6はセリンであり、X a a 2 5はフェニルアラニンであり、X a a 2 7はトレオニンであり、X a a 2 8はプロリンである、または；

(8)前記一般式(1)において、X a a 1はグリシンであり、X a a 5はグルタミンであり、X a a 1 2はセリンであり、X a a 1 4はチロシンであり、X a a 1 6はロイシンであり、X a a 1 9はチロシンであり、X a a 2 1はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、X a a 1 6はトレオニンであり、X a a 2 5はフェニルアラニンであり、X a a 2 7はトレオニンであり、X a a 2 8はプロリンである、または；

(9)前記一般式(1)において、X a a 1はグリシンであり、X a a 5はグルタミンであり、X a a 1 2はセリンであり、X a a 1 4はアラニンであり、X a a 1 6はロイシンであり、X a a 1 9はチロシンであり、X a a 2 1はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、X a a 1 6はチロシンであり、X a a 2 5はフェニルアラニンであり、X a a 2 7はトレオニンであり、X a a 2 8はプロリンである、または；

(10)前記一般式(1)において、X a a 1はグリシンであり、X a a 5はグルタミンであり、X a a 1 2はセリンであり、X a a 1 4はアスパラギン酸であり、X a a 1 6はロイシンであり、X a a 1 9はチロシンであり、X a a 2 1はアスパラギンであり、前記一般式(2)で、X a a 1 6はチロシンであり、X a a 2 5はフェニルアラニンであり、X a a 2 7はトレオニンであり、X a a 2 8はプロリンである、または；

(11)前記一般式(1)において、X a a 1はグリシンであり、X a a 5はグルタミンであり、X a a 1 2はセリンであり、X a a 1 4はチロシンであり、X a a 1 6はロイシンであり、X a a 1 9はチロシンであり、X a a 2 1はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、X a a 1 6はアスパラギン酸であり、X a a 2 5はフェニルアラニンであり、X a a 2 7はトレオニンであり、X a a 2 8はプロリンである、または；

(12)前記一般式(1)において、X a a 1はグリシンであり、X a a 5はグルタミンであり、X a a 1 2はセリンであり、X a a 1 4はチロシンであり、X a a 1 6はロイシンであり、X a a 1 9はチロシンであり、X a a 2 1はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、X a a 1 6はチロシンであり、X a a 2 5はアスパラギン酸であり、X a a 2 7はトレオニンであり、X a a 2 8はプロリンである、または；

(13)前記一般式(1)において、X a a 1はグリシンであり、X a a 5はグルタミンであり、X a a 1 2はセリンであり、X a a 1 4はチロシンであり、X a a 1 6はロイシンであり、X a a 1 9はチロシンであり、X a a 2 1はアスパラギンであり、前記一般式(2)において、X a a 1 6はチロシンであり、X a a 2 5はグルタミン酸であり、X a a 2 7はトレオニンであり、X a a 2 8はプロリンである、インスリンアナログ。

【0093】

また、具体的な一実施様態によれば、前記インスリンアナログは、配列番号：28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、及び52からなる

10

20

30

40

50

群から選択されたアミノ酸配列を含むインスリンアナログであってもよいが、これに制限されるものではない。

【0094】

本発明に係るインスリンアナログは、前記記述された特定の配列を含むペプチド、前記記述された特定配列で（必須で）構成されたペプチドであってもよいが、これに制限されるものではない。

【0095】

一方、本願で「特定の配列番号で構成される」ペプチドまたはインスリンアナログと記載されている場合でも、その配列番号のアミノ酸配列からなるペプチドまたはインスリンアナログと同一あるいは対応する活性を有する場合は、その配列番号のアミノ酸配列の前後の無意味な配列を追加または自然に発生しうる突然変異、あるいはそのサイレント突然変異（silent mutation）を除くものではなく、このような配列を追加、あるいは突然変異を有する場合でも、本願の範囲内に属することが自明である。

10

【0096】

一方、前記インスリンアナログは、ペプチドそれ自体、その塩（例えば、前記ペプチドの薬学的に許容可能な塩）、またはその溶媒和物の形態をすべてを含む。

【0097】

また、ペプチドまたはインスリンアナログは、薬学的に許容される任意の形態であってもよい。

【0098】

前記塩の種類は特に制限されない。ただし、個体、例えば哺乳類に安全かつ効果的な形態であることが望ましいが、特にこれに制限されるものではない。

20

【0099】

前記用語、「薬学的に許容される」は、医薬学的な判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、またはアレルギー反応などを引き起こすことなく、目的の用途に効果的に使用可能な物質を意味する。

【0100】

本発明において、用語、「薬学的に許容される塩」とは、薬学的に許容される無機酸、有機酸、または塩基から誘導された塩を含む。適切な酸の例としては、塩酸、臭素酸、硫酸、硝酸、過塩素酸、フマル酸、マレイン酸、リン酸、グリコール酸、乳酸、サリチル酸、コハク酸、トルエン p スルホン酸、酒石酸、酢酸、クエン酸、メタンスルホン酸、ギ酸、安息香酸、マロン酸、ナフタレン 2 スルホン酸、ベンゼンスルホン酸などを挙げることができる。適切な塩基から誘導された塩は、ナトリウム、カリウムなどのアルカリ金属、マグネシウムなどのアルカリ土金属、及びアンモニウムなどを含むことができる。

30

【0101】

また、本発明で使用される用語、「溶媒和物」は、本発明に係るペプチドまたはその塩が溶媒分子と複合体を形成したものをいう。

【0102】

本発明を具現するための他の様態は、前記インスリンアナログをコードする分離された核酸、前記核酸を含む組換え発現ベクター、及び前記組換え発現ベクターを含む、形質転換体を提供する。

40

【0103】

前記インスリンアナログについては、先に説明した通りである。

【0104】

本発明において、用語、「核酸」は、一本鎖または二本鎖の形態で存在するデオキシリボヌクレオチド（DNA）またはリボヌクレオチド（RNA）であり、ゲノムDNA、cDNA、及びこれから転写されたRNAを含む意味を有し、核酸分子において基本的な構成単位であるヌクレオチドは、自然のヌクレオチドだけでなく、糖または塩基部位が変形された類似体（analogue）も含む（非特許文献4及び5）。本発明の核酸は、標準的な分

50

子生物学技術を用いて分離または製造することができる。例えば、適切なプライマー配列を用いて天然型インスリンの遺伝子配列 (NM\_000207.2、NCBI) から P C R (ポリメラーゼ連鎖反応) を介して増幅することができ、自動化された D N A 合成器を用いる標準的な合成技術を用いて製造することができる。

【 0 1 0 5 】

本発明の核酸は、具体的には、配列番号： 2 7、2 9、3 1、3 3、3 5、3 7、3 9、4 1、4 3、4 5、4 7、4 9、及び 5 1 に記載されている塩基配列を含む。本発明は、一実施形態で配列番号： 2 7、2 9、3 1、3 3、3 5、3 7、3 9、4 1、4 3、4 5、4 7、4 9、及び 5 1 に記載されている塩基配列だけでなく、前記配列と 7 0 % 以上の同一性、具体的には、8 0 % 以上の同一性、より具体的には、9 0 % 以上の同一性、より具体的には、9 5 % 以上の同一性、最も具体的には、9 8 % 以上の同一性を示す配列であって、実質的に核酸がコードしたペプチドが生体内の血糖調節機能を保有しつつ、天然型インスリンに比べて受容体結合能力が低下したものをすべて含む。

10

【 0 1 0 6 】

本発明に係る組換えベクターは、典型的にはクローニングのためのベクターまたは発現のためのベクターとして構築することができ、原核細胞または真核細胞を宿主細胞にして構築することができる。

【 0 1 0 7 】

本発明において、用語、「ベクター」とは適当な宿主細胞で目的タンパク質を発現することができる組換えベクターであって、核酸挿入物が発現されるように動作可能に連結された必須的な調節要素を含む核酸構造物 (construct) を意味する。本発明は、インスリンアナログをコードする核酸を含む組換えベクターを製造することができるが、前記組換えベクターを宿主細胞に形質転換 (transformation) または形質感染 (transfection) させることで、本発明のインスリンアナログを取得することができる。

20

【 0 1 0 8 】

本発明でインスリンアナログをコードする核酸は、プロモーターに作動可能に連結されてもよい。

【 0 1 0 9 】

本発明において、用語、「作動可能に連結された (operatively linked)」は、核酸の発現調節配列 (例えば、プロモーター、シグナル配列、リボソーム結合部位、転写終結配列など) と他の核酸配列との機能的な結合を意味し、これにより前記調節配列は、前記他の核酸配列の転写及び/または解読を調節することになる。

30

【 0 1 1 0 】

本発明において、用語、「プロモーター」は、ポリメラーゼに対する結合部位を含み、プロモーターの下位遺伝子の m R N A への転写開始活性を有する、通常、コーディング領域の上位 (upstream) に位置する非解読の核酸配列、すなわち、ポリメラーゼが結合して遺伝子の転写を開始するようにする D N A 領域をいい、m R N A 転写開始部位の 5 ' 部位に位置することができる。

【 0 1 1 1 】

例えば、本発明のベクターが組換えベクターであり、原核細胞を宿主とする場合に、転写を進行させることができる強力なプロモーター (例えば、t a c プロモーター、l a c プロモーター、l a c U V 5 プロモーター、l p p プロモーター、p L プロモーター、p R プロモーター、r a c 5 プロモーター、amp プロモーター、r e c A プロモーター、S P 6 プロモーター、t r p プロモーター、及び T 7 プロモーターなど)、解読の開始のためのリボソーム結合部位及び転写/解読終結配列を含むことが一般的である。

40

【 0 1 1 2 】

また、本発明に用いられるベクターは、当業界でよく使用されているプラスミド (例えば、p S C 1 0 1、p G V 1 1 0 6、p A C Y C 1 7 7、C o l E 1、p K T 2 3 0、p M E 2 9 0、p B R 3 2 2、p U C 8 / 9、p U C 6、p B D 9、p H C 7 9、p I J 6 1、p L A F R 1、p H V 1 4、p G E X シリーズ、p E T シリーズ、p P I C Z シリ

50

ーズ、pUC19など)、ファージ(例えば、gt4・B、Charon、z1及びM13など)またはウイルス(例えば、SV40など)を操作して製作されてもよい。

#### 【0113】

一方、本発明のベクターが組換えベクターであり、真核細胞を宿主とする場合に、哺乳動物細胞のゲノムから由来したプロモーター(例えば、メタロチオネインプロモーター)または哺乳動物ウイルス由来のプロモーター(例えば、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター、SV40プロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター及びHSVのtkプロモーター)が用いられてもよく、転写終結配列としてポリアデニル化配列(例えば、小成長ホルモントミネーター及びSV40由来のポリアデニル化配列)を一般的に有する。

10

#### 【0114】

また、本発明の組換えベクターは、選択マーカーとして当業界で通常的に利用されている抗生剤耐性遺伝子を含み、例えば、アンピシリン、ゲンタマイシン、カルベニシリン、クロラムフェニコール、ストレプトマイシン、カナマイシン、ジェネティシン、ネオマイシン及びテトラサイクリンに対する耐性遺伝子が用いられてもよい。

#### 【0115】

本発明の組換えベクターは、回収される目的タンパク質、すなわち、短鎖インスリンアナログ、プロインスリンまたはインスリンアナログの精製を容易にするために、必要に応じて他の配列をさらに含んでもよい。前記さらに含まれる配列は、タンパク質精製のためのタグ配列であってもよく、例えば、グルタチオンSトランスフェラーゼ(Pharmacia、USA)、マルトース結合タンパク質(NEB、USA)、FLAG(ABI、USA)及び6つのヒスチジン(hexahistidine)などがあるが、前記例によって目的タンパク質の精製のために必要な配列の種類が制限されるものではない。

20

#### 【0116】

前記のようなタグ配列を含む組換えベクターによって発現された融合タンパク質は、アフィニティー・クロマトグラフィーによって精製されてもよい。例えば、グルタチオンSトランスフェラーゼが融合した場合には、この酵素の基質であるグルタチオンを用いることができ、6つのヒスチジンタグが用いられた場合には、Ni-NTAカラムを用いて、必要な目的タンパク質を容易に回収することができる。

30

#### 【0117】

本発明において、用語、「形質転換(transformation)」とは、DNAを宿主細胞内に導入してDNAが染色体の因子として、または染色体統合完成によって複製可能になることで、外部のDNAを細胞内に導入して人為的に遺伝的な変異を起こす現象を意味する。本発明の形質転換方法は、任意の形質転換方法が使用されてもよく、当業界の通常の方法によって容易に行うことができる。一般的に、形質転換の方法は、CaCl<sub>2</sub>沈殿法、CaCl<sub>2</sub>沈殿法にDMSO(dimethyl sulfoxide)と呼ばれる還元物質を使用することにより効率を高めたHanahan方法、電気穿孔法(electroporation)、リン酸カルシウム沈殿法、原形質融合法、シリコンカーバイド繊維を用いた攪拌法、アグロバクテリア媒介形質転換法、PEGを用いた形質転換法、デキストラン硫酸、リポフェクタミン及び乾燥/抑制媒介された形質転換法などがある。

40

#### 【0118】

本発明に係るインスリンアナログをコードする核酸を含む組換えベクターを形質転換させるための方法は前記例に限定されず、当業界で一般的に使用される形質転換または形質感染方法が制限なく使用されてもよい。

#### 【0119】

目的核酸であるインスリンアナログをコードする核酸を含む組換えベクターを宿主細胞内に導入することにより、本発明の形質転換体(transformant)を獲得することができる。

#### 【0120】

50

本発明に適した宿主は、本発明の核酸を発現するようにする限り、特に制限されない。本発明に用いられる宿主の特定の例としては、大腸菌 (*E. coli*) のようなエシェリキア (*Escherichia*) 属細菌；バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) のようなバチルス (*Bacillus*) 属細菌；シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) のようなシュードモナス (*Pseudomonas*) 属細菌；ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)、サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) のような酵母；スポドプテラ・フルギベルダ (S F 9) のような昆虫細胞；及び CHO、COS、BSC などの動物細胞がある。具体的には、宿主細胞に大腸菌を用いてもよいが、これに制限されない。

【0121】

本発明を具現するための他の様態は、前記形質転換体を用いてインスリンアナログを製造する方法を提供する。

【0122】

具体的には、下記段階を含む前記インスリンアナログを製造する方法を提供する：

a) 前記インスリンアナログをコードする核酸を含む形質転換体を培養してインスリンアナログを発現させる段階；及び

b) 発現されたインスリンアナログを分離及び精製する段階。

【0123】

本発明で形質転換体の培養に用いられる培地は、適切な方法で宿主細胞培養の要件を満たす必要がある。宿主細胞の生長のために培地中に含まれる炭素源は、製造された形質転換体の種類に応じて当業者の判断により適宜選択することができ、培養時期及び量を調節するために適当な培養条件を採用することができる。

【0124】

用いられる糖源としては、グルコース、サッカロース、ラクトース、フルクトース、マルトース、デンプン、セルロースなどの糖及び炭水化物、大豆油、ひまわり油、ヒマシ油、ココナツ油などの油及び脂肪、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸のような脂肪酸、グリセロール、エタノールなどのアルコール、酢酸などの有機酸が含まれる。これらの物質は、個別的に、または混合物として用いられてもよい。

【0125】

用いられる窒素源としては、ペプトン、酵母抽出物、肉汁、麦芽抽出物、トウモロコシ浸漬液、大豆、小麦、及び尿素または無機化合物、例えば硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、炭酸アンモニウム及び硝酸アンモニウムが含まれる。窒素源も、個別的に、または混合物として用いられてもよい。

【0126】

用いられるリン源としては、リン酸二水素カリウムまたはリン酸水素二カリウムまたは相応するナトリウム含有塩が含まれる。また、培養培地は成長に必要な硫酸マグネシウムまたは硫酸鉄のような金属塩を含有してもよい。

【0127】

最後に、前記物質に加えて、アミノ酸及びビタミンのような必須成長物質が用いられてもよい。また、培養培地に適切な前駆体が用いられてもよい。前記された原料は、培養中に培養物に適切な方法によって回分式または連続式で添加されてもよい。水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニアのような塩基性化合物またはリン酸または硫酸のような酸化合物を適切な方法で用いて培養物の pH を調節してもよい。また、脂肪酸ポリグリコールエステルのような消泡剤を用いて気泡生成を抑制してもよい。好気状態を維持するために培養物内の酸素または酸素含有ガス（例えば、空気）を注入する。

【0128】

本発明に係る形質転換体の培養は、通常 20 ~ 45、具体的には、25 ~ 40 の温度で行われる。また、培養は、所望のインスリンアナログの生成量が最大に得られるまで継続されるが、このような目的のために培養は、通常、10 ~ 160 時間持続してもよい。

10

20

30

40

50

## 【0129】

前述したように、宿主細胞に応じて適切な培養条件を造成することによって、本発明に係る形質転換体はインスリンアナログを生産するようになり、ベクターの構成及び宿主細胞の特徴に基づいて生産されたインスリンアナログは、宿主細胞の細胞質内、原形質膜空間 (periplasmic space) または細胞外に分泌される。

## 【0130】

宿主細胞内または外に発現されたタンパク質は、通常の方法で精製することができる。精製方法の例としては、塩析 (例えば、硫酸アンモニウム沈殿、リン酸ナトリウム沈殿など)、溶媒沈殿 (例えば、アセトン、エタノールなどを用いたタンパク質画分沈殿など)、透析、ゲルろ過、イオン交換、逆相カラムクロマトグラフィーのようなクロマトグラフィー及び限ろ過などの手法を単独または組み合わせて適用することができる。

10

## 【0131】

本発明の具体例では、形質転換体から封入体形態で発現されたインスリンアナログを分離及び精製するために、下記段階をさらに含んでもよい：

b 1) 前記 a) 段階の培養液から形質転換体を収穫して破碎する段階；

b 2) 破碎された細胞溶解物から発現されたインスリンアナログを回収してリフォールディングする段階；

b 3) リフォールディングされたインスリンアナログを、陽イオン交換クロマトグラフィーで精製する段階；

b 4) 精製されたインスリンアナログをトリプシンとカルボペプチダーゼ B で処理する段階；

b 5) 処理されたインスリンアナログを陽イオン交換クロマトグラフィー及び陰イオン交換クロマトグラフィーまたは逆相クロマトグラフィーで順次精製する段階。

20

## 【0132】

本発明を具現するための他の様態は、有効成分として前記インスリンアナログを含む組成物、例えば、薬学的組成物を提供する。

## 【0133】

前記薬学的組成物は、インスリン関連疾患、例えば、糖尿病の治療用薬学的組成物であってもよい。

## 【0134】

前記インスリンアナログについては、先に説明した通りである。

30

## 【0135】

本発明において、用語、「インスリン関連疾患」は、インスリンの生理活性がないか、または低いために発生するか進行する疾患であって、例えば、糖尿病が挙げられるが、特にこれに制限されない。

## 【0136】

本発明に係るインスリンアナログを含む薬学的組成物は、薬学的に許容可能な担体を含んでもよい。

## 【0137】

本発明において、用語、「薬学的に許容可能な」とは、治療効果を示すことができるほどの十分な量と副作用を起こさないことを意味し、疾患の種類、患者の年齢、体重、健康、性別、患者の薬物に対する敏感度、投与経路、投与方法、投与回数、治療期間、配合または同時使用される薬物など医学分野でよく知られている要素に応じて、当業者によって容易に決定することができる。

40

## 【0138】

薬学的に許容される担体は、経口投与時には結合剤、滑沢剤、崩壊剤、賦形剤、可溶化剤、分散剤、安定化剤、懸濁化剤、色素、及び香料などを使用することができ、注射剤の場合には、緩衝剤、保存剤、無痛化剤、可溶化剤、等張化剤及び安定化剤などを混合して使用することができ、局所投与用の場合には、基剤、賦形剤、潤滑剤、及び保存剤などを使用することができる。本発明の薬学的組成物の剤形は、上述したような薬学的に許容さ

50

れる担体と混合して多様に製造することができる。例えば、経口投与の際には、錠剤、トローチ、カプセル、エリキシル、サスペンション、シロップ及びウエハーなどの形態で製造することができる。注射剤の場合には、単位投薬アンプルまたは多数回投薬形態で製造することができる。その他にも溶液、懸濁液、錠剤、丸薬、カプセル及び徐放性製剤などで剤形化することができる。

【0139】

一方、剤形化に適合した担体、賦形剤及び希釈剤の例としては、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、キシリトール、エリスリトール、マルチトール、澱粉、アカシア、アルギン酸、ゼラチン、リン酸カルシウム、ケイ酸カルシウム、セルロース、メチルセルロース、微晶質セルロース、ポリビニルピロリドン、水、メチルヒドロキシベンゾエート、プロピルヒドロキシベンゾエート、タルク、ステアリン酸マグネシウムまたは鉱物油などが使用されることができる。また、充填剤、抗凝集剤、潤滑剤、湿潤剤、香料、乳化剤、及び防腐剤などをさらに含むことができる。

10

【0140】

また、本出願のインスリンアナログは、本出願の組成物の総重量に対して0.001重量%~10重量%で含まれてもよいが、特にこれに制限されるものではない。

【0141】

本発明を具現するための他の様態は、前記インスリンアナログまたはこれを有効成分として含む薬学的組成物を、これを必要とする個体に投与する段階を含む、インスリン関連疾患、例えば、糖尿病を治療する方法を提供する。

20

【0142】

前記インスリンアナログ及び薬学的組成物については、先に説明した通りである。

【0143】

本発明で、「投与」は、任意の適切な方法で患者に所定の物質を導入することを意味し、前記アナログの投与経路は、薬物が目的の組織に到達することができる限り、いかなる一般的な経路を通じて投与されてもよい。腹腔内投与、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、皮内投与、経口投与、局所投与、鼻内投与、肺内投与、及び直腸内投与などが挙げられるが、これらに制限されない。しかし、経口投与時のペプチドは消化されるので、経口用組成物は、活性薬剤をコーティングしたり、胃での分解から保護されるように剤形化することが望ましい。好ましくは注射剤の形態で投与してもよい。また、薬学的組成物は、有効成分が標的細胞に移動することができる任意の装置によって投与してもよい。

30

【0144】

また、本発明の薬学的組成物は、治療する疾患、投与経路、患者の年齢、性別、体重、及び疾患の重症度などのいくつかの関連因子と一緒に、有効成分である薬物の種類に応じて決定される。本発明の薬学的組成物は、生体内の持続性が優れているので、本発明の薬学的組成物の投与回数及び頻度を著しく減少させることができる。

【0145】

本発明の組成物の総有効量は、単一投与量(single dose)で患者に投与されてもよく、複数の投与量(multiple dose)で長期間投与される分割治療方法(fractionated treatment protocol)によって投与されてもよい。本発明の薬学的組成物は、疾患の程度に応じて有効成分の含量を異にすることができる。具体的には、本発明のインスリンアナログの好ましい全体容量は、一日に患者の体重1kg当たり約0.0001mg~500mgであってよい。

40

【0146】

しかし、前記インスリンアナログの容量は、薬学的組成物の投与経路及び治療回数だけでなく、患者の年齢、体重、健康状態、性別、疾患の重症度、食物や排泄率など、さまざまな要因を考慮して、患者の有効投与量が決定されるので、このような点を考慮すると、当分野の通常の知識を有する者であれば、前記本発明の組成物の特定の用途に応じた適切な有効投与量を決定することができる。本発明に係る薬学的組成物は、本発明の効果を示す限り、その剤形、投与経路及び投与方法に特に制限されない。

50

## 【0147】

本発明を具現するための他の一つの様態は、薬剤の製造において、前記インスリンアナログの用途である。

## 【0148】

一つの様態として、前記薬剤は、インスリン関連疾患の予防または治療用であるが、特にこれに制限されない。

## 【0149】

他の様態として、糖尿病の予防または治療用であるが、特にこれに制限されない。

## 【0150】

本発明を具現するための他の一つの様態は、インスリン関連疾患、具体的には、糖尿病の治療において、前記インスリンアナログの用途である。

10

## 【0151】

前記インスリンアナログ、インスリン関連疾患については、先に説明した通りである。

## 【0152】

以下、下記実施例により本発明をより詳細に説明する。但し、下記実施例は、本発明を例示するためのもので、本発明の範囲がこれに限定されるものではない。

## 【0153】

実施例1：短鎖インスリンアナログ発現ベクターの製作

保有している天然型インスリン発現ベクターを鋳型とし、A鎖またはB鎖のアミノ酸を一つずつ変形させたインスリンアナログを製作するために順方向及び逆方向オリゴヌクレオチドを合成した後(表2)、PCRを行い、それぞれのアナログ遺伝子を増幅した。

20

## 【0154】

下記表1に、それぞれのA鎖またはB鎖のアミノ酸の変化配列及びアナログ名を示した。つまり、アナログ1の場合は、A鎖の14番チロシン(Y)がヒスチジン(H)に置換、アナログ6の場合、B鎖の16番チロシンがグルタミン酸(E)に置換された形態である。

## 【0155】

【表 1】

表 1

インスリンアナログの番号	変化配列
アナログ 1	A <sup>14</sup> Y → H
アナログ 2	A <sup>14</sup> Y → K
アナログ 3	A <sup>19</sup> Y → E
アナログ 4	A <sup>19</sup> Y → S
アナログ 5	A <sup>19</sup> Y → T
アナログ 6	B <sup>16</sup> Y → E
アナログ 7	B <sup>16</sup> Y → S
アナログ 8	B <sup>16</sup> Y → T
アナログ 9	A <sup>14</sup> Y → A
アナログ 10	A <sup>14</sup> Y → D
アナログ 11	B <sup>16</sup> Y → D
アナログ 12	B <sup>25</sup> F → D
アナログ 13	B <sup>25</sup> F → E

10

20

30

【 0 1 5 6 】

インスリンアナログ増幅のためのプライマーは、表 2 に示した。

【 0 1 5 7 】

【表 2】

表 2

アナログ	配列	配列番号
アナログ 1	5' CAGCATCTGCTCCCTCCATCAGC TGGAGAACTAC 3'	配列番号 1
	5' GTAGTTCTCCAGCTGATGGAGGG AGCAGATGCTG 3'	配列番号 2
アナログ 2	5' CAGCATCTGCTCCCTCAAGCAGC TGGAGAACTAC 3'	配列番号 3
	5' GTAGTTCTCCAGCTGCTTGAGGG AGCAGATGCTG 3'	配列番号 4
アナログ 3	5' CTACCAGCTGGAGAACGAGTGCA ACTGAGGATCC 3'	配列番号 5
	5' GGATCCTCAGTTGCACTCGTTCT CCAGCTGGTAG 3'	配列番号 6
アナログ 4	5' CTACCAGCTGGAGAACTCCTGCA ACTGAGGATCC 3'	配列番号 7
	5' GGATCCTCAGTTGCAGGAGTTCT CCAGCTGGTAG 3'	配列番号 8
アナログ 5	5' CTACCAGCTGGAGAACACCTGCA ACTGAGGATCC 3'	配列番号 9
	5' GGATCCTCAGTTGCAGGTGTTCT CCAGCTGGTAG 3'	配列番号 10
アナログ 6	5' CTGGTGGAAGCTCTCGAGCTAGT GTGCGGGGAAC 3'	配列番号 11
	5' GTTCCCCGCACACTAGCTCGAGA GCTTCCACCAG 3'	配列番号 12
アナログ 7	5' CTGGTGGAAGCTCTCTCCCTAGT GTGCGGGGAAC 3'	配列番号 13
	5' GTTCCCCGCACACTAGGGAGAGA GCTTCCACCAG 3'	配列番号 14

10

20

30

40

【 0 1 5 8 】

【表 3】

アナログ 8	5' CTGGTGGGAAGCTCTCACCCCTAGT GTGCGGGGAAC3'	配列番号 1 5	
	5' GTTCCCCGCACACTAGGGTGAGA GCTTCCACCAG3'	配列番号 1 6	
アナログ 9	5' CAGCATCTGCTCCCTCGCCCAGC TGGAGAACTAC3'	配列番号 1 7	10
	5' GTAGTTCTCCAGCTGGGCGAGGG AGCAGATGCTG3'	配列番号 1 8	
アナログ 10	5' CAGCATCTGCTCCCTCGACCAGC TGGAGAACTAC3'	配列番号 1 9	
	5' GTAGTTCTCCAGCTGGTTCGAGGG AGCAGATGCTG3'	配列番号 2 0	
アナログ 11	5' CTGGTGGGAAGCTCTCGACCTAGT GTGCGGGGAAC3'	配列番号 2 1	20
	5' GTTCCCCGCACACTAGGTCGAGA GCTTCCACCAG3'	配列番号 2 2	
アナログ 12	5' GGGGAACGAGGGCTTCGACTACAC ACCCAAGACC3'	配列番号 2 3	
	5' GGTCTTGGGTGTGTAGTCGAAGC CTCGTTCCCC3'	配列番号 2 4	
アナログ 13	5' GGGGAACGAGGGCTTCGAGTACAC ACCCAAGACC3'	配列番号 2 5	30
	5' GGTCTTGGGTGTGTACTCGAAGC CTCGTTCCCC3'	配列番号 2 6	

## 【0159】

インスリンアナログ増幅のためのPCR条件は、95℃で30秒、55℃で30秒、68℃で6分であり、このプロセスを18回繰り返した。このような条件で得られたインスリンアナログ断片は、細胞内の封入体形態で発現させるためにpET22bベクターに挿入されており、このように得られた発現ベクターをpET22bインスリンアナログ1~13と命名した。前記発現ベクターは、T7プロモーターの調節下にインスリンアナログ1~13のアミノ酸配列をコードする核酸を含む。前記発現ベクターを含む宿主内でのインスリンアナログのタンパク質を封入体形態で発現させた。

## 【0160】

表3に、それぞれのインスリンアナログ1~13のDNA配列及びタンパク質配列を示した。

## 【0161】

それぞれの配列変更確認はDNA配列分析を通じて確認し、その結果、それぞれのイン

10

20

30

40

50

スリンアナログが目的とするところにより、配列が変更されたことが確認できた。

【0162】

【表4】

表3

アナログ	配列		配列番号	
アナログ 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 GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC CAT CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	配列 番号 27	10
	タンパク質	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 His Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	配列 番号 28	20
アナログ 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	配列 番号 29	30
				40

【0163】

【表5】

		GCCCTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC AAG CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC		
	タンパク質	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 Lys Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	配列 番号 30	10          20
アナログ 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 GCCCTG 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 GAG TGC AAC	配列 番号 31	30
	タンパク質	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	配列 番号 32	40

【表 6】

		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 Glu Cys Asn		
アナログ 4	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 GCCCTG 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 TCC TGC AAC	配列 番号 33	10
	タンパク質	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 Ser Cys Asn	配列 番号 34	30
アナログ 5	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	配列 番号 35	40

【表 7】

		GCCCTG 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 ACC TGC AAC		
	タンパク質	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 Thr Cys Asn	配列 番号 36	10          20
アナログ 6	DNA	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC GAG 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 GCCCTG 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	配列 番号 37	30
	タンパク質	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu 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	配列 番号 38	40

【表 8】

		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		
アナログ 7	DNA	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TCC 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 GCCCTG 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	配列 番号 39	10
	タンパク質	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Ser 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	配列 番号 40	30
アナログ 8	DNA	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC ACC 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	配列 番号 41	40

【表 9】

		GCCCTG 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		
	タンパク質	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Thr 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	配列 番号 4 2	10          20
アナログ 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 GCCCTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC GCCCAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	配列 番号 4 3	30
	タンパク質	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	配列 番号 4 4	40

【表 10】

		Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Ala Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn		
アナログ 10	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 GCCCTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC GAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	配列 番号 45	10
	タンパク質	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 Asp Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	配列 番号 46	30
アナログ 11	DNA	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC GAC 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	配列 番号 47	40

【表 11】

		GCCCTG 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		
	タンパク質	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Asp 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	配列 番号 48	10          20
アナログ 12	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 GAC 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 GCCCTG 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	配列 番号 49	30
	タンパク質	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Asp 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	配列 番号 50	40

【表 1 2】

		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	
アナログ 13	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 GAG 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 GCCCTG 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	配列 番号 51
	タンパク質	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Glu 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	配列 番号 52

10

20

30

## 【0171】

実施例 2：組換えインスリンアナログの融合ペプチドの発現

40

T7プロモーター調節下の組換えインスリンアナログの発現を行った。それぞれの組換えインスリンアナログの発現ベクターとしてE.coli BL21 DE3 (E. coli B F-dcm ompT hsdS(rB-mB-) gal DE3); Novagen) を形質転換した。形質転換の方法は、Novagen社で推薦する方法に従った。各組換え発現ベクターが形質転換された個々の単一コロニーをとり、アンピシリン(50 μg/ml)が含まれた2Xルリアブロス(Luria Broth, LB)培地に接種し、37℃で15時間培養した。組換え菌株の培養液と30%グリセロールを含む2X LB培地を1:1(v/v)の割合で混合して、各1mlずつクライオチューブに分注して-140℃に保管した。これを組換え融合タンパク質の生産のための細胞ストック(cell stock)として使用した。

## 【0172】

50

遺伝子組換えインスリンアナログの発現のためには、各細胞ストック1バイアルを溶かし、500 mlの2Xルリアブロスに接種し、37℃で14～16時間振とう培養した。OD600の値が5.0以上を示すと培養を終了し、これを種培養液として使用した。50L発酵器(MSJ U2、B.E.MARUBISHI、日本)を用いて、種培養液を17Lの発酵培地に接種し、初期バス(bath)発酵を開始した。培養条件は、温度37℃、空気量20L/分(1vvm)、攪拌速度500rpm及び30%アンモニア水を使用してpH6.70に維持した。発酵の進行は、培養液内の栄養素が制限されたとき、追加の培地(feeding solution)を添加して流加培養を行った。菌株の成長は、OD値によってモニタリングし、OD値が1.00以上で最終濃度500μMのIPTGで導入した。培養は導入後、約23～25時間までさらに進行し、培養終了後に遠心分離器を用いて組換え菌株を取得して使用時まで-80℃で保管した。

10

## 【0173】

実施例3：組換えインスリンアナログの回収及びリフォールディング(refolding)

前記実施例2で発現させた組換えインスリンアナログを可溶性の形態に変えるために細胞を破碎してリフォールディングした。細胞ペレット100g(wet weight)を1Lの溶解緩衝液(50mM Tris HCl(pH9.0)、1mM EDTA(pH8.0)、0.2M NaClと0.5%トリトンX100)に再浮遊した。微細溶液化プロセスMicrowellizer(Microfluidic Corp. Model M110EH30)を使用して、15,000psiの圧力で実行して細胞を破碎した。破碎された細胞溶解物を7,000rpmで4～8分で20分間遠心分離して上澄液を捨て、3Lの洗浄緩衝液(0.5%トリトンX100と50mM Tris HCl(pH8.0)、0.2M NaCl、1mM EDTA)に再浮遊した。7,000rpmで4～8分で20分間遠心分離してペレットを蒸留水に再浮遊した後、同様の方法で遠心分離した。ペレットをとり、緩衝液(1MLグリシン、3.78g/LシステインHCl、pH10.6)に再浮遊して、常温で1時間攪拌した。再浮遊された遺伝子組換えインスリンアナログの回収のために8Mウレアを追加した後、3～5時間攪拌した。可溶化された組換えプロインスリンアナログのリフォールディング(refolding)のために7,000rpmで4～8分で30分間遠心分離した後、上澄液を取った後、還元剤(15mM LシステインHCl)を1時間処理し、ここに一定の倍数の蒸留水を蠕動ポンプ(peristaltic pump)を用いて入れながら4～8分で12時間以上攪拌した。

20

30

## 【0174】

実施例4：陽イオン交換クロマトグラフィー精製

45%エタノールを含む20mMクエン酸ナトリウム(pH2.0)緩衝液で平衡化されたSPFF(GE healthcare社)カラムに再接合が終わった試料を結合させた後、塩化カリウム0.5Mと45%エタノールを含む20mMクエン酸ナトリウム(pH2.0)緩衝液を用いて濃度が0%から100%になるように10カラム容量の直線濃度勾配でインスリンアナログタンパク質を溶出した。

## 【0175】

実施例5：トリプシン(Trypsin)とカルボキシペプチダーゼB(Carboxypeptidase B)の処理

40

溶出された試料を限外ろ過膜で塩を除去し、緩衝溶液(10mM Tris HCl、pH8.0)に交替した。得られた試料タンパク量の約30,000モル比に該当するトリプシンと約3,000モル比に該当するカルボキシペプチダーゼBを添加した後、4～8分で16時間以上攪拌した。

## 【0176】

実施例6：陽イオン交換クロマトグラフィー精製

反応が終わった試料を45%エタノールを含む20mMクエン酸ナトリウム(pH2.0)緩衝液で平衡化されたSPHP(GE healthcare社)カラムに再度結合させた後、塩化カリウム0.5Mと45%エタノールを含む20mMクエン酸ナトリウム(pH2.0)緩衝液を用いて濃度が0%から100%になるように10カラム容量の直線濃度勾配

50

でインスリンアナログタンパク質を溶出した。

【0177】

実施例7：逆相クロマトグラフィー精製

前記実施例6で得られた試料から純粋なインスリンアナログを純粋分離するためにリン酸ナトリウムとイソプロパノールを含む緩衝液で平衡化された逆相クロマトグラフィー Source 30 RPC (GE healthcare、米国)に結合させた後、リン酸ナトリウムとイソプロパノールを含む緩衝液を用いて直線濃度勾配でインスリンアナログタンパク質を溶出した。

【0178】

このように精製されたインスリンアナログは、タンパク質電気泳動 (SDS PAGE、図1)及び高圧クロマトグラフィー (HPLC)を用いて分析し、この中で代表としてインスリンアナログ9番、10番、11番、12番の純度分析の結果を示した(図2)。

10

【0179】

実施例8：インスリンアナログのインスリン受容体の結合力の比較

インスリンアナログのインスリン受容体結合力を測定するために、SPA (Scintillation Proximity assay)方法を用いて分析した。96ウェルピコプレート (pico plate)にインスリン受容体が発現されたCHO細胞株の細胞膜とPVT SPAビーズを一緒に入れた。インスリン受容体に対する結合力を確認するために、10個以上の濃度に希釈したヒトインスリン及びそれぞれのインスリンアナログ、そして競争相手として、放射性同位元素である<sup>125</sup>ヨウ素が付着したインスリンを一緒に入れた後、常温で4時間の競争反応させた。4時間後、ベータカウンターを用いてインスリン受容体の結合力を測定した。各物質の結合力は、Graph Pad Prism 6ソフトウェアを使用してIC<sub>50</sub>に算出し、ヒトインスリンのインスリン受容体結合力に対する相対的なインスリンアナログのインスリン受容体結合力に数値化した。

20

【0180】

その結果、ヒトインスリンに比べてインスリンアナログ(1番)は90%、インスリンアナログ(2番)は95%、インスリンアナログ(3番)は1.0%、インスリンアナログ(4番)は<0.1%、インスリンアナログ(6番)は20%、インスリンアナログ(7番)は8.5%、インスリンアナログ(9番)は79%、インスリンアナログ(10番)は79%、インスリンアナログ(11番)は24%、インスリンアナログ(12番)は<0.1%、インスリンアナログ(13番)は<0.1%の受容体結合力が確認された(表4)。このように、本発明のインスリンアナログは、天然型インスリンに比べてインスリン受容体結合力が減少したことを観察した。

30

【0181】

【表 1 3】

表 4

物質名	インスリン受容体の結合力 (v s. ヒトインスリン)	
インスリンアナログ	インスリンアナログ(1番)	90%
	インスリンアナログ(2番)	95%
	インスリンアナログ(3番)	1.0%
	インスリンアナログ(4番)	<0.1%
	インスリンアナログ(6番)	20%
	インスリンアナログ(7番)	8.5%
	インスリンアナログ(9番)	79%
	インスリンアナログ(10番)	79%
	インスリンアナログ(11番)	24%
	インスリンアナログ(12番)	<0.1%
	インスリンアナログ(13番)	<0.1%

10

20

## 【 0 1 8 2】

## 実施例 9 : インスリンアナログ 10 のインビトロ効力の比較

インスリンアナログ 10 のインビトロ効力を測定するために、脂肪細胞に分化させたマウス由来の 3T3 L1 細胞株を用いたグルコース吸収能 (Glucose uptake、または脂質合成) 試験を実施した。3T3 L1 細胞を 10% NBS (新生仔牛血清) を含む DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium、Gibco、Cat.No. 12430) 培地を用いて、週 2 ~ 3 回継代培養し維持した。3T3 L1 細胞を分化用培地 (10% FBS を含む DMEM) を用いて懸濁した後、48 ウェルのプレートにウェル当り  $5 \times 10^4$  個になるように接種して 48 時間培養した。脂肪細胞への分化のために、分化用培地に  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  ヒトインスリン (Sigma, Cat. No. I9278)、 $0.5 \mu\text{M}$  IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine, Sigma, Cat. No. I5879)、及び  $1 \mu\text{M}$  デキサメタゾン (Sigma, Cat. No. D4902) を混合し、既存培地を除去した後、ウェル当り  $250 \mu\text{l}$  ずつ入れた。48 時間後、分化用培地に  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  のヒトインスリンのみを添加した培地に再度交換した。以後、48 時間ごとに  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  のヒトインスリンを添加した分化用培地に交換しながら、12 日間脂肪細胞への分化が誘導されることを確認した。グルコース吸収能の試験のために、分化が終わった細胞を無血清 DMEM 培地で 1 回水洗した後、 $250 \mu\text{l}$  ずつ無血清 DMEM を入れて 4 時間血清の枯渇を誘導した。ヒトインスリンとインスリンアナログ 10 を  $10 \mu\text{M}$  から  $0.001 \text{ nM}$  まで無血清 DMEM 培地で 10 倍に順次希釈して用意した。用意された試料を細胞にそれぞれ  $250 \mu\text{l}$  ずつ添加した後、24 時間、37、5%  $\text{CO}_2$  培養器で培養した。培養が終わった培地のグルコース残量を測定するために、 $200 \mu\text{l}$  の培地を取って、D PBS でそれぞれ 5 倍に希釈して GOPOD (GOPOD Assay Kit, Megazyme, Cat. No. K-GLUC) 分析を行った。グルコース標準溶液の吸光度を基準に培地の残りのグルコース濃度を換算してグルコース吸収能に対する  $\text{EC}_{50}$  をそれぞれ算出した。

30

40

50

## 【0183】

総3回の試験を繰り返し、その結果、ヒトインスリンとインスリンアナログ10の  $E_{C_{50}}$  はそれぞれ  $14.4 \pm 1.0 \text{ nM}$  と  $7.8 \pm 0.7 \text{ nM}$  に算出された。つまり、ヒトインスリンに比べてインスリンアナログ10は  $185.5 \pm 25.7\%$  のグルコース吸収能を有することが確認された(図3)。

## 【0184】

実施例10：インスリンアナログ10の細胞安定性の比較

インスリンアナログ10の細胞安定性を確認するためにヒト由来の Hep G2 細胞株を用いて試験を実施した。まず、Hep G2 細胞を、10% FBS を含む DMEM 培地を用いて、週2~3回継代培養し維持した。24ウェルのプレートにポリ-L リジン (Trevigen, Cat.No. 3438-100-01) をウェル当り  $300 \mu\text{l}$  ずつ入れて37℃で2時間コーティングした。冷たい DPBS で2回水洗した後、Hep G2 細胞を培養用培地(10% FBS を含む DMEM) を用いて懸濁した後、24ウェルのプレートのウェル当り  $1 \times 10^5$  個となれるように接種して24時間培養した。試験用培地(2% FBS を含む DMEM) を用いて細胞を水洗した後、ヒトインスリンとインスリンアナログ10を  $500 \text{ nM}$  ずつ含む試験用培地を各ウェル当り  $500 \mu\text{l}$  ずつ入れた。以降、0、2、6、9、24、48時間、37℃、5%  $\text{CO}_2$  培養器で培養した後、培養が終わったら培地を回収して冷凍保管した。培地内インスリン残量を測定するために PBS-T で100倍に希釈して、ヒトインスリン ELISA キット (Alpco, Cat.No. 80-INSHU-E10.1) を用いて分析を行った。

10

20

## 【0185】

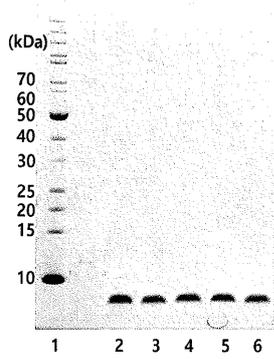
総3回の試験を繰り返し、その結果、0時間に比べて48時間培養後、培地内インスリンの残量がヒトインスリンとインスリンアナログ10それぞれ  $20.9 \pm 11.4\%$  と  $72.7 \pm 5.7\%$  と算出された。つまり、ヒトインスリンと比べてインスリンアナログ10は、より優れた細胞の安定性を示すことが確認された(図4)。

## 【0186】

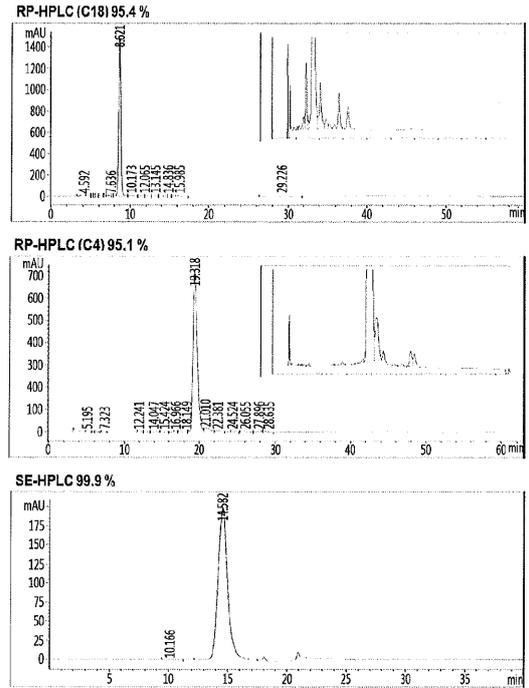
以上の説明から、本発明が属する技術分野の当業者は、本発明がその技術的思想や必須の特徴を変更せず、他の具体的な形態で実施されることを理解できるだろう。これに関連し、以上で記述した実施例は、すべての面で例示的なものであり、限定的なものではないものとして理解しなければならない。本発明の範囲は、前記の詳細な説明ではなく、後述する特許請求の範囲の意味及び範囲、そしてその等価概念から導き出されるすべての変更または変形された形態が本発明の範囲に含まれるものと解釈されるべきである。

30

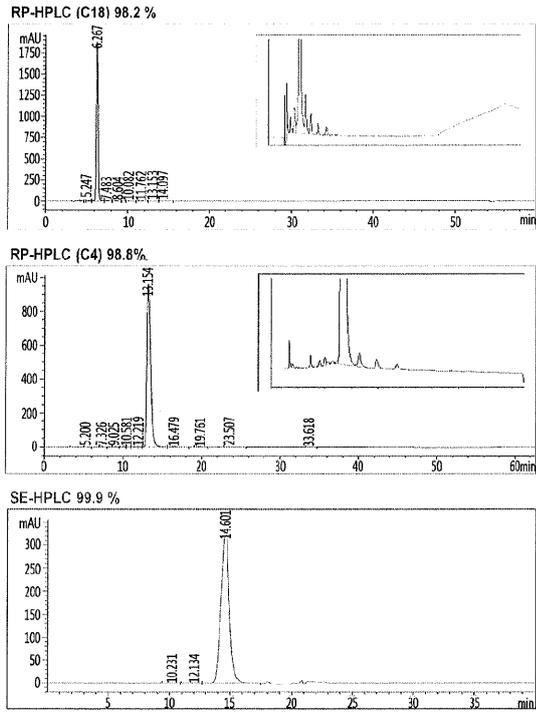
【 図 1 】



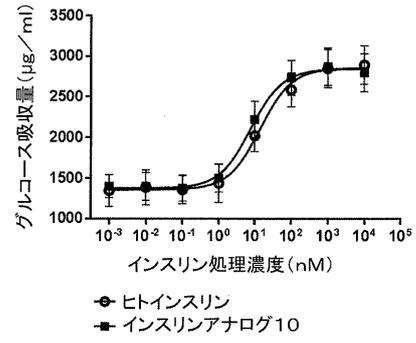
【 図 2 a 】



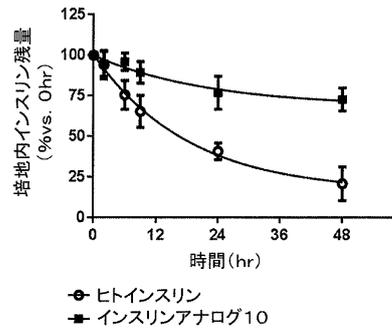
【 図 2 d 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 配列表 】

2019531075000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2017/010504**

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> <i>C07K 14/62(2006.01)i, C07K 1/12(2006.01)i, C07K 1/18(2006.01)i, C07K 1/20(2006.01)i, C12N 15/70(2006.01)i, C12P 21/00(2006.01)i, A61K 38/28(2006.01)i</i> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 14/62; A61K 38/28; A61K 38/26; C07K 1/12; C07K 1/18; C07K 1/20; C12N 15/70; C12P 21/00 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) & Keywords: insulin analogue, receptor, coupling, decrease		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2016-0007295 A (HANMI PHARM. CO., LTD.) 20 January 2016 See paragraphs [0106]-[0151]; claims 1-19; tables 1, 3; sequence identifier nos. 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 40-41, 43-45.	1-23
X	KR 10-2016-0001391 A (HANMI PHARM. CO., LTD.) 06 January 2016 See paragraphs [0026]-[0039]; [0093]-[0140]; claims 1-4.	1-23
X	KR 10-2015-0138101 A (HANMI PHARM. CO., LTD.) 09 December 2015 See paragraphs [0035]-[0046], [0116]-[0147]; and claims 1-5.	1-23
X	KR 10-2015-0087130 A (HANMI PHARM. CO., LTD.) 29 July 2015 See paragraphs [0105]-[0148], [0217]-[0240]; and claims 1-15.	1-23
X	KR 10-2014-0106452 A (HANMI PHARM. CO., LTD.) 03 September 2014 See paragraphs [0029]-[0043], [0096]-[0122]; and claims 1-4.	1-23
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "T" 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>31 JANUARY 2018 (31.01.2018)</b>		Date of mailing of the international search report <b>31 JANUARY 2018 (31.01.2018)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seons-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/010504

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 24  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claim 24 pertains to a method for treatment of the human body by therapy, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2017/010504**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2016-0007295 A	20/01/2016	WO 2016-006963 A1	14/01/2016
KR 10-2016-0001391 A	06/01/2016	WO 2015-199511 A1	30/12/2015
KR 10-2015-0138101 A	09/12/2015	AU 2015-268183 A1	22/12/2016
		CA 2950266 A1	03/12/2015
		CN 106559984 A	05/04/2017
		EP 3156066 A1	19/04/2017
		JP 2017-521377 A	03/08/2017
		US 2017-0143802 A1	25/05/2017
		WO 2015-183038 A1	03/12/2015
KR 10-2015-0087130 A	29/07/2015	AU 2015-206890 A1	04/08/2016
		CA 2937168 A1	23/07/2015
		EP 3098235 A1	30/11/2016
		JP 2017-505141 A	16/02/2017
		US 2017-0101455 A1	13/04/2017
		WO 2015-108398 A1	23/07/2015
KR 10-2014-0106452 A	03/09/2014	AU 2014-221531 A1	27/08/2015
		AU 2014-221534 A1	20/08/2015
		AU 2014-287880 A1	11/02/2016
		CN 104995206 A	21/10/2015
		CN 105229025 A	06/01/2016
		CN 105517578 A	20/04/2016
		EP 2963055 A1	06/01/2016
		EP 2963056 A1	06/01/2016
		EP 3020418 A1	18/05/2016
		JP 2016-510003 A	04/04/2016
		JP 2016-510004 A	04/04/2016
		JP 2016-529227 A	23/09/2016
		KR 10-2014-0106455 A	03/09/2014
		KR 10-2015-0008012 A	21/01/2015
		US 2016-0000931 A1	07/01/2016
		US 2016-0008483 A1	14/01/2016
		US 2016-0158378 A1	09/06/2016
		WO 2014-133324 A1	04/09/2014
		WO 2014-133327 A1	04/09/2014
		WO 2015-005748 A1	15/01/2015

국제조사보고서

국제출원번호  
**PCT/KR2017/010504**

<b>A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))</b> <b>C07K 14/62(2006.01)i, C07K 1/12(2006.01)i, C07K 1/18(2006.01)i, C07K 1/20(2006.01)i, C12N 15/70(2006.01)i, C12P 21/00(2006.01)i, A61K 38/28(2006.01)i</b>		
<b>B. 조사된 분야</b> 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 14/62; A61K 38/28; A61K 38/26; C07K 1/12; C07K 1/18; C07K 1/20; C12N 15/70; C12P 21/00 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: 인슐린 아날로그, 수용체, 결합, 감소		
<b>C. 관련 문헌</b>		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2016-0007295 A (한미약품 주식회사) 2016.01.20 단락 [0106]-[0151]; 청구항 1-19; 표 1, 3; 서열번호 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 40-41, 43-45 참조.	1-23
X	KR 10-2016-0001391 A (한미약품 주식회사) 2016.01.06 단락 [0026]-[0039]; [0093]-[0140]; 청구항 1-4 참조.	1-23
X	KR 10-2015-0138101 A (한미약품 주식회사) 2015.12.09 단락 [0035]-[0046], [0116]-[0147]; 및 청구항 1-5 참조.	1-23
X	KR 10-2015-0087130 A (한미약품 주식회사) 2015.07.29 단락 [0105]-[0148], [0217]-[0240]; 및 청구항 1-15 참조.	1-23
X	KR 10-2014-0106452 A (한미약품 주식회사) 2014.09.03 단락 [0029]-[0043], [0096]-[0122]; 및 청구항 1-4 참조.	1-23
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 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 2018년 01월 31일 (31.01.2018)	국제조사보고서 발송일 2018년 01월 31일 (31.01.2018)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 김선희 전화번호 +82-42-481-5405	

국제조사보고서

국제출원번호

PCT/KR2017/010504

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

- 1.  청구항: 24  
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,  
청구항 24는 치료에 의한 인체의 처치방법에 관한 것이므로 PCT 17(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하  
여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
- 2.  청구항:  
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니  
다. 구체적으로는,
- 3.  청구항:  
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

- 1.  출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합  
니다.
- 2.  추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를  
요구하지 아니하였습니다.
- 3.  출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대  
상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
- 4.  출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발  
명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에  
관한 기재

- 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된  
기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서 대응특허에 관한 정보		국제출원번호 <b>PCT/KR2017/010504</b>	
국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2016-0007295 A	2016/01/20	WO 2016-006963 A1	2016/01/14
KR 10-2016-0001391 A	2016/01/06	WO 2015-199511 A1	2015/12/30
KR 10-2015-0138101 A	2015/12/09	AU 2015-268183 A1 CA 2950266 A1 CN 106559984 A EP 3156066 A1 JP 2017-521377 A US 2017-0143802 A1 WO 2015-183038 A1	2016/12/22 2015/12/03 2017/04/05 2017/04/19 2017/08/03 2017/05/25 2015/12/03
KR 10-2015-0087130 A	2015/07/29	AU 2015-206890 A1 CA 2937168 A1 EP 3098235 A1 JP 2017-505141 A US 2017-0101455 A1 WO 2015-108398 A1	2016/08/04 2015/07/23 2016/11/30 2017/02/16 2017/04/13 2015/07/23
KR 10-2014-0106452 A	2014/09/03	AU 2014-221531 A1 AU 2014-221534 A1 AU 2014-287880 A1 CN 104995206 A CN 105229025 A CN 105517578 A EP 2963055 A1 EP 2963056 A1 EP 3020418 A1 JP 2016-510003 A JP 2016-510004 A JP 2016-529227 A KR 10-2014-0106455 A KR 10-2015-0008012 A US 2016-0000931 A1 US 2016-0008483 A1 US 2016-0158378 A1 WO 2014-133324 A1 WO 2014-133327 A1 WO 2015-005748 A1	2015/08/27 2015/08/20 2016/02/11 2015/10/21 2016/01/06 2016/04/20 2016/01/06 2016/01/06 2016/05/18 2016/04/04 2016/04/04 2016/09/23 2014/09/03 2015/01/21 2016/01/07 2016/01/14 2016/06/09 2014/09/04 2014/09/04 2015/01/15

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2015년 1월)

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	E
A 6 1 K 38/28 (2006.01)	A 6 1 K 38/28	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 35/741 (2015.01)	A 6 1 K 35/741	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, 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

(74) 代理人 100140132

弁理士 竹林 則幸

(72) 発明者 チェ インヨン

大韓民国キョンギ - ド 1 8 4 6 9 . ファンソン - シ . トンタンキフン - ロ 5 5 0

(72) 発明者 チョン ソンヨブ

大韓民国キョンギ - ド 1 8 4 6 9 . ファンソン - シ . トンタンキフン - ロ 5 5 0

(72) 発明者 マルクス・コルン

ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン . サノフィ - アベンティス・ドイツ  
ラント・ゲー・エム・ペー・ハー

(72) 発明者 シュテファン・ゲスレーゲン

ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン . サノフィ - アベンティス・ドイツ  
ラント・ゲー・エム・ペー・ハー

(72) 発明者 ノルベルト・テナーゲルス

ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン . サノフィ - アベンティス・ドイツ  
ラント・ゲー・エム・ペー・ハー

F ターム(参考) 4B064 AG16 CA19 CE11 DA07

4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA24 CA44

4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 BA01 BA02 DB34 NA05 NA12 ZC351

ZC352

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA05 NA12 ZC35

4C087 AA01 BC34 BC83 CA12 NA05 NA12 ZC35

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA40 DA37 EA20 EA23 FA70 FA72

FA74 GA23