



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0092360  
(43) 공개일자 2012년08월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/37 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2011-0012366  
(22) 출원일자 2011년02월11일  
심사청구일자 2011년02월11일

(71) 출원인  
대구대학교 산학협력단  
경상북도 경산시 진량읍 대구대로 201 (대구대학교)  
(72) 발명자  
장세현  
서울특별시 강남구 삼성로64길 5, 현대아파트 10  
6동 603호 (대치동)  
이창우  
경상북도 경산시 하양읍 130-8번지 우방3차아파트  
102동 507호  
최말기  
경상북도 경산시 하양읍 130-8번지 우방3차아파트  
102동 507호  
(74) 대리인  
이덕록

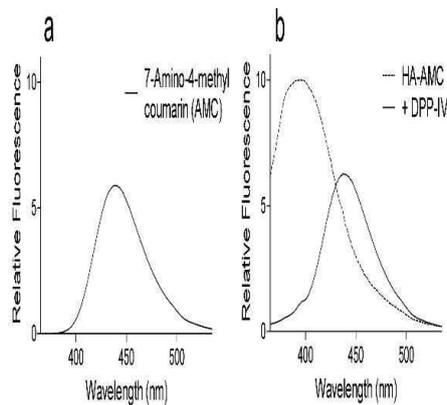
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭 DPP-IV 효소 활성 측정용 기질 및 그에 의한 효소 활성 측정 방법

(57) 요약

본 발명은 DPP-IV 효소 활성을 측정하기 위해 사용되는 7-아미노-4-메틸쿠마린(7-amino-4-methylcoumarin: AMC) 잔기가 결합된 것을 특징으로 하는 기질 및 상기 기질에 의해 DPP-IV 효소 각각의 활성을 측정하는 방법에 관한 것으로, 본 발명은 안전하면서도 민감도가 높은 기질을 사용하여 DPP-IV 효소 활성을 정확하게 측정할 수 있는 효과를 갖는다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0003845

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기초연구사업 (신진교수)

연구과제명 제2형 당뇨병에서 G 단백질 비의존적 GLP-1 수용체 신호전달연구

주관기관 대구대학교 산학협력단

연구기간 2010.05.01 ~ 2013.04.30

---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

글루카곤 유사 펩타이드-1(GLP-1)의 N-말단 다이펩타이드 His-Ala에 7-아미노-4-메틸쿠마린(AMC)이 결합된 것을 특징으로 하는, 다이펩티딜 펩티다아제-IV(DPP-IV) 효소 활성 측정용 기질.

**청구항 2**

청구항 1의 기질을 다이펩티딜 펩티다아제-IV(DPP-IV) 효소로 처리한 후의 형광 스펙트럼이 7-아미노-4-메틸쿠마린(AMC)의 본래 스펙트럼보다 청색 쪽으로 이동하는 것을 확인하는 단계 및 상기 AMC 가수분해의 초기 반응속도로부터 기질의 동역학 계수를 구하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 DPP-IV 효소 활성의 측정 방법.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 다이펩티딜 펩티다아제-IV(이하, DPP-IV' 라 함) 효소 활성 측정용 기질 및 그에 의한 DPP-IV 효소 활성 측정 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 DPP-IV 효소 활성을 측정하기 위해 사용되는 7-아미노-4-메틸쿠마린(7-amino-4-methylcoumarin: 이하, 'AMC' 라 함) 잔기가 결합된 기질 및 상기 기질에 의해 DPP-IV 효소 각각의 활성을 측정하는 방법에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 최근 몇 년동안 인간 혈청 알부민 또는 면역글로불린 중쇄 감마와 같은 거대분자를 테더링(tethering)함으로써, 순환 프로테아제에 의해 분해되기 쉬운 치료적으로 중요한 단백질의 반감기를 증가시키는 많은 융합 단백질이 바이오 의약품으로 개발되었다.

[0003] DPP-IV는 아데노신 디아미나아제 복합 단백질 2 또는 CD26 (분화 26의 클러스터)으로도 알려져 있으며, 인체에서 DPP-IV 유전자에 의해 코딩되는 단백질이다.

[0004] DPP-IV 유전자에 의해 코딩되는 단백질은 대부분의 세포 표면에 발현되는 항원성 효소이며, 면역 조절, 형질 도입 및 세포자멸사(apoptosis)에 관련된다. 이는 내인성 막 당단백질, 및 폴리펩타이드의 N-말단으로부터 X-프롤린 다이펩타이드를 절단하는 세란 엑소펩티다아제이다. 또한, 다양한 기질이 알려져 있는 효소이다. CD26/DPP-IV 기질은 프롤린(또는 알라닌)-함유 펩타이드이고, 성장 인자, 케모카인(kemokine), 뉴로펩타이드 및 혈관작용성 펩타이드를 포함한다.

[0005] 예컨대, Arg-Pro-p-nitroanilide (Sigma, A1204), Gly-Pro-4-methoxy-beta-naphthylamide (Sigma, G9137) 및 Gly-Pro-AMC (Anaspec, 24098)이 DPP-IV 효소 기질로 많이 사용되어 왔다. 또한, DPP-IV는 상기 서열 이외에 글루카곤 유사 펩타이드-1(Glucagon-like peptide-1: 이하, 'GLP-1' 이라 함) 호르몬의 N-말단 다이펩타이드 His-Ala 다음을 절단한다.

[0006] GLP-1은 창자의 L-세포로부터 생성되는 인크레틴 호르몬으로, 당-의존적 인슐린 분비, 글루카곤 분비 억제, 췌장 β-세포의 증식 및 음식 섭취 억제에서 중요한 역할을 한다. 그러나, DPP-IV 절단으로 인해 GLP-1 반감기가 짧아지므로( $t_{1/2} < 2$ 분), 인슐린-내성 제2형 당뇨병 치료에서 만족스러운만한 효과를 나타내지 못하는 문제점이 있었다.

[0007] 이를 해결하기 위해, DPP-IV에 의해 절단되지 않는 GLP-1 유사체 합성 연구가 많이 이루어졌으며, 이러한 연구 일환으로 GLP-1 서열의 아미노산을 변화시키는 연구도 이미 많이 이루어졌다. 예컨대, pSGHV0백터에서 GLP-1이 하나의 아미노산, 즉, Ala 또는 Gly로 N-말단 연장되는 GLP-1/IgG-Fc 융합물을 들 수 있다.

[0008] 본 발명자들은 이러한 GLP-1 유사체를 DPP-IV 효소 활성 측정에 이용하는 연구를 하었는데, 이는 지금까지 DPP-IV 효소 활성 측정에 사용된 Arg-Pro, Gly-Pro 서열 등을 대신하면서도 보다 만족스러운 측정 결과를 얻고자 함

이다.

[0009] 기질에 의한 효소 활성 측정과 관련하여, 대한민국 등록특허 제100736743호에 에코틴-융합단백질을 기질로 사용한 특정 기질단백질의 특이적 분해효소의 활성 측정방법이 기재되어 있고, 대한민국 등록특허 제100454903호에 엠이케이케이3 단백질 인산화효소의 기질 펩티드 및 이를 이용한 비방사성 엠이케이케이3 단백질 인산화효소활성측정법이 기재되어 있으며, 대한민국 특허출원 제10-2001-7011319호에는 펩타이드 DEVD-amc를 포함한 기질을 이용하는 막 유래된 카스파제 활성의 동정 방법이 기재되어 있고, 대한민국 특허출원 제10-2007-7027433호에는 샘플 중의 트롬빈 활성을 시험관 내에서 측정하는 방법에서 AMC(7-아미노-4-메틸쿠마린) 형광분자를 사용하는 방법이 기재되어 있다.

[0010] 그러나, 선행 기술중 어디에서도 DPP-IV 효소 활성을 측정하는데 있어서 AMC가 결합된 기질을 사용하는 것에 대하여는 전혀 기재 또는 시사되어 있지 않다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 DPP-IV 효소의 활성 측정을 위하여 사용될 수 있는 인체에 안전하면서도 민감도가 높은 기질을 제공하는데 있다.

#### 과제의 해결 수단

[0012] 또한, 본 발명에서는 GLP-1 호르몬의 N-말단 다이펩타이드 His-Ala에 AMC가 결합된 것을 특징으로 하는 DPP-IV 효소 활성 측정용 기질이 제공된다.

[0013] 또한, 본 발명에서는 상기 기질을 DPP-IV 효소로 처리한 후의 형광 스펙트럼이 AMC 본래 스펙트럼보다 청색 쪽으로 이동하는 것을 확인하는 단계 및 AMC 가수분해의 초기 반응속도로부터 기질의 동역학 계수를 구하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 DPP-IV 효소의 활성 측정 방법이 제공된다.

### 발명의 효과

[0014] 인체에 안전하면서도 민감도가 높은 본 발명의 기질을 사용하여 DPP-IV 효소 활성을 정확하게 측정할 수 있다.

#### 도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 DPP-IV 분해 어세이를 나타낸 것으로, 도 1a 및 도 1b는 각각 AMC를 DPP-IV의 존재하에서(도 1a), 또는 His-Ala(HA)-AMC를 DPP-IV의 부재(점선) 또는 존재(실선)하에(도 1b), 37°C에서 1시간동안 배양한 후에 350nm 여기시의 형광 변화를 365 내지 535 nm 사이에서 측정한 그래프이다.

#### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명에서는 GLP-1 호르몬의 N-말단 다이펩타이드 His-Ala에 AMC가 결합된 기질을 사용한다.

[0017] DPP-IV 효소는 특히 아미노산 Pro 또는 Ala의 뒤에서 기질 N-말단의 다이펩타이드를 절단하므로, His-Ala-AMC를 합성하고, 이에 대한 형광 스펙트럼을 측정한다.

[0018] DPP-IV의 형광 기질인 His-Ala-AMC의 발광 스펙트럼은 AMC의 본래 스펙트럼보다 청색 쪽으로 이동한다. 그러나, DPP-IV에 의해 His-Ala와 AMC간 펩타이드 결합이 가수분해되면 AMC의 본래 스펙트럼으로 복귀된다. 이때, AMC 가수분해의 초기 반응속도를 측정하여 기질의 동역학 계수를 얻는다.

[0019] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 하기 실시예는 예시를 위한 것이므로, 본

발명의 권리범위가 실시예에 한정되는 것이 아님이 당업자에게 명백할 것이다.

[0020] 물질

[0021] 7-아미노-4-메틸쿠마린을 시그마(Sigma, 미국 소재)로부터 구입하였다. AMC-결합된 펩타이드, 즉, His-Ala-AMC는 펩트론(Pepton: 대한민국 소재)에서 합성하였다. 다른 시약 전부는 달리 표기하지 않는 한, 시그마에서 입수하였다.

[0022] DPP-IV 효소의 활성 측정

[0023] AMC-결합된 펩타이드를 합성하고, 아세트이트 완충액을 사용하고, 동결 건조하였다. 1mM EDTA, 50mM 트리스-HCl 500  $\mu$ L중 100  $\mu$ M AMC-결합된 펩타이드 His-Ala-AMC, pH 8.0을 DPP-IV와 함께 1시간동안 37°C에서 배양하였다. AMICO-Bowman Series 2(AB2) 분광형광계를 이용하여 340nm 여기 시의 형광 변화를 365 내지 535 nm 사이에서 측정하였다. GraphPad Prism 소프트웨어를 이용하여 데이터를 도시하고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0024] AMC 자체는 340 nm에서 여기시에 440nm에서 최대 발광을 나타내었다 (도 1a). AMC-결합된 펩타이드의 형광 발광은 AMC에 비해 청색 쪽으로 이동하였다. 37°C에서 1시간동안 DPP-IV 처리한 경우에 His-Ala-AMC의 형광 발광이 AMC의 정상 스펙트럼으로 복귀되고(도 1b 참조), 이는 His-Ala 및 AMC 간의 펩타이드 결합이 DPP-IV에 의해 절단되었음을 의미한다.

[0025] 동역학 변수를 결정하기 위하여 AMC 가수분해의 초기 반응속도를 측정하였으며, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다. 유리 AMC의 양은 시간 의존적인 방식으로 일차 함수적으로 증가한다. 라인웨버-버크 도면(Lineweaver-Burk plot)에서 수득된 미카엘리스-멘텐(Michaelis-Menten) 상수를 측정한 후에 라인위버-버크 식에 정합(fit)시켰다. 모든 실험은 3회 반복하였다.

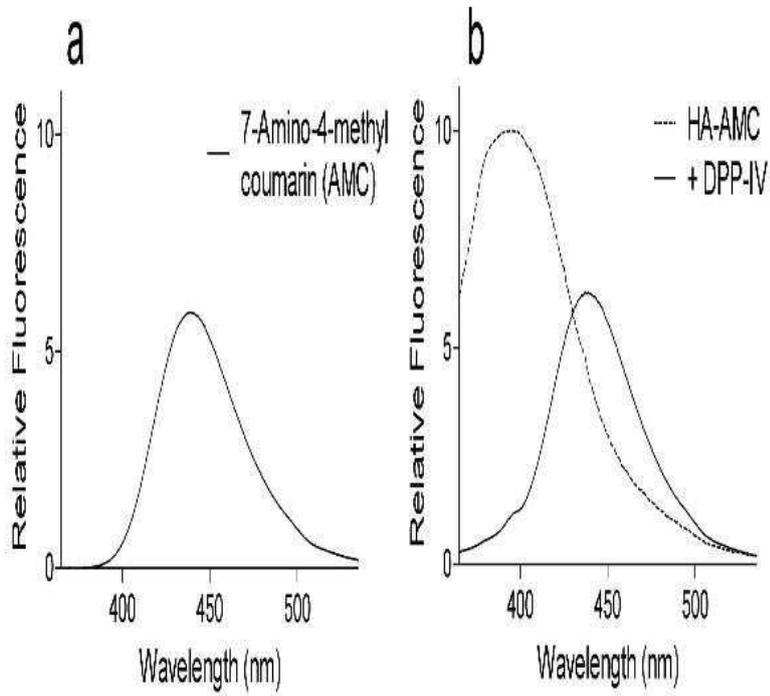
**표 1**

[0026] His-Ala-AMC에 대한 DPP-IV의 동역학 변수

	$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_{cat}/K_M$ ( $s^{-1}M^{-1}$ )
His-Ala-AMC	$86.2 \pm 4.7$	0.8	9,300

도면

도면1



도면2

