



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년07월28일

(11) 등록번호 10-2282240

(24) 등록일자 2021년07월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/605 (2006.01) *A23L 33/18* (2016.01)
A61K 38/26 (2006.01) *A61K 47/64* (2017.01)
A61K 47/68 (2017.01) *A61P 25/18* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 14/605 (2013.01)
A23L 33/18 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2019-0153065

(22) 출원일자 2019년11월26일

심사청구일자 2019년11월26일

(65) 공개번호 10-2020-0069225

(43) 공개일자 2020년06월16일

(30) 우선권주장
1020180155957 2018년12월06일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌

JP2016188225 A*

US20140170142 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 경상국립대학교산학협력단
 경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자
 노구섭
 경상남도 진주시 가좌안골길21번길 5, 102동 701호 (가좌동, 가좌제일풍경채)

신명철
 경상남도 창원시 성산구 동산로 115, 120동 306호 (상남동, 대동아파트)
 (뒷면에 계속)

(74) 대리인
 이치영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 12 항

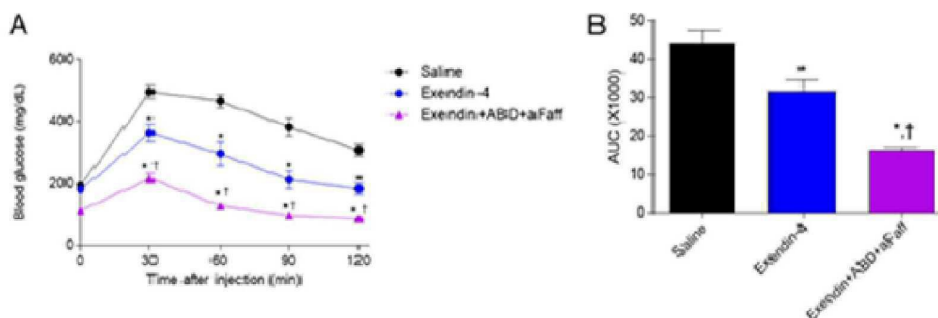
심사관 : 이형준

(54) 발명의 명칭 지속형 엑센딘-4 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 엑센딘-4(exendin-4)에 알부민 결합 도메인(ABD)과 항-FcRn 아피바디(affibody)가 융합되어 있는 지속형 엑센딘-4 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명에 따른 지속형 엑센딘-4는 종래 당뇨 치료제로 사용하던 엑센딘-4에 비해 생체 내 반감기가 획기적으로 증가하였고, 그 결과 엑센딘-4의 종래 용도인 당뇨 치료제로서 뿐만 아니라, 비만 및 지방간 등과 같은 기타 대사성질환 및 당뇨 합병증 치료 효과, 대사 질환에 의해 야기되는 인지장애질환에 대한 개선 효과를 동시에 발휘하는 특징이 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 38/26 (2013.01)
A61K 47/643 (2017.08)
A61K 47/6811 (2017.08)
A61P 25/18 (2018.01)
C07K 16/283 (2013.01)
C12N 15/70 (2013.01)
C07K 2318/00 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)
C07K 2319/31 (2013.01)

박태훈

경상남도 진주시 초전북로 20, 905호 (초전동, 초전일동아파트)

(72) 발명자

이종율

경상남도 합천군 가야면 황산1길 69-15 (황산리)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2015R1A5A2008833
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	선도연구센터지원사업/기초의과학분야
연구과제명	바이오항노화 의과학연구센터
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경상대학교
연구기간	2015.10.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 엑센딘-4(exendin-4)에 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 알부민 결합 도메인(ABD)과 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시되는 항-FcRn 아피바디(affibody)가 융합되어 있는 지속형 엑센딘-4.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 엑센딘-4와 알부민 결합 도메인, 알부민 결합 도메인과 항-FcRn 아피바디는 각각 펩티드 링커로 연결된 것을 특징으로 하는 지속형 엑센딘-4.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 펩티드 링커는 (GGGGS)₄의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 지속형 엑센딘-4.

청구항 5

제1항, 제3항 및 제4항 중 어느 한 항의 지속형 엑센딘-4를 유효성분으로 포함하는 대사성 질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 대사성 질환은 당뇨, 지방간 및 비만으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 질환인 것을 특징으로 하는 대사성 질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항, 제3항 및 제4항 중 어느 한 항의 지속형 엑센딘-4를 유효성분으로 포함하는 대사성 질환 예방 또는 개선용 식품용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 대사성 질환은 당뇨, 지방간 및 비만으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 질환인 것을 특징으로 하는 식품용 조성물.

청구항 9

서열번호 4의 염기서열로 표시되는 엑센딘-4(exendin-4)를 코딩하는 핵산, 서열번호 5의 염기서열로 표시되는 알부민 결합 도메인(ABD)을 코딩하는 핵산 및 서열번호 6의 염기서열로 표시되는 항-FcRn 아피바디를 코딩하는 핵산을 포함하는 제조법 벡터.

청구항 10

삭제

청구항 11

제9항의 재조합 벡터가 도입된 지속형 엑센딘-4 생산용 재조합 미생물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 재조합 미생물은 대장균인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 13

제1항, 제3항 및 제4항 중 어느 한 항의 지속형 엑센딘-4를 유효성분으로 포함하는 인지 장애 질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 14

제1항, 제3항 및 제4항 중 어느 한 항의 지속형 엑센딘-4를 유효성분으로 포함하는 인지능력 개선용 식품용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 지속형 엑센딘-4 및 이의 용도에 관한 것으로, 더 상세하게는 엑센딘-4(exendin-4)에 알부민 결합 도메인(ABD)과 항-FcRn 아피바디(affibody)가 융합되어 있는 지속형 엑센딘-4 및 이의 당뇨, 지방간 및 비만 등의 대사성질환 및 인지장애질환의 치료, 개선 및 예방 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 엑센딘-4는 힐라 몬스터(Gila monster, Heloderma suspectum)의 침샘에 의해 생성되는 39개 아미노산 펩타이드이다. 엑센딘-4는 글루카곤 유사 펩타이드-1(glucagon like peptide-1, GLP-1) 수용체의 활성화인자이나, 글루카곤 수용체를 의미 있게 활성화하지는 않는다. 엑센딘-4는 GLP-1에서 관찰되는 혈당조절 작용의 대부분을 공유한다. 임상연구와 비임상연구는 엑센딘-4가 글루코오스 의존성 인슐린 합성 및 분비의 증진, 글루코오스 의존성 글루카곤 분비의 억제, 위 배출의 둔화, 식품 섭취 및 체중 감량 및 베타 세포 질량의 증가 및 베타 세포 기능을 나타내는 마커들의 증가를 포함하는 여러 가지 유익한 항당뇨 성질을 나타낸다는 점을 보여준 바 있다(대한민국 공개특허 10-2015-0064093). 2005년 Eli Lilly 및 Emily pharmaceutical companies는 합성 엑센딘-4인 Byetta[®]를 개발하고, 당뇨병 치료제로 승인받았으나, 엑센딘-4의 작은 분자량으로 콩팥에서 급속히 제거되어 GLP-1R을 장기간 자극할 수 없어, 효과적인 치료 효과를 달성하기 위해서는 1일 2회 투여가 필요하여 치료제로서의 편리성에 많은 문제점을 안고 있었다.

[0004] 따라서, 1형 당뇨와 2형 당뇨의 치료 효과를 개선하기 위해서는 지속형 엑센딘-4의 개발이 요구되었고, 많은 제약회사에서는 엑센딘-4의 분자적 구조를 바꾸어 저혈당증 중에 체내에 지속시간을 증가시키는 연구를 진행하였다. 예를 들어, WO 2011/153965에서는 엑센딘-4에 인간 IgG2의 Fc 부위를 연결 펩타이드로 부착하여 체내 반감기를 증가시키고자 하였으며, 대한민국 공개특허 10-2018-0090750에서는 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 면역글로불린 Fc를 폴리에틸렌 글리콜을 통해 연결시킨 지속형 엑센딘-4를 제안한 바 있다.

[0005] GLP-1 수용체 작용제는, 설치류에서 인지 기능을 향상시킬 수 있고, GLP-1 수용체 녹아웃 마우스는, 해마 GLP-1 수용체 유전자 전이 후에 저장되는 학습 결핍증을 특징으로 하는 표현형을 갖는다. 최근, 이삭슨(Isacson) 등은, 성체 설치류에서 해마-관련 인지 및 기분-관련 행동에 대한 만성 엑센딘-4 치료의 효과를 밝혔다. 다른 연구에서, 당뇨병의 마우스 모델의 배근신경절에서 발견되는 다발성 신경병증은 엑센딘-4에 의해 역전되었다. 다른 GLP-1 유사체, 리라글루타이드가, 고지방 식이-유도된 비만 및 인슐린내성을 앓고 있는 마우스에서 인지 기능 및 해마 시냅스 가소성에 대해 이로운 효과를 발휘하는 것이 밝혀졌다(대한민국 공개특허 10-2014-0071350).

[0006] 그러나, 상기와 같은 지속형 엑센딘-4의 반감기는 여전히 짧아, 추가로 연장된 반감기를 갖고, 이와 더불어 항당뇨 효과뿐 아니라 항비만, 지방간 개선 및 인지장애 개선 등 대상증후군의 모든 합병증 개선이 가능한 치료제의 개발이 필요하다. 이에 본 발명자들은 기존의 지속형 제제들 보다 혈중 반감기가 현저히 연장된 엑센딘-4를 개발하였으며, 이렇게 개발된 지속형 엑센딘-4는 당뇨를 비롯한 당뇨의 합병증인 지방간, 비만 등의 대사질환을 동시에 해결할 수 있고, 인지 장애 개선에 효과를 나타내는 치료제로서 개발이 가능함을 동물실험을 통해 입증하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 10-2015-0064093
- (특허문헌 0002) 국제공개특허 2011/153965
- (특허문헌 0003) 대한민국 공개특허 10-2018-009075
- (특허문헌 0004) 대한민국 공개특허 10-2014-0071350

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 체내 반감기가 증가된 지속형 엑센딘-4를 제공하고, 이의 대사성질환 및 인지장애질환의 치료, 예방 및 개선 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 엑센딘-4(exendin-4)에 알부민 결합 도메인(ABD)과 항-FcRn 아피바디(affibody)가 융합되어 있는 지속형 엑센딘-4를 제공한다.
- [0011] 본 발명은 또한, 상기 지속형 엑센딘-4를 유효성분으로 포함하는 대사성 질환 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0012] 본 발명은 또한, 상기 지속형 엑센딘-4를 유효성분으로 포함하는 대사성 질환 예방 또는 개선용 식품용 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한, 엑센딘-4(exendin-4)를 코딩하는 핵산, 알부민 결합 도메인(ABD)을 코딩하는 핵산 및 항-FcRn 아피바디(affibody)를 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한, 상기 재조합 벡터가 도입된 지속형 엑센딘-4 생산용 재조합 미생물을 제공한다.
- [0015] 본 발명은 또한, 상기 지속형 엑센딘-4를 유효성분으로 포함하는 인지 장애 질환 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한, 상기 지속형 엑센딘-4를 유효성분으로 포함하는 인지능력 개선용 식품용 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한 상기 지속형 엑센딘-4를 이를 필요로 하는 객체에 투여하는 단계를 포함하는 대사성질환 치료, 예방 또는 개선 방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명은 또한 상기 지속형 엑센딘-4를 이를 필요로 하는 객체에 투여하는 단계를 포함하는 인지장애의 치료 또는 예방 방법, 또는 인지능력의 개선 방법을 제공한다.
- [0019] 본 발명은 또한 상기 지속형 엑센딘-4를 이를 필요로 하는 객체에 투여하는 단계를 포함하는 인지능력 개선 방법을 제공한다.
- [0020] 본 발명은 또한, 대사성질환의 치료, 예방 또는 개선에 사용하기 위한 상기 지속형 엑센딘-4의 용도를 제공한다.
- [0021] 본 발명은 또한, 인지 장애의 치료 또는 예방, 인지능력의 개선에 사용하기 위한 상기 지속형 엑센딘-4의 용도를 제공한다.
- [0022] 본 발명은 또한, 대사성질환의 치료, 예방 또는 개선을 위한 약제의 제조를 위한 지속형 엑센딘-4의 용도를 제공한다.
- [0023] 본 발명은 또한, 인지장애의 치료 또는 예방, 또는 인지능력의 개선을 위한 약제의 제조를 위한 지속형 엑센딘-4의 용도를 제공한다.

발명의 효과

[0025] 본 발명에 따른 지속형 엑센딘-4는 종래 당뇨 치료제로 사용하던 엑센딘-4에 비해 생체 내 반감기가 획기적으로 증가하였고, 그 결과 엑센딘-4의 종래 용도인 당뇨 치료제로서 뿐만 아니라 비만 및 지방간 등과 같은 기타 대사성질환 및 당뇨 합병증에도 동시에 그 효과를 나타내고, 대사 질환에 의해 야기되는 인지장애 질환에 대한 개선 효과도 발휘하는바, 당뇨 및 기타 대사성질환, 인지장애질환 환자의 치료 및 개선, 예방 용도로 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 Exendin-4-ABD-aFaff, Exendin-4, Exendin-4-aFaff와 Exendin-ABD의 발현을 위해 pET28a 플라스미드에 삽입된 부분의 모식도이다.

도 2는 Exendin-4-ABD-aFaff, Exendin-4, Exendin-4-aFaff와 Exendin-ABD의 발현을 쿠마시 염색하여 확인한 결과이다.

도 3은 Exendin-4-ABD-aFaff와 Exendin-4 단회투여에 따른 단기 혈당량 변화를 시간별로 관찰하고(A), 이의 곡선하면적을 나타낸 결과이다(B).

도 4는 Exendin-4-ABD-aFaff와 Exendin-4 단회투여에 따른 장기 혈당량 변화를 시간별로 관찰하고(A), 이에 따른 체중변화를 관찰한 결과이다(B).

도 5는 Exendin-4, Exendin-4-ABD-aFaff, Exendin-4-ABD와 Exendin-4-aFaff 단회투여에 따른 장기 혈당량 변화를 시간별로 비교하고(A), 이에 따른 체중변화를 비교한 결과이다(B).

도 6은 고지방식이 또는 정상식이 마우스에서 Exendin-4-ABD-aFaff와 Exendin-4 투여 농도에 따른 혈당량 변화(A) 및 혈중 인슐린 변화를 관찰한 결과이다(B).

도 7은 Exendin-4-ABD-aFaff와 Exendin-4 투여 농도에 따른 당부하검사 및 인슐린부하검사 결과를 나타낸다.

도 8은 Exendin-4-ABD-aFaff와 Exendin-4 투여 농도에 따른 간 효소 수치인 ALT(A) 및 AST(B)의 변화를 분석한 결과이다.

도 9는 Exendin-4-ABD-aFaff와 Exendin-4 투여 농도에 따른 간 세포내 지방 축적을 H&E 염색 및 Nile Red 형광 염색으로 관찰한 결과이다.

도 10은 Exendin-4-ABD-aFaff와 Exendin-4 투여 농도에 따른 간 크기 및 무게 변화를 정량적(A) 또는 육안으로(B) 관찰한 결과이다.

도 11은 Exendin-4-ABD-aFaff와 Exendin-4 투여 농도에 따른 지방증(steatosis), 간소엽염증(lobular inflammation), 간세포풍선변성(hepatocellular ballooning)의 비알코올성지방간질환(Nonalcoholic Fatty Liver Disease) 활성도 점수(activity score)를 측정된 결과이다.

도 12는 Exendin-4-ABD-aFaff와 Exendin-4 투여 농도에 따른 식욕 감소(A) 및 몸무게 감소(B) 효과를 관찰한 결과이다.

도 13은 Exendin-4-ABD-aFaff와 Exendin-4 투여 농도에 따른 혈액내 총 콜레스테롤 수치 변화를 관찰한 결과이다.

도 14는 Exendin-4-ABD-aFaff와 Exendin-4 투여 농도에 따른 배안의 창자간막지방(내장지방)무게를 관찰한 결과이다.

도 15는 Exendin-4-ABD-aFaff 투여에 따른 인지능력 개선 효과를 모리스 수중 미로 실험으로 관찰한 결과이다.

도 16은 Exendin-4-ABD-aFaff (E-ABD-affibody)의 약동학적 특성을 exendin-4 (Exendin), exendin-4-aFaff (E-affibody), exendin-4-ABD (E-ABD)와 비교한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서

사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

- [0030] 본 발명에서는 당뇨병 치료제로 사용되는 엑센딘-4의 짧은 반감기로 잦은 투여가 요구되는 종래 치료제의 문제 점을 개선하기 위해, 엑센딘-4의 생체 내 반감기를 증가시키고자 하였으며, 엑센딘-4에 알부민 결합 도메인과 항-FcRn 아피바디(affibody)가 융합되는 경우, 엑센딘-4의 생체 내 반감기가 획기적으로 증가되는 것을 확인하였다.
- [0031] 따라서, 본 발명은 일 관점에서 엑센딘-4(exendin-4)에 알부민 결합 도메인(ABD)과 항-FcRn 아피바디(affibody)가 융합되어 있는 지속형 엑센딘-4에 관한 것이다.
- [0032] 본 발명은 알부민에 높은 결합력을 가진 알부민 결합 도메인(ABD)을 엑센딘-4에 융합하고, 인간 FcRn에 높은 결합력을 가지는 아피바디(affibody) 분자를 추가로 융합하여 혈관내피세포 내 엑센딘-4의 분해를 효과적으로 억제하므로써 극도로 증대된 반감기를 갖는 엑센딘-4-알부민 결합 도메인-항-FcRn 아피바디(affibody) 융합 단백질(이하, '지속형 엑센딘-4'로 칭한다.)을 포함한다. 본 발명에 따른 지속형 엑센딘-4는 혈중 반감기가 바람직 하게는 3일 이상, 더 바람직하게는 4일 이상, 더 바람직하게는 5일 이상, 더 바람직하게는 6일 이상인 것을 특징으로 한다.
- [0033] 본 발명에 있어서, 상기 지속형 엑센딘-4를 구성하는 엑센딘-4는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되고, 알부민 결합 도메인은 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되며, 항-FcRn 아피바디(affibody)는 서열번호 3이 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0034] Exendin-4(서열번호 1)
- [0035] HGGGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
- [0036] ABD(서열번호 2)
- [0037] LKEAKEKAIEELKKAGITSDYYFDLINKAKTVEGVNALKDEILKA
- [0038] 항-FcRn 아피바디(affibody)(서열번호 3)
- [0039] VDAKYAKEFESAAHEIRWLPNLTQDQVAFIHKLSDDPSQSSELLSEAKKLNSQAPK
- [0041] 그러나, 상기 기재한 서열 외에도 또 다른 양태로서, 알부민 결합 도메인은 streptococcal protein G과 특히 이 중 G148-GA3 domain을 기반으로 아미노산의 서열을 조금씩 바꾼 다양한 알부민 결합 도메인을 본 발명에 적용할 수 있으며, 그 일례로서 하기와 같은 알부민 결합 도메인을 활용할 수도 있을 것이다.
- [0042] 다른 양태의 ABD (ABD 035) (서열번호 7)
- [0043] LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP
- [0044] 또 다른 양태로서, 항-FcRn 아피바디(affibody)는 다음과 같은 서열이 본 발명에 활용될 수 있으며, 이밖에도 다른 양태의 항-FcRn 아피바디(affibody)가 본 발명에 활용될 수 있을 것이다.
- [0045] 다른 양태의 항-FcRn 아피바디(affibody)(서열번호 8)
- [0046] VDAKYAKEQDAAAHEIRWLPNLTFDQVAFIHKLADDPQSSELLSEAKKLNSQAPK
- [0047] 또 다른 양태의 항-FcRn 아피바디(affibody)(서열번호 9)
- [0048] VDAKYAKEWMRAAHEIRWLPNLTFDQVAFIHKLEDDPSQSSELLSEAKKLNSQAPK
- [0049] 한편, 본 기술분야에서 통상의 기술을 가진 자는 본 발명의 기술적 특징이 유지되는 범위 내에서 해당 서열을 균등한 범위로 변형하여 적용할 수 있음은 당업자에게 자명하다.
- [0051] 본 발명에 있어서, 엑센딘-4와 알부민 결합 도메인, 알부민 결합 도메인과 항-FcRn 아피바디(affibody)는 각각 펩티드 링커로 연결된 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 펩티드 링커는 이에 한정되는 것으로 아니나, (GGGS)₄의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0053] 한편, 본 발명에서는 본 발명에 따른 지속형 엑센딘-4의 혈당 조절 기능이 1회 투여로 12일 이상 지속되는 것을 확인하였으며, 이에 본 발명의 지속형 엑센딘-4는 용량에 따라 일주 내지 이주체형으로 활용이 가능함을 알 수 있었다. 또한, 매주 1회의 주사로 10주 동안 약물 투여시, 간 효소 수치를 정상화하고 지방간 개선 효과를 나타 내고, 체내 콜레스테롤을 감소시키며 몸무게 감소 효과를 발휘함과 동시에 인지장애 개선 등과 같은 대상증후군

의 모든 합병증이 개선됨을 확인하였다.

- [0054] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서 상기 지속형 액센딘-4를 유효성분으로 포함하는 대사성질환 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0055] 본 발명에 있어서, 상기 대사성질환은 이에 한정되지는 않으나, 당뇨, 지방간 및 비만으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 질환인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0056] 즉, 본 발명은 고혈당증, 제2형 당뇨병, 글루코오스 내성 손상(IGT), 제1형 당뇨병, 비만, 대사증후군, 제2형 당뇨병에서의 질병 진행의 지연 또는 예방, 대사 증후군 치료, 비만 치료 또는 과체중 예방, 식품 섭취 감소, 에너지 소비 증가, 체중 감소, 글루코오스 내성 손상으로부터 제2형 당뇨병으로의 진행 지연; 제2형 당뇨병으로부터 인슐린 필요성 당뇨병으로의 진행 지연; 식욕 조절; 포만감 유도; 성공적인 체중 감량 후 체중 회복 방지; 과체중 또는 비만과 관련된 질병 또는 상태 치료; 식욕 이상 항진증 치료; 폭식증 치료; 제2형 당뇨병, IGT, 이상지질혈증, 관상 동맥성 질병, 간 지방증 치료, 저혈당증, 인슐린 유도성 저혈당증, 반응성 저혈당증, 당뇨병성 저혈당증, 비 당뇨병성 저혈당증, 단식, 저혈당증, 약물 유도성 저혈당증, 위장 접합술에 의해 유도된 저혈당증, 임신 중 저혈당증, 알코올 유도성 저혈당증, 인슐린종 및 폰 기에르케 병의 치료 또는 예방 용도로 사용될 수 있다.
- [0057] 또한, 본 발명에서는 고지방식이에 의해 대사성질환이 발병한 쥐의 인지 능력이 저해되었으나, 본 발명에 따른 지속형 액센딘-4를 투여하는 경우, 이러한 인지 능력 저해 현상이 현저히 개선되는 것을 확인하였다.
- [0058] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서 상기 지속형 액센딘-4를 유효성분으로 포함하는 인지 장애 질환 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0059] 본 발명에서 인지장애질환이란, 대사성 질환에 의해 발병하는 경도인지기능장애(mild cognitive impairment), 혈관성 치매, 알츠하이머병과 같은 퇴행성뇌질환인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0061] 본 발명의 약학적 조성물은 지속형 액센딘-4 또는 그의 약제학적으로 허용 가능한 담체 혹은 매체와 조합될 수 있는 조성물로 제공될 수 있다. 이용되는 담체 혹은 매체는 용매, 분산제, 코팅, 흡수 촉진제, 제어된 방출제(즉, 서방제), 및 1종 이상의 불활성 부형제(전분, 폴리올, 과립제, 극미세 셀룰로스(microfine cellulose), 미세결정형 셀룰로스(예컨대, 셀피어, 셀피어 비즈(Celphere beads), 희석제, 운활제, 결합제(binder), 붕해제 등을 포함함) 등을 포함할 수 있다. 필요한 경우, 개시된 조성물의 정제 제형은 표준 수성 혹은 비수성 수법에 의해 코팅될 수도 있다. 약제학적으로 허용가능한 담체 및 약제학적으로 허용가능한 불활성 담체로서 이용하기 위한 부형제 그리고 상기 추가의 성분의 예로는, 결합제, 충전제, 붕해제, 운활제, 향미생물제 및 코팅제를 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0062] 허용 가능한 약학적 담체 또는 매체는 경구, 직장, 비강 또는 (피하, 근육 내, 정맥 내, 피내, 및 경피를 포함하는) 비경구 투여에 적합한 제형에 사용되는 것들을 포함한다. 본 발명의 화합물은 전형적으로 비경구적으로 투여될 것이다.
- [0063] 상기 '치료'란, 달리 언급되지 않는 한, 상기 용어가 적용되는 질환 또는 질병, 또는 상기 질환 또는 질병의 하나 이상의 증상을 역전시키거나, 완화시키거나, 그 진행을 억제하거나, 또는 예방하는 것을 의미하며, 본 발명에서 '치료하는'이란 용어는 '치료'가 상기와 같이 정의될 때 치료하는 행위를 말한다.
- [0064] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 지속형 액센딘-4를 유효량 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다.
- [0065] 본 발명에서, 용어 "유효량(또는, 유효한 양)"은 바람직한 효과를 전달하기에는 매우 충분하지만 의학적 판단 범위 내에서 심각한 부작용을 충분히 방지할 정도로 적은 양을 의미한다. 본 발명의 조성물에 의하여 체내에 투여되는 지속형 액센딘-4의 양은 투여 경로, 투여 대상을 고려하여 적절하게 조정될 수 있다.
- [0067] 본 발명의 동물실험에 기초한 일 양태로서 마우스 일회 복강투여량은 50nmol/kg 의 경우 1.6 mg/kg와 200nmol/kg 의 경우 6.4 mg/kg과 같다.
- [0068] 상기 실험 결과를 최적제형 개발시 사용하는 당업계의 공식에 적용하면, 본 발명의 치료적 유효량(예를 들어 경구 투여를 위한 유효량)은 60 kg 성인을 기준으로 하기의 수식으로 계산될 수 있다.
- [0069] (1.6mg or 6.4mg) * 0.08(마우스 체표면적 환산지표)*60 (60kg성인기준)

- [0070] = 7.68 or 30.72mg/day/60 kg성인 (1회 투여로 약 2주일 효과)
- [0071] 본 발명의 조성물은 대상 개체 및 투여용량에 따라 7일 내지 14일에 한 번 투여될 수 있다. 단위 투여량은 사람 피험자 및 다른 포유동물을 위한 단위 투여에 적합하게 물리적으로 분리된 단위를 의미하며, 각 단위는 적절한 약제학적 담체를 포함하며 치료 효과를 나타내는 본 발명의 지속형 엑센딘-4의 예정된 양을 함유한다. 본 발명의 조성물 경구 투여량은 일회에 0.0001 내지 10g, 바람직하게는 0.001 내지 5 g이다. 본 발명의 경구 투여를 위한 지속형 엑센딘-4의 약학적 유효량은 0.0001 내지 10 g/1일이다. 한편, 종래 단백질 치료제로서 바이에터 (Byetta)의 피하주사제로의 투여량이 1일 2회 5 ug 또는 10 ug로 약 12주간 투여한다. 이 점을 감안할 때, 본 발명의 1회 피하 주사 투여량은 0.1 ug 내지 100ug, 바람직하게는 1 ug 내지 20ug로 예측된다. 본 발명에 따른 상기와 같은 투여 용량으로는 주 1회 내지 2주 1회 투여가 가능할 것이다. 그러나, 투여량은 환자의 대사 또는 인지 능력 관련 질환의 심각도 및 사용되는 보조 유효 성분에 따라 가변적이다. 본 발명의 투여량 범위는 어떠한 방식으로도 본 발명의 범위를 제한하지 아니한다.
- [0073] 또한, 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다.
- [0074] 본 발명의 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화 될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴캡셀, 멸균 주사용액, 멸균 분말의 형태일 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 대사 또는 인지능력 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 활성 성분의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있고, 본 발명에 따른 대사 및/또는 인지능력 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 대사 및/또는 인지능력 관련 질환의 증상을 예방, 개선 또는 치료하는 효과를 가지는 공지의 화합물과 병행하여 투여할 수 있다.
- [0076] 본 발명은 또 다른 관점에서 대사 관련 질환 및/또는 인지장애질환의 예방 또는 치료에 사용되기 위한 상기 지속형 엑센딘-4의 용도에 관한 것이다.
- [0077] 본 발명에서, 용어 '예방'은 질병을 축소시키는 방지(averting), 지연(delaying), 방해(impeding) 또는 저해(hindering)와 관련된 것이다.
- [0078] 본 발명에서, 용어 '치료'는 질병의 증상을 개선, 치유 또는 감소 또는 질병의 진행을 감소 또는 정지시키기 위해 질병에 걸린 피험자를 돌보는 것과 관련된 것이다.
- [0079] 본 발명은 또 다른 관점에서 약학적 유효량의 상기 지속형 엑센딘-4를 대사 관련 질환 및/또는 인지장애질환의 예방 또는 치료나, 대사 건강 및/또는 인지능력의 개선이 요구되는 객체(subject)에 투여하는 단계를 포함하는 대사 관련 질환 및/또는 인지장애 질환의 예방, 치료, 또는 개선 방법에 관한 것이다.
- [0080] 상기 대사 관련 질환 및/또는 인지장애질환의 예방 또는 치료방법에 사용되는 약학적 조성물 및 투여 방법은 상기에서 설명하였으므로, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [0081] 한편, 상기 대사 관련 질환 및/또는 인지 장애 질환 예방 또는 치료용 조성물을 투여할 수 있는 개체는 인간을 비롯한 모든 동물을 포함한다. 예를 들어, 개, 고양이, 마우스와 같은 동물일 수 있다.
- [0082] 본 발명은 또 다른 관점에서, 대사성질환의 치료, 예방 또는 개선을 위한 약제의 제조를 위한 지속형 엑센딘-4의 용도에 관한 것이다.
- [0083] 본 발명은 또 다른 관점에서, 인지장애의 치료, 예방 또는 인지능력의 개선을 위한 약제의 제조를 위한 지속형 엑센딘-4의 용도에 관한 것이다.
- [0084] 본 발명은 또 다른 관점에서, 본 발명에 따른 지속형 엑센딘-4를 유효성분으로 포함하는 대사성질환 예방 또는 개선 식품용 조성물에 관한 것이다.
- [0085] 본 발명에 있어서, 이에 한정되지는 않으나, 상기 대사성질환은 당뇨, 지방간 및 비만으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 질환인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0086] 본 발명은 또 다른 관점에서, 본 발명에 따른 지속형 엑센딘-4를 유효성분으로 포함하는 인지능력 개선용 식품

용 조성물에 관한 것이다.

- [0087] 상기 인지능력이란, 이해력, 사고력, 기억력, 판단력 등 지식을 획득하고 사용하는 방식에 관한 능력을 의미한다.
- [0088] 상기 식품용 조성물은 이에 한정되지는 않으나, 비만, 지방간, 당뇨 등 대사 관련 질환의 개선, 예방 및/또는 인지능력 개선에 효과를 나타내도록, 예컨대, 식품의 주원료, 부원료, 식품 첨가제, 또는 기능성 음료로 용이하게 활용할 수 있다.
- [0089] 상기 식품이란, 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 식품, 식품 첨가제, 건강기능식품 및 기능성 음료를 모두 포함하는 것을 말한다.
- [0090] 본 발명에 따른 상기 식품용 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본원발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 목류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 빵류, 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스낵류), 캔디류, 초코렛류, 껌류, 아이스크림류, 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과일 음료, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등)를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.
- [0091] 상기 건강기능식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체내조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다. 상기 기능성 식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0092] 본 발명에서 상기 기능성 음료란 감증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며, 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 대사 관련 질환 및/또는 인지 장애 증상의 개선 또는 예방용 조성물을 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0093] 나아가 상기 기술한 것 이외에 본 발명의 대사 질환 및/또는 인지 장애 증상의 개선 또는 예방을 위한 식품용 조성물을 함유하는 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 향진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있으며, 상기 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0094] 본 발명의 식품용 조성물을 함유하는 식품에 있어서, 상기 본 발명에 따른 조성물의 양은 전체 식품 중량의 0.001중량% 내지 100중량%로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 1중량% 내지 99중량%로 포함할 수 있고, 음료의 경우, 100ml를 기준으로 0.001g 내지 10g, 바람직하게는 0.01g 내지 1g의 비율로 포함할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효 성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있으므로 상기 범위에 한정되는 것은 아니다.
- [0095] 본 발명의 식품용 조성물은 상기 지속형 엑센딘-4를 독립적으로 또는 허용 가능한 담체에 첨가하거나, 인간 또는 동물이 섭취하기에 적합한 조성물 형태로 제조될 수 있다. 즉, 다른 대사 질환 및/또는 인지능력 개선용 물질을 함유하지 않은 식품 및 이미 몇 가지의 대사 질환 및/또는 인지능력 개선용 물질을 함유한 식품에 첨가되어 사용될 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물에 사용될 수 있는 담체의 예로는 증량제, 고섬유 첨가제, 캡슐화제, 지질 등일 수 있으며 이러한 담체들의 예는 당업계에 충분히 공지되어 있다. 본 발명의 식품은 동결건조되거나 캡슐화된 형태 또는 현탁액이나 건조분말 형태일 수 있다.
- [0097] 한편, 본 발명에서는 재조합 벡터와 재조합 미생물을 이용하여 지속형 엑센딘-4를 용이하게 생산할 수 있음을 확인하였다.
- [0098] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 엑센딘-4(exendin-4)를 코딩하는 핵산, 알부민 결합 도메인(ABD)을 코딩하는 핵산 및 항-FcRn 아피바디(affibody)를 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터에 관한 것이다.

- [0099] 본 발명에 있어서, 상기 엑센딘-4를 코딩하는 핵산은 서열번호 4의 염기서열로 표시되고, 알부민 결합 도메인을 코딩하는 핵산은 서열번호 5의 염기서열로 표시되며, 항-FcRn 아피바디(affibody)를 코딩하는 핵산은 서열번호 6의 염기서열로 표시될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0101] 엑센딘-4를 코딩하는 핵산(서열번호 4)
- [0102] CACGGCGAGGGCACCTTTACCAGCGACCTGAGCAAGCAAATGGAAGAGGAAGCGGTTTCGTCTGTTTATTGAGTGGCTGAAAAATGGCGGTCGAGCAGCGGTGCTCCGCCGCCGAGC
- [0104] 알부민 결합 도메인을 코딩하는 핵산(서열번호 5)
- [0105] CTGAAAGAGGCGAAGGAAAAAGCGATCGAGGAAGAAAGCGGGTATTACCAGCGACTACTATTTTCGATCTGATCAACAAGGCGAAAACCGTGGAGGGTGTTAACGCGCTGAAGGACGAAATTCTGAAAGCG
- [0107] 항-FcRn 아피바디(affibody)를 코딩하는 핵산(서열번호 6)
- [0108] GTGGATGCGAAGTATGCGAAAGAGTTTCGAAAGCGCGGCATGAGATCCGTTGGCTGCCAACCTGACCTATGATCAGCGTGTGCGTTTATTCACAACTGAGCGACGATCCGAGCCAGCAGCGAACTGCTGAGCGAAGCGAAAACTGAACGATAGCCAAGCGCCGAAAG
- [0110] 본 발명은 또한, 상기 재조합 벡터가 도입된 지속형 엑센딘-4 생산용 재조합 미생물에 관한 것이다. 상기 재조합 미생물은 대장균인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0111] 본 발명에 따른 재조합 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있고, 원핵세포 또는 진핵세포를 숙주세포로 사용하기 위한 벡터로서 구축될 수 있다.
- [0112] 본 발명에서 용어, "벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 재조합 벡터로서, 핵산 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절요소를 포함하는 핵산 구조물(construct)을 의미한다. 본 발명은 지속형 엑센딘-4를 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터를 제조할 수 있는데, 상기 재조합 벡터를 숙주 세포에 형질전환(transformation) 또는 형질감염(transfection) 시킴으로써, 본 발명의 지속형 엑센딘-4를 수득할 수 있다.
- [0113] 본 발명에서 지속형 엑센딘-4를 코딩하는 핵산은 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 본 발명에서 용어, "작동 가능하게 연결된(operatively linked)"은 핵산 발현 조절서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 라이보솜 결합부위, 전사 종결서열 등)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.
- [0114] 본 발명에서 용어, "프로모터"는 폴리머라제에 대한 결합 부위를 포함하고 프로모터 하위 유전자의 mRNA로의 전사 개시 활성을 가지는, 코딩 영역의 상위(upstream)의 비해독된 핵산 서열, 즉, 폴리머라제가 결합하여 유전자의 전사를 개시하도록 하는 DNA 영역을 말하며, mRNA 전사 개시부위의 5'-부위에 위치한다.
- [0115] 예를 들어, 본 발명의 벡터가 재조합 벡터이고 원핵세포를 숙주로 하는 경우에, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예: tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pLλ 프로모터, pRλ 프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터, trc 프로모터, phoA 프로모터, araBAD 프로모터, T5 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합부위 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다.
- [0116] 또한, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHc79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈, pPICZ α 시리즈, pUC19 등), 파지(예: λgt, λB, λ-Charon λ Δz1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0117] 한편, 본 발명의 벡터가 재조합 벡터이고 진핵세포를 숙주로 하는 경우에, 포유동물 세포의 계놈으로부터 유래된 프로모터(예: 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 우두바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열(예: 소성장 호르몬 터미네이터 및 SV40 유래 폴리 아데닐화 서열)을 일반적으로 갖는다.
- [0118] 또한, 본 발명의 재조합 벡터는 선택 마커로서 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신,

게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 사용될 수 있다.

- [0119] 본 발명의 재조합 벡터는 회수되는 목적 단백질, 즉 지속형 엑센딘-4의 정제를 용이하게 하기 위하여 필요에 따라 다른 서열을 추가로 포함할 수 있다. 상기 추가로 포함될 수 있는 서열은 단백질 정제용 태그 서열일 수 있으며, 예컨대, 글루타티온 S-트랜스퍼라제(Pharmacia, USA), 말토스 결합 단백질(NEB, USA), FLAG(ABI, USA), SUMO 및 6개 히스티딘(hexahistidine) 등이 있으나, 상기 예들에 의하여 목적 단백질의 정제를 위하여 필요한 서열의 종류가 제한되는 것은 아니다. 상기와 같은 태그 서열을 포함하는 재조합 벡터에 의해 발현된 융합 단백질은 친화성 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다. 예컨대, 글루타티온-S-트랜스퍼라제가 융합된 경우에는 이 효소의 기질인 글루타티온을 이용할 수 있고, 6개 히스티딘 태그가 이용된 경우에는 Ni-NTA 칼럼을 이용하여 원하는 목적 단백질을 용이하게 회수할 수 있다. 상기 지속형 엑센딘-4를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 이용하여, 상기 벡터가 형질전환된 재조합 미생물이 구축될 수 있다.
- [0120] 본 발명에서 용어, "형질전환(transformation)"이란 DNA를 숙주세포 내로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것으로, 외부의 DNA를 세포 내로 도입하여 인위적으로 유전적인 변화를 일으키는 현상을 의미한다.
- [0121] 본 발명의 형질전환 방법은 임의의 형질전환 방법이 사용될 수 있으며, 당업계의 통상적인 방법에 따라 용이하게 수행할 수 있다. 일반적으로 형질전환 방법에는 CaCl₂ 침전법, CaCl₂ 침전법에 DMSO(dimethyl sulfoxide)라는 환원물질을 사용함으로써 효율을 높인 Hanahan 방법, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리아 매개 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환법 등이 있다.
- [0122] 본 발명에 따른 지속형 엑센딘-4를 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터를 형질전환시키기 위한 방법은 상기 예들에 국한되지 않으며, 당업계에서 통상적으로 사용되는 형질전환 또는 형질감염 방법이 제한 없이 사용될 수 있다.
- [0123] 목적 핵산인 지속형 엑센딘-4를 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터를 숙주세포 내로 도입함으로써 본 발명의 형질전환체(transformant)를 획득할 수 있다.
- [0124] 본 발명에 적합한 숙주는 본 발명의 핵산을 발현하도록 하는 한 특별히 제한되지 않는다. 본 발명에 사용될 수 있는 숙주의 특정한 예로는 대장균(*E. coli*)과 같은 에스케리키아(*Escherichia*) 속 세균; 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같은 바실러스(*Bacillus*) 속 세균; 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)와 같은 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속 세균; 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 스킴조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*)와 같은 효모; 스포도프테라 프루기페르다(SF9)와 같은 곤충세포; 및 CHO, COS, BSC 등과 같은 동물세포가 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0126] 본 발명은 또한, (a) 상기 재조합 미생물을 배양하는 단계; (b) 상기 배양된 재조합 미생물을 파쇄하여 지속형 엑센딘-4를 수득하는 단계; 및 (c) 상기 지속형 엑센딘-4를 정제하는 단계를 포함하는 생체 내 반감기가 증가된 지속형 엑센딘-4의 제조방법을 제공한다.
- [0128] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0130] **실시예 1. SUMO-Exendin-4-ABD-aFaff 발현용 플라스미드 제작**
- [0132] SUMO-Exendin-4-ABD-aFaff 발현을 위한 pET28a-SUMO-Exendin-4-ABD-aFaff 플라스미드의 제작을 위해 Exendin-4-ABD-aFaff의 발현 유전자(570 bp)를 Genscript에 의뢰하여 합성한 후, 제한효소 Nde1과 EcoR1로 절단하여 pET28a-SUMO 벡터에 T4 ligase를 활용하여 삽입하였다. 마찬가지로 pET28a-SUMO-Exendin-4, pET28a-SUMO-Exendin-4-ABD와 pET28a-SUMO-Exendin-4-aFaff도, SUMO-Exendin-4의 발현유전자 (441 bp), Exendin-4-ABD의 발현유전자 (336 bp), Exendin-4-aFaff의 발현유전자 (375 bp)를 Genscript에 의뢰하여 합성한 후, 각각 제한효소 Nde1과 EcoR1로 절단한 후, SUMO-Exendin-4 유전자는 pET28a 벡터에, Exendin-4-ABD와 Exendin-4-aFaff 유전자는 pET28a-SUMO 벡터에 T4 ligase를 활용하여 삽입하였다. 제작된 Exendin-4-ABD-aFaff, Exendin-4, Exendin-4-ABD와 Exendin-4-aFaff의 발현 플라스미드들은 DH5 α 대장균에 형질주입하였다.
- [0134] 본 발명에서 사용된 아미노산 서열은 다음과 같고, Exendin-4, ABD, 항-FcRn 아피바디(affibody)는 (GGGG)₄ 링

커로 연결되어 있다.

- [0135] Exendin-4(서열번호 1)
- [0136] HGEFTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
- [0137] ABD(서열번호 2)
- [0138] LKEAKEKAIEELKKAGITSDYYFDL INKAKTVEGVNALKDEILKA
- [0139] 항-FcRn 아피바디(affibody)(서열번호 3)
- [0140] VDAKYAKEFESAHEIRWLPNLTYDQRVAF IHKLSDDPSQSSELLSEAKKLND SQAPK

[0142] **실시예 2. Exendin-4-ABD-aFaff 발현 및 정제**

[0143] Exendin-4-ABD-aFaff의 발현을 위해 pET28A-SUMO-Exendin-4-ABD-aFaff를 생산용 대장균주인 BL21에 형질주입 후, 카나마이신이 함유된 (80 µg/mL) LB 한천배지에서 선택배양하였다. 이후, 한천배지에서 자란 콜로니를 하나 취하여 50 mL의 액상 LB 배지에 접종 후, 250 rpm의 회전속도로 37°C에서 밤새 배양하였다. 다음날, 이 starter culture를 카나마이신이 함유된 1L의 대용량 LB 배지에 가한 후 동일한 조건에서 배양하였다. 이 배양액이 600 nm에서 흡광도가 1에 도달하면 IPTG를 (최종농도: 0.5 mM) 가한 후, 4시간 동안 추가로 배양하였다. 배양이 끝나고 나면, 20 mM 인산완충용액 (300 mM NaCl, 1% leupeptin and 1% soybean protease inhibitor (Sigma Aldrich), pH 7) 60 mL를 가하여 현탁시키고 초음파파쇄기를 활용하여 대장균 세포들을 파쇄하였다. 이렇게 얻은 파쇄된 대장균액을 원심분리 (4000 rpm에서 20분)한 후, 상청액을 취하여 Talon 레진 (Clontech, Mountain View, CA)을 이용하여 정제하였다. 정제 시, 인산완충액으로 세척하고, SUMO-Exendin-4-ABD-aFaff 단백질은 elution buffer (20 mM PBS, 300 mM NaCl, 300 mM imidazole, pH 7)를 활용하여 수득하였다. Exendin-4, Exendin-4-ABD와 Exendin-4-aFaff의 경우, Exendin-4-ABD-aFaff와 동일한 발현 및 정제법을 활용하여 생산하였다. Exendin-4-ABD-aFaff, Exendin-4, Exendin-4-ABD와 Exendin-4-aFaff의 발현 및 정제는 쿠마시 염색으로 확인하였다(도 2).

[0145] **실시예 3. 지속형 Exendin-4(Exendin-4-ABD-aFaff)의 혈당 개선 효과**

[0147] **3-1. 단기 혈당량 변화**

[0148] 중앙실험동물(주)에서 3주령의 수컷C57BL/6J마우스를 구입하여 경상대학교 동물실험실에서 사육을 하였다. 12주 동안 60%Kcal fat (미국 Research Diet사)의 사료를 먹인 후 3그룹(각 10마리)으로 나누어 약물을 주사하기 하루 전에 금식(약 14시간)하도록 하였다. 오전 9시에 각 그룹의 마우스에게 0.9% normal saline, exendin-4 (50 nmol/kg; 0.9 mg/kg), 그리고 exendin-4-ABD-aFaff (50 nmol/kg; 1.6 mg/kg)을 복강주사한 후 1시간뒤에 내당 부하검사(glucose tolerance test)를 실시하였다. D-glucose(2g/kg)을 복강주사한 후 2시간 동안 30분 간격으로 마우스의 꼬리에서 혈액을 뽑아 Accu-Check glucometer기로 혈당을 측정하고(A), 약에 대한 효능을 나타내는 곡선하면적(Area Under Curve, AUC)을 측정하였다(B).

[0149] 그 결과, 도 3에서와 같이 고지방식이에 의한 비만 마우스의 인슐린저항성 개선 효과에 있어서 단일 투여로 지속형 exendin-4는 기존의 exendin-4의 혈당개선효과보다 2시간 이내에 50%이상 당부하 효과를 개선시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0151] **3-2. 장기 혈당량 변화**

[0152] 중앙실험동물(주)에서 3주령의 수컷C57BL/6J마우스를 구입하여 경상대학교 동물실험실에서 사육을 하였다. 14주 동안 60%Kcal fat (미국 Research Diet사)의 사료를 먹인 후 5그룹(각 7마리)으로 나누어 약물을 주사하였다. 오전 10시에 각 그룹의 마우스에게 0.9% normal saline, exendin-4 (0.9 mg/kg, 3.6 mg/kg), 그리고 exendin-4-ABD-aFaff (1.6 mg/kg, 6.4 mg/kg)을 복강주사 한 후 2주 동안 마우스의 꼬리에서 혈액을 뽑아 Accu-Check glucometer기로 혈당을 측정하고(A), 약물투여에 따른 체중변화를 관찰하였다(B).

[0153] 그 결과, 도 4에서와 같이, exendin-4 (200 nmol/kg; 3.6 mg/kg)를 1회 복강주사 한 마우스의 혈당은 약 12시간 동안만 혈당이 낮게 유지되었으며, 체중감소의 효과는 없는 것으로 나타났으나, exendin-4-ABD-aFaff (200 nmol/kg; 6.4 mg/kg)를 1회 복강주사 한 마우스의 경우 12일 동안 혈당이 낮게 유지되었으며, 체중감소의 효과도 뛰어난을 확인하였다.

[0155] **3-3. exendin-4-ABD-aFaff의 지속력 향상(시너지 효과)**

[0156] 본 발명에서는 exendin-4-ABD-aFaff가 exendin-4의 대사성 질환 치료 효과를 현저히 오랜 시간 지속시킬 수 있음을 확인하고, 이를 exendin-4에 aFaff만 결합하거나, exendin-4에 ABD만 결합한 것과 비교해 보고자 하였다.

[0157] 이를 위하여, 중앙실험동물(주)에서 3주령의 수컷C57BL/6J마우스를 구입하여 경상대학교 동물실험실에서 사육하며, 14주 동안 60%Kcal fat (미국 Research Diet사)의 사료를 먹인 후 5그룹(각 5-7마리)으로 나누어 약물을 주사하였다(금식을 하지 않음). 오전 10시에 각 그룹의 마우스에게 0.9% normal saline, exendin-4 (EX, 200 nmol/kg; 3.6 mg/kg), exendin-4-aFaff (EX-aFaff, 200 nmol/kg; 4.8 mg/kg), exendin-4-ABD (EX-ABD, 200 nmol/kg; 4.8 mg/kg), 그리고 exendin-4-ABD-aFaff (EX-ABD-aFaff, 200 nmol/kg; 6.4 mg/kg)을 복강주사 한 후 12일 동안 마우스의 꼬리에서 혈액을 뽑아 Accu-Check glucometer기로 혈당을 측정하고, 약물투여에 따른 체중변화를 확인해 보았다.

[0158] 그 결과, 도 5에서와 같이, exendin-4-ABD-aFaff를 1회 복강주사 한 마우스의 혈당이 약 12일 동안 약물을 처리하지 않은 마우스의 혈당보다 현저히 낮게 유지되었는데, exendin-4-aFaff는 복강주사 후 초기 1~5일째 효과가 미미하고, exendin-4-ABD의 경우 복강주사 후 7일 이후 혈당이 급속히 증가하는 것에 비해, exendin-4-ABD-aFaff는 12일 동안 꾸준히 혈당을 낮은 수준으로 유지할 수 있다는 점에서 유리한 효과가 관찰되었다. 또한, 체중 감소 효과에 있어서도 exendin-4, exendin-4-aFaff, exendin-4-ABD를 1회 복강주사한 마우스에서는 몸무게의 변화가 관찰되지 않았으나, exendin-4-ABD-aFaff는 고지방식이에 의한 체중의 급격한 증가가 관찰되지 않아, 체중 감소 효과가 우수함을 확인하였다. 이 실험결과를 토대로 exendin-4-ABD를 포함하는 기존의 지속형 exendin-4보다 exendin-4-ABD-aFaff가 현저히 증가된 혈중 반감기를 보유함을 알 수 있으며, 이러한 탁월한 혈중 안정성으로 인해 기존의 지속형제제로 최대 주1회 투여가 가능했던 것에 비해 최대 주2회 1회 투여로도 혈당수치를 정상으로 유지하는 것이 가능함을 확인하였다. 또한, 이를 토대로 exendin-4-ABD-aFaff의 획기적인 체내 체류시간의 증가가 비단 당뇨치료뿐만 아니라 당뇨의 제 합병증 치료에도 더욱 효과적일 것이라고 유추할 수 있었다.

[0159]

[0160] **3-4. 고지방식이 및 정상식이 그룹에서 혈당량 변화 비교**

[0161] 중앙실험동물(주)에서 3주령의 수컷C57BL/6J마우스를 구입하여 경상대학교 동물실험실에서 사육을 하였다. 16주 동안 60%Kcal fat (미국 Research Diet사)의 사료를 먹인 후 7그룹(각 7-12마리)으로 나누어 10주 동안 매주 1회 약물을 복강주사 하였다. 오전 10시에 각 그룹의 마우스에게 0.9% normal saline, exendin-4 (0.9 mg/kg, 3.6 mg/kg), 그리고 exendin-4-ABD-aFaff (1.6 mg/kg, 6.4 mg/kg)를 복강주사하였다. 하루 전에 금식한 후 꼬리에서 혈액을 뽑아 Accu-Check glucometer기로 혈당을 측정함(A). 마우스를 마취 후 좌심실을 통해 추출한 혈청(serum)을 녹십자(주)에 보내어 혈당분석으로 의뢰하였으며, insulin분석은 일본 Shibayagi사의 마우스 인슐린 ELISA kit를 구입하여 분석하였다.

[0162] 그 결과, 도 6에서와 같이, 고지방식이(HFD)마우스의 혈당은 정상식이(ND) 마우스의 혈당보다 높았지만, exendin-4-ABD-aFaff (200 nmol/kg; 6.4 mg/kg)를 투여한 마우스의 혈당은 통계적으로 유의하게 감소하였음을 확인하였다. 이 경우, exendin-4를 투여한 마우스의 혈당은 감소되지 않아, exendin-4-ABD-aFaff의 효과의 우수성을 알 수 있었다. 또한, 정상식이 (ND) 마우스에서는 exendin-4-ABD-aFaff의 장기간 투여에도 혈당에 크게 변화가 없음을 통해 저혈당쇼크 유발 위험성이 작은 것을 확인하였다. 혈청 인슐린의 농도는 정상식이 마우스를 제외한 고지방식이 및 고지방식이 약물 투여군 모두에서 인슐린 농도가 증가되었다. 고지방식이 마우스군보에서 혈액내 인슐린 농도가 증가한 이유는 exendin-4의 작용기전인 췌장세포의 인슐린 분비를 증가시키는 작용 때문인 것으로 보인다.

[0164] **3-5. 당부하검사 및 인슐린부하검사**

[0165] Exendin-4-ABD-aFaff와 Exendin-4 투여에 따른 당부하검사 및 인슐린부하검사는 실시예 3-4의 동물실험군을 대상으로 실험을 진행하였다.

[0166] 당부하검사(glucose tolerance test)는 하루 전 금식(약 14시간) 후, 오전 9시에 D-glucose(2g/kg)를 복강주사하고 2시간 동안 30분 간격으로 마우스의 꼬리에서 혈액을 뽑아 Accu-Check glucometer기로 혈당을 측정하고 (GTT), 약에 대한 효능을 나타내는 곡선하면적(Area Under Curve, AUC)을 계산하였다.

[0167] 인슐린부하검사(insulin tolerance test)는 오후 2시에 insulin (0.75 U/kg, Humulin-R, Eli Lilly, USA)을 복강주사하고 1시간 동안 15분 간격으로 마우스의 꼬리에서 혈액을 뽑아 Accu-Check glucometer기로 혈당을 측정

하고(GTT), 약에 대한 효능을 나타내는 곡선하면적(Area Under Curve, AUC)을 계산하였다.

- [0168] 그 결과, 도 7에서와 같이, 당부하검사(glucose tolerance test)에서는 exendin-4-ABD-aFaff를 투여한 마우스에서만 당부하가 감소하였으며, 인슐린부하검사(insulin tolerance test)에서는 exendin-4와 exendin-4-ABD-aFaff를 투여한 군에서 인슐린저항성이 개선됨을 확인하였다. 한편, exendin-4-ABD-aFaff(200 nmol/kg; 6.4 mg/kg)를 투여한 마우스군에서는 내당개선과 인슐린민감도가 모두 증가하였다.
- [0170] **실시예 4. 지속형 Exendin-4(Exendin-4-ABD-aFaff)의 지방간 개선 효과**
- [0172] Exendin-4-ABD-aFaff와 Exendin-4 투여에 따른 지방간 개선 효과는 실시예 3-4의 동물실험군을 대상으로 실험을 진행하였다.
- [0174] **실시예 4-1. 간 효소 수치 변화**
- [0175] 마우스를 마취 후 좌심실을 통해 전혈(whole blood)을 1ml주사기로 뽑은 후 원심분리기를 이용하여 혈청(serum)과 혈구(blood cell)를 분리하였다. 혈청은 2가지 간효소인 ALT와 AST분석을 녹십자㈜에 의뢰하였다.
- [0176] 그 결과, 도 8에서와 같이, 두 가지 간 효소 모두 고지방식이 마우스에서 증가하였으나, exendin-4-ABD-aFaff를 투여한 마우스에서는 두 효소 수치가 모두 감소되었고, exendin-4를 투여한 마우스에서는 두 효소 수치가 거의 감소하지 않은 것으로 확인되었다.
- [0178] **실시예 4-2. 간 세포내 지방 축적 확인 및 간 크기와 무게 변화 관찰**
- [0179] 마취제 Zoletil (Virbac Laboratories)을 근육주사 후 고정액(4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS)으로 심장 관류하였다. 간을 적출 후 6시간 동안 추가로 고정액에 넣어 두었다. Hematoxylin and eosin (H&E)염색을 하기 위해 파라핀 간 절편을 만들고, 동결 절단을 하여 간세포내 지방 망울을 관찰하기 위해 Nile Red (Sigma)로 형광염색을 한 후, 이를 광학 및 형광현미경으로 관찰하였다.
- [0180] 그 결과, 도 9에서와 같이, 고지방식이 마우스 간 조직에서는 지방축적이 된 다수의 간세포들이 관찰었다. 이 경우, Exendin-4를 투여한 간 조직의 지방축적은 개선되지 않았지만, exendin-4-ABD-aFaff를 투여한 마우스 간 조직내의 지방축적은 농도의존적으로 개선됨을 확인하였다.
- [0182] 한편, 간 크기 및 무게 변화 관찰을 위하여 좌심실을 통해 전혈(whole blood)을 뽑은 후, 간을 적출하여 무게를 측정하였다.
- [0183] 그 결과, 도 10에서와 같이, 고지방식이 마우스의 간무게는 정상식이 마우스의 간무게보다 약 2배 증가하였으며, exendin-4-ABD-aFaff 투여시 농도별로 간의 무게가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 육안으로 관찰하면 고지방식이 마우스 간은 정상식이 마우스 간보다 크기가 크고, 노란색을 보이지만, exendin-4-ABD-aFaff를 투여한 지방간의 색깔은 정상 간의 색깔과 유사하고 크기도 많이 감소한 것을 알 수 있다. 하지만 exendin-4를 투여한 마우스 간은 여전히 노란색을 띄고 있으며, 크기도 거의 감소하지 않는 것으로 확인되었다.
- [0185] **실시예 4-3. 비알코올성지방간질환(nonalcoholic fatty liver disease) 활성화 측정**
- [0187] 비알코올성지방간질환의 활성도를 측정하기 위하여 실시예4-2의 간조직 절편들을 광학현미경으로 관찰하여, 지방증(steatosis), 소엽염증(lobular inflammation), 간세포풍선변성(hepatocellular ballooning)의 수치를 측정하고, 각 측정값의 총합을 구하였다.

표 1

NAFLD activity score	NASH fibrosis stage
Steatosis < 5%: 0 5-33%: 1 34-66%: 2 > 66%: 3	Stage 0 No fibrosis
Lobular inflammation None: 0 < 2: 1 2-4: 3 > 4: 4	Stage 1 Zone 3 perisinusoidal fibrosis • Mild - 1a • Moderate - 1b • Portal/periportal - 1c
Ballooning of hepatocytes None: 0 Few ballooned: 1 Many ballooned: 2	Stage 2 Perisinusoidal and portal/periportal fibrosis
NAS score (0-8) < 3: not NASH ≥ 5: NASH	Stage 3 Bridging fibrosis
	Stage 4 Cirrhosis

[0189]

[0191]

그 결과, 도 11에서와 같이, 정상식이 마우스 간조직에서는 지방증, 소염염증, 간세포풍선변성 등이 모두 관찰되지 않았지만, 고지방식이 마우스 간조직에서는 3가지 병리적 특징이 모두 증가되는 것으로 확인되었다. 한편, exendin-4-ABD-aFaff(200 nmol/kg; 6.4 mg/kg)를 투여한 고지방식이 마우스에서는 비알코올성지방간질환의 활성도가 가장 많이 감소되는 것으로 나타났으나, exendin-4를 투여한 마우스에서는 이러한 감소 효과가 관찰되지 않았다.

[0193]

실시에 5. 지속형 Exendin-4(Exendin-4-ABD-aFaff)의 비만 개선 효과

[0195]

Exendin-4-ABD-aFaff와 Exendin-4 투여 농도에 따른 비만 개선 효과는 실시에 3-4의 동물실험군을 대상으로 실험을 진행하였다.

[0197]

5-1. 식욕 감소, 몸무게 감소, 체지방 감소

[0198]

동물실험군에 약물 주사 후 매주 사료 섭취량과 몸무게를 측정하였다.

[0199]

그 결과, 도 12에서와 같이, 정상식이 동물실험군에서는 사료 섭취량이 높은 것으로 나타났으나, 고지방식이 동물실험군에서는 사료의 지방 함량이 높아 섭취량이 감소하는 것으로 나타났다. 다만, 고지방식은 지방함량에 따른 칼로리(60%kcal)가 높아 사료 섭취량 감소에도 몸무게는 증가하는 것으로 나타났다. 한편, 다른 비교실험군과 달리, exendin-4-ABD-aFaff (200 nmol/kg; 6.4 mg/kg)를 투여한 고지방식이 마우스에서 약 7주 동안 식욕 감소 효과를 나타내었고, 10주 후에는 유의한 몸무게 감소 효과를 나타내었다.

[0201]

한편, 마우스를 마취 후 좌심실을 통해 전혈(whole blood)을 1 ml 주사기로 뽑은 후 원심분리기를 이용하여 혈청(serum)과 혈구(blood cell)를 분리하고, 녹십자(주)에 보내어 혈청 총 콜레스테롤 농도를 분석하였다.

[0202]

그 결과, 도 13에서와 같이 혈청 총 콜레스테롤 농도는 고지방식이 마우스에서 정상식이 마우스보다 약 2.5배 증가하였으나, exendin-4-ABD-aFaff를 투여한 고지방식이 마우스에서는 농도 의존적으로 뚜렷하게 감소되는 경향을 나타내었고, exendin-4를 투여한 고지방식이 마우스에서는 통계적으로 유의한 감소 효과가 관찰되지 않았다.

[0204]

5-2. 창자간막 지방 무게 감소

[0205]

좌심실을 통해 전혈(whole blood)을 뽑은 후, 간, 부고환지방체, 콩팥주위지방, 그리고 창자간막지방을 적출하여 무게를 측정하였다.

[0206]

그 결과, 도 14에서와 같이, 고지방식이 마우스의 창자간막지방무게는 정상식이 마우스의 창자간막지방무게보다 약 2배 증가하였지만, Exendin-4-ABD-aFaff 또는 Exendin-4 투여한 고지방식이 마우스의 창자간막지방무게가 감소되는 것으로 관찰되었다. 특히 exendin-4-ABD-aFaff(200 nmol/kg; 6.4 mg/kg)를 투여한 고지방식이 마우스의 경우, 부고환지방체, 콩팥주위지방, 그리고 창자간막지방(mesenteric fat)이 효과적으로 감소된 것을 관찰되었다.

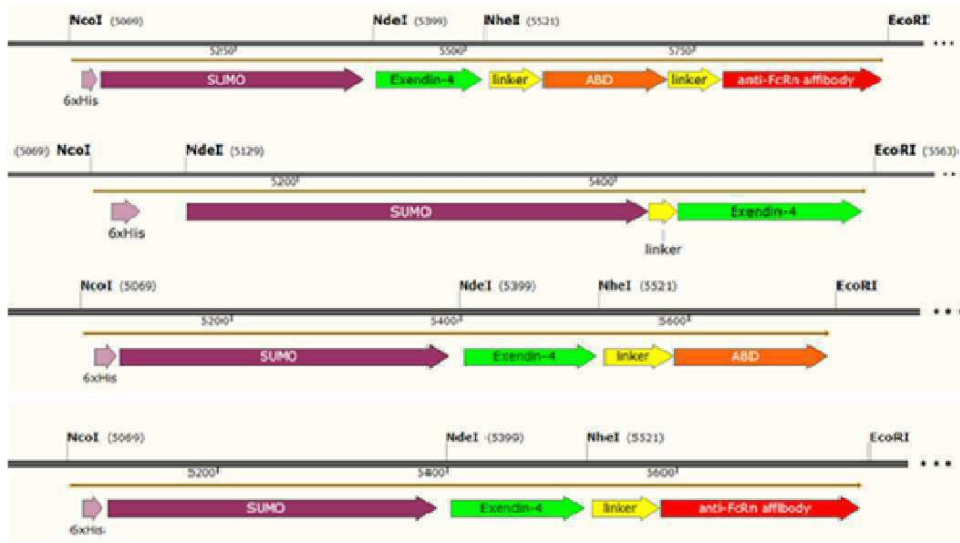
[0208]

실시에 6. 지속형 Exendin-4(Exendin-4-ABD-aFaff)의 인지능력 개선 효과

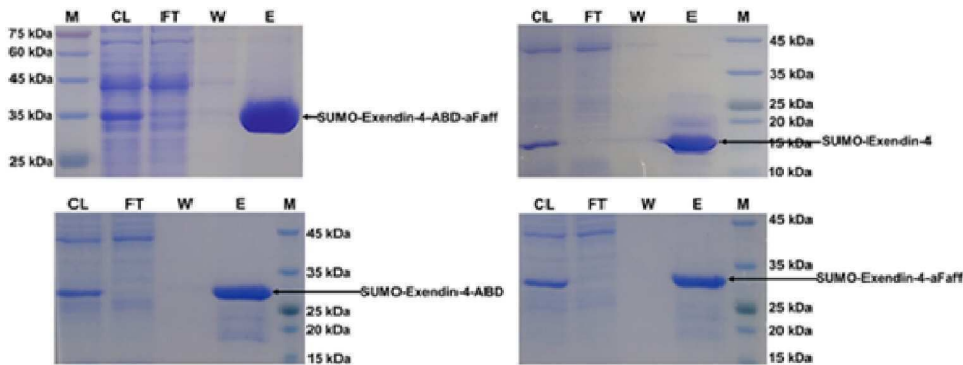
- [0210] Exendin-4-ABD-aFaff 투여에 따른 인지능력 개선 효과를 확인해 보고자, 실시예 3-4의 동물실험군을 대상으로 실험을 진행하였다.
- [0212] 장기기억검사를 위해 모리스수중미로실험(Morris water maze test)을 실시하였다. 직경이 100cm의 water maze pool 안에 물(21±2℃을 원형도피대(platform)가 보이지 않도록 플랫폼 보다 1cm 높게 채우고, 수조 내에 프리마((주)동서)를 풀어서 플랫폼을 보이지 않게 하였다. Pool은 4개의 동일한 사분면으로 나누어서 북동(NE), 북서(NW), 남동(SE), 남서(SW)로 구분하였고, 이 중 남동(SE) 사분면의 중심부에 플랫폼이 놓여지고, 각 사분면의 가장자리에서 마우스가 벽면을 보게 하여 입수시켰다. 4일 동안 1일에 90초간 4회씩 마우스를 pool에 입수시켜 플랫폼으로 올라갈 때까지의 시간(Escape Latency)를 측정하였다. 이 때 90초가 지나도록 플랫폼 위에 올라가지 못한 마우스는 플랫폼 위치를 알려주어 20초간 머물게 하였다. 마지막 날인 5일째에 Probe test를 위해 플랫폼을 제거한 후, 60초 동안 마우스를 수영하게 한 후, 플랫폼이 위치한 구간에서 머무르는 시간(Time in the target platform quadrant)과 플랫폼을 지나가는 횟수(Number of the platform crossings)를 측정하였다. 수중미로 안에서의 모든 마우스의 행동은 video tracking system (Noldus EthoVision XT7, Noldus Information Technology, The Netherlands)을 이용하여 기록하였다.
- [0213] 그 결과, 도 15에서와 같이, 1일부터 4일까지 학습효과는 정상식이(ND)마우스가 고지방식이(HFD)마우스보다 뛰어났으며, exendin-4-ABD-aFaff를 처리한 고지방식이 마우스의 학습효과는 점진적으로 개선되는 것을 볼 수 있었다(도 15A). 마지막 날에는 플랫폼을 제거하여 기존에 탈출했던 곳에 얼마나 오래 머무는지를 확인해 본 결과, 고지방식이마우스(HFD)는 정상식이 마우스보다 훨씬 짧은 시간 동안 플랫폼에 머무르는 것으로 관찰되었으나, exendin-4-ABD-aFaff(EXA200)투여 고지방식이 마우스는 사분면에 머무르는 시간이 증가하였다(도 15B). 한편, 마우스가 플랫폼을 찾는 모습을 비디오카메라 추적 관찰한 결과, exendin-4-ABD-aFaff(EXA200)를 투여한 고지방식이 마우스의 추적선이 이를 투여하지 않은 고지방식이 마우스의 경우보다 플랫폼이 있었던 사분면에서 더 많이 관찰되었다(도 15C).
- [0215] **실시예 7. 지속형 Exendin-4(Exendin-4-ABD-aFaff)의 약동학적 평가**
- [0217] 중앙실험동물(주)에서 6주령의 수컷 ICR마우스를 구입하여 경상대학교 동물실험실에서 사육을 하였다. 일주일이 경과한 후, ICR 마우스에 exendin-4 (50 nmol/kg; 0.9 mg/kg), exendin-4-aFaff (50 nmol/kg; 1.2 mg/kg), exendin-4-ABD (50 nmol/kg; 1.2 mg/kg) 그리고 exendin-4-ABD-aFaff (50 nmol/kg; 1.6 mg/kg)를 각각 피하 주사로 투여 후, 지정한 시간별(0, 5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 7 h, 8 h, day 2, day 3, day 4, day 7, day 10, day 14)로 혈장을 채취하고, 이 혈장샘플내 농도를 HPLC(Waters사의 Alliance 2695 HPLC)를 활용하여 크기배제크로마토그래피(Shodex SEC)로 분석하여 정량하였다.
- [0218] 그 결과, 도 16에서와 같이 exendin-4와 exendin-4-aFaff(E-affibody)는 유사한 혈중약물동태를 보였으며, 혈중반감기도 각각 1.46과 1.44시간으로 차이가 없었다. 이에 비해, exendin-4-ABD는 혈중반감기가 3.2일로 exendin-4에 비해 현저히 증가된 것을 확인하였으며, exendin-4-ABD-aFaff의 경우, 혈중반감기가 6.4일로 나타나 exendin-4-ABD에 비해 2배 더 개선된 것을 확인할 수 있었다.
- [0220] 상기 실시예를 종합하면, 본 발명에 따른 지속형 exendin-4(exendin-4-ABD-aFaff)는 exendin-4-ABD와 같은 지속형 exendin-4에 비해 혈중 반감기가 현저히 증가하고, 이러한 탁월한 혈중 안정성으로 인해 기존 지속형제제로 최대 주 1회 투여가 가능했던 것에 비해 적어도 2주 1회 투여로 혈당수치를 정상으로 유지하는 것이 가능하고, 따라서 본 발명의 지속형 exendin-4를 사용하는 경우 획기적인 체내 체류시간의 증가가 단순히 당뇨 치료 뿐만 아니라 당뇨의 다양한 합병증 치료에도 효과적임을 확인할 수 있다.
- [0222] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

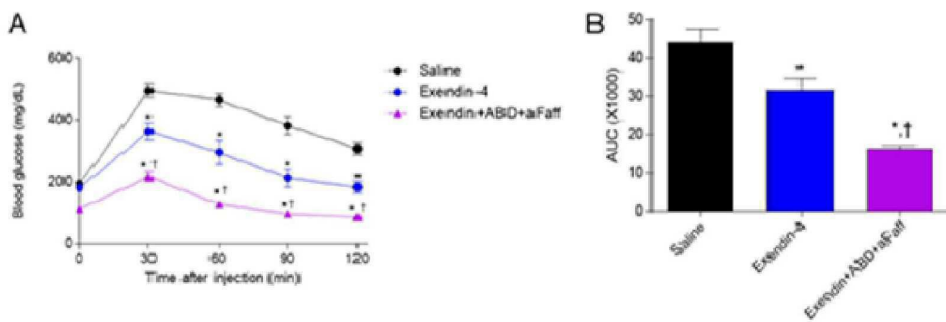
도면1



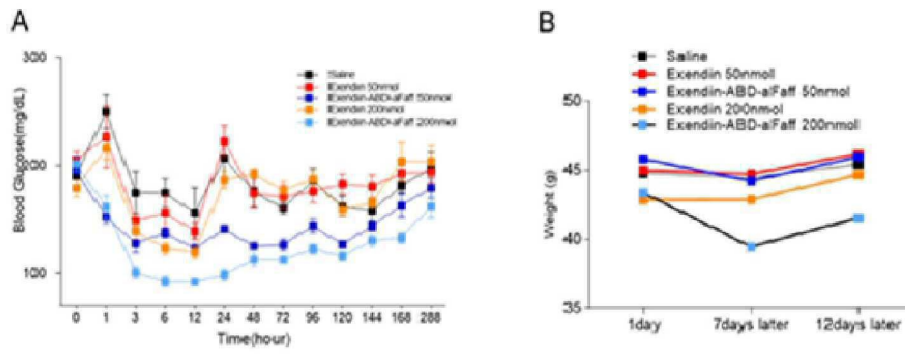
도면2



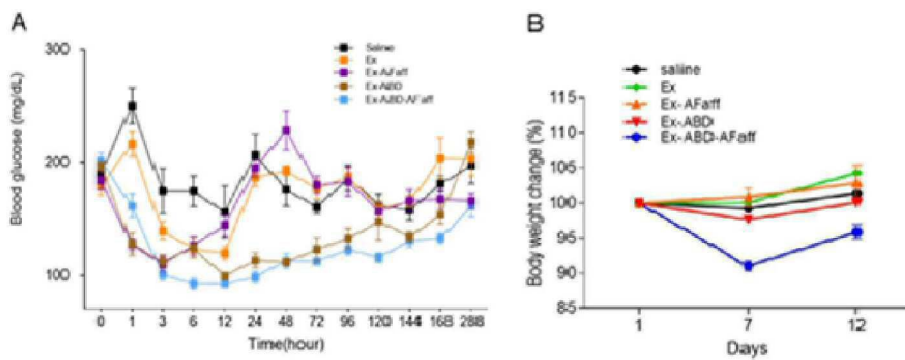
도면3



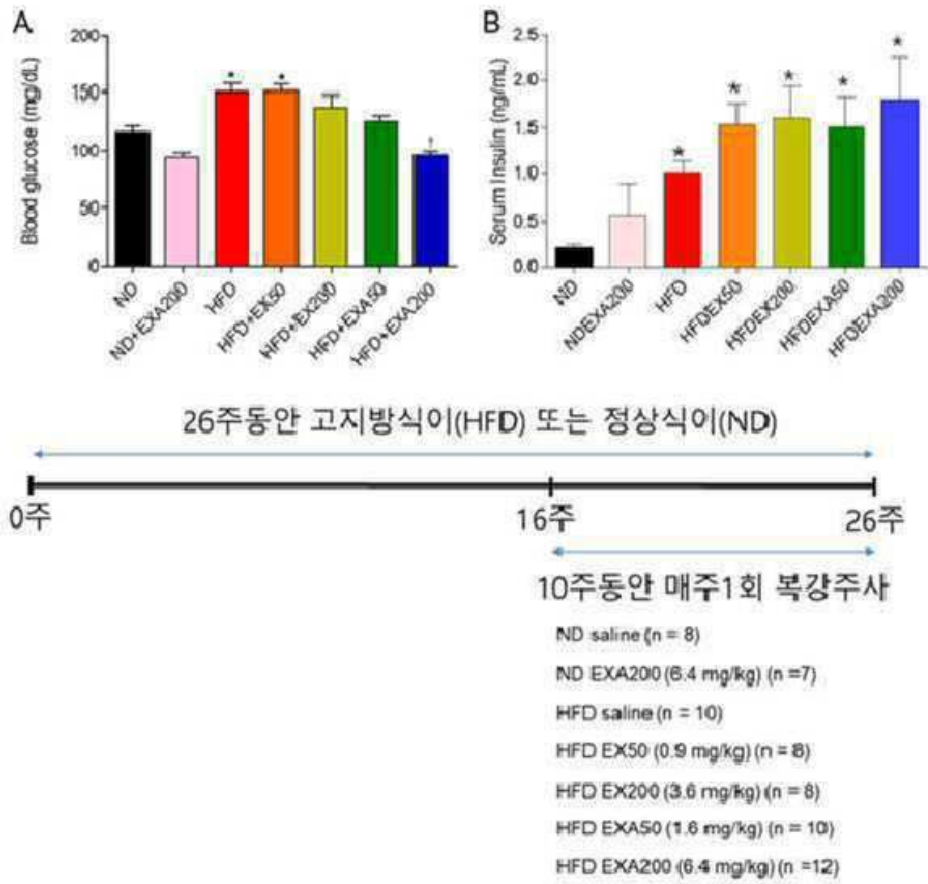
도면4



도면5



도면6

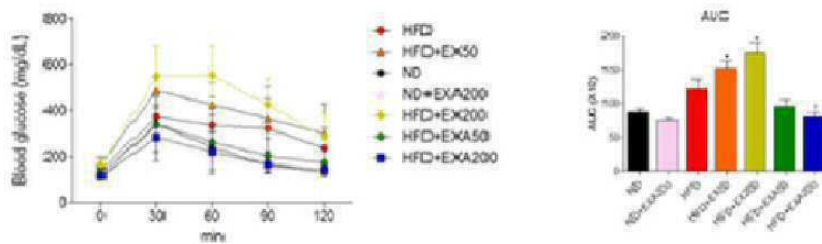


- 정상식이 (Normal Diet, ND), 고지방식(High-fat diet, HFD), IEX (Exendin-4), EXA (exendin-4-ABD-aFalf); NDEXA = ND+EXA; HFDEX=HFD+EX; HFDEXA=HFD+EXA

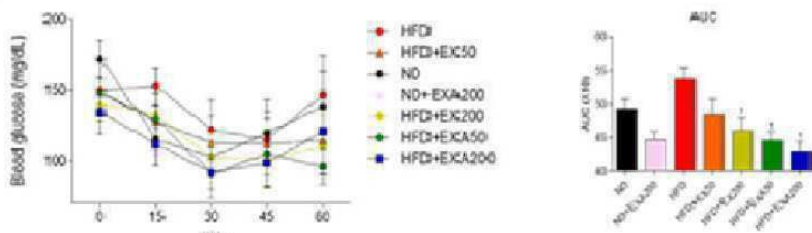
- SUMO-Exendin-4 분자량이 17.9kDa, SUMO-Exendin-4-ABD-aFalf의 분자량 31.2kDa

도면7

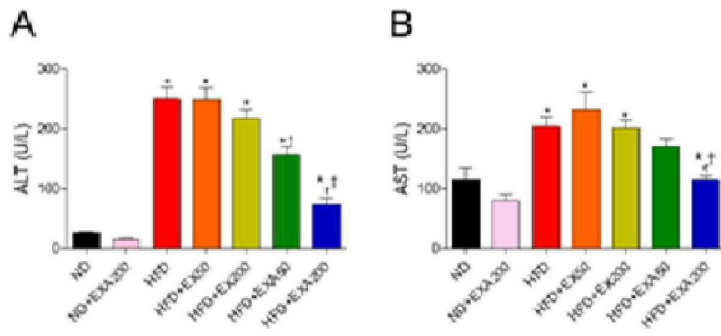
GTT



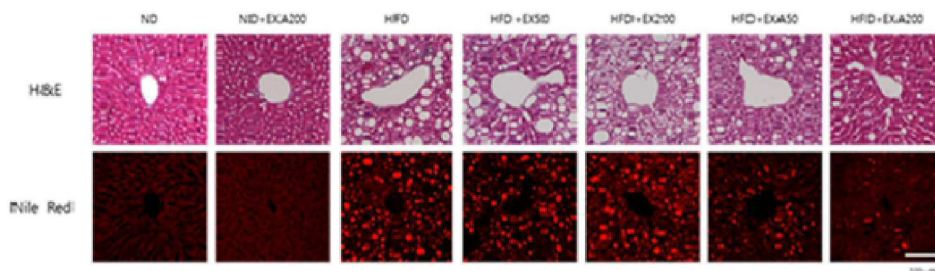
ITT



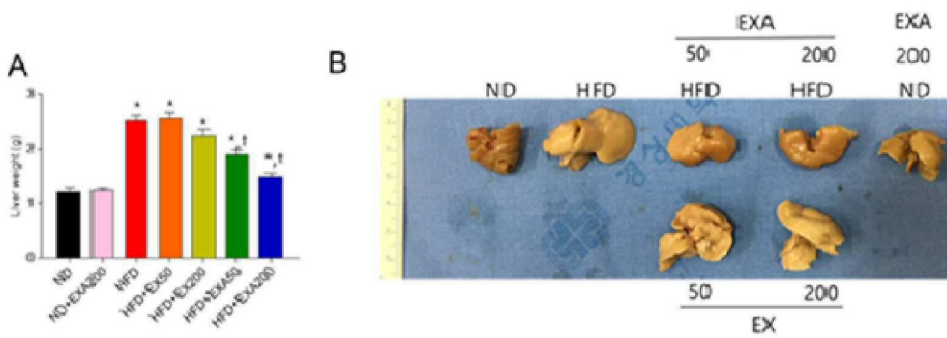
도면8



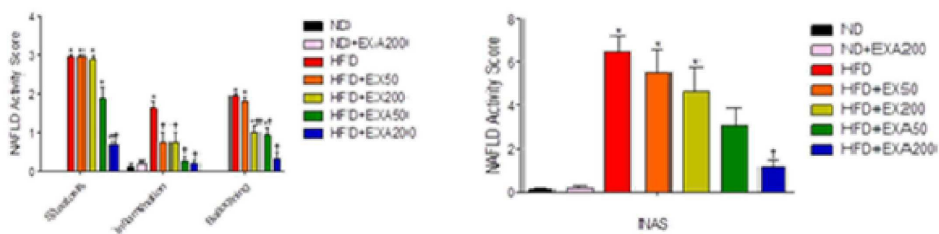
도면9



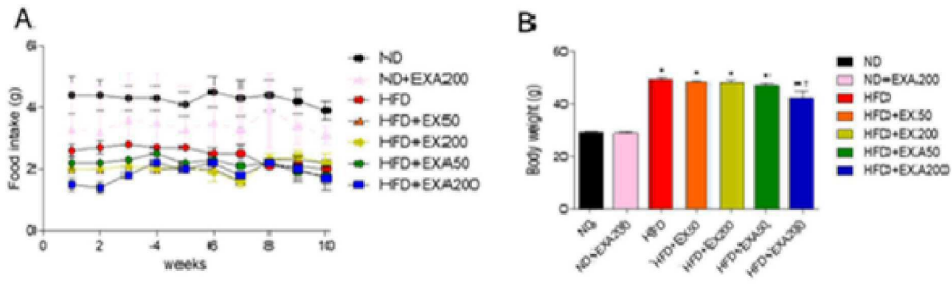
도면10



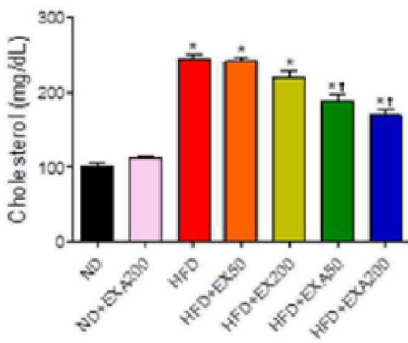
도면11



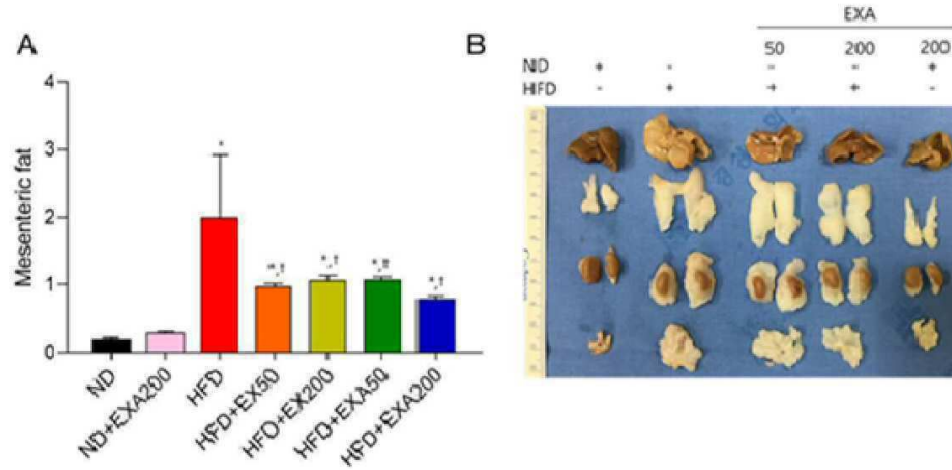
도면12



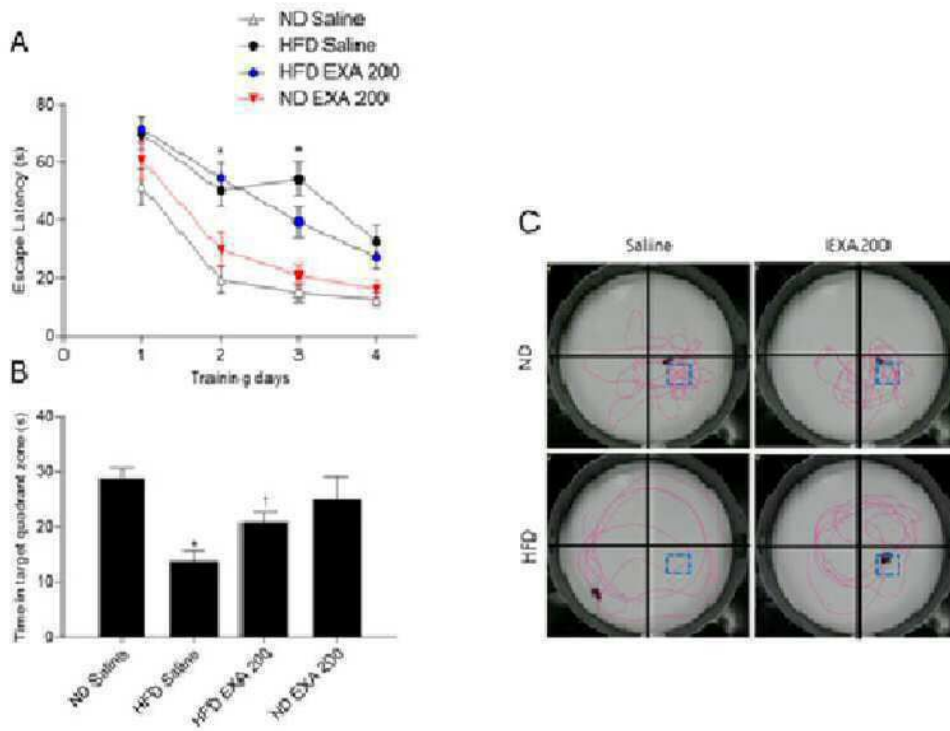
도면13



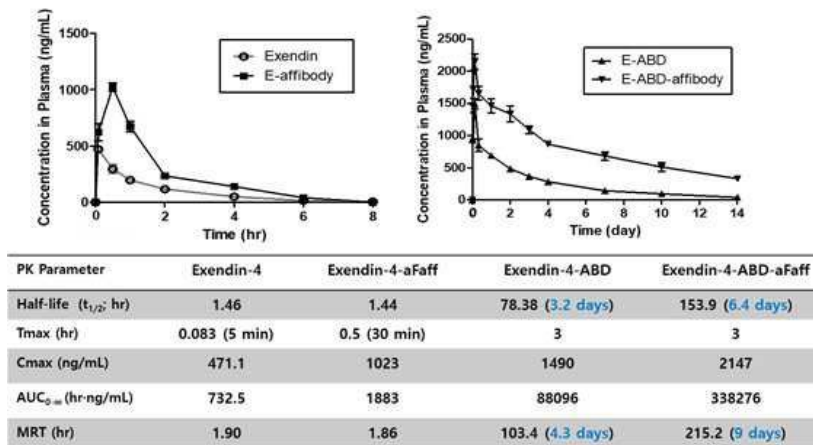
도면14



도면15



도면16



서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> A Long-acting Exendin-4 and Use of There
- <130> P19-B307
- <150> KR 1020180155957
- <151> 2018-12-06
- <160> 9
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1

<211> 39
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Exendin-4
 <400> 1
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35
 <210> 2
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Albumin Binding Domain
 <400> 2
 Leu Lys Glu Ala Lys Glu Lys Ala Ile Glu Glu Leu Lys Lys Ala Gly
 1 5 10 15
 Ile Thr Ser Asp Tyr Tyr Phe Asp Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val
 20 25 30
 Glu Gly Val Asn Ala Leu Lys Asp Glu Ile Leu Lys Ala

35 40 45
 <210> 3
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Anti-FcRn affibody
 <400> 3
 Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Phe Glu Ser Ala Ala His Glu Ile
 1 5 10 15
 Arg Trp Leu Pro Asn Leu Thr Tyr Asp Gln Arg Val Ala Phe Ile His
 20 25 30

Lys Leu Ser Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ser Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 4
 <211> 117
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Exendin-4
 <400> 4
 cagcgcgagg gcacctttac cagcgacctg agcaagcaaa tggaagagga agcggttcgt 60
 ctgtttattg agtggctgaa aaatggcggg ccgagcagcg gtgctccgcc gccgagc 117

<210> 5
 <211> 135
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Albumin Binding Domain
 <400> 5
 ctgaaagagg cgaaggaaaa agcgatcgag gaactgaaga aagcgggtat taccagcgac 60
 tactatttcg atctgatcaa caaggcgaaa accgtggagg gtgtaaacgc gctgaaggac 120
 gaaattctga aagcg 135

<210> 6
 <211> 174
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Anti-FcRn Affibody
 <400> 6
 gtggatgcga agtatgcgaa agagttcgaa agcgcggcgc atgagatccg ttggctgccg 60
 aacctgacct atgatcagcg tgttgcgttt attcacaac tgagcgacga tccgagccag 120
 agcagcgaac tgctgagcga agcgaaaaaa ctgaacgata gccaagcgcc gaag 174

<210> 7
 <211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ABD 035

<400> 7

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly

1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu

20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro

35 40 45

<210> 8

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-FcRn affibody

<400> 8

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Gln Asp Ala Ala Ala His Glu Ile

1 5 10 15

Arg Trp Leu Pro Asn Leu Thr Phe Asp Gln Arg Val Ala Phe Ile His

20 25 30

Lys Leu Ala Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ser Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 9

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-FcRn affibody

<400> 9

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Trp Met Arg Ala Ala His Glu Ile

1 5 10 15

Arg Trp Leu Pro Asn Leu Thr Phe Asp Gln Arg Val Ala Phe Ile His

20 25 30
Lys Leu Glu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ser Glu Ala
35 40 45
Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys

50 55