



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년06월11일
 (11) 등록번호 10-0902208
 (24) 등록일자 2009년06월03일

(51) Int. Cl.

C07K 14/435 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2003-7014451

(22) 출원일자 2003년11월06일

심사청구일자 2007년05월07일

번역문제출일자 2003년11월06일

(65) 공개번호 10-2003-0094386

(43) 공개일자 2003년12월11일

(86) 국제출원번호 PCT/CN2002/000316

국제출원일자 2002년05월08일

(87) 국제공개번호 WO 2002/90388

국제공개일자 2002년11월14일

(30) 우선권주장

01112856.9 2001년05월10일 중국(CN)

(56) 선행기술조사문헌

W00104156 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

상하이 후아이 바이오 랩

중국, 상하이 200235, 카오바오 로드, 36

(72) 발명자

선, 유쿤

중국, 상하이 200233, 카오바오로드 36

우, 령시

중국, 상하이 200233, 카오바오로드 36

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순영, 김영철, 이준서

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 신원해

(54) 인슐린 친화성 웨티드 유도체

(57) 요약

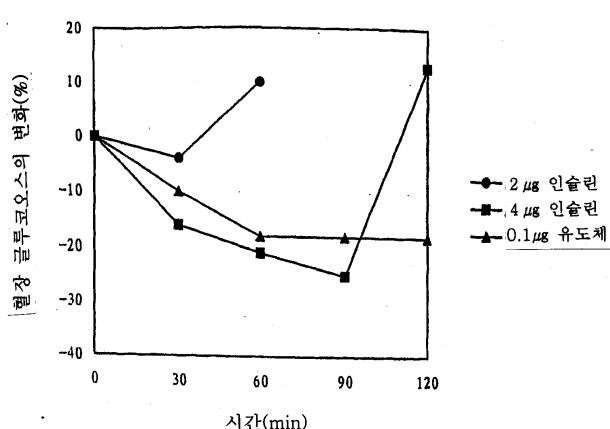
본 발명은 인슐린 친화성 웨티드 엑센딘-4 유도체 및 약제학적으로 허용되는 그 염에 관한 것으로서, 이는 타입 II 당뇨병 치료에 유용하다. 엑센딘-4의 유도체는 하기와 같은 화학적 구조를 갖는다:

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-X-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Y-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Z.

상기에서, X는 Arg, Leu 또는 Ile이고; Y는 His, Arg 또는 Lys이며; Z는 Arg-OH, -OH, -NH₂ 또는 Lys-OH이다.

본 발명의 유도체들은 합성 화학 수단에 의해 제조될 수 있는데, 더욱 용이하게는 재조합 테크닉에 의해 제조될 수 있으며, 이는 상업적 생산을 가능케 한다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

주, 지용

중국, 상하이200233, 카오바오로드36

유, 강

중국, 상하이200233, 카오바오로드36

센, 춘주안

중국, 상하이200233, 카오바오로드36

자오, 샤오령

중국, 상하이200233, 카오바오로드36

조우, 지악시양

중국, 상하이200233, 카오바오로드36

특허청구의 범위

청구항 1

하기 아미노산 서열을 갖는 인슐린 분비 촉진용 펩티드 또는 약제학적으로 허용되는 그 염.

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-X-Glu-Glu-Ala-Val-Y-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Z.

상기에서, X는 Met, Leu 또는 Ile이고; Y는 His 또는 Lys이며; Z는 Arg-OH이다.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서, Y가 His인 펩티드 또는 약제학적으로 허용되는 그 염.

청구항 6

제1항에 있어서, X가 Leu 또는 Ile이고, Y는 Lys인 펩티드 또는 약제학적으로 허용되는 그 염.

청구항 7

제6항에 있어서, X가 Leu인 펩티드 또는 약제학적으로 허용되는 그 염.

청구항 8

재조합 테크닉에 의해 제1항 및 제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 펩티드를 생산하는 방법으로서,

a. 상기 펩티드의 아미노산 서열에 따라 유전자 단편들을 합성하는 단계;

b. 상기 유전자 단편들의 라이케이션, 재조합 플라스미드의 제조, 박테리아 세포의 배양 및 상기 재조합 플라스미드의 형질전환을 통해 클로닝된 박테리아 균주를 얻는 단계;

c. 상기 박테리아 균주의 발효 및 세포 벽의 파괴를 통해 세포 내용물을 추출하는 단계; 및

d. 세포 내용물의 용균, 조 산물의 분리, HPLC에 의한 정제 및 동결건조 단계를 통해 최종 산물을 얻는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 펩티드 생산방법.

청구항 9

제1항 및 제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 또는 약제학적으로 허용되는 그 염을 포함하는 타입 II 당뇨병 치료제.

명세서

기술분야

<1>

본 발명은 타입 II 당뇨병 치료에 유용한 활성 펩티드 화합물에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 인슐린 친화성 펩티드 엑센틴-4의 유도체에 관한 것이다.

배경기술

- <2> 동량일때 글루코오스의 경구투여가 주사보다 더 많은 인슐린 분비를 촉진한다는 것이 알려져 왔다. 그 이유를 밝히기 위한 많은 연구 후에, 인크레틴(incretin)이 이 현상에 중요한 역할을 한다는 것이 입증되었다.
- <3> 인크레틴은 한 그룹의 펩티드 화합물로서, 그 중에 강한 저해 활성을 갖는 위 저해 펩티드(gastric inhibitory peptide, GIP) 및 글루카곤-유사 펩티드(GLP-1)는 1985년도에 개시되었다. 두 종류의 GLP-1이 존재하는데, 그 중 하나는 GLP-1(7-36) 아미드로서 이는 30개의 아미노산 잔기로 구성되며, 나머지 하나는 GLP-1(7-37)으로서 이는 31개의 아미노산 잔기로 구성된다. 그 둘은 인슐린 분비를 자극함에 있어서 유사한 활성을 가진다. 생체외에서 췌장 섬 세포에 작용시, GLP-1은 $1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-11}$ mol/L 만큼 낮은 농도에서 인슐린 분비를 자극할 수 있다. DNA 및 아미노산 서열의 분석에 의해 이러한 인슐린 친화성 펩티드가 장관 단백분해 효소의 작용 하에서 글루카곤 전구체인 "프로글루카곤"의 단백분해로부터 유래된다는 것이 밝혀졌다. 따라서, 그들을 글루카곤 유사 펩티드로 부른다.
- <4> GLP-1의 한 특징은 그것이 췌장 베타 세포를 자극하여 프로인슐린 mRNA 및 프로인슐린을 합성하고 인슐린을 방출할 수 있다는 것이다. GLP-1이 췌장 베타 세포에 미치는 작용은 글루코오스 농도에 의존한다. 혈당농도가 6mmol/L보다 높을 때 GLP-1은 인슐린 분비를 현저히 자극하며, 혈당 농도가 정상 수준으로 회복되면 GLP-1의 자극 활성은 더이상 관찰되지 않는다. 그러한 특징으로 인해 타입 II 당뇨병 치료에 매우 유용하게 이용될 수 있다. 최근 몇년 동안 타입 II 당뇨병 환자들을 대상으로 임상 실험을 한 결과, GLP-1이 인슐린 분비를 자극하고 글루코오스 농도를 낮추는 작용을 하는 것이 입증되었다.
- <5> GLP-1(7-36) 아미드의 화학적 구조는 다음과 같다:
- <6> His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-NH₂
- <7> 상기에서, His는 히스티딘을, Ala는 알라닌을, Glu는 글루탐산을, Gly는 글리신을, Thr은 트레오닌을, Phe는 페닐알라닌을, Ser은 세린을, Asp는 아스파르트산을, Val은 발린을, Tyr은 티로신을, Leu은 루신을, Gln은 글루타민을, Lys은 리신을, Ile은 이소루신을, Arg은 아르기닌을 의미한다.
- <8> 국제공개 WO 91/11467은 GLP-1 펩티드 7-34, 7-35, 7-36 및 7-37의 유사체들을 개시하고 있는데, 이들은 타입 II 당뇨병 치료에 유용하다.
- <9> 멕시코 구슬 도마뱀(beaded lizard)(Heloderma horridum)의 독액으로부터 분리된 펩티드 화합물 엑센딘-4가 1996년도에 Jean-Pierre Ranfman에 의해 Regulatory Peptides에 개시된 바 있다. 엑센딘-4는 아미드화된 카르복시 말단을 갖는 39개의 아미노산 잔기로 구성된다.
- <10> 엑센딘-4의 화학적 구성은 다음과 같다:
- | | | |
|------|---|----|
| <11> | 10 | |
|
 | | |
| <12> | His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu- | |
| <13> | 20 | 30 |
|
 | | |
| <14> | Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly- | |
| <15> | 39 | |
|
 | | |
| <16> | Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-NH ₂ | |
|
 | | |
| <17> | 상기에서, Met은 메티오닌을, Asn은 아스파라진을, Pro는 프롤린을 의미한다. | |
| <18> | 엑센딘-4는 아미노산 서열에 있어서 GLP-1과 53%의 상동성을 나타낸다. 또한 엑센딘-4는 GLP-1 수용체와 조합될 수 있는 능력을 가져 인슐린 분비를 촉진한다. 따라서, 그것은 인슐린 친화성 펩티드로 간주된다. | |
| <19> | 미국 특허 제 05424286호는 인슐린 분비에 대한 자극 효과에 관해 엑센딘-4 및 GLP-1 사이에 수행된 몇몇 비교 실험 결과를 개시하였다. 그 결과에 따르면, GLP-1과 비교하여 엑센딘-4는 인슐린 분비를 자극하는 더 강한 능력을 가졌고 그러한 자극 활성을 보이기 위해서 더 낮은 농도를 필요로 한다. 또한 엑센딘-4는 GLP-1보다 생체 내에서 더 긴 수명을 가졌다. 이러한 특징의 과점에서 엑센딘-4는 타입 II 당뇨병 치료에 더 바람직한 치료제가 될 수 있다. | |

<20> 엑센딘-4는 펩티드 합성기 상의 고상 합성과 같은 화학적 합성 방법에 의해 제조될 수 있지만, 그러한 방법은 가격이 비싸기 때문에 엑센딘-4의 상업화에 장애물이 된다. 따라서, 상업화 목적으로 생산가를 절감하기 위해 바이오-엔지니어링 테크닉들이 시도되고 있다.

발명의 상세한 설명

<21> 발명의 목적

<22> 본 발명은 인슐린 친화성 펩티드 엑센딘-4의 몇몇 유도체를 제공하는 것에 관한 것이다. 그러한 유도체들은 인슐린 분비를 촉진하여 혈당 농도를 낮추는 것을 돋는다. 따라서, 그것들은 타입 II 당뇨병 치료에 유용할 수 있다. 그러한 유도체들은 합성 화학적 수단으로 제조될 수 있고, 더 용이하게는 재조합 테크닉으로 제조될 수 있는데, 이를 통해 생산가를 절감할 수 있다.

<23> 발명의 개요

<24> 본 발명은 인슐린 친화성 펩티드 유도체 및 그것의 약제학적으로 허용되는 염을 제공한다. 상기 인슐린 친화성 펩티드는 하기와 같은 아미노산 서열을 갖는다.

<25> 10 14

<26> His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-X-Glu-Glu-Glu-

<27> 20 30

<28> Ala-Val-Y-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-

<29> 39 40

<30> Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Z

<31> 상기에서, X는 Arg, Leu, Ile 또는 Met; Y는 His, Arg 또는 Lys; Z는 Arg-OH, -OH, -NH₂ 또는 Lys-OH; 이고,

<32> X가 Met이고 Y가 Arg일 때 Z는 NH₂일 수 없다.

<33> 본 발명의 인슐린 친화성 펩티드 유도체들은 서열번호 1 내지 서열번호 4(<210>1 내지 <210>4)에 기재된 아미노산 서열을 갖는다.

<34> 본 발명의 인슐린 친화성 펩티드 유도체들은 양성적 화합물로서, 충분히 산성이거나 충분히 염기성이어서 많은 무기염기, 무기산 및 유기산 중 어느 것과 반응하여 염을 형성할 수 있다. 산부가염을 형성하기 위하여 통상적으로 이용되는 산으로서는, 염산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 황산, 인산 등과 같은 무기산, p-톨루엔су폰산, 메탄су폰산, 옥살산, p-브로모페닐-술폰산, 탄산, 숙신산, 시트르산, 벤조산, 아세트산 등의 유기산이 있다. 그러한 염의 예로는 술페이트, 피로술페이트, 바이술페이트, 술피트, 바이술피트, 포스페이트, 모노하이드로젠포스페이트, 다이하이드로젠포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트, 클로라이드, 브로마이드, 요오다이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 테카노에이트, 카프릴레이트, 포르메이트, 이소부티레이트, 카프로에이트, 햅타노에이트, 프로피오레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 숙시네이트, 수베르에이트, 세바케이트, 푸마르에이트, 말레이트, 부틴-1,4-다이오에이트, 헥신-1,6-다이오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 다이니트로벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 술포네이트, 크실렌술포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, 감마-하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 타르타르에이트, 메탄술포네이트, 프로판술포네이트, 나프탈렌-1-술포네이트, 나프탈렌-2-술포네이트, 만델레이트 등을 포함한다. 바람직한 산부가염은 염산 및 브롬화수소산과 같은 무기산, 특히 염산과 형성된 염이다.

<35> 알칼리 또한 이용되어 본 발명의 유도체와 반응하여 염을 형성할 수 있다. 그러한 알칼리의 대표적인 예로는 암모늄, 알칼리 금속, 알칼리 금속 수산화물, 카보네이트 및 바이카보네이트를 포함한다. 통상 그러한 알칼리는 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화암모늄 및 탄산칼륨이 될 수 있다.

<36> 본 발명은 또한 고상 합성에 의한 인슐린 친화성 펩티드 유도체의 생산방법을 제공하는데, 그 방법은 고상 캐리어로서 HMP 수지를 이용하고, 아미노산의 알파-아민을 9-플루오르에닐 메톡시카르보닐(Fmoc)로 보호하고, 인슐

린 친화성 펩티드 유도체의 아미노산 서열에 따라 펩티드 합성기 상에서 잔기를 합성하고, 분리, 정제 및 동결건조 단계를 통해 산물을 얻는 것을 포함한다.

<37> 본 발명은 또한 재조합 테크닉에 의해 인슐린 친화성 펩티드 유도체를 생산하는 방법을 제공하는데, 그 방법은,

<38> a. 인슐린 친화성 펩티드 유도체의 아미노산 서열에 따라 유전자 단편들을 합성하는 단계,

<39> b. 상기 유전자 단편들의 라이케이션, 재조합 플라스미드 제조, 박테리아 세포의 배양 및 상기 재조합 플라스미드의 형질전환을 통해 클로닝된 박테리아를 얻는 단계,

<40> c. 상기 박테리아 균주의 발효 및 세포벽의 파괴를 통해 세포 함유물을 추출하는 단계,

<41> d. 세포 함유물의 용균, 조 산물의 분리, HPLC에 의한 정제 및 동결건조를 통해 최종 산물을 얻는 단계를 포함한다.

<42> 한편, 본 발명은 또한 타입 II 당뇨병 치료에 있어서의, 상기 인슐린 친화성 펩티드 유도체 및 약제학적으로 허용되는 그 염의 용도에 관한 것이다.

<43> 본 발명은 펩티드 화합물 액센딘-4의 신규한 유도체들(이들은 액센딘-4 유도체들의 범위를 넓힌다)을 제공한다. 본 발명의 유도체들은 인슐린 분비를 촉진하고 혈당 농도를 낮추는 생물학적 활성을 가진다. 그들은 타입 II 당뇨병의 치료에 사용될 수 있다. 그러한 유도체들은 화학적 합성, 더 용이하게는 재조합 테크닉에 의해 제조될 수 있는데, 이로써 생산비용을 절감할 수 있다. 또한, 그러한 유도체들의 생물학적 활성은 NOD(non-obese diabetic) 마우스를 이용한 약물동력학 연구를 통해 입증되었는데, 본 발명의 유도체 0.1 μ g이 상기 마우스의 복부에 주입되었을 때 상기 인슐린 친화성 펩티드 유도체는 인슐린 분비 및 혈당 농도 감소에 있어 명백한 효과를 나타내었다.

실시예

<50> 발명의 상세한 설명

<51> 하기 실시예들은 예시적인 것이며, 어떤 방식으로든 본 발명의 범위를 제한하려는 의도는 아니다.

<52> 실시예1

<53> X가 Arg, Y가 Lys이고 Z가 -OH인 인슐린 친화성 펩티드 유도체의 고상 합성에 의한 제조

<54> (1) 아미노산 모노머:

표 1

Fmoc-L-Ala-OH	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH
Fmoc-L-Asn(Trt)-OH	Fmoc-L-Met-OH
Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH	Fmoc-L-Phe-OH
Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	Fmoc-L-Pro-OH
Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH
Fmoc-L-Gly-OH	Fmoc-L-Thr(tBu)-OH
Fmoc-L-His(Trt)-OH	Fmoc-L-Trp-OH
Fmoc-L-Ile-OH	Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH
Fmoc-L-Leu-OH	Fmoc-L-Val-OH

<55> <56> 상기에서, Fmoc는 9-플루오르에닐 메톡시카르보닐을,

<57> BOC는 터트(tert)-부틸옥시카르보닐을,

<58> Trt는 트리틸을,

<59> OtBu는 삼차 부틸 에스테르를,

<60> tBu는 터트-부틸을 나타낸다.

<61> (2) 장치 및 시약

<62> 장치: Model 433A 펩티드 합성기(Applied Biosystem, US)

<63> 시약: N-메틸 케토페롤리딘, 메틸렌 클로라이드, 헥사하이드로페리딘, 메탄올, 디메틸아미노페리딘/DMF, N,N-다이이소프로필에틸아민/NMP, 100mmole HBTU / DMF 중의 0.5M HOBT, N,N-다이사이클로헥실카보다이이미드/NMP

<64> 상기에서,

<65> DMF는 N,N-디메틸포름아미드

<66> NMP는 N-메틸파롤리돈

<67> HOBT는 1-하이드록시벤조트리아졸, 및

<68> HBTU는 2-(1H-벤조트리아졸-일-1,1,3,3-테트라메틸-우로늄 헥사플루오로포스페이트)를 나타낸다.

<69> (3) 절차

<70> a. 합성

<71> 합성 스케일 0.25를 취하여, 예컨대 그 합성 과정은 다음과 같았다. 0.25g의 HMP 수지를 측량하여 합성기의 반응기 용기에 넣었다. 각각이 보호기와 결합된 1mmol의 다양한 잔기들을 측량하여 카르복시 말단부터 아미노 말단까지 인슐린 친화성 펩티드 유도체의 아미노산 서열에 따라 합성기에 배열하였다. 25°C의 실온에서 컴퓨터 프로그램의 제어 하에서 자동적으로 Fmoc 보호의 제거, 잔기의 활성화 및 활성화된 잔기의 HMP 수지에의 부착이 수행되었다. 그러한 반응은 전체 펩티드가 합성될 때까지 반복되었다. 합성 완료 후, 사이드 체인 보호기와 결합된 각 잔기를 갖는 잔기-부착 수지를 펩티드 합성기 상에서 공기 건조시킨 후 측량하였다.

<72> b. 보호기 제거 및 수지의 부착

<73> 보호기에 결합된 인슐린 친화성 펩티드 유도체의 각 잔기를 갖는 잔기-부착 수지를 플러그드 애를렌마이어 플라스크에 넣고 하기 나타난 절단 시약들을 첨가하였다.

표 2

<74>

시약	용량
물	0.50ml
메틸 폐네이트	0.50ml
페놀	0.75g
머캡토에탄올	0.20ml
트리플루오로아세트산	10.0ml

<75> 30°C의 일정한 온도에서 6시간동안 전자기 교반 반응을 수행하였다. 여과 단계 이후 수성 여과물을 수거하였다. 수지를 소량의 트리플루오로아세트산으로 세척하였다. 그 다음에 상기 수거된 수성 여과물 및 세척 용액을 함께 혼합하고 에테르를 첨가하여 침전시켰다. 상기 혼합물을 여과하고 그 결과된 침전물을 소량의 에테르로 세척하였다. 제습기에서 증발시킨 후, 조 산물을 얻었다.

<76> c. HPLC에 의한 정제 및 동결건조

<77> 예비적 HPLC를 이용하여 조 산물의 분리 및 정제를 수행하였다. 동결 건조 단계 이후에 최종 산물을 얻었다. 그 산물의 분자량은 크로마토그램-질량 스펙트로그램 조인트 분석을 이용하여 결정하였다. 그 펩티드 유도체는 분

자량이 4316.7이었고, 이론적 분자량은 4300.6이었다.

<78> 실시예2

<79> X가 Leu이고, Y가 Lys이며 Z가 Arg-OH인 인슐린 친화성 웨티드 유도체의 바이오 엔지니어링 테크닉에 의한 제조

<80> A. 인슐린 친화성 웨티드 유도체의 아미노산 서열에 의한 유전자 단편의 합성

(1) 5' AAT TCC ATG CAC GGC GAA GGC ACC TTC ACC AGC GAT
CTG AGC AAA CAG CTG GAA GAA GCG GTT AA

(2) 5' ACTG TTC ATC GAA TGG CTG AAA AAC GGC GGC CCG AGC
AGC GGC GCG CCG CCG AGC CGT TAG A

(3) 5' AGCTT CTA ACG GCT CGG CGG CGG CGC GCC GCT GCT
CGG GCC GCC GTT TTT CAG CCA TTC GAT GA

(4) 5' ACAG TTT AAC CGC TTC TTC CAG CTG TTT GCT CAG
ATC GCT GGT GAA GGT GCC TTC GCC GTG CAT GG

<81>

B. 클로닝

<83> 라이케이션:

<84> 2개의 투브를 취하여, OD_{260nm}(260nm에서의 광학밀도)=0.1인 단편(1) 및 단편(4)을 한 투브에 넣고, 동일한 광학밀도를 갖는 단편(2) 및 단편(3)을 다른 투브에 넣었다. 그런 다음에 폴리뉴클레오티드 카이네이즈 베퍼, 폴리뉴클레오티드 카이네이즈 및 ATP를 상기 두개의 투브에 각각 첨가하였다. 그 반응 혼합물을 37°C에서 60분간 인큐베이션시켜 인산화된 유전자 단편의 5' 말단을 생성시켰다. 그런 다음에 상기 두 개의 투브를 95°C의 워터 배쓰에 위치시키고 10분간 인큐베이션시켰다. 상기 워터 배쓰를 중지하고 따뜻한 상태에서 자연적으로 실온까지 냉각시켰고, 이 과정동안 어닐링 반응이 수행되었다. T4 라이케이즈 및 T4 라이케이즈 베퍼가 상기 각 두 투브에 첨가되었고, 그 혼합물을 유전자 단편들의 라이케이션을 위해 16°C에서 하룻밤동안 인큐베이션시켰다.

<85> 플라스미드

<86> Lac, P_L 또는 Tac와 같은 프로모터 함유 플라스미드를 한 투브에 넣고 제한 효소 엔도뉴클레아제 EcoRI 및 HindIII로 분해시켰다. 그 분해된 플라스미드를 하이드록시벤젠:클로로포름 용매로 추출하고 원심분리하여 수거하였다. 수상이 남겨졌고 클로로포름 용매로 3회 세척하였다. 원심분리를 계속하였고 그 결과된 수상을 이소프로판을 용매로 침전시킨 다음 원심분리하고 공기-건조시켰다.

<87> 상기 분해된 플라스미드 및 상기 라이케이션된 단편을 함께 혼합하였다. T4 라이케이즈 및 라이케이즈 베퍼를 상기 혼합물에 첨가하였다. 라이케이션 반응을 실온에서 3-4시간 수행하였다.

<88> 숙주 박테리아 세포의 배양:

<89> 이 콜라이 JM103의 박테리아 세포를 LB 액체 배지(10g의 펩톤, 5g의 효모 추출물 및 5g의 염화나트륨을 함유하는 1000ml의 LB 액체 배지)에서 4시간동안 37°C에서 교반하면서 인큐베이션시켰다. 그 박테리아 배양물을 원심분리하고 수거된 박테리아 세포를 염화칼슘 용액으로 처리하고 더 이상의 이용을 위해 -4°C에서 유지시켰다.

<90> 형질전환

<91> 클론된 플라스미드를 이 콜라이 JM103 숙주 세포로 형질전환시켰다. 그 형질전환된 박테리아 세포를 아이스 배쓰에서 30분간 인큐베이션시켰다. 그 후 42°C에서 2분동안 인큐베이션시켰다. 상기 박테리아 세포를 암피실린 항생제를 함유하는 한천 플레이트 상에 스프레드 시키고 37°C에서 하룻밤 인큐베이션시켰다. 그 후 콜로니 스크리닝을 수행하고 재조합 플라스미드를 함유하는 콜로니들을 양성 콜로니로 하였다.

<92> C. 발효:

<93> 상기 유도체 유전자를 운반하는 재조합 플라스미드를 갖는 스크리닝된 콜로니를 LB 액체 배지 내에서 교반하면서 인큐베이션시켰다. 단백질 유도 목적으로 0.5mM의 이소프로필 베타-D-티오갈락토파라노시드(IPTG)를 첨가하였다. 박테리아 세포를 하룻밤 인큐베이션시키고 원심분리하여 수확하였다. 발현된 단백질을 12% 소디움 도데칸술포네이트를 함유하는 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동(PAGE)를 통해 확인하였다.

<94> D. 세포 함유물

<95> 각각 300mI의 박테리아 배양물을 함유하는 10개의 병을 상기 언급한 조건 하에서 교반하면서 인큐베이션시켰다. 단백질 유도 단계 이후에 용균 용액(1% 염화나트륨을 함유하는 20mM 인산 버퍼, pH 7.5) 및 라이소자임을 첨가하였다. 상기 박테리아 배양물을 30°C에서 30분간 인큐베이션시키고 원심분리하였다. 수거된 침전물을 6M의 구아닌 하이드로클로라이드(Gu · HCl)로 처리하여 세포 함유물을 추출하였다. 원심분리를 계속하여 결과된 상청액을 투석하여 구아닌 하이드로클로라이드를 제거하였다. 투석물을 20mM 인산 버퍼(1% 염화나트륨 및 0.1% Tween 80을 함유하는, pH 7.5)로 3회 세척하고 그 이후에 세포 함유물을 얻었다.

<96> E. 용균

<97> 세포 함유물을 8M 카바마이드 용액에 용해시켰다. 염산을 첨가하여 50mM의 농도를 만들었다. 시아노겐 브로마이드를 첨가한 후 상기 용액을 빛이 차단되고 질소가 보호되는 조건 하에서 교반하였다. 용균 반응을 2시간 수행한 후 HPLC 분석을 하였다.

<98> F. 정제

<99> 상기 용균 반응 완료한 후, Sephadex G-25 상에서 파티션 크로마토그래피를 통해 조 산물을 얻고 HPLC 정제를 통해 최종 산물을 얻었다. 고상 합성 결과와 유사하게 질량 스펙트럼 분석에 의해 상기 웨티드 유도체의 분자량은 이론치와 일치하는 것으로 나타났다.

<100> 실시예 3

<101> 약물동력학적 연구

<102> 실험은 체중이 $17 \pm 2g$ 이고 2시간 절식(단식)한 NOD 마우스(non-obese diabetic mice)로 수행하였다. 콘트롤 그룹 1의 마우스에는 2 μ g의 인슐린을 복부 주사하였고, 콘트롤 그룹 2의 마우스에는 4 μ g의 인슐린을 복부 주사하였으며, 실험군에는 실시예1에 기재된 바와 같이 얻어진 인슐린 친화성 웨티드 유도체 0.1 μ g을 복부 주사하였다.

<103> 혈액 샘플을 다른 시점에 수거하였다. 혈장 글루코오스 농도를 혈장 글루코오스 테스팅 키트(Shanghai Institute of Biological Products Ministry of Health)를 이용하여 결정하였다. 그 결과를 도면에 나타내었다. 혈당에 대한 인슐린 친화성 웨티드 유도체의 감소 효과가 매우 자명하게 관찰된다.

<104> 실시예4

<105> NOD 마우스에서 혈당에 대한 엑센딘4(Lys₂₀, Arg₄₀) 및 엑센딘4(Leu₁₄, Lys₂₀, Arg₄₀)의 감소효과

- <106> 재료 및 방법:
- <107> NOD 마우스를 Shanghai Laboratory Animal Center of Chinese Academy of Sciences를 통해 제공받았다. 0.9% 염화나트륨 용액, 엑센딘4(Lys₂₀, Arg₄₀) 및 엑센딘4(Leu₁₄, Lys₂₀, Arg₄₀) 웨პ티드를 분석에 이용하였다. 혈장 글루코오스 테스팅 키트는 Shanghai Institute of Biological Products Ministry of Health로부터 구입하였다.
- <108> 하룻밤 절식한 NOD를 세 그룹으로 분류하였다. 첫번째 그룹의 마우스는 40% 글루코오스 및 1 μ g의 엑센딘4(Lys₂₀, Arg₄₀)를 함유하는 200 μ l 용액을 복부 주사하였다. 두번째 그룹의 마우스에게는 40% 글루코오스 및 2 μ g의 엑센딘4(Leu₁₄, Lys₂₀, Arg₄₀)를 함유하는 200 μ l 용액을 복부 주사하였다. 반면, 세번째 그룹인 콘트롤 그룹의 마우스에게는 글루코오스 용액을 복부 주사하였다.
- <109> 헤파린으로 alfl 처리된 눈금이 있는 모세관을 이용하여 리트로-오비탈 제이너스 시누스(retro-orbital zeinous sinus)로부터 30 μ l의 혈액 샘플을 즉시 채취하였다. 상기 샘플을 3000rpm의 보통 살린에 넣고 살린과 혼합하였다. 3000rpm에서 원심분리하여 적혈구를 제거하고 글루코오스 결정을 위해 혈청을 얻었다. 다른 혈액 샘플을 각각 30분, 60분 및 120분에 상기 기재한 바와 같이 채취하였다. 그 다음 혈청을 분리하였다. 3개의 혈장 샘플의 글루코오스 농도를 테스팅 키트에 의해 상기 기재한 바와 같은 방법에 따라 측정하고 혈당 농도에 대한 GLP-1(7-36)의 감소효과를 검출하였다.
- <110> 도 1에 나타낸 바와 같이, 현저한 증가 후에 콘트롤 그룹의 혈당 농도는 점차적으로 정상 수준으로 회복된다. 반면, 실험군의 글루코오스 농도는 눈에 띠는 증가는 보이지 않았고 모든 시간에서 정상 수준을 유지하였다. 그 이유는 엑센딘 4 유도체의 투여가 인슐린 분비를 자극하고 따라서 혈당의 현저한 변동을 피했기 때문이다. 따라서, 혈당에 대한 엑센딘4(Lys₂₀, Arg₄₀) 및 엑센딘4(Leu₁₄, Lys₂₀, Arg₄₀)의 감소효과는 실험 결과에 의해 뒷받침된다.
- <111> 실시예5
- <112> 인슐린 분비에 대한 엑센딘4(Lys₂₀, Arg₄₀)의 자극 효과
- <113> 재료 및 방법:
- <114> NOD 마우스를 Shanghai Laboratory Animal Center of Chinese Academy of Sciences를 통해 제공받았다. 40% 글루코오스 용액, 0.9%의 염화나트륨 용액 및 엑센딘4(Lys₂₀, Arg₄₀)을 본 실험에 사용하였다. 인슐린 방사선면역 분석 키트는 Shanghai Institute of Biological Products Ministry of Health로부터 구입하였다.
- <115> NOD 마우스를 2 그룹으로 분류하였다. 50 μ l의 혈액 샘플을, 내부 벽을 1mg/mL 헤파린으로 행구고 미리 공기 건조시킨 눈금이 있는 모세관을 이용하여, 눈의 정맥총으로부터 채취하였다. 두 그룹의 마우스 각각에 5 μ g의 엑센딘4(Lys₂₀, Arg₄₀)를 함유하는 보통 살린 200 μ l를 복부 주사하였고 이 시점을 0분으로 기록하였다. 상기 기재된 바와 같이 각각 5분, 10분, 20분 및 30분에 다른 혈액 샘플들을 채취하였다. 샘플링 후 각 혈액 샘플을 즉시 보통 살린 50 μ l를 함유하는 원심분리 튜브에 넣고 살린과 혼합하였다. 적혈구를 3000rpm에서 원심분리하여 제거하였다. 다른 샘플들의 인슐린 농도를 방사선면역분석 키트에 의해 기재된 방법에 따라 측정하였고 인슐린 분비에 대한 엑센딘4(Lys₂₀, Arg₄₀)의 자극 효과를 검출하였다.
- <116> 도 2에 나타낸 바와 같이, 엑센딘4(Lys₂₀, Arg₄₀)의 복부 주사가 인슐린 분비를 현저히 자극할 수 있다.
- <117> 실시예 6
- <118> C-웨პ티드 분비에 대한 엑센딘4(Lys₂₀, Arg₄₀)의 자극 효과
- <119> 재료 및 방법:
- <120> 건강한 C₅₇/BL 마우스를 Shanghai Laboratory Animal Center of Chinese Academy of Sciences를 통해 제공받았다. 40% 글루코오스 용액, 0.9%의 염화나트륨 용액 및 엑센딘4(Lys₂₀, Arg₄₀)을 본 실험에 사용하였다. 인슐린

방사선면역분석 키트 및 C-펩티드 방사선면역분석 키트는 Shanghai Institute of Biological Products Ministry of Health로부터 구입하였다.

<121> 건강한 C₅₇/BL 마우스를 2 그룹으로 분류하였다. 50μl의 혈액 샘플을, 내부 벡을 1mg/mL 헤파린으로 행구고 미리 공기 건조시킨 눈금이 있는 모세관을 이용하여, 눈의 정맥총으로부터 채취하였다. 두 그룹의 마우스 각각에 5μg의 엑센딘4(Lys₂₀, Arg₄₀)를 함유하는 보통 살린 200μl를 복부 주사하였고 이 시점을 0분으로 기록하였다. 상기 기재된 바와 같이 각각 5분, 10분, 20분 및 30분에 다른 혈액 샘플들을 채취하였다. 샘플링 후 각 혈액 샘플을 즉시 보통 살린 50μl를 함유하는 원심분리 튜브에 넣고 살린과 혼합하였다. 적혈구를 3000rpm에서 원심분리하여 제거하였다. 다른 샘플들의 C-펩티드 농도를 방사선면역분석 키트에 의해 기재된 방법에 따라 측정하였고, C-펩티드 분비에 대한 엑센딘4(Lys₂₀, Arg₄₀)의 자극 효과를 검출하였다.

<122> 도 3에 나타낸 바와 같이, 엑센딘4(Lys₂₀, Arg₄₀)의 복부 주사가 C-펩티드의 분비를 현저히 자극할 수 있다.

도면의 간단한 설명

<44> 본 발명은 하기 도면 및 실시예를 참고로 하여 더욱 상세히 설명될 것이다.

<45> 도 1은 본 발명의 인슐린 친화성 펩티드 유도체의 약물동력학적 연구의 결과를 나타낸다.

<46> 도 2는 실시예1에서 제조된 산물의 질량 스펙트럼 분석 결과를 나타낸다(이론적 분자량 4300.6, 실측 분자량 4316.7).

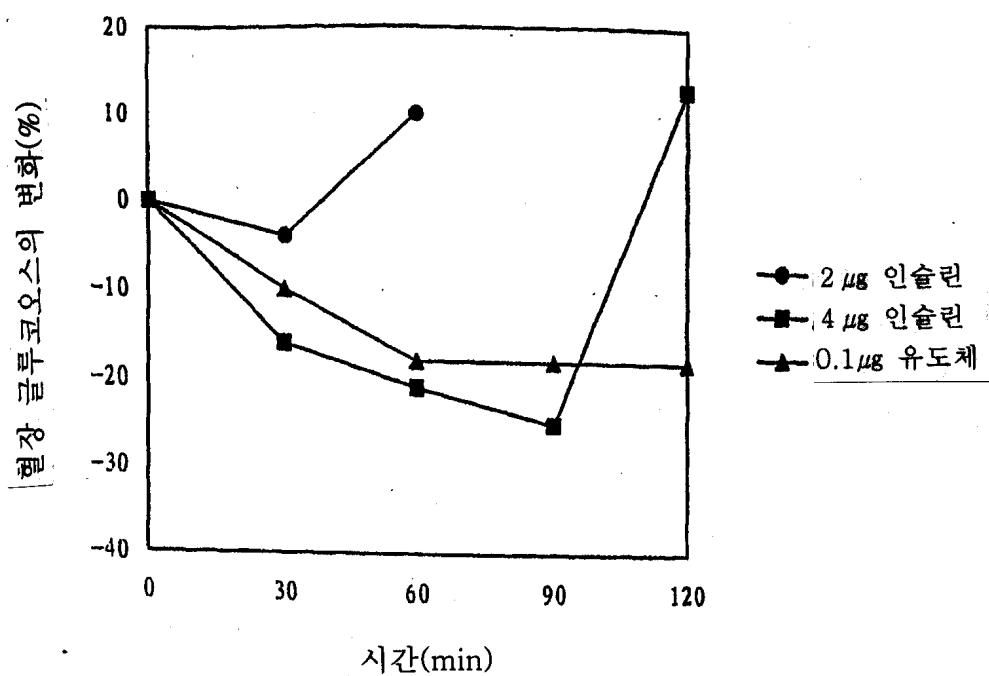
<47> 도 3은 엑센딘 4(Lys₂₀, Arg₄₀) 및 엑센딘 4(Leu₁₄, Lys₂₀, Arg₄₀)의 혈당감소효과의 실험 결과를 도식적으로 나타낸다.

<48> 도 4는 인슐린 분비에 대한 엑센딘 4(Lys₂₀, Arg₄₀)의 자극 효과의 실험 결과를 도식적으로 나타낸다.

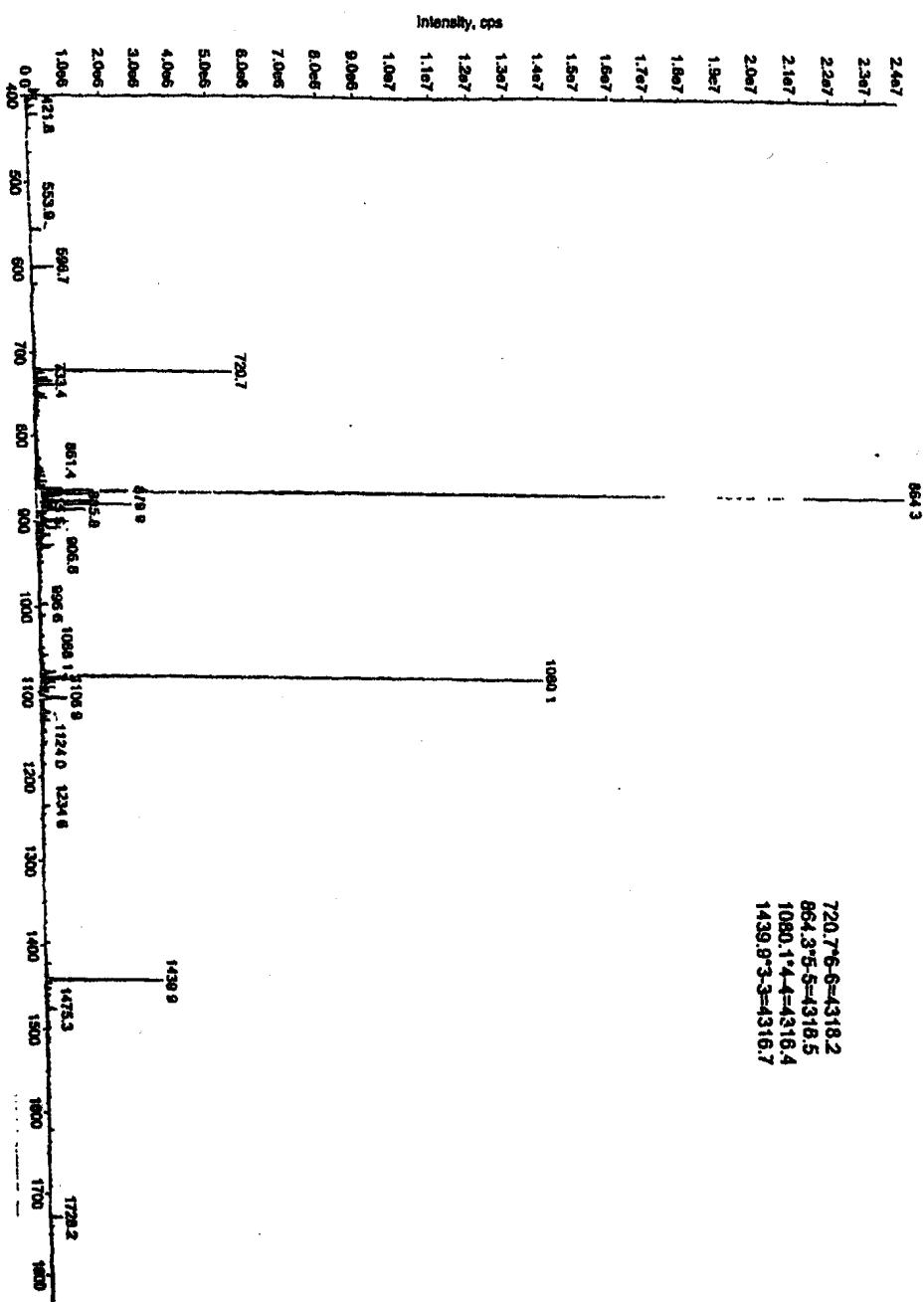
<49> 도 5는 엑센딘 4(Lys₂₀, Arg₄₀)의 C-펩티드-분비 자극 효과의 실험 결과를 도식적으로 나타낸다.

도면

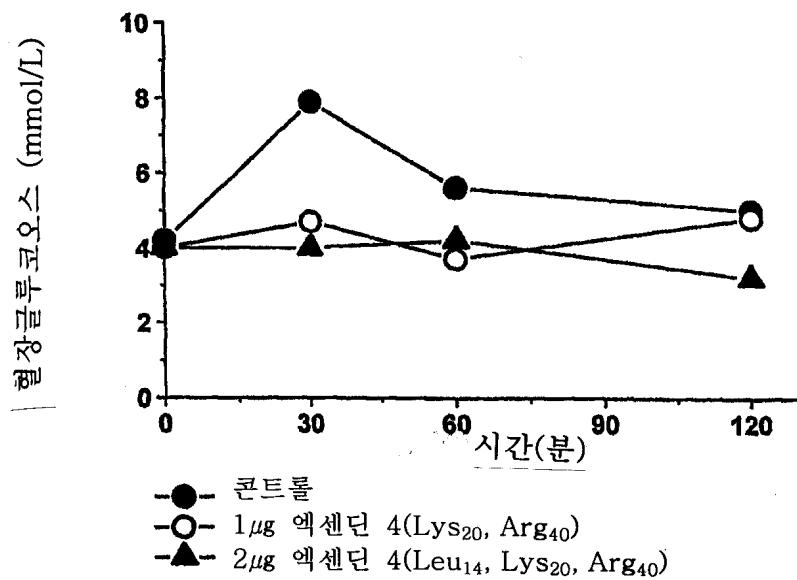
도면1



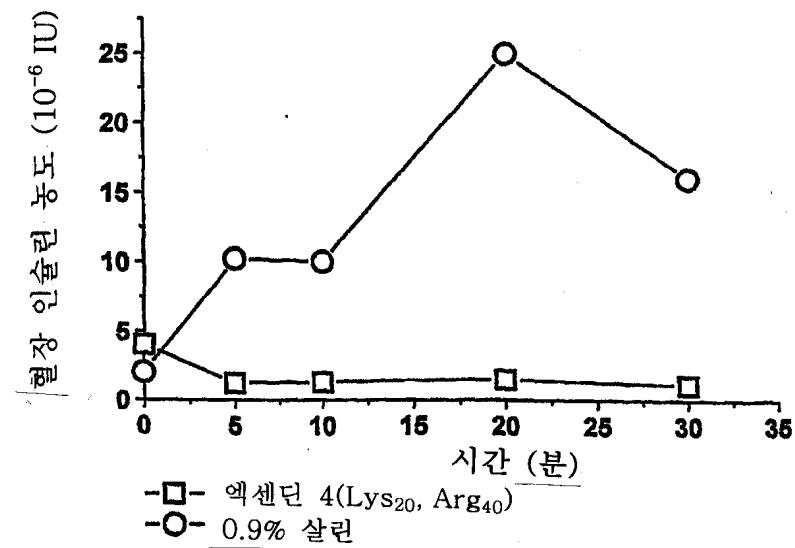
도면2



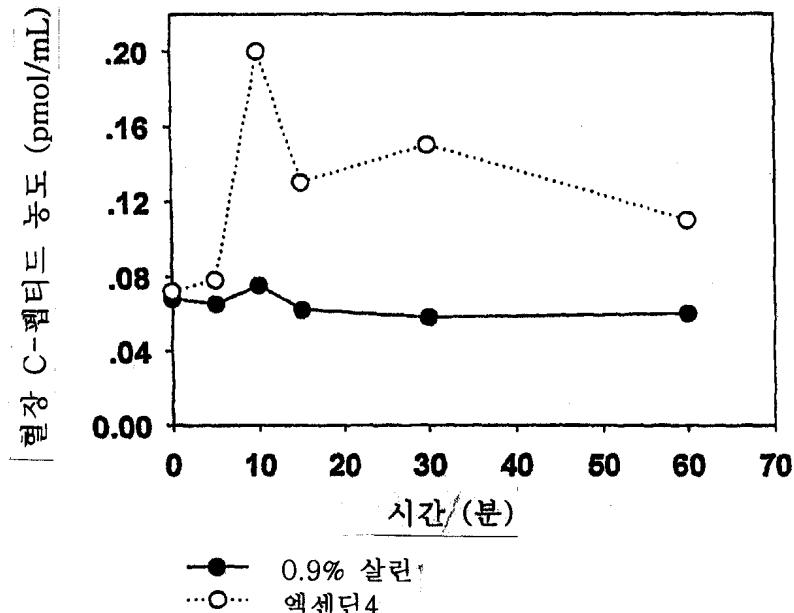
도면3



도면4



도면5



서열 목록

<110> Shanghai Huayi Bio Lab
 <120> Derivatives of exendin
 <130> IF03P064/CN
 <150> CN 01112856.9
 <151> 2001-05-10
 <160> 4
 <170> Kopatent In 1.71
 <210> 1
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Exendin 4 Analogue
 <220>

<221> VARIANT
 <222> (14)
 <223> Leu or Ile or Met
 <220>

<221> VARIANT
 <222> (20)
 <223> Arg or Lys
 <220>

<221> VARIANT
 <222> (40)
 <223> Lys
 <400> 1

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Arg Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val His Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Arg

35 40

<210> 2

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Exendin 4 Analogue

<220>

<221> VARIANT

<222> (14)

<223> Leu or Ile or Met

<220>

<221> VARIANT

<222> (20)

<223> Arg or Lys

<400> 2

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Arg Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val His Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 3

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Exendin 4 Analogue

<220>

<221> VARIANT

<222> (14)

<223> Leu or Ile

<220>

<221> VARIANT

<222> (20)

<223> Arg or Lys

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)

<223> AMIDATION,

<400> 3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Arg Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val His Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 4

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Exendin 4 Analogue

<220>

<221> VARIANT

<222> (20)

<223> Lys

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)

<223> AMIDATION,

<400> 4

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val His Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35