(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년12월30일
(11) 등록번호 10-2748352
(24) 등록일자 2024년12월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/46 (2006.01) *A23K 20/147* (2016.01)
A23L 33/17 (2016.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01) *C07K 14/47* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/463 (2013.01)
A23K 20/147 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2023-0166628
(22) 출원일자 2023년11월27일
심사청구일자 2023년11월27일
(56) 선행기술조사문헌
JP2016188225 A*
US20170166614 A1*
The Journal of Clinical Endocrinology&Metabolism, 91(12), pp4753-4761(2006.12.01.) 1부.*
경상대학교 대학원 약학과 학위논문(석사), pp1~39(2020.08.31.) 1부.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
신명철
경상남도 창원시 성산구 동산로 115, 120동 306호 (상남동, 대동아파트)
노구섭
경상남도 진주시 가좌안골길21번길 5, 102동 701호 (가좌동, 가좌제일풍경채)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

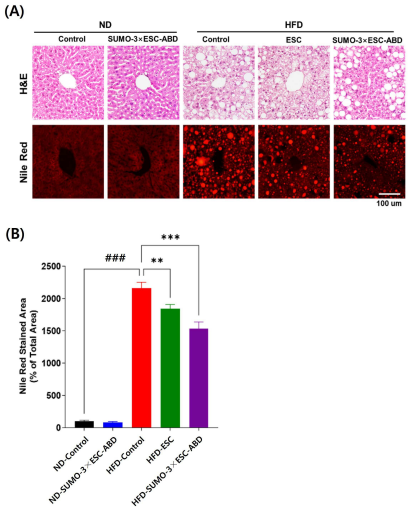
전체 청구항 수 : 총 8 항 심사관 : 한정선

(54) 발명의 명칭 **지속형 ESC-ABD 융합 단백질 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 지속형 ESC-ABD 융합 단백질 및 이의 용도에 관한 것으로, 상세하게는 에스쿨렌틴-2CHa(esculentin-2CHa; ESC) 및 알부민 결합 도메인(Albumin binding domain; ABD)을 포함하는 지속형 ESC-ABD 융합 단백질을 제조하였으며, 지방간 유도 동물모델에서 10주 동안 본 발명의 ESC-ABD 융합 단백질을 투여하였을 때, 간 세포내 지방축적 및 간 효소 수치가 감소되며, 지방간 관련 주요 단백질의 발현이 억제되었으며, 에스쿨렌틴-2CHa에 대비하여 본 발명의 ESC-ABD 융합 단백질의 혈중 반감기가 획기적으로 증가되는 것을 확인하였다. 따라서 본 발명의 조성물은 지방간 질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 의약품, 건강기능식품 등의 소재 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
A23L 33/17 (2016.08)
A61K 38/00 (2013.01)
A61P 1/16 (2018.01)
C07K 14/47 (2013.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/30 (2013.01)
C07K 2319/31 (2013.01)

(72) 발명자
이재웅
경상남도 진주시 진주대로 652-15, 101동 306호 (가좌동, 가좌 대화리네르빌)

아마타아 리주
경상남도 진주시 진주대로500번길 12-8, 305호 (가좌동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711197916
과제번호	00219399
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	대사이상 간질환 연구센터
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경상국립대학교 산학협력단
연구기간	2023.06.01 ~ 2024.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

N 말단으로부터 SUMO 태그, 에스쿨렌틴-2CHa(esculentin-2CHa; ESC) 및 알부민 결합 도메인(Albumin binding domain; ABD)이 순차적으로 결합되고, 상기 에스쿨렌틴-2CHa는 $(GGGGS)_4$의 아미노산 서열로 표시되는 펩티드 링커에 의해 3번 반복적으로 연결되며, 에스쿨렌틴-2CHa 및 알부민 결합 도메인은 펩티드 링커로 연결된 것을 특징으로 하며, 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 지속형 ESC-ABD 융합 단백질.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항의 지속형 ESC-ABD 융합 단백질을 코딩하는 유전자.

청구항 9

제8항의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 10

제9항의 재조합 벡터로 형질전환된, 인간을 제외한 숙주세포.

청구항 11

제1항의 지속형 ESC-ABD 융합 단백질을 유효성분으로 함유하는 비알코올 단순 지방간의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 12

삭제

청구항 13

제1항의 지속형 ESC-ABD 융합 단백질을 유효성분으로 함유하는 비알코올 단순 지방간의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 14

제1항의 지속형 ESC-ABD 융합 단백질을 유효성분으로 함유하는 비알코올 단순 지방간의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물.

청구항 15

제1항의 지속형 ESC-ABD 융합 단백질을 유효성분으로 함유하는 비알코올 단순 지방간의 예방 또는 개선용 사료첨가제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 지속형 ESC-ABD 융합 단백질 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 국내 간질환 사망률은 인구 십만명 당 23.5명으로 매우 높으며, 40대 사망원인 1위(41.1명/10만 명), 50대 사망원인 2위(72.4명/10만 명), 30대 사망원인 3위(10명/10만 명)를 차지하는 등 간질환은 한국 중년층 인구의 주요 사망원인이다.

[0003] 상기 간질환 중에서 지방간은 정상세포 내에는 존재하지 않는 중성지방이 간 세포 내에 비정상적으로 침착되어 보이는 현상이 나타난 것을 말한다. 정상 간은 약 5%가 지방조직으로 구성되어 있으며 중성지방, 지방산, 인지질, 콜레스테롤 및 콜레스테롤 에스터가 지방의 주요 성분이나, 일단 지방간이 발생하면 대부분의 성분이 중성지방으로 대체되며 중성지방의 양이 간 중량의 5% 이상이면 지방간으로 진단된다. 지방간이 악화되어 간세포 속의 지방 덩어리가 커지면 핵을 포함한 세포의 중요한 구성성분이 한쪽으로 밀려 간세포의 기능이 저하되며, 세포 내에 축적된 지방으로 인하여 팽창된 간세포들이 간세포 사이에 있는 미세 혈관과 임파선을 압박하여 간 내의 혈액과 임파액의 순환에 장애가 생기게 된다. 이렇게 되면 간세포는 산소와 영양공급을 적절히 받을 수 없어 간기능이 저하되는 것이다.

[0004] 비알코올지방간질환(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 알코올에 의한 간 손상이 아니라, 지방산이 중성지방의 형태로 간의 실질세포 내에 5% 이상 축적된 경우로 정의한다. 병리학적으로는 단순 지방간(simple steatosis)과 염증을 동반한 지방간염(steatohepatitis)으로 분류되는데, 장기간 방치 시, 간염, 간섬유, 간경변 등의 심각한 간 질환으로 이행될 수 있다. 국내에서도 생활양식의 변화로 인해 비알코올지방간질환 발생빈도가 증가하는 추세이다.

[0005] 에스쿨렌틴-2CHa[esculentin-2CHa(1-30); ESC]는 개구리속과 같은 많은 양서류 종의 피부 상피 세포막 외부에 위치한 항균 펩타이드이다. 이 펩타이드는 방어 반응 기능 및 제2형 당뇨병부터 세균 및 진균 감염에 이르는 다양한 인간 병리 치료에 적용 가능성 때문에 최근 더욱 중요해지고 있다. Esculentin-2CHa는 Esculentin-2 계열에 속하는 펩타이드로 광범위한 항균 활성과 인간 적혈구에 대한 낮은 세포독성으로 알려져 있다. 그러나 그 구조와 이러한 펩타이드가 수행하는 기능과의 관계에 대해서는 알려진 바가 많지 않다.

[0006] 지방간 관련 선행기술로는 한국등록특허 제1671248호에 '알파 망고스틴을 유효성분으로 함유하는 비알코올지방간질환 및 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물'이 개시되어 있으며, 한국등록특허 제2218545호에 '모노아세틸디아실글리세롤 화합물을 유효성분으로 함유하는 지방간 질환 치료용 조성물'이 개시되어 있다. 하지만, 본 발명의 '지속형 ESC-ABD 융합 단백질 및 이의 용도'에 대해서는 아직까지 개시된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 에스쿨렌틴-2CHa(esculentin-2CHa; ESC) 및 알부민 결합 도메인(Albumin binding domain; ABD)을 포함하는 지속형 ESC-ABD 융합 단백질을 제조하였으며, 지방간 유도 동물모델에서 10주 동안 본 발명의 ESC-ABD 융합 단백질을 투여한 결과, 간 세포 내 지방축적 및 간효소 수치가 감소되며, 지방간 관련 주요 단백질의 발현이 억제되었으며, 에스쿨렌틴-2CHa(ESC)에 대비하여 ESC-ABD 융합 단백질의 혈중 반감기가 획기적으로 증가되는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 에스쿨렌틴-2CHa(esculentin-2CHa; ESC) 및 알부민 결합 도메인(Albumin binding domain; ABD)을 포함하는 지속형 ESC-ABD 융합 단백질을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 지속형 ESC-ABD 융합 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 지속형 ESC-ABD 융합 단백질을 유효성분으로 함유하는 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 지속형 ESC-ABD 융합 단백질을 유효성분으로 함유하는 지방간 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 지속형 ESC-ABD 융합 단백질을 유효성분으로 함유하는 지방간 질환의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 지속형 ESC-ABD 융합 단백질을 유효성분으로 함유하는 지방간 질환의 예방 또는 개선용 사료첨가제를 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명은 지속형 ESC-ABD 융합 단백질 및 이의 용도에 관한 것으로, 상세하게는 에스쿨렌틴-2CHa(esculentin-2CHa; ESC) 및 알부민 결합 도메인(Albumin binding domain; ABD)을 포함하는 지속형 ESC-ABD 융합 단백질을 제조하였으며, 지방간 유도 동물모델에서 10주 동안 본 발명의 ESC-ABD 융합 단백질을 투여하였을 때, 간 세포 내 지방축적 및 간 효소 수치가 감소되며, 지방간 관련 주요 단백질의 발현이 억제되었으며, 에스쿨렌틴-2CHa에 대비하여 ESC-ABD 융합 단백질의 혈중 반감기가 획기적으로 증가되는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 본 발명의 지속형 ESC-ABD 융합 단백질(SUMO-3×ESC-ABD) 발현을 위해 pET28a-SUMO-3×플라스미드에 삽입된 부분의 모식도이다.

도 2는 본 발명의 지속형 ESC-ABD 융합 단백질(SUMO-3×ESC-ABD)의 발현을 쿠마시 염색하여 확인한 결과이다. CL: 파쇄된 대장균액의 원심분리 상징액(cell lysate); FT: Talon 레진 통과액(flow through); W: Talon 레진 세척액(wash); E: Talon 레진 용출물(eluent); 1 내지 7: 초원심분리(ultracentrifuge) 1-7회를 통해 정제된 SUMO-3×ESC-ABD; M: 크기 마커.

도 3은 지방간 유도 동물모델에서 본 발명의 지속형 ESC-ABD 융합 단백질(SUMO-3×ESC-ABD) 투여에 따른 간 크기 및 무게 변화를 육안으로 관찰한 사진(A) 및 이를 정량화한 그래프(B)이다. ND-Control은 아무것도 처리하지 않은 정상식이군이고, ND-SUMO-3×ESC-ABD는 정상식이하고 본 발명의 ESC-ABD 융합 단백질(SUMO-3×ESC-ABD)을 투여한 군이며, HFD-Control은 아무것도 처리하지 않은 고지방식이군이고, HFD-ESC는 고지방식이하고 에스쿨렌틴-2CHa(ESC)을 투여한 군이며, HFD-SUMO-3×ESC-ABD는 고지방식이하고 본 발명의 SUMO-3×ESC-ABD를 투여한 군이다. ###은 정상식이군(ND-Control) 대비 고지방식이군(HFD-Control)의 간 무게가 유의미하게 증가하였다는 것으로, $p<0.001$이고, **은 고지방식이군(HFD-Control) 또는 ESC 투여군(HFD-ESC) 대비 본 발명의 SUMO-3×ESC-ABD 투여군(HFD-SUMO-3×ESC-ABD)의 간 무게가 유의미하게 감소하였다는 것으로, $p<0.01$이다.

도 4는 지방간 유도 동물모델에서 본 발명의 지속형 ESC-ABD 융합 단백질(SUMO-3×ESC-ABD) 투여에 따른 간 세포 내 지방축적을 H&E 염색과 Nile Red 형광염색으로 관찰한 사진(A) 및 이를 정량화한 그래프(B)이다. ###은 아무것도 처리하지 않은 정상식이군(ND-Control) 대비 아무것도 처리하지 않은 고지방식이군(HFD-Control)의 지방축적이 유의미하게 증가하였다는 것으로, $p<0.001$이고, **, ***은 고지방식이군(HFD-Control) 대비 ESC 투여군(HFD-ESC) 또는 본 발명의 SUMO-3×ESC-ABD 투여군(HFD-SUMO-3×ESC-ABD)의 지방축적이 유의미하게 감소하였다는 것으로, **은 $p<0.01$이고 ***은 $p<0.001$이다.

도 5는 지방간 유도 동물모델에서 본 발명의 지속형 ESC-ABD 융합 단백질(SUMO-3×ESC-ABD) 투여에 따른 간 효소 수치인 ALT(A) 및 AST(B)의 변화를 분석한 결과이다. ###은 아무것도 처리하지 않은 정상식이군(ND-Control)

대비 아무것도 처리하지 않은 고지방식이군(HFD-Control)의 AST 및 ALT의 함량이 유의미하게 증가하였다는 것으로, $p<0.001$이고, *, ***은 고지방식이군(HFD-Control) 대비 ESC 투여군(HFD-ESC) 또는 본 발명의 SUMO-3×ESC-ABD 투여군(HFD-SUMO-3×ESC-ABD)의 AST 및 ALT의 함량이 유의미하게 감소하였다는 것으로, *은 $p<0.05$이고 ***은 $p<0.001$이다.

도 6은 지방간 유도 동물모델에서 본 발명의 지속형 ESC-ABD 융합 단백질(SUMO-3×ESC-ABD) 투여에 따른 GS(glutamine synthetase) 및 CD36의 발현 변화를 이중면역형광염색 후 광학현미경으로 촬영한 사진(A) 및 이를 정량화한 그래프(B)이다. ###은 아무것도 처리하지 않은 정상식이군(ND-Control) 대비 아무것도 처리하지 않은 고지방식이군(HFD-Control)의 GS 및 CD36의 발현량이 유의미하게 증가하였다는 것으로, $p<0.001$이고, **, ***은 고지방식이군(HFD-Control) 대비 본 발명의 SUMO-3×ESC-ABD 투여군(HFD-SUMO-3×ESC-ABD)의 GS 및 CD36의 발현량이 유의미하게 감소하였다는 것으로, **은 $p<0.01$이고 ***은 $p<0.001$이다.

도 7은 지방간 유도 동물모델에서 본 발명의 지속형 ESC-ABD 융합 단백질(SUMO-3×ESC-ABD) 투여에 따른 간내 지질축적의 주요 마커인 CD36, PPARγ 및 페릴리핀-2(perilipin-2)의 발현 변화를 나타낸 밴드 사진(A) 및 이를 정량화한 그래프(B)이다. #, ##, ###은 아무것도 처리하지 않은 정상식이군(ND-Control) 대비 아무것도 처리하지 않은 고지방식이군(HFD-Control)의 CD36, PPARγ 및 페릴리핀-2의 발현량이 유의미하게 증가하였다는 것으로, #은 $p<0.05$이고, ##은 $p<0.01$이며, ###은 $p<0.001$이다. *, **, ***은 고지방식이군(HFD-Control) 대비 ESC 투여군(HFD-ESC) 또는 본 발명의 SUMO-3×ESC-ABD 투여군(HFD-SUMO-3×ESC-ABD)의 CD36, PPARγ 및 페릴리핀-2의 발현량이 유의미하게 감소하였다는 것으로, *은 $p<0.05$이고, **은 $p<0.01$이며 ***은 $p<0.001$이다.

도 8은 본 발명의 지속형 ESC-ABD 융합 단백질(SUMO-3×ESC-ABD)에 대한 약동학적 특성을 확인한 결과이다. (A)는 에스쿨렌틴-2CHa(ESC)에 대한 혈중 반감기를 측정한 것이고, (B)는 ESC-ABD 융합 단백질(SUMO-3×ESC-ABD)에 대한 혈중 반감기를 측정한 것이다. IV(Intravenous)는 정맥 내 주사를 의미하고, SC(subcutaneous)는 피하 내 투여를 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 에스쿨렌틴-2CHa(esculentin-2CHa; ESC) 및 알부민 결합 도메인(Albumin binding domain; ABD)을 포함하는 지속형 ESC-ABD 융합 단백질을 제공한다.

[0019] 본 발명의 ESC-ABD 융합 단백질은 에스쿨렌틴-2CHa에 비해 혈중 반감기가 427배 증가된 것으로 이하 '지속형 ESC-ABD 융합 단백질'이라 칭한다.

[0020] 상기 지속형 ESC-ABD 융합 단백질은 N 말단으로부터 SUMO 태그, 에스쿨렌틴-2CHa 및 알부민 결합 도메인이 순차적으로 결합된 것을 특징으로 하나, 이에 제한되지 않는다.

[0021] 상기 에스쿨렌틴-2CHa는 펩티드 링커에 의해 3번 반복적으로 연결되는 것일 수 있으며, 상기 펩티드 링커는 $(GGGGS)_4$의 아미노산 서열로 표시되는 것일 수 있다.

[0022] 상기 에스쿨렌틴-2CHa 및 알부민 결합 도메인은 펩티드 링커로 연결된 것이 바람직하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0023] 상기 에스쿨렌틴-2CHa는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되고, 알부민 결합 도메인은 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0024] 상기 지속형 ESC-ABD 융합 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 또한, 본 발명은 상기 지속형 ESC-ABD 융합 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다.

[0026] 본 발명에 따른 지속형 ESC-ABD 융합 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 5의 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로는, 상기 유전자는 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0027] 또한, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

[0028] 본 발명의 재조합 벡터는 회수되는 목적 단백질, 즉 지속형 ESC-ABD 융합 단백질의 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(IBI, 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 지속형 ESC-ABD 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 ESC-ABD 융합 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 이용하여, 상기 벡터가 형질전환된 재조합 미생물이 구축될 수 있다.

[0029] 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[0030] 본 발명에서, 상기 지속형 ESC-ABD 융합 단백질을 코딩하는 유전자는 재조합 벡터 내로 삽입될 수 있다. 용어 "재조합 발현 벡터"는 세균 플라스미드, 파아지, 효모 플라스미드, 식물 세포 바이러스, 포유동물 세포 바이러스, 또는 다른 벡터를 의미한다. 대체로, 임의의 플라스미드 및 벡터는 숙주 내에서 복제 및 안정화할 수 있다면 사용될 수 있다. 상기 발현 벡터의 중요한 특성은 복제 원점, 프로모터, 마커 유전자 및 번역 조절 요소(translation control element)를 가지는 것이다.

[0031] 지속형 ESC-ABD 융합 단백질을 코딩하는 유전자 서열 및 적당한 전사/번역 조절 신호를 포함하는 발현 벡터는 당업자에 주지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 상기 방법은 시험관 내 재조합 DNA 기술, DNA 합성 기술 및 생체 내 재조합 기술 등을 포함한다. 상기 DNA 서열은 mRNA 합성을 이끌기 위해 발현 벡터 내의 적당한 프로모터에 효과적으로 연결될 수 있다. 또한 발현 벡터는 번역 개시 부위로서 리보좀 결합 부위 및 전사 터미네이터를 포함할 수 있다.

[0032] 본 발명의 벡터를 원핵세포에 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, 대장균(Escherichia coli) Rosetta, 대장균 JM109, 대장균 BL21, 대장균 RR1, 대장균 LE392, 대장균 B, 대장균 X 1776, 대장균 DH5α, 대장균 W3110, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 츄린겐시스(*Bacillus thuringiensis*)와 같은 바실러스 속 균주, 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아 마르세슨스(*Serratia marcescens*) 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.

[0033] 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주세포로서, 효모(Saccharomyce cerevisiae), 곤충세포, 사람세포(예컨대, CHO 세포주(Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, HEK 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용될 수 있다.

[0034] 본 발명의 형질전환된 숙주세포는 대장균 BL21 균주일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0035] 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은, 숙주세포가 원핵 세포인 경우, $CaCl_2$ 방법, 하나한 방법(Hanahan, D., 1983 J. Mol. Biol. 166, 557-580) 및 전기천공 방법 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포좀-매개 형질감염법, DEAE-덱스트란 처리법, 및 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있다.

[0036] 또한, 본 발명은 상기 지속형 ESC-ABD 융합 단백질을 유효성분으로 함유하는 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0037] 상기 지방간 질환은 비알코올 또는 알코올 단순 지방간; 비알코올 또는 알코올 지방간염; 및 비알코올 또는 알코올 간경변 중에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 바람직하게는 비알코올 단순 지방간일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0038] 본 발명의 조성물은 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있으며, 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결

합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 캡슐제, 산제, 과립제, 정제, 환제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성 용제 및 현탁 용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 비경구 투여 시 피부 외용 또는 복강 내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사 방식을 선택하는 것이 바람직하다.

[0039] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효량의 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명은 상기 지속형 ESC-ABD 융합 단백질을 유효성분으로 함유하는 지방간 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0041] 본 발명의 지방간 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽 및 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다.

[0042] 본 발명의 건강기능식품 조성물을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 지속형 ESC-ABD 융합 단백질을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합 양은 그의 사용 목적(예방 또는 개선)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간 섭취하는 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0043] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 지속형 ESC-ABD 융합 단백질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합체 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0044] 본 발명의 조성물을 건강 음료로 사용할 경우, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 덱스트린, 사이클로 덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마린, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린 또는 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100g당 일반적으로 약 0.01~0.04g, 바람직하게는 약 0.02~0.03g이다. 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물은 100 중량부 당 0.01~0.1중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0045] 또한, 본 발명은 상기 지속형 ESC-ABD 융합 단백질을 유효성분으로 함유하는 지방간 질환의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물을 제공한다.

[0046] 본 발명의 지속형 ESC-ABD 융합 단백질을 포함하는 수의학적 조성물은 통상의 방법에 따른 적절한 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 지속형 ESC-ABD 융합 단백질을 포함하는 수의학적 조성물에 포함될 수 있는 부형제 및 희석제로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 세탄올, 스테아릴알콜, 유동파라핀, 솔비탄모노스테아레이트, 폴리소르베이트 60, 메칠파라벤, 프로필파라벤 및 광물유를 들 수 있다.

[0047] 본 발명에 따른 지속형 ESC-ABD 융합 단백질을 포함하는 수의학적 조성물은 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향신료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있는데, 본 발명에 의한 수의학적 조성물은 동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화될 수 있고, 제형은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 용액, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캅셀, 좌제, 멸균 주사용액, 멸균 외용제 등의 형태일 수 있다.

[0048] 본 발명에 의한 수의학적 조성물은 동물의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 1일 1회 내지 수회 투여할 수 있고, 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0049] 또한, 본 발명은 상기 지속형 ESC-ABD 융합 단백질을 유효성분으로 함유하는 지방간 질환의 예방 또는 개선용 사료첨가제를 제공한다.

[0050] 본 발명의 사료 첨가제는 사료관리법상의 보조사료에 해당한다. 본 발명에서 용어 '사료'는 동물이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분을 의미할 수 있다. 상기 사료의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 사료를 사용할 수 있다. 상기 사료의 비 제한적인 예로는, 곡물류, 근과류, 식품 가공 부산물류, 조류, 섬유질류, 제약 부산물류, 유지류, 전분류, 박류 또는 곡물 부산물류 등과 같은 식물성 사료; 단백질류, 무기물류, 유지류, 광물성류, 유지류, 단세포 단백질류, 동물성 플랑크톤류 또는 음식물 등과 같은 동물성 사료를 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

[0051] 이하, 본 발명의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0052] **실시예 1. 본 발명의 지속형 ESC-ABD 융합 단백질(SUMO-3×ESC-ABD) 발현용 플라스미드 제작**

[0053] ESC-ABD 융합 단백질 발현용 pET28a-SUMO-3×ESC-ABD 플라스미드의 제작을 위해, esculentin-2CHa(1-30) 3개가 $(GGGGS)_4$ 링커로 연결된 유전자(402bp, Genscript)를 제한효소(NdeI 및 NheI)로 자른 후, 미리 제작한 pET28a-SUMO-ABD 벡터에 T4 ligase를 활용하여 삽입하였다(도 1). 제작된 pET28a-SUMO-3×ESC-ABD의 발현 플라스미드는 대장균 DH5α에 형질주입하여 유지하였다.

[0054] 본 발명에서 사용된 아미노산 서열은 하기 표 1과 같고, ESC(esculentin-2CHa) 및 ABD(Albumin binding domain)는 $(GGGGS)_4$ 링커로 연결되어 있다.

표 1

[0055] 본 발명에서 사용된 아미노산 서열

	아미노산 서열
esculentin-2CHa	**GFSSIFRGVAKFASKGLGKDLAKLGVDLVA** (서열번호 1)
ABD	LKEAKEKAIEELKKAGITSDYYFDLINKAKTVEGVNALKDEILKA (서열번호 2)
SUMO	SDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAFAKRQGKEMDSLRFLYDGIRIQADQTPEDLDMEDNDIIEAHREQIGGG (서열번호 3)
SUMO-3×ESC-ABD	MGSSHHHHHHGSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAFAKRQGKEMDSLRFLYDGIRIQADQTPEDLDMEDNDIIEAHREQIGGGHM**GFSSIFRGVAKFASKGLGKDLAKLGVDLVAG**GGGSGGGGSGGGGSGGGGS**GFSSIFRGVAKFASKGLGKDLAKLGVDLVA**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**GFSSIFRGVAKFASKGLGKDLAKLGVDLVA**ASGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLKEAKEKAIEELKKAGITSDYYFDLINKAKTVEGVNALKDEILKA (서열번호 4)

[0056] **실시예 2. 본 발명의 지속형 ESC-ABD 융합 단백질(SUMO-3×ESC-ABD) 발현 및 정제**

[0057] ESC-ABD 융합 단백질의 발현을 위해 pET28A-SUMO-3×ESC-ABD를 생산용 대장균주인 BL21에 형질주입 후, 카나마이신(80㎍/㎖)이 함유된 LB 한천배지에서 선택배양하였다. 이후, 한천배지에서 자란 콜로니를 하나 취하여 50㎖의 액체 LB 배지에 접종 후, 250 rpm의 회전속도로 37℃에서 밤새 배양하였다. 다음날, 이 스타터 배양을 1L의 카나마이신이 함유된 대용량 LB 배지에 가한 후 동일한 조건에서 배양하였다. 이 배양액이 600nm에서 흡광도가 1에 도달하면 IPTG(최종농도: 0.5mM)를 가한 후, 4시간 동안 추가로 배양하였다. 배양이 끝나고 나면, 20mM 인산완충용액[300mM NaCl, 1% leupeptin 및 1% soybean protease inhibitor(Sigma Aldrich, pH 7] 60㎖를 가하여 현탁시키고, 초음파파쇄기를 사용하여 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-3×ESC-ABD 단백질은 용출 완충액(20mM PBS, 30mM NaCl, 300mM imidazole, pH 7)을 사용하여 얻었다. SUMO-3×ESC-ABD의 발현 및 정제는 쿠마시 염색으로 확인하였다(도 2).

[0058] **실시예 3. 본 발명의 지속형 ESC-ABD 융합 단백질(SUMO-3×ESC-ABD)의 지방간 개선 효과**

[0059] **1) 간 크기와 무게 변화 관찰 및 간 세포 내 지방 축적 확인**

[0060] 3주령의 수컷 C57BL/6J 마우스를 하나상사로부터 구입하여 경상국립대학교 동물실험실에서 사육을 하였다. 14주 동안 정상식이(Normal Diet; ND) 또는 고지방식이(High-fat diet; HFD, 60%Kcal fat 함유, 미국 Research Diet 사)의 사료를 먹인 후 5그룹(각 5마리)으로 나누어 10주 동안 매주 2회 약물을 복강주사 하였다: ND-Control: 아무것도 처리하지 않은 정상식이군, ND-SUMO-3×ESC-ABD: 정상식이 및 SUMO-3×ESC-ABD 투여군, HFD-Control: 아무것도 처리하지 않은 고지방식이군이고, HFD-ESC: 고지방식이 및 ESC 투여군, HFD-SUMO-3×ESC-ABD: 고지방식이 및 SUMO-3×ESC-ABD 투여군. 오전 10시에 각 그룹의 마우스에게 0.9% 생리식염수, ESC(Esculentin-2CHa(1-30) 펩타이드; 450nmol/kg) 또는 SUMO-3×ESC-ABD(150nmol/kg)를 복강주사 하였다.

[0061] 10주간의 약물 투여 후, 마우스에게 마취제 Zoletil(Virbac Laboratories)을 근육주사 후 고정액(4% paraformaldehyde in 0.1M PBS)으로 심장 관류하였다. 간을 적출하여 무게를 측정한 후 6시간 동안 추가 고정액에 넣어 두었다. H&E(Hematoxylin and eosin) 염색을 하기 위해 파라핀 간절편을 만들고, 간세포 내 지방방울(lipid droplet)을 관찰하기 위해 Nile Red(Sigma)로 형광염색을 하여 광학 및 형광현미경으로 관찰하였다.

[0062] 그 결과, 도 3에 개시한 바와 같이 정상식이군(ND-Control) 대비 고지방식이군(HFD-Control)의 간 무게가 약 2배 증가하였으며, 육안으로 관찰했을 때도 간 크기가 더 크고 노란색을 띄는 것을 확인할 수 있었다. 반면에, 고지방식이군(HFD) 대비 본 발명의 SUMO-3×ESC-ABD 투여군(HFD-SUMO-3×ESC-ABD)의 경우, 마우스 간의 무게가 유의한 수준으로 감소되고, 간의 색도 정상식이군(ND-Control)과 유사한 수준으로 회복되는 것을 확인하였다. 이와 대조적으로, ESC 투여군(HFD-ESC)에서는 고지방식이군과 비교하여 간의 무게 및 색 변화가 거의 없는 것을 확인하였다.

[0063] 또한, H&E 염색 결과, 정상식이군(ND-Control) 대비 고지방식이군(HFD-Control)에서 지방축적이 된 다수의 간세포들이 관찰되었고, 지방방울도 현저하게 생성된 것을 알 수 있었다. 이에 반해, 본 발명의 SUMO-3×ESC-ABD 투여군(HFD-SUMO-3×ESC-ABD)에서는 지방축적이 억제되고 지방방울도 유의미하게 감소된 것을 확인하였다(도 4).

[0064] **2) 간 효소 수치 변화 확인**

[0065] 10주간의 약물투여 후, 마우스를 마취하고 좌심실을 통해 전혈(whole blood)을 1㎖ 주사기로 뽑은 후 원심분리기를 이용하여 혈청(serum) 및 혈구(blood cell)를 분리하였다. 혈청은 2가지 간효소인 AST 및 ALT 분석을 녹십자㈜에 의뢰하였다.

[0066] 그 결과, 도 5에 개시한 바와 같이 두 가지 간 효소 모두 고지방식이 마우스에서 증가하였으나, SUMO-3×ESC-ABD 투여군에서 두 효소 수치가 모두 감소되었다. 반면에, ESC 투여군(HFD-ESC)에서는 AST 수치가 감소할 뿐, ALT 수치는 고지방식이군과 유사한 수준으로 확인되었다.

[0067] **3) 지방간 관련 주요 단백질의 발현 변화 확인**

[0068] 10주간의 약물 투여 후, 마우스에게 마취제 Zoletil(Virbac Laboratories)을 근육주사 후 고정액(4% paraformaldehyde in 0.1M PBS)으로 심장 관류하였다. 심장 관류 이후, 마우스에서 간을 적출하여 무게를 측정한 후 6시간 동안 추가 고정액에 넣어 두었다. 간 절편을 만들고, 이를 GS(glutamine synthetase) 항체 및 항-CD36 항체를 활용하여 이중면역형광염색(double immunohistochemistry) 후 광학현미경으로 관찰하였다. 이와 더

불어, 동결된 간 조직에서 단백질을 추출하여 이를 웨스턴 블롯(Western blot)을 통해 지방간과 연관된 주요 지표 단백질들의 발현량을 확인하였다.

[0069] 그 결과, 도 6에 개시한 바와 같이 정상식이군(ND-Control) 대비 고지방식이군(HFD-Control)에서 간 내 지질축적과 연관성이 높은 CD36 및 GS의 발현량이 증가하였고, 이에 대비하여 본 발명의 SUMO-3×ESC-ABD 투여군(HFD-SUMO-3×ESC-ABD)에서는 모두 유의하게 감소하였다.

[0070] 웨스턴 블롯 결과에서도 마찬가지로, 정상식이군(ND-Control) 보다 고지방식이군(HFD-Control)에서 간 내 지질축적의 주요 마커인 CD36, PPARγ 및 perilipin-2의 발현이 현저하게 증가되었고, 이에 대비하여 본 발명의 SUMO-3×ESC-ABD 투여군(HFD-SUMO-3×ESC-ABD)에서 이러한 마커들의 발현이 모두 유의미하게 감소하였다(도 7).

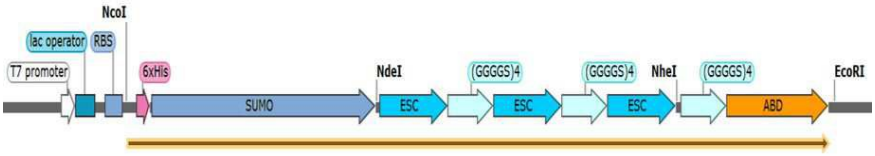
[0071] **실시예 4. 본 발명의 지속형 ESC-ABD 융합 단백질(SUMO-3×ESC-ABD)의 혈중체류기간 증가 효과**

[0072] 6주령의 수컷 C57BL/6J 마우스를 하나상사로부터 구입하여 경상국립대학교 동물실험실에서 사육을 하였다. 1주간 환경에 적응 시킨 후 3그룹(각 5마리)으로 나누고, 1그룹의 마우스에겐 근적외선 염료인 Flamma-774(Bioacts)가 표지된 ESC(2700nmol/kg)를 정맥 내 투여 하고, 투여 후 0, 2, 5, 10, 20 그리고 30분에 채혈하였다. 그룹 2 및 3의 마우스에겐 Flamma-774가 표지된 SUMO-3×ESC-ABD(250nmol/kg)를 각각 정맥 내(IV; IntraVenous) 및 피하(SC; SubCutaneous) 주사하고, 투여 후 0, 0.5, 1, 4, 8, 24, 48, 그리고 72 시간에 채혈하였다. 채혈한 혈액은 원심분리하여 혈장을 분리하고, 형광측정법을 활용하여 혈장 내 ESC 및 SUMO-3×ESC-ABD의 농도를 측정하였다. 시간에 따른 약물의 혈장농도 자료를 토대로 Phoenix®WinNonlin® 소프트웨어(Certara LP)를 활용하여 ESC 및 SUMO-3×ESC-ABD의 약물동력학적 분석을 수행하였다.

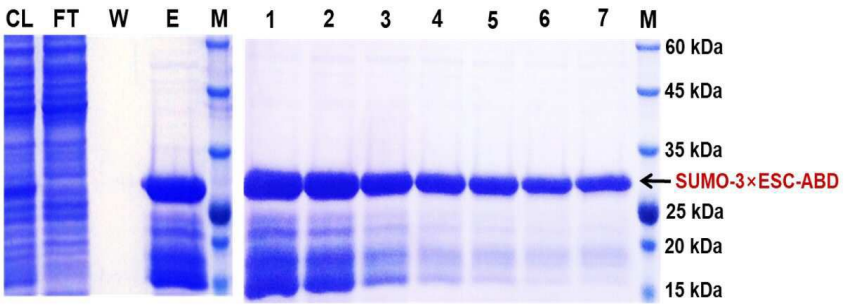
[0073] 그 결과, 도 8에 개시한 바와 같이 ESC의 정맥(IV) 내 투여 시 혈중 반감기는 1.7분이었고, 이에 비해 본 발명의 SUMO-3×ESC-ABD의 정맥 내 투여 시 혈중 반감기는 12.1시간으로 ESC와 비교하였을 때 427배가 증가되었다. 또한, 약물에 대한 체내 노출량을 나타내는 지표인 시간-농도 곡선에서의 곡선하면적(AUC: area under the curve)도 ESC 대비 SUMO-3×ESC-ABD는 86배 증가되었다. 한편, 본 발명의 SUMO-3×ESC-ABD를 피하(SC) 투여한 경우의 혈중 반감기는 정맥 내 투여한 경우 보다도 2배 정도 증가된 23.5 시간인 것을 확인하였다.

도면

도면1



도면2

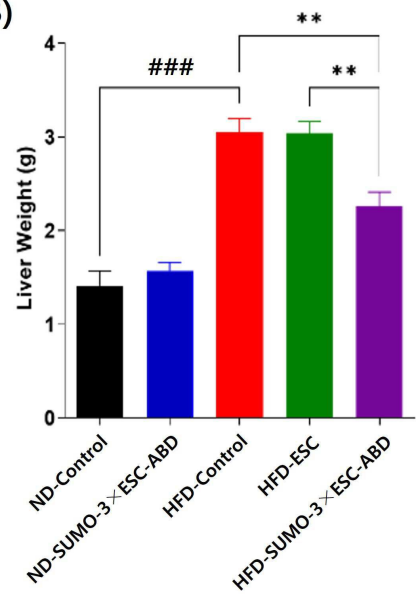


도면3

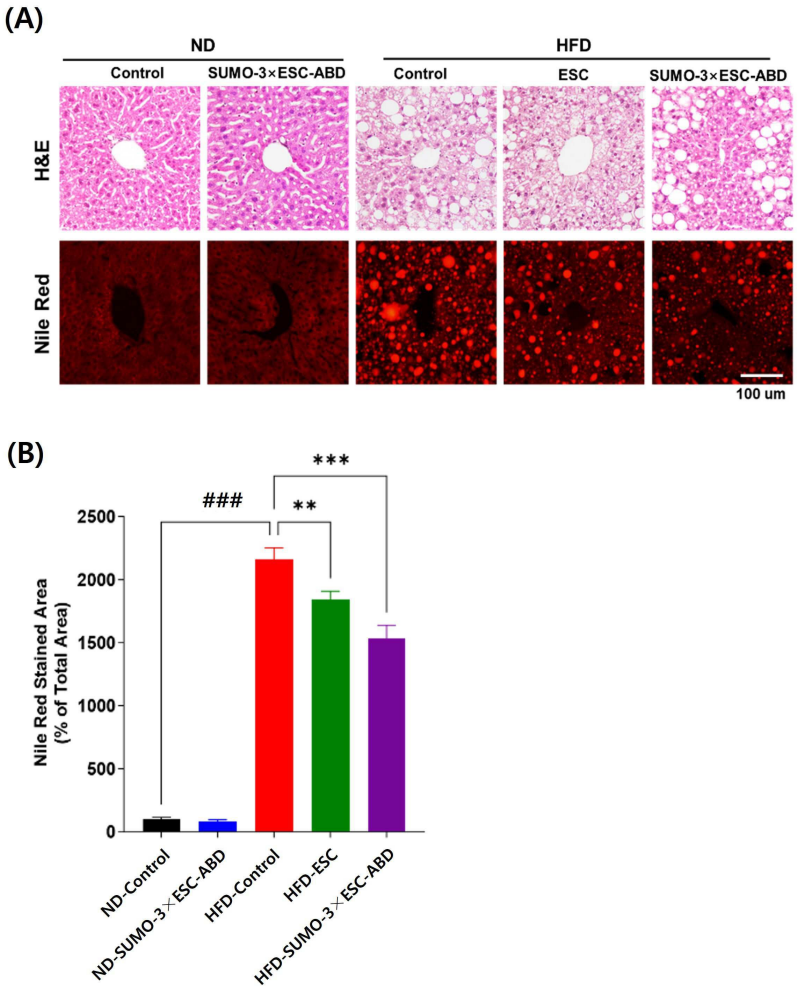
(A)


ND
HFD
Control
SUMO-3×ESC-ABD
Control
ESC
SUMO-3×ESC-ABD

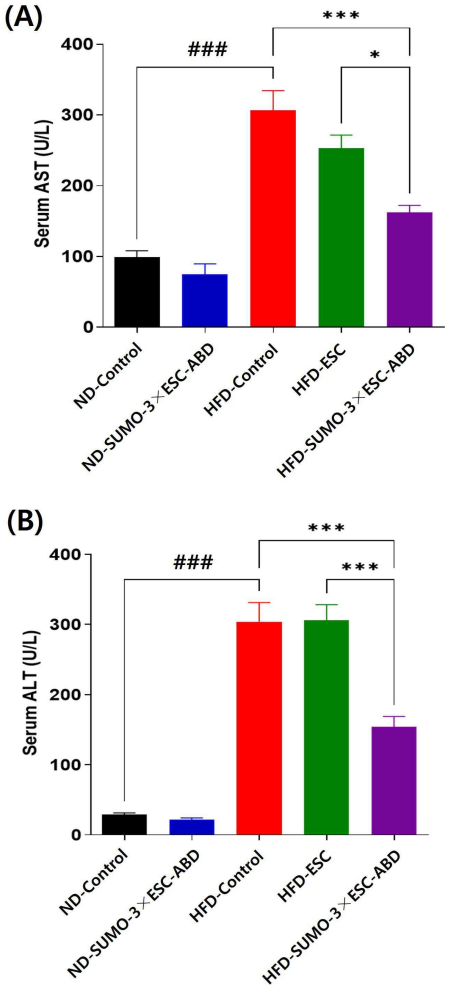
(B)


Liver Weight (g)
0
1
2
3
4
###
**
**
ND-Control
ND-SUMO-3×ESC-ABD
HFD-Control
HFD-ESC
HFD-SUMO-3×ESC-ABD

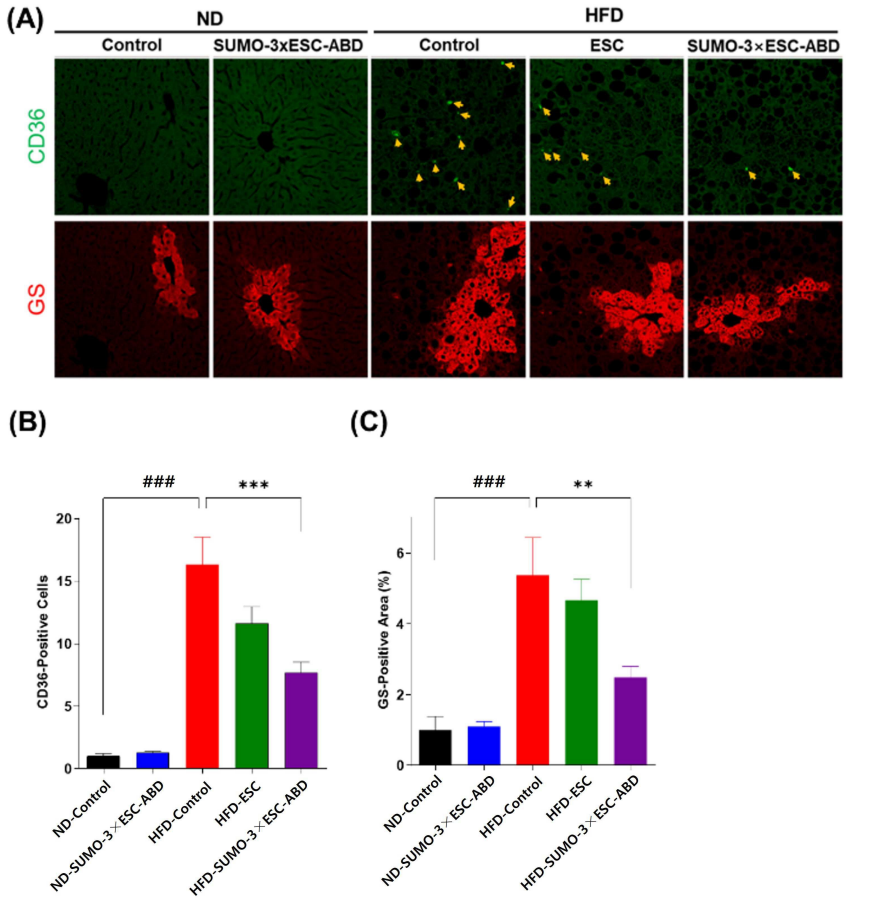
도면4


(A)
ND
HFD
Control
SUMO-3×ESC-ABD
Control
ESC
SUMO-3×ESC-ABD
H&E
Nile Red
100 um
(B)
###
**
***
Nile Red Stained Area (% of Total Area)
2500
2000
1500
1000
500
0
ND-Control
ND-SUMO-3×ESC-ABD
HFD-Control
HFD-ESC
HFD-SUMO-3×ESC-ABD

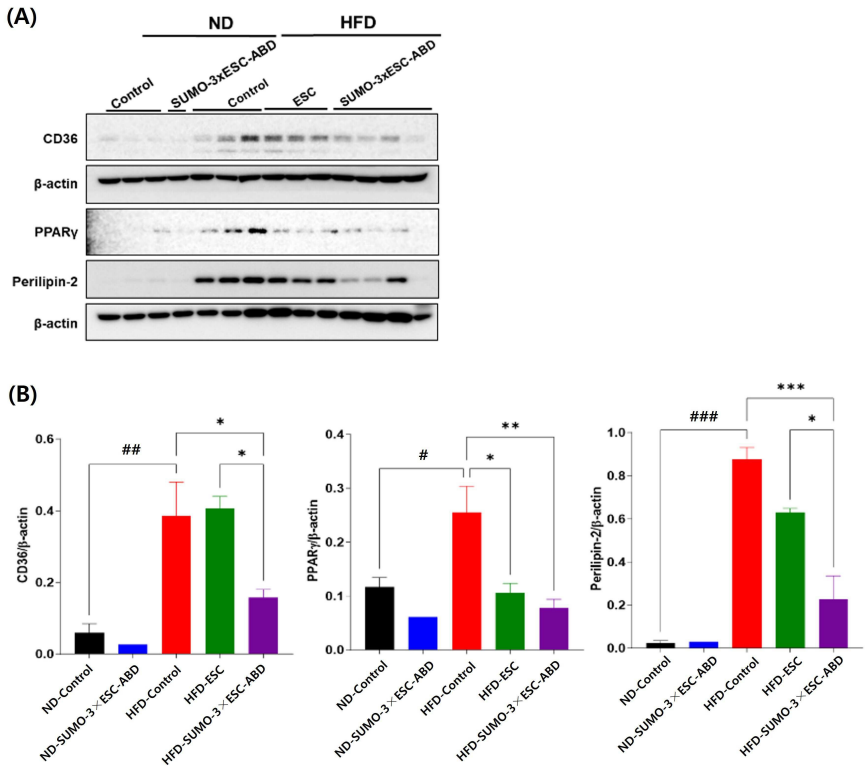
도면5


(A)
Serum AST (U/L)
400
300
200
100
0
###
***
*
ND-Control
ND-SUMO-3×ESC-ABD
HFD-Control
HFD-ESC
HFD-SUMO-3×ESC-ABD
(B)
Serum ALT (U/L)
400
300
200
100
0
###
***
***
ND-Control
ND-SUMO-3×ESC-ABD
HFD-Control
HFD-ESC
HFD-SUMO-3×ESC-ABD

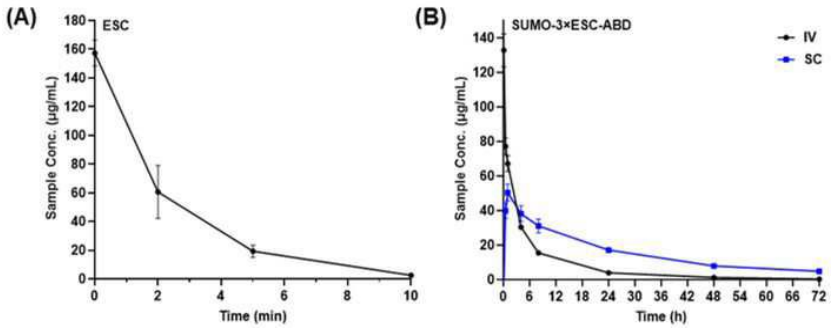
도면6


(A)
ND
HFD
Control
SUMO-3xESC-ABD
Control
ESC
SUMO-3×ESC-ABD
CD36
GS
(B)
(C)
###
***
**
CD36-Positive Cells
GS-Positive Area (%)
ND-Control
ND-SUMO-3×ESC-ABD
HFD-Control
HFD-ESC
HFD-SUMO-3×ESC-ABD

도면7


(A)
ND
HFD
Control
SUMO-3xESC-ABD
Control
ESC
SUMO-3xESC-ABD
CD36
β-actin
PPARγ
Perilipin-2
β-actin
(B)
CD36/β-actin
PPARγ/β-actin
Perilipin-2/β-actin
ND-Control
ND-SUMO-3×ESC-ABD
HFD-Control
HFD-ESC
HFD-SUMO-3×ESC-ABD

도면8


(A)
ESC
Sample Conc. (μg/mL)
Time (min)
(B)
SUMO-3×ESC-ABD
IV
SC
Sample Conc. (μg/mL)
Time (h)

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.