(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2022 년 7 월 28 일 (28.07.2022)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2022/158921 A1

(51) 국제특허분류:
C07K 14/47 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) *A61P 9/00* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2022/001179

(22) 국제출원일: 2022 년 1 월 24 일 (24.01.2022)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2021-0009214 2021 년 1 월 22 일 (22.01.2021) KR

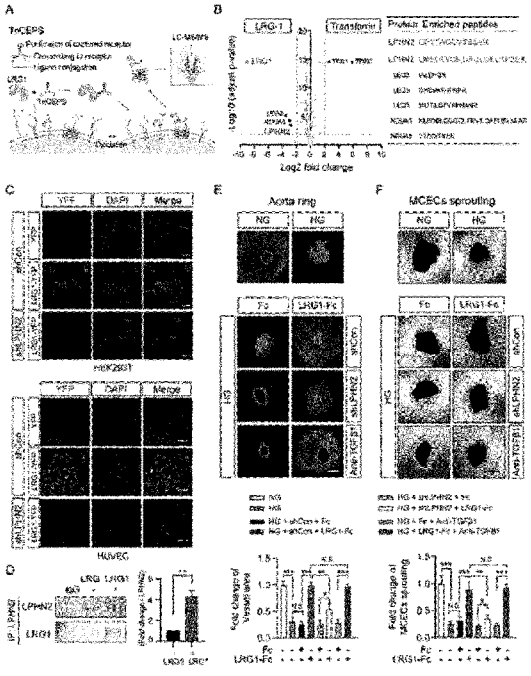
(71) 출원인: 기초과학연구원 (**INSTITUTE FOR BASIC SCIENCE**) [KR/KR]; 34126 대전광역시 유성구 엑스포로 55, Daejeon (KR). 인하대학교 산학협력단 (**INHA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION**) [KR/KR]; 22212 인천광역시 미추홀구 인하로 100, Incheon (KR). 한국과학기술원 (**KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**) [KR/KR]; 34141 대전광역시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR).

(72) 발명자: 김호민 (**KIM, Ho Min**); 34200 대전광역시 유성구 상대남로 26 #904-203, Daejeon (KR). 김도균 (**KIM, Do-Kyun**); 34126 대전광역시 유성구 엑스포로 55, Daejeon (KR). 류지간 (**RYU, Ji-Kan**); 22001 인천광역시 연수구 컨벤시아대로42번길 77 #902-701, Incheon (KR). 서준규 (**SUH, Jun-Kyu**); 06285 서울특별시 강남구 영동대로 230 #3-803, Seoul (KR). 윤국남 (**YIN, Guo Nan**); 22333 인천광역시 중구 인항로 30 #108-201, Incheon (KR).

(74) 대리인: 이처영 등 (**LEE, Cheo Young** et al.); 06210 서울특별시 강남구 언주로 430 16층, Seoul (KR).

(54) **Title:** DEGLYCOSYLATED LRG1 GLYCOPROTEIN AND LRG1 GLYCOPROTEIN VARIANT, AND USE THEREOF

(54) **발명의 명칭:** 탈당화된 LRG1 당단백질 및 LRG1 당단백질 변이체, 및 이의 용도



(57) **Abstract:** The present invention relates to a deglycosylated LRG1 glycoprotein and a LRG1 glycoprotein variant, and a use thereof. The deglycosylated LRG1 glycoprotein and LRG1 glycoprotein variant of the present invention exhibit effects of angiogenesis, nerve growth and nerve regeneration that are superior to those of conventional LRG1 glycoproteins, and thus a composition containing the glycoprotein or variant is effective in preventing or treating ischemic diseases, peripheral nerve diseases, erectile dysfunction and/or neurodegenerative diseases, the diseases including vascular erectile dysfunction, ischemic heart/brain/peripheral vascular diseases, diabetic vascular complications, neurogenic erectile dysfunction, diabetic neurologic complications, post-operative/post-traumatic peripheral nerve damage, and neurodegenerative diseases.

WO 2022/158921 A1

[다음 쪽 계속]

(81) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 탈당화된 LRG1 당단백질 및 LRG1 당단백질 변이체, 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 탈당화된 LRG1 당단백질 및 LRG1 당단백질 변이체는 기존의 LRG1 당단백질보다 현저히 우수한 혈관 신생, 신경 성장 및 신경 재생 효과를 나타내며, 따라서, 이를 포함하는 조성물은 혈관성 발기부전, 허혈성 심장/뇌/말초 혈관 질환, 당뇨성 혈관 합병증, 신경인성 발기부전, 당뇨성 신경합병증, 수술/외상 후 말초신경 손상, 퇴행성 신경질환을 포함하는 허혈성 질환, 말초신경질환, 발기부전 및/또는 퇴행성 신경질환의 예방 및 치료에 유용하다.

명세서

발명의 명칭: 탈당화된 LRG1 당단백질 및 LRG1 당단백질 변이체, 및 이의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 탈당화된 LRG1 당단백질 및 LRG1 당단백질 변이체, 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 탈당화된 LRG1 당단백질 또는 LRG1 당단백질 변이체는 LPHN2에 결합 및 상호작용하고, Akt, NF-kB p65 의 인산화를 유도하여 높은 혈관 신생, 신경재생 및 신경성장 유도 효과를 나타내는 것을 특징으로 한다.

[2]

배경기술

[3] LRG1(Leucine rich α-2 glycoprotein)은 건강한 사람의 혈청에서 최초로 분리되어 보고되었으며, 10-50μg/ml 수준으로 인간 혈청에 풍부하게 존재하는 것으로 보고되었다Haupt and Baudner, 1977; Takahashi et al., 1985). LRG1은 류신 반복성 부위(leucine-rich repeat; LRR) 패밀리의 고보존 멤버이다(Bella et al., 2008; Ng et al., 2011).

[4] 혈청에서 LRG1의 발견 이후, 염증성 질환 (Serada et al., 2012), 수두증(Nakajima et al., 2011), 심부전 (Watson et al., 2011), 자가면역 질환 (Serada et al., 2010), 신경퇴행성 질환 (Miyajima et al., 2013), 및, 난소, 폐, 담도, 간세포 암과 같은 다양한 유형의 암 (Andersen et al., 2010; Ladd et al., 2012; Okano et al., 2006; Sandanayake et al., 2011)에서 LRG1이 차별적으로 발현됨이 지속적으로 확인되어, 이러한 질환들에 대한 잠재적인 바이오마커로 주목을 받고 있다. 그러나, LRG1의 차별적 발현이 관측되는 다양한 질병에서 LRG1의 병리학적 메커니즘 및 생리적 역할에 대해서는 거의 보고된 바 없다.

[5] 최근, LRG1이 맥락막 및 망막 혈관 신생과 함께, 마우스의 망막에서 고도로 상향 조절된 발현을 나타내며, 상향조절된 LRG1이 내피 세포의 형성 및 기능에 중요한 역할을 하는 TGF-β의 존재 아래에서 TGF-β 보조 수용체인 엔도글린(ENG)에 결합하고, Smad1/5/8 경로를 활성화 하여, 병리학적 혈관 신생을 촉진할 수 있음이 Nature를 통해 보고된 바 있다(X. Wang et al.Nature 499, 306-311 (2013)). 그러나, LRG1과 ENG는 전형적인 수용체-리간드 상호 작용과 비교하여 상대적으로 약한 결합 친화성(~2.9 μM)을 나타내어, LRG1와 TGF-β 및 ENG의 상호작용을 통한 TGF-β 수용체 활성화 메커니즘만으로는 LRG1의 생리학적을 설명하기에 한계가 있다.

[6] 한편, 당뇨병(Diabetes mellitus; DM)은 만성 대사장애로, 발병률이 전 세계적으로 빠르게 증가하고 있다. 당뇨병은 인슐린 분비 및/또는 인슐린 저항성에 대한 결함으로 고혈당을 나타내는 것을 특징으로 한다. 당뇨병 환자는 일반적으로 발기 부전(erectile dysfunction), 심혈관 질환(cardiovascular disease),

뇌졸중(stroke), 만성 신장 질환(chronic kidney disease), 족부 궤양(foot ulcers), 망막증(retinopathy) 등의 다양한 합병증을 유발하는 내피기능 이상(endothelial dysfunction) 및 신경병증 (neuropathy)과 같은 증상을 함께 나타낸다(Int J Vasc Med 2012, 918267 (2012)). 당뇨병환자에서 또한 높은 LRG1 혈장 수치를 나타내며, 이는 혈관 내피 기능 장애, 동맥 경화 및 말초 동맥 질환과 같은 합병증, 당뇨성 신장 질환에 대한 불량한 예후와 관련이 있으며(J Am Soc Nephrol 30, 546-562 (2019)), 병원성 TGF-β/ALK1 매개 혈관 신생의 마우스 모델의 표현형에 해당한다(Journal of clinical endocrinology and 40 metabolism 100, 1586-1593 (2015)). 대조적으로, 스트렙토조토신(streptozotocin; STZ) 유도된 당뇨병 마우스 모델에서 LRG1의 외인성 각막 처리는 TGF-β 의존적 신호 전달을 통해 상피 상처의 치유 및 신경의 재생을 가속화 한다(Li et al., 2020).

[7] 발기 부전(erectile dysfunction; ED)은 당뇨병에서 흔히 나타나는 주요 병증으로 당뇨성 발기 부전의 병태 생리학은 허혈(Ischemia)과 같은 미세혈관병증(microangiopathy) 및 말초신경의 축삭재생 손상과 같은 신경병증(neuropathy)으로 이어진다(Kolluru et al., 2012). 당뇨 환자에서, LRG1과 발기 부전, 혈관병증 및 신경병증의 연관성은 전혀 밝혀진 바 없다.

[8] 최근 발기부전에 관한 연구는 기질성 원인에 비중을 두며, 주로, 비아그라를 포함한 경구용 PDE-5(phosphodiesterase-5) 저해제가 전세계적으로 사용되고 있으나 약 30%가량의 많은 환자에게는 효과가 없으며 궁극적으로 당뇨성 발기 부전 환자의 혈관병증 및 신경병증을 치료할 수 없다(Kim et al., 2020).

[9] 혈관과 신경은 유사한 분포 패턴을 나타내며, 일부 부위에서는 나란히 형성된다는 점을 고려할 때(Nature 436, 193-200 (2005)), 신경 및 혈관 네트워크의 형성에서 공통된 메커니즘을 타겟팅하는 것은 혈관병증과 신경병증의 동시 치료에 매우 효과적인 전략으로 인식된다. 안지오뉴린(angioneurins)으로 명명되는 VEGF, 안지오포이에틴(angiopoietin), NGF, BDNF, FGF2, 및 HGF와 같은 인자들은 모두 혈관 및 신경의 형성 및 발달에 관여하며, 상기 인자들의 경로가 손상되는 경우, 신경 및 혈관 장애가 동시에 발생할 수 있다. 혈관병증 및 신경 병증의 치료를 위해, COMP-Ang1, 혈관 내피 성장 인자(VEGF), dickkorf2, 뉴로트로핀-3(NT3) 및 뇌 유래 신경 영양 인자(BDNF)와 같은 다양한 혈관 신생 또는 신경 영양인자 등이 시험되었으나(Bennett et al., 2005; Burchardt et al., 2005; Ghatak et al., 2017; Hu et al., 2018; Jin et al., 2011), 임상적인 성공을 거둔 물질은 매우 제한적이다.

[10]

[11] 이러한 배경기술 아래에서, 본 발명자들은 당뇨성 발기 부전, 허혈성 질환, 신경질환의 예방 또는 치료를 위한 새로운 단백질 의약품을 발명하기 위해 예의 노력한 결과, LRG1 당단백질과 TGF-β/ENG의 상호작용을 통한 혈관 및 신경의 재생이 가능한 점에 착안하여, LRG1 및 Fc 도메인의 융합 단백질이 음경 해면체 내피세포 및 신경 세포의 재생을 유도하여 음경 발기력을 증가시키고, 우수한

혈관 및 신경 재생 효과를 보임을 확인하고, 상기 융합 단백질의 발기 부전, 허혈성 질환, 신경질환의 치료용도를 등록받은 바 있다(대한민국 등록특허 제2162934호 및 제2002866호). 그러나, LRG1과 ENG의 약한 결합 친화성(~2.9 μM)은 TGF-β 기반 메커니즘만으로 LRG1의 혈관 및 신경 재생 효과를 충분히 설명하기 어렵다.

[12]

[13] 이러한 배경 기술 아래에서, 본 발명자들은 TGF-β/ENG 기반의 경로 외에, LRG1의 또 다른 혈관 및 신경 형성 경로의 존재할 것이라 예측하고 이를 밝히기 위해 예의 노력한 결과, 당뇨 환자와 같은 고혈당 조건에서 LRG1가 TGF-β 비의존적 혈관 신생 및 신경 영양 효과를 나타내는 것을 확인하였으며, LPHN2(Latrophilin-2)의 상호작용 및 하위 신호전달에 의한 TGF-β 비의존적 혈관 및 신경 재생 메커니즘을 규명하였다. 나아가, 고혈당 조건에서 LRG1의 탈당화가 LPHN2와의 결합에 매우 중요한 역할을 하는 것을 확인하고, 인공적으로 탈당화된 LRG1의 투여가 직접(LPHN2 경로) 및 간접적(신경 세포에서 신경 영양인자 발현 향상)으로 혈관 신생 및 신경 영양 효과를 나타낼 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[14]

[15] 본 배경기술 부분에 기재된 상기 정보는 오직 본 발명의 배경에 대한 이해를 향상시키기 위한 것이며, 이에 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 있어 이미 알려진 선행기술을 형성하는 정보를 포함하지 않을 수 있다.

[16]

[17] **발명의 요약**

[18] 본 발명의 목적은 높은 혈관 신생, 신경 성장 및 신경 재생 유도 효과를 나타내는 탈당화된 LRG1 당단백질을 제공하는 데 있다.

[19] 본 발명의 다른 목적은 LRG1의 신규한 수용체 및 이에 기반한 TGF-β 비의존적 혈관 신생, 혈관 성장 메커니즘을 제공하는 데 있다.

[20] 본 발명의 다른 목적은 글리코실화 부위에 변이를 포함하는 LRG1 당단백질을 제공하는 데 있다.

[21] 본 발명의 또 다른 목적은 탈당화된 LRG1 당단백질 또는 LRG1 당단백질 변이체와 Fc 도메인이 융합된, 융합 단백질을 제공하는 데 있다.

[22] 본 발명의 또 다른 목적은 탈당화된 LRG1 당단백질, LRG1 당당백질 변이체, 및 융합 단백질의 용도를 제공하는 데 있다.

[23]

[24] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하나 이상의 글리코실기(glycosyl group)가 탈당화된, LRG1 당단백질(Leucine rich α-2 glycoprotein)을 제공한다:

[25] 본 발명은 또한 어느 하나 이상의 글리코실화 부위에 변이를 포함하는 LRG1 당단백질(Leucine rich α-2 glycoprotein) 변이체를 제공한다.

[26] 본 발명은 또한 LRG1 당단백질 변이체를 코딩하는 핵산을 제공한다.

[27] 본 발명은 또한 상기 핵산을 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[28] 본 발명은 또한 상기 핵산 또는 상기 재조합 벡터가 도입된 숙주세포를 제공한다.

[29] 본 발명은 또한, 상기 숙주세포를 배양하여, LRG1 당당백질 변이체를 생성하는 단계; 및 상기 생성된 LRG1 당단백질 변이체를 수득하는 단계를 포함하는 LRG1 당단백질 변이체의 제조방법을 제공한다.

[30] 본 발명은 또한, 상기 LRG1 당단백질, 또는 LRG1 당단백질 변이체에 Fc 도메인이 융합된 융합 단백질을 제공한다.

[31] 본 발명은 또한, 상기 LRG1 당단백질, LRG1 당단백질 변이체, 또는 융합 단백질을 포함하는 혈관신생, 신경성장 또는 신경재생 유도용 조성물을 제공한다.

[32] 본 발명은 또한, 상기 LRG1 당단백질, LRG1 당단백질 변이체, 또는 융합 단백질을 포함하는 허혈성 질환, 말초신경질환, 발기부전 및/또는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[33] 본 발명은 또한, 상기 LRG1 당단백질, LRG1 당단백질 변이체, 또는 융합 단백질을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 혈관신생, 신경성장 및/또는 신경재생 유도방법을 제공한다.

[34] 본 발명은 또한, 상기 LRG1 당단백질, LRG1 당단백질 변이체, 또는 융합 단백질을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 허혈성 질환, 말초신경질환, 발기부전 및/또는 퇴행성 신경질환의 치료방법을 제공한다.

[35] 본 발명은 또한, 상기 LRG1 당단백질, LRG1 당단백질 변이체, 또는 상기 융합 단백질의 혈관신생, 신경성장 및/또는 신경재생 유도용도를 제공한다.

[36] 본 발명은 또한, 상기 LRG1 당단백질, LRG1 당단백질 변이체, 또는 융합 단백질의 허혈성 질환, 말초신경질환, 발기부전 및/또는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용도를 제공한다.

[37] 본 발명은 또한, 상기 LRG1 당단백질, LRG1 당단백질 변이체, 또는 융합 단백질의 혈관신생, 신경성장 및/또는 신경재생 유도용 조성물의 제조에 있어서의 용도를 제공한다.

[38] 본 발명은 또한, 상기 LRG1 당단백질, LRG1 당단백질 변이체, 또는 융합 단백질의 허혈성 질환, 말초신경질환, 발기부전 및/또는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 조성물의 제조에 있어서의 용도를 제공한다.

[39]

도면의 간단한 설명

[40] 도 1은 부착 GPCR인 LPHN2가 LRG1의 TGF-β 비의존적 수용체임을 나타내는 도이다.

[41] 도 1A: LRG1에 대한 TGF-β-비의존적 수용체를 동정하기 위한 LRC-TriCEPS

기술의 개략도

[42] 도 1B: 볼케이노 플롯, TriCEPS 결합 LRG1 또는 트랜스페린을 글리신 퀜칭된 TriCEPS 시약 대조군 샘플과 비교하여, 샘플 간의 폴드 체인지(Fold, Change; FC)에 대해 플롯팅된 FDR 조정 P-값을 나타내었다. 세 가지 단백질, LPHN2, LEG3 및 NDUA5는 농축 인자가 4보다 크고 FDR 조정 P-값이 0.05 미만인 것으로 정의 된 수용체 후보이다.

[43] 도 1C: 부모(parental, shCon-발현) 또는 LPHN2- 녹다운 HEK293T 세포 (위) 및 HUVEC (아래)에 대한 LRG1-YFP 또는 YFP의 세포 표면 결합. 스케일 바, 100 μm.

[44] 도 1D: 전체 HUVEC 용해물에서 LPHN2의 면역 침전(IP). LRG1(1μg/ml)의 유무에 관계없이 10분 동안 처리한 후 면역 블롯 분석을 통해 LRG1 및 LPHN2를 검출하였다. 데이터는 평균±SEM (n=3)이다.

[45] 도 1E 및 1F: 표시된 단백질 및 렌티 바이러스(shCon, shLPHN2) 또는 Anti-TGF-β1 항체를 처리하여 정상 글루코스(NG) 또는 고-글루코스 (HG) 조건 하에서 생체 외 마우스 대동맥 고리 분석(E) 및 마우스 해면체 5 내피 세포 (MCEC) 발아 분석(F). 발아된 미세 혈관은 내피 세포 마커인 PECAM-1(적색, E)로 면역 염색되었다. 점선은 발아 내피 세포 범위(F)를 나타낸다. 스케일 바, 100 μm. 대동맥 고리(평균±SEM (n=4), E)에서 발아하는 미세 혈관 영역의 강도와 해면 조직에서 발아하는 내피 세포(평균±SEM (n=6), F)를 정량화하였다(아래). NG 그룹의 상대 비율은 1로 정의하였다.

[46]

[47] 도 2는 TGF-β1 부재시, LRG1이 결합하는 새로운 수용체를 확인한 결과이다.

[48] 도 2A 및 2B: 표시된 농도의 다음 단백질로 처리 한 후 수행된 HUVEC를 사용한 튜브 형성 분석(A) 및 트랜스 웰 세포 이동 분석(B): Fc(1μg/ml; 음성 대조군), LRG1-Fc(1μg/ml), TGF-β1(5ng/ml), LRG1-Fc(1μg/ml)+TGF-β1(5ng/ml), LRG1-Fc(1μg/ml)+항-TGF-β1 Ab(10μg/ml) 및 LRG1-Fc(1μg/ml)+TGF-β1(5ng/ml)+항-TGF-β1 Ab(10μg/ml). 좌측: 대표 이미지, 스케일 바, 200 μm. 우측: 마스터 정션(Master junction) 및 이주(migration)된 세포는 이미지 J를 사용하여 정량화되었으며 결과는 평균±SEM (n=4)으로 표시하였다. Fc 그룹의 상대 비율은 1로 정의하였다(B).

[49] 도 2C: LRG1-YFP 또는 YFP의 HEK293T 세포(좌측) 및 HUVEC(우측)에 대한 세포 표면 결합. LRG1-YFP(10μg/ml) 또는 YFP(10μg/ml) 처리 후 평가하였으며, 핵은 4,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI; 파란색)으로 표지되었다. 스케일 바, 100 μm.

[50] 도 2D: 음성 대조군(글리신), 양성 대조군(트랜스페린) 및 LRG1을 포함하는 리간드를 NHS 에스테르 기능(NHS ester functionality)를 사용하여 비오틴 함유 TriCEPS 시약과 접합시켰다. 세포 표면 수용체에 대한 TriCEPS 결합 리간드의 결합은 FITC-streptavidin에 의해 검출하였으며 FACS로 분석하였다. 상기 분석은

트랜스페린-TriCEPS 및 LRG1-TriCEPS가 TriCEPS 모이어티로부터의 간섭없이 HEK293T 세포에 결합함을 나타내었다.

[51] 도 2E: shCon 또는 shNPHN2 렌티 바이러스로 처리 한 후 HEK293T 세포 및 HUVEC에서 LPHN2 발현을 웨스턴 블롯 분석한 결과

[52] 도 2F: HUVEC를 표시된 시간 간격으로 LRG1 단백질(1μg/ml)로 처리한 다음 LPHN2를 전체 세포 용해물에서 면역 침전(IP)하고 SDS-PAGE 겔에서 분리하여 쿠마시 블루 용액으로 염색한 결과.

[53] 도 2G: LC-MS/MS 분석에 의한 LPHN2-상호 작용 단백질의 식별. LC-MS/MS 분석(~ 70 kDa)을위한 겔 밴드는 도 2F에 표시하였다. LC-MS/MS 분석에 의해 확인된 단백질은 상위 일치 펩티드에 따라 나열하였다.

[54] 도 2H 튜브 형성 분석. 고-글루코스 (HG) 조건에서 부모(스크램블된 shRNA-발현) 및 LPHN2- 녹다운 (shLPHN2- 발현) MCEC를 Fc(1μg/ml; 음성 대조군) 또는 LRG1-Fc(1μg/ml)와 함께 72시간동안 배양하고, 튜브 형성을 분석하였다. 대조군(shCon) 및 실험군(shLPHN2) 렌티 바이러스를 5 x104 형질 도입 단위(TU)/ml로 배양 배지에 첨가했다. 좌측: 튜브 형성의 대표적인 이미지, 스케일 바, 100 μm. 우측: 이미지 J를 사용하여 정량화한 마스터 접합, 결과는 평균±SEM (n=4).

[55] 도 2I: MCEC를 상이한 용량(5x103 TU 및 5 x104 TU/ml 배양 배지)의 대조군 shRNA(shCon) 또는 LPHN2를 표적화하는 shRNA(shLPHN2)를 함유하는 렌티 바이러스로 적어도 72시간동안 감염시켰다. 상단: shCon 또는 shLPHN2 렌티 바이러스에 감염된 MCEC(상단)의 LPHN2에 대한 대표적인 웨스턴 블롯. 하단: 이미지 J를 사용하여 정량화된 정규화된 밴드 강도 값, 결과는 평균±SEM (n=4). shCon 그룹의 상대 비율은 1로 정의하였다.

[56] 도 2J: HG 조건 하에서 배양 배지에서 TGFβ1 수준 증가를 나타내는 NG 및 HG 조건 하에서 MCEC(좌측), 대동맥 링 조직(중간) 및 해면체 조직(우측)의 조절된 배지에서 TGFβ1에 대한 대표적인 웨스턴 블롯 결과. 정규화된 밴드 강도 값은 이미지 J를 사용하여 정량화되었으며 결과는 평균±SEM (n=4)으로 표시하였다. NG 조건 그룹의 상대 비율은 1로 정의하였다.

[57]

[58]

[59] 도 3은 LRG1/LPHN2 매개 혈관 신생이 STZ 유발 당뇨병 마우스에서 발기 부전의 개선에 관한 도면이다.

[60] 도 3A 및 3B: 스크램블 shRNA 대조군 (shCon) 또는 LPHN2 녹다운 shRNA (shLPHN2) (1x105 TU/마우스) 조건에서 0 및 3일에 Fc(음성 대조군, 5μg/20μl), LRG1-Fc(5μg/20μl), 또는 LRG1-Fc(5μg/20μl)+Anti-TGF-β1 antibody (10μg/ml)의 반복적인 해면 내 주사 2주 후, 대조군 및 STZ-유도 당뇨병 마우스에서 대표적인 해면내 압력(ICP) 반응(A) 및 해면 조직에서의 면역염색(B, 혈소판/내피 세포 부착 분자-1(PECAM-1, 녹색) 및 신경-교세포 항원 2(NG2, 빨간색)). (A) 자극

간격은 단색 막대로 표시하였다. 평균 최대 ICP 및 총 ICP (곡선 아래 영역)대 평균 수축기 혈압(MSBP)의 비율은 각 그룹(n=5, 하단)에 대해 계산하였다. (B)shCon+Fc 그룹의 상대 비율은 1로 정의하였다(n=5, 우측).

[61] 도 3C 내지 3H: Fc 또는 LRG1-Fc의 반복적 인 해면 내 주사 2 주 후의 STZ- 유도 당뇨병 마우스에서 인산화 된 eNOS (p-eNOS)(C), BrdU(E), claudin-5(F), 산화 저밀도 지단백질(LDL, G), TUNEL(H)의 면역염색. 스케일 바, 100 μm.

[62] 도 3D: 표지된 조건의 전체 마우스 음경 조직에서 p-eNOS 및 eNOS의 대표적인 웨스턴 블롯.

[63] 도 3I: 면역염색 및 웨스턴 블롯팅을 사용한 p-eNOS 발현의 정량화(n=4), 고출력 필드 당 BrdU 면역양성 내피 세포(n=4), claudin-5(n=4) 및 산화-LDL(n=4)의 발현, 고출력 필드 당 TUNEL 양성 세포 사멸 내피 세포의 수(n=4).

[64] * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001 (student's t test). N.S.: 유의미하지 않음.

[65]

[66] 도 4는 STZ-유도된 LRG1-Tg 마우스에서 LRG1의 혈관 신생 효과에 관한 도면이다.

[67] 도 4A: LRG1-Tg 마우스, 스크램블 shRNA 대조군(shCon) 또는 LPHN2 녹다운 shRNA(shLPHN2) 조건(1x105 TU/마우스)에서 STZ 주사를받은 LRG1-Tg 마우스에서 8주에 대표적인 해면내 압력(ICP) 반응. 해면신경은 5V에서 자극하였다. 자극 간격은 단색 막대로 표시하였다. 평균 최대 ICP 및 총 ICP (곡선 아래 영역) 대 평균 수축기 혈압 (MSBP)의 비율은 각 그룹 (n=5)에 대해 계산되었습니다.

[68] 도 4B: shCon 또는 shLPHN2 렌티 바이러스 (1x105 TU/마우스)를 주사한 LRG1-Tg 마우스 및 STZ 유도 LRG1-Tg 마우스의 해면 조직에서 PECAM-1(녹색) 및 claudin-5 또는 산화된 저밀도 지단백질(LDL)에 대한 이중-면역염색결과. 이미지 J(n=4)를 사용하여 claudin-5 및 산화 LDL 발현을 정량화하였으며, LRG1-Tg 그룹의 상대 비율은 1로 정의하였다. 스케일 바, 100 μm.

[69] * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001 (student's t test). N.S.: 유의미하지 않음

[70]

[71] 도 5는 LRG1의 LPHN2 의존적 신경 영양 효과에 관한 도면이다.

[72] 도 5A: 마우스 해면체 조직(상단) 및 등측 신경 번들(DNB, 고배율, 하단)에서 LPHN2(빨간색) 및 신경 섬유(NF; 녹색)의 염색 결과. 핵은 4,6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI; 파란색)으로 염색하였다. 스케일 바, 200μm(상단) 및 25μm(하단).

[73] 도 5B: 야생형(WT) 및 STZ 유발 당뇨병 마우스의 등측 신경 다발에서 LPHN2 발현(평균±SEM (n=6)).

[74] 도 5C: 스크램블 shRNA 대조군 (shCon) 또는 LPHN2 녹다운 shRNA (shLPHN2) (1x105 TU/마우스) 존재 아래, 0일 및 3일에 Fc(음성 대조군, 5μg/20μl) 또는

LRG1-Fc(5μg/20μl)의 반복적인 해면 내 주사 2주 후, 대조군 및 STZ- 유도 당뇨병 마우스의 등측 신경 다발에서 βIII-튜불린(녹색) 면역 염색결과. (평균±SEM (n=6)). 도 5B 및 5C에서, 핵은 DAPI (파란색)로 염색하였다.

[75] 도 5D: 0일 및 3일에 Fc (음성 대조군, 5μg/20μl) 또는 LRG1-Fc (5μg/20μl)의 반복적인 해면 내 주사 2주 후, 대조군 및 STZ-유도 당뇨병 마우스의 등쪽 신경 다발에서 βIII-튜불린(빨간색) 및 nNOS(녹색)에 대한 면역 염색(평균±SEM (n=4)). 도 5B, 5C, 5D에서, 대조군의 상대 비율은 1로 정의하였다. 스케일 바, 25 μm.

[76] 도 5E: 정상 글루코스(NG) 및 고 글루코스(HG) 조건에서 마우스 DRG 조직에서 LPHN2 발현 (평균±SEM (n=4, 하단)).

[77] 도 5F: 스크램블 shRNA 대조군 (shCon) 또는 LPHN2 녹다운 shRNA (shLPHN2) (1x105 TU/마우스) 존재 아래, 정상 글루코스 (NG) 또는 고 글루코스 (HG) 조건에서 1주간 Fc (음성 대조군, 1μg/ml) 또는 LRG1-Fc (1μg/ml)로 처리된 마우스 DRG 조직에서 βIII-튜불린 면역염색 결과(상단). 스케일 바, 100 μm. DRG 조직에서 βIII-튜불린-면역양성 신경 돌기 길이의 정량화(하단, 평균±SEM (n=4)). NG 그룹의 상대 비율은 1로 정의하였다.

[78] **P < 0.01; ***P < 0.001 (Student's t test). N.S.: 유의미하지 않음.

[79]

[80] 도 6은 STZ 유발 당뇨병 마우스 모델에서 LPHN2 발현 및 고혈당증에서 LRG1의 신경 영양 효과에 관한 도면이다.

[81] 도 6A: 마우스 해면체(CC) 조직에서 LPHN2의 발현. 좌측 상단: 면역 형광 염색을 위해 마우스 음경 조직을 단면화하였다; 생체 외 MCEC 발아 분석에는 CC 조직만이 사용되었다. 좌측: 정상 마우스의 해면 조직에서 대표적인 LPHN2(빨간색) 염색. 스케일 바, 200μm. 우측: CC(스케일 바, 100μm), 등측 정맥(DV; 스케일 바, 50μm), 해면 동맥(CA; 스케일 바, 25μm) 및 등측 동맥 (DA; 스케일 바 25μm)에서 LPHN2 염색의 고배율 이미지. 핵은 DAPI(파란색)로 염색되었다.

[82] 도 6B: STZ 유발 당뇨병 및 HG 조건에서 마우스 음경, MCEC 및 MPG에서 LPHN2 발현 증가. 상단: LPHN2에 대한 대표적인 웨스턴 블롯. 하단: 이미지 J로 정량화된 정규화된 밴드 강도 값, 평균 ± SEM (n = 4). NG 대조군의 상대 비율은 1로 정의하였다.

[83] 도 6C: 대조군 및 STZ 유발 당뇨병 마우스의 해면 조직에서 LPHN2(빨간색) 및 PECAM-1(녹색)에 대한 면역 염색. 해면 조직의 LPHN2 및 PECAM-1 면역양성 영역은 Image J를 사용하여 정량화되었으며 결과는 평균±SEM (n=6)으로 표시하였다. 스케일 바, 100 μm. 대조군의 상대적인 비율은 1로 정의하였다.

[84] 도 6D: 8주 동안 STZ 주사를받은 야생형(WT) 대조군 및 LRG1-Tg 마우스의 등측 신경 다발에서 βIII-Tubulin(녹색) 면역 염색. 등측 신경 다발의 βIII-튜불린-면역양성 영역은 Image J를 사용하여 정량화되었으며, 결과는

평균±SEM (n=4)으로 표시하였다. 스케일 바, 25 μm. WT 그룹의 상대 비율은 1로 정의하였다.

[85] 도 6E: 정상 글루코스(NG) 또는 고 글루코스(HG) 조건에서, 스크램블 shRNA 대조군(shCon), LPHN2 녹다운 shRNA(shLPHN2) (5x104 TU/ml 배양 배지) 또는 Anti-TGF-β1 항체(10μg/ml)의 존재 하에 Fc(음성 대조군, 1μg/ml) 또는 LRG1-Fc(1μg/ml)로 처리된 마우스 MPG 조직에서 βIII-Tubulin 1주동안의 면역염색 결과. 스케일 바, 100 μm. 하단: MPG 조직에서 βIII-튜불린-면역 양성 신경 돌기 길이의 정량화(평균±SEM (n=4)). NG 그룹의 상대 비율은 1로 정의하였다.

[86] 도 6F: HG 조건의 배양 배지에서 TGFβ1 발현 증가. NG 및 HG 조건의 컨디셔닝된 배지에서 MPG 조직(좌측) 및 DRG 조직(우측)의 TGFβ1에 대한 대표적인 웨스턴 블롯 결과. 정규화 된 밴드 강도 값은 이미지 J를 사용하여 정량화되었으며 결과는 평균±SEM(n=4)으로 표시하였다. NG 조건 그룹의 상대 비율은 1로 정의하였다.

[87] * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001 (student's t test). N.S.: 유의미하지 않음.

[88]

[89] 도 7은 탈당화된 LRG1의 LPHN2에 대한 결합 증가를 통한 혈관 신생 및 신경 돌기 성장의 강화효과에 관한 도면이다.

[90] 도 7A: 무-글루코스, 정상 글루코스 또는 고 글루코스(G/F, NG, HG)를 함유하는 HUVEC 배양 배지에서 LRG1를 배양하고 샘플을 SDS-PAGE 및 쿠마시 블루 염색으로 분석한 결과.

[91] 도 7B: LPHN2 엑토 도메인 (Lec, Olf, Lec+Olf 또는 Ecto-full 도메인; Lec, 렉틴; Olf, olfactomedin-like; HomoR, 호르몬 수용체 모티프; GAIN/GPS, GPCR자가 단백 분해-유도/GPCR 단백질 분해 부위)에 대한 LRG1 (천연 및 탈당화된 형태)의 결합 친화도.

[92] 도 7C: 부모 및 LPHN2-녹다운 HUVEC에 대한 LRG1의 결합에 대한 FACS 분석 결과.

[93] 도 7D: LRG1(1μg/ml) 또는 DG-LRG1(1μg/ml)로 처리한 뒤, HUVEC을 사용한 튜브 형성 분석(상단) 및 트랜스 웰 세포 이동 분석(하단). 스케일 바, 200μm.

[94] 도 7E: LRG1(1μg/ml) 또는 DG-LRG1(1μg/ml)를 처리한 마우스 DRG 조직(상단) 및 1차 피질 뉴런(하단)에서 βIII-튜불린 면역염색 결과. 스케일 바, DRG의 경우 200μm, 피질 뉴런의 경우 100μm.

[95] 도 7F: HUVEC 튜브 형성의 마스터 접합, 이주된 HUVEC, DRG 외식편 및 피질 뉴런(200 cells/field)에서 βIII-튜불린-면역양성 신경돌기의 길이의 정량화 결과(평균±SEM (n=4), 우측). 미처리 군의 상대 비율은 1로 정의 하였다.

[96] **P < 0.01; ***P < 0.001 (Student's t test). N.S.: 유의미하지 않음.

[97]

[98] 도 8은 LRG1 및 LPHN의 생화학적 분석 및 LPHN의 서열 정렬 결과를 나타낸

도면이다.

[99] 도 8A: HUVEC-컨디셔닝된 무-글루코스 배지(G/F CM), 정상 글루코스 배지(NG CM) 및 고 글루코스 배지(HG CM)를 SDS-PAGE 및 쿠마시 블루 염색에 의해 분석한 결과.

[100] 도 8B: LPHN2의 도메인 구조의 개략도(좌측, 약어: Lec, 렉틴; Olf, olfactomedin-like; HomoR, 호르몬 수용체 모티프; GAIN/GPS, GPCR 자가 단백질 분해 유도/GPCR 단백질분해 부위). 정제된 재조합 인간 LPHN2 엑토 도메인 변이체(렉틴 도메인, 잔기 F26-Q95; Olfactomedin- 유사 도메인, 잔기 V135-P394; Lectin-Olfactomedin-like 도메인, 잔기 F26-P394; 및 Lectin-Olfactomedin-like-GAIN/GPS 도메인, 잔기 F26-R796)는 SDS-PAGE 및 쿠마시 블루 염색으로 분석하였다(우측).

[101] 도 8C: HEK293 세포에 대한 LRG1의 결합 친화도. 부모 및 LPHN2-녹다운 HEK293T 세포를 Alexa 647-접합 LRG1(1μM) 또는 DG-LRG1(1μM)로 처리했다. PBS로 세척한 후, FACS로 형광신호를 측정하여 세포에 결합하는 LRG1 및 DG-LRG1을 결정하였다.

[102] 도 8D: 인간 LPHN1 및 LPHN3의 정제된 재조합 Lectin-Olfactomedin-like domain을 SDS-PAGE 및 Coomassie Blue 염색으로 분석한 결과.

[103] 도 8E: LPHN1 및 LPHN3의 Lec-Olf 도메인에 대한 천연 LRG1 및 DG-LRG1 결합을 평가하는 고체상 결합 분석 결과. LPHN1 및 LPHN3의 Lec-Olf 도메인(100nM)을 플레이트에 코팅했다. 세척 및 차단 후, 상이한 양(0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 및 10μM)의 천연 LRG1 또는 DG-LRG1을 첨가하고 코팅된 단백질에 결합된 LRG1 또는 DG-LRG1을 항 LRG1 항체 및 항 마우스 2 차 항체를 사용한 ELISA를 수행하여 검출하였다.

[104] 도 8F: 정제된 LRG1 변이체 (N269D, N325D, N269D/N325D) 및 대조군 LRG1 (천연 및 탈당화된 형태)을 SDS-PAGE 및 쿠마시 블루 염색에 의해 분석한 결과.

[105] 도 8G 및 8H: shLPHN2 렌티 바이러스(5x104 TU/ml 배양 배지) 또는 항-TGF-β1 항체(10μg/ml)의 존재하에 LRG1(1μg/ml) 또는 DG-LRG1(1μg/ml)로 처리한 후, HUVEC를 사용한 튜브 형성 분석(G) 및 트랜스 웰 세포 이동 분석(H). HUVEC는 정상적인 글루코스 배지에서 배양하였다. 스케일 바, 200 μm.

[106] 도 8I 및 도 8J shLPHN2 렌티 바이러스(5x104 TU/ml 배양 배지) 또는 항-TGF-β1 항체(10μg/ml)의 존재하에 LRG1(1μg/ml) 또는 DG-LRG1(1μg/ml)로 처리한 후, 마우스 DRG 조직(I) 및 마우스 1차 피질 뉴런(J)에서 βIII-Tubulin 면역염색 결과. 마우스 DRG 조직 및 피질 뉴런은 정상적인 글루코스 배지에서 배양하였다. 스케일 바, (I)의 경우 200 μm, (J)의 경우 100 μm.

[107]

[108] 도 9는 LRG1의 결정 구조 및 LRG1의 기능을 위한 주요 당화부위의 확인 결과에 관한 도면이다.

[109] 도 9A: 인간 LRG1의 전체 구조 (평면도 및 측면도). LRRNT(파란색); 8개의

LRR 모듈(녹색); LRRCT(주황색); 이황화 다리(회색); 페닐알라닌 스파인 및 아스파라긴 래더(자주색, magenta).

[110] 도 9B: 인간 LRG1(청록색 표면)에 부착된 글리칸(노란색). 하단 패널: 아스파라긴 잔기(N79, N186, N269 및 N325)에 부착된 N-아세틸글루코사민에 대해 2σ에서 카운터된 전자 밀도 맵.

[111] 도 9C: LRG1상의 글리코실화 부위의 서열 정렬. 엄격한 동일성(흰색 문자가 있는 빨간색 상자); 그룹 내 유사성(빨간색 문자); 그룹 간의 유사성(검정색 글자). 글리코실화된 아스파라긴 잔기는 노란색 육각형으로 표시하였다.

[112] 도 9D: 1μg/ml의 LRG1, DG-LRG1 또는 LRG1 변이체(N79D, N186D, N269D, N325D)로 처리한 후, HUVEC를 사용한 튜브 형성 분석 결과. 스케일 바, 200 μm. 우측: 마스터 접합의 정량화 (평균±SEM (n=4)).

[113] 도 9E 및 9F: 1μg/ml의 LRG1, DG-LRG1 또는 LRG1 변이체(N79D, N186D, N269D, N325D)로 처리된 마우스 DRG 조직(E) 및 마우스 1차 피질 뉴런(F)에서의 βIII-튜불린 면역염색 결과. 스케일 바, (E)의 경우 200 μm, (F)의 경우 100 μm. DRG 외식편 및 피질 뉴런(200 cells/field)에서 βIII-튜불린-면역양성 신경돌기 길이를 정량화하였다(우측, 평균±SEM (n=4)). LRG1 처리 군의 상대 비율은 1로 정의하였다.

[114] ***P < 0.001 (Student's t test). N.S.: 유의미하지 않음.

[115]

[116] 도 10은 인간 LRG1의 서열 정렬 및 다른 LRR 패밀리 단백질과 LRG1의 구조적 비교 결과에 관한 도면이다.

[117] 도 10A: Homo sapiens(huLRG1, NP_443204.1), Macaca mulatta(maLRG1, EHH29497.1), Mus musculus(muLRG1, NP_084072.1), Rattus norvegicus(raLRG1, NP_001009717.1), Bos taurus(boLRG1, DAA27797.1) 및 Canis lupus dingo (caLRG1, XP_025312813.1)로부터 유래된 LRG1들의 서열정렬 결과. 컨센서스 서열 (LxxLxLxxNxL) 및 주요 보존된 페닐알라닌, 이황화 브릿지 및 글리코실화된 Asn 잔기는 서열 정렬 하단에 표시하였다. 2차 구조 요소는 정렬 상단에 표시하였다(β-스트랜드 (화살표) 및 α-나선(실린더)). 서열 정렬은 T-Coffee (http://tcoffee.crg.cat) 및 ESPript 서버 (http://espript.ibcp.fr)를 사용하여 얻었다.

[118] 도 10B: 인간 LRG1의 LRRNT 및 LRRCT 도메인과 다른 LRR 단백질의 구조적 비교. 이황화 다리는 회색 선으로 표시하였다.

[119]

[120] 도 11은 구축된 LRG1-LPHN2 신호 전달 경로에 관한 도면이다.

[121] 도 11A: 항-LPHN2 항체에 의한 면역침강의 pY-LPHN2 및 LPHN2에 특이적인 항체를 사용한 웨스턴 블롯 분석 결과. 높은 포도당 조건에서 표시된 시간 동안 LRG1(1μg/ml) 또는 DG-LRG1(1μg/ml)으로 HUVEC를 자극하였다.

[122] 도 11B: LRG1(1μg/ml) 또는 DG-LRG1(1μg/ml) 처리 후, HUVEC의 Cignal Finder

GPCR 신호 10-경로 리포터 어레이 결과. 듀얼-루시퍼라아제 분석의 결과는 정규화된 상대 발광 신호로 표시하였다. (평균±SEM, n=3). 미처리 군의 상대 비율은 1로 정의하였다.

[123] 도 11C: DG-LRG1에 의해 인산화가 증가된 단백질 간의 상호작용을 나타낸 네트워크 모델. 각 노드 색상은 인산화 수준의 증가(빨간색)를 나타낸다. 색상 막대는 미처리 대조군 조건에 대한 DG-LRG1에 의한 인산화 수준의 log-2-폴드 체인지의 기울기를 나타낸다. 각 노드의 P는 해당 단백질의 인산화를 나타낸다. 단백질간 상호작용: 활성화(화살표); 억제(짧은 선으로 차단된 실선); 직접 활성화(실선 화살표); 간접 활성화(점선 화살표); 단백질-단백질 상호 작용(회색 선); 원형질막(녹색 선).

[124] 도 11D: 표시된 시간 동안 LRG1(1μg/ml) 또는 DG-LRG1 (1μg/ml)로 자극 된 HUVEC 및 피질 뉴런의 웨스턴 블롯 결과.

[125] 도 11E:

[126] 상단 이미지: HUVEC 튜브 형성(상단), DRG 외식편(중단) 및 마우스 1차 피질 뉴런(하단)에서 βIII-튜블린 염색 결과. HUVEC 및 마우스 DRG 외식편 및 마우스 1차 피질 뉴런은 정상 글루코스 조건에서 DG-LRG1(1μg/ml), LY(10μM), PP2(10μM), DG-LRG1(1μg/ml)+LY(10μM), 또는 DG-LRG1(1μg/ml)+PP2(10μM)로 처리되었다. 스케일 바, 100μm.

[127] 하단 그래프: Quantification of 마스터 정션, DRG에서 βIII-튜블린-면역양성 액손 길이, 및 피질 뉴런(n=4 fields, 200 cells/field)에서 βIII-튜블린-면역양성 신경돌기 평균 길이의 정량화 그래프 (평균±SEM (n=4)). 미처리 그룹의 상대 비율은 1로 정의하였다.

[128] 도 11F: TGF-β1과의 공동 처리 또는 미처리 조건에서 LRG1 또는 DG-LRG1로 자극된 HUVEC의 웨스턴 블롯결과.

[129] 도 11G 및 11H: 1μg/ml의 LRG1 또는 DG-LRG1로 자극된 HUVECs(G) 및 마우스 1차 피질 뉴런(H)의 혈관신생인자(VEGF, angiopoietin-1, FGF2)(G) 및 신경 영양 인자(NGF, BDNF, NT-3)(H)에 특이적인 항체를 사용한 웨스턴 블롯 결과. 도 11H에서, 마우스 1차 피질 뉴런에 shLPHN2 또는 shCon을 처리한 뒤, 1μg/ml의 LRG1 또는 DG-LRG1로 자극하였다.

[130] 도 11A, 11B, 및 11E에서, **P < 0.01; ***P < 0.001 (Student's t test). N.S.: 유의미하지 않음.

[131]

[132] 도 12는 LRG1 / LPHN2 매개 신호 전달 경로를 나타낸 것이다.

[133] 도 12A: DG-LRG1 처리 후 단백질의 변경된 단백질 및 인산화 수준. 색상은 DG-LRG1에 의한 레벨의 증가(빨간색) 또는 감소(파란색)를 나타낸다. 색상 막대는 처리되지 않은 대조군 조건에 대한 DG-LRG1에 의한 단백질의 log-2-폴드-체인지 또는 인산화 수준의 기울기를 나타낸다. 단백질 및 인산화 수준의 구별은 괄호 안의 라벨에 각각 "Ab-"및 "Phospho-"로 표시하였다. NF-κB

및 상류 인산화 단백질(LYN 및 AKT1)은 빨간색으로 표시된다.

[134] 도 12B: HUVEC(좌측) 또는 피질 뉴런(우측)의 웨스턴 블롯 결과. shLPHN2 또는 대조군 shRNA (shCon)로 처리한 후, 표시된 시간 동안 1μg/ml의 LRG1 또는 DG-LRG1로 자극했다.

[135] 도 12C: PP2 (10 μM) 또는 LY294002 (10 μM)로 전처리하거나 전처리하지 않은 경우, 1μg/ml의 DG-LRG1로 자극된 HUVEC의 웨스턴 블롯 결과.

[136] 도 12D: shLPHN2 또는 대조군 shRNA (shCon)로 처리한 후, TGF-β1과 함께 1μg/ml LRG1 또는 DG-LRG1으로 자극한 HUVEC의 웨스턴 블롯 결과.

[137]

[138] **발명의 상세한 설명 및 구체적인 구현예**

[139] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[140] 달리 지시되지 않는 한, 핵산 및 아미노산은 좌측에서 우측으로 각각 5'에서 3' 및 N-말단에서 C-말단 배향으로 기록된다. 명세서 내에서 열거된 수치 범위는 범위를 정의하는 숫자를 포함하고, 정의된 범위 내의 각각의 정수 또는 임의의 비-정수 분획을 포함한다.

[141] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자가 통상적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 것들과 유사하거나 등가인 임의의 방법 및 재료가 본 발명을 테스트하기 위한 실행에서 사용될 수 있지만, 바람직한 재료 및 방법이 본원에서 기술된다.

[142]

[143] LRG1은 인간 혈청에 존재하는 당단백질로, 다양한 질병에서 그 발현이 증가되어, 주로 바이오마커로서의 용도가 보고되어 왔으며, 최근 LRG1의 TGF-β 의존적 혈관신생 및 신경 성장 효과가 보고된 바 있다.

[144] 본 발명자들은 이러한 LRG1 당단백질의 TGF-β/ENG 의존적 혈관신생 및 신경 재생효과에 기반하여 LRG1 및 Fc 도메인의 융합 단백질이 음경 해면체 내피세포 및 신경 세포의 재생을 유도하여 음경 발기력을 증가시키고, 우수한 혈관 및 신경 재생 효과를 보임을 확인하여, 상기 융합 단백질의 발기 부전, 허혈성 질환, 신경질환의 치료용도를 등록받은 바 있다(대한민국 등록특허 제2162934호 및 제2002866호).

[145] 그러나, LRG1과 ENG의 약한 결합 친화성(~2.9 μM)은 TGF-β 기반 메커니즘만으로 LRG1의 혈관 및 신경 재생 효과를 충분히 설명하기 어렵다.

[146] 본 발명의 일 실시예에서, LRG1의 TGF-β/ENG 의존적 경로 외의 혈관 및 신경 형성 경로를 의 존재할 것이라 예측하고 이를 밝히기 위해 프로테오믹스 기반의 연구를 수행한 결과, 신규한 LRG1 수용체로 LPHN2를 확인하였다. 나아가,

고-글루코스 조건(예, 당뇨병 개체)에서 TGF-β 항체 처리시에도 LPHN2 경로를 통해 혈관신생 및 신경성장을 유도 할 수 있음을 확인하여 LPHN2가 종래 공지된 LRG1/TGF-β 경로에 비의존적인 경로임을 확인하였다. 다만, 천연 LRG1은 정상 생쥐의 혈관이나 뉴런에는 유의미한 영향을 미치지 않는 다는 것을 확인하였다.

[147] 본 발명의 다른 실시예에서, 고-글루코스 조건에서의 기능적 활성화 메커니즘을 확인하였다. 구체적으로, 고-글루코스 조건에서 LRG1 당단백질이 탈당화되는 것을 확인하였으며, LRG1의 탈당화 형태가 정상 LRG1에 비해 매우 높은 LPHN2 결합 친화도를 갖는 다는 것을 확인하였다. 나아가, 탈당화된 LRG1이 정상 글루코스 조건에서도 혈관 신생 및 신경 영양효과를 나타내는 것을 확인하여, LRG1의 탈당화가 혈관 신생 및 신경 영양효과에 대한 고-글루코스 조건에서의 기능적 활성화 메커니즘임을 입증하고 또 다른 실시예에서, 탈당화된 LRG1/LPHN2의 혈관신생 및 신경재생 경로를 구축하였다.

[148]

[149] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 하나 이상의 글리코실기(glycosyl group)가 탈당화된, LRG1 당단백질(Leucine rich α-2 glycoprotein)에 관한 것이다.

[150] 본 발명의 하나 이상의 글리코실기(glycosyl group)가 탈당화된, LRG1 당단백질은 TGF-β 경로에 비의존적으로, 높은 혈관 신생, 신경 성장 및/또는 신경 재생 유도효과를 나타내는 것을 특징으로 할 수 있다.

[151] 본 발명의 하나 이상의 글리코실기(glycosyl group)가 탈당화된, LRG1 당단백질은 LPHN2와 상호작용하고, 이의 하위 신호 전달을 유도하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[152] 본 발명에서, “LRG1(Leucine-Rich alpha-2-Glycoprotein 1)”또는 “LRG1 당단백질”은 류신 중복성 부위를 갖는 혈청 당단백질을 의미한다. 상기 LRG1 당단백질은 인간, 유인원, 말, 돼지, 토끼, 마우스 등 다양한 동물, 바람직하게는 포유동물 유래의 LRG1 당단백질 및 이의 기능적으로 동일한 단백질을 제한 없이 포함하는 의미로 사용된다. 바람직하게는 상기 LRG1 당단백질은 인간 유래인 것일 수 있다. 본 발명에 있어서, LRG1 당단백질은 전장 당단백질 뿐만 아니라, 실질적으로 동일한 기능 및/또는 효과가 유지되는 LRG1 당단백질의 절편을 포함하는 의미로 사용된다.

[153] 본 발명에 있어서, 상기 LRG1 당단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[154] 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열은 인간 LRG1 단백질로, 본 발명의 실시예에서 사용되었다. 인간 LRG1(서열번호 1)은 T37, N79, N186, N269, 및 N325 잔기에 글리코실기를 갖는 5개의 글리코실화 부위(T37:O-linked, 나머지: N-linked)를 포함하는 것으로 알려져 있다(UniProt ID: P02750/ A2GL_HUMAN; Reference Seq ID: NP_443204.1).

[155] 또한, 서열번호 1의 1 내지 35번째 아미노산은 신호서열(signal peptide)이며, 36

내지 347 아미노산(서열번호 2)이 활성서열에 해당한다.

[156] 따라서, 본 발명에 있어서, 상기 LRG1 당단백질은 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[157] 상기 서열번호 1의 글리코실화 부위인 T37, N79, N186, N269, 및 N325 잔기는 서열번호 2의 T2, N44, N151, N234, 및 N290 잔기와 대응한다.

[158] 본 발명의 따른 LRG1 당단백질은 특정 아미노산 잔기 위치에서, 아미노산 잔기가 보존적으로 치환된 변이체들도 포함하는 의미로 해석된다.

[159] 본 명세서에서 "보존적 치환"이란 1개 이상의 아미노산을 해당 LRG1 당단백질의 생물학적 또는 생화학적 기능의 손실을 야기하지 않는 유사한 생화학적 특성을 갖는 아미노산으로 치환하는 것을 포함하는 LRG1 당단백질의 변형을 의미한다.

[160] "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기를 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체시키는 치환이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 부류는 해당 기술분야에 규정되어 있으며, 잘 알려져 있다. 이들 부류는 염기성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 대전되지 않은 극성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 글리신, 아스파라진, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비-극성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지된 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)을 포함한다.

[161] 본 발명의 LRG1 당단백질은 서열번호 1의 인간 LRG1 당단백질 또는 서열번호 2를 포함하는 LRG1 당단백질 뿐만 아니라, 이와 실질적으로 동일한 기능 및/또는 효과를 가지며, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상 또는 85% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상 95% 이상, 가장 바람직하게는 99% 이상의 아미노산 서열 상동성을 가지는 LRG1 당단백질 및 이의 절편들을 모두 포함하는 의미로 해석된다.

[162] 본 발명의 용어, "절편"은 모 단백질이 절단된 일부 단편을 의미하며, C'-말단 및/또는 N'-말단이 절단된 것일 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 절편은 본 발명의 탈당화된 LRG1 당단백질과 실질적으로 동일한 기능 및/또는 효과를 갖는 절편을 의미한다. 예를 들어, 상기 절편은 전장 단백질에서 신호 서열이 절단된 단편을 포함할 수 있다.

[163]

[164] 본 발명의 일 실시예에서, 고-글루코스 조건에서 LRG1 당단백질의 탈당화되는 것을 확인하였으며, LRG1의 탈당화가 혈관 신생 및 신경 영양효과에 대한 고-글루코스 조건에서의 기능적 활성화 메커니즘임을 입증하였다. 특히, LRG1 당단백질의 N-결합된 글리코실 기의 탈당화가 LPHN2 경로 의존적 혈관신생 및 신경재생 유도에 필수적이며, 그 중에서도 N325 잔기의 탈당화가 가장 중요함을

확인하였다.

[165] 따라서, 본 발명에 있어서, 상기 LRG1 당단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열 중 N79, N186, N269, 및 N325에서 선택되는 아미노산에 결합된 글리코실 기 중 어느 하나 이상이 탈당화된 것을 특징으로 할 수 있다.

[166] 따라서, 본 발명에 있어서, 상기 LRG1 당단백질은 서열번호 2를 포함하고, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열 N44, N151, N234, 및 N290에서 선택되는 아미노산에 결합된 글리코실 기 중 어느 하나 이상이 탈당화된 것을 특징으로 할 수 있다.

[167] 본 발명에 있어서, 더욱 바람직하게는 상기 LRG1 당단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열 중 N325 아미노산에 결합된 글리코실 기가 탈당화된 것을 특징으로 할 수 있다.

[168] 본 발명에 있어서, 더욱 바람직하게는 상기 LRG1 당단백질은 서열번호 2를 포함하고, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열 중 N290 아미노산에 결합된 글리코실 기가 탈당화된 것을 특징으로 할 수 있다.

[169] 본 발명에 있어서, 서열번호 1의 N325 아미노산에 결합된 글리코실 기가 단독으로 탈당화될 수 있다.

[170] 본 발명에 있어서, 상기 LRG1 당단백질은 서열번호 2를 포함하고, 서열번호 2의 N290 아미노산에 결합된 글리코실 기가 단독으로 탈당화될 수 있다.

[171] 본 발명에 있어서, 서열번호 1의 N325 아미노산의 탈당화와 함께 하나 이상의 다른 아미노산에 결합된 글리코실 기가 탈당화된 것을 특징으로 할 수 있다.

[172] 본 발명에 있어서, 상기 LRG1 당단백질은 서열번호 2를 포함하고, 서열번호 2의 N290 아미노산의 탈당화와 함께 하나 이상의 다른 아미노산에 결합된 글리코실 기가 탈당화된 것을 특징으로 할 수 있다.

[173]

[174] 본 발명에 있어서, 상기 LRG1 당단백질이 서열번호 1 또는 서열번호 2와 다른 아미노산 서열을 갖는 경우, 예를 들어 다른 생물유래의 LRG1 당단백질인 경우 통상의 기술자는 서열의 정렬(alignment) 및 분석 등을 통해 상기한 글리코실화 부위에 상응하는 아미노산을 용이하게 도출할 수 있다. 이 경우, 본 발명의 탈당화된 LRG1 당단백질은 상기 기재된 글리코실화 부위에 상응하는 부위의 아미노산의 글리코실 기가 탈당화된 것을 특징으로 할 수 있음은 자명하다.

[175] 본 발명에 있어서, 상기 LRG1 당단백질은 LPHN2(latrophilin-2)에 결합하는 것을 특징으로 할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서 확인한 바와 같이 본 발명의 탈당화된, LRG1 당단백질은 KD 값 500nM 이하 바람직하게는 480nM 이하, 가장 바람직하게는 450nM 이하의 결합 친화도를 나타내는 것을 특징으로 할 수 있다.

[176] 본 발명에 있어서, 본 발명의 탈당화된, LRG1 당단백질은 정상 LRG1 단백질에 비해 1.3배 이상, 바람직하게는 1.5배 이상, 가장바람직하게는 2배 이상의 LPHN2 발현 세포 표면 결합율을 나타내는 것을 특징으로 할 수 있다.

[177] 본 발명의 탈당화된 LRG1 당단백질은 Lyn, AKT 및 NF-κB p65 중 어느 하나

이상의 인산화를 유도하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[178] 본 발명의 탈당화된 LRG1 당단백질은 신경세포에서의 신경 영양 인자, 예를 들어, NGF, BDNF, NTR3 등의 발현을 향상시키는 것을 특징으로 할 수 있다.

[179] 본 발명의 탈당화된 LRG1 당단백질은 본 발명의 일 실시예에서와 같이, 온전한 LRG1 당단백질에 PNGase F와 같은 탈당화 효소를 처리하여 글리코실 기가 탈당화된 LRG1 당단백질을 제조할 수 있으며, 보다 특이적인 글리코실화 부위에서의 탈당화를 위해, 글리코실화 부위의 아미노산의 치환과 같은 변이체를 제조하여 탈당화된 LRG1 단백질을 제조할 수 있다.

[180]

[181] 본 발명의 일 실시예에서, 탈당화된 LRG1은 두 가지 방법을 사용하였다. LRG1의 탈당화 중요성을 확인하기 위해 LRG1의 N-결합 글리칸을 임의로 분해하는 PNGase F를 사용하여 제조하였으며(실시예 5), 각각 글리코실화 부위에 글리코실 기가 연결되지 않은 LRG1 당단백질을 제조하기 위해, N79, N186, N269, 및 N325 각각을 아스파르트 산(Aspartic acid, D)으로 치환하는 LRG1 변이체를 제조하여 사용하였다.

[182]

[183] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서, 하나 이상의 글리코실화 부위에 변이를 포함하는 LRG1 당단백질(Leucine rich α-2 glycoprotein) 변이체에 관한 것이다.

[184] 본 발명의 용어 “글리코실화(glycosylation)”는 단백질의 세린이나 아스파라진 등 단백질의 변형 중 가장 흔한 형태로, 글리코실 기, 즉 탄수화물체인 글리칸(glycan)이 아미노산 잔기, 예를 들어 세린의 산소나 아스파라진의 질소에 결합하는 과정을 의미한다. 상기 글리코실화는 단백질 2차 및 3차구조, 세포간 신호전달, 생물학적 활성, 안정성 등 다양한 특성에 영향을 미칠 수 있다.

[185] 본 발명에 있어서 상기 글리코실화는 N-글리코실화(N-(linked) glycosylation), O-글리코실화(O-(linked) glycosylation), 인산화 세린 글리코실화(Phosphoserine glycosylation) glycosylation) 및 C-만노실화(C-mannosylation)등 일 수 있으며, 바람직하게는 N-글리코실화 또는 O-글리코실화 일수 있다.

[186] 본 발명의 용어 “글리코실화 부위”는 LRG1 당단백질에서 글리코실 기가 연결된 아미노산 또는 글리코실 기의 연결에 영향을 미치는 이의 인접 아미노산을 의미한다. 인간 LRG1(서열번호 1)에서 글리코실화 부위는 T73, N79, N186, N269, 및 N325가 알려져 있으며, T73은 O-연결된 글리코실 기, 나머지 4개의 아미노산(N79, N186, N269, 및 N325)은 N-연결된 글리코실 기를 갖는 것으로 알려져 있다. 서열 번호 1 외의 LRG1 당단백질(예, 다른 동물 유래 LRG1 당단백질)의 경우 글리코실화 부위는 상이할 수 있으나, 본 발명의 일 실시예에서 확인한 것과 같이, 글리코실화 부위 중 서열번호 1의 N269 및 Asn325에 상응하는 부위는 고도로 보존된 것을 특징으로 한다.

[187] 본 발명에 있어서, 상기 LRG1 당단백질(Leucine rich α-2 glycoprotein) 변이체는 변이된 글리코실화 부위에서 글리코실 기를 포함하지 않는 것을 특징으로 할 수

있다.

[188] 본 발명에 있어서, 상기 변이체는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 LRG1 당단백질이 변이된, LRG1 당단백질 변이체인 것을 특징으로 할 수 있다.

[189] 본 발명에 있어서, 상기 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 LRG1 당단백질이 변이된, LRG1 당단백질 변이체인 것을 특징으로 할 수 있다.

[190] 본 발명에 있어서, 상기 LRG1 당단백질 변이체는 서열번호 1의 N79, N186, N269, 및 N325 에서 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산에 변이를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[191] 본 발명에 있어서, 상기 LRG1 당단백질 변이체는 서열번호 2의 N44, N151, N234, 및 N290에서 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산에 변이를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[192] 본 발명에 있어서, 가장 바람직하게는 상기 LRG1 당단백질 변이체는 서열번호 1의 N325 아미노산에 변이를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[193] 본 발명에 있어서, 상기 LRG1 당단백질 변이체는 서열번호 2의 N290 아미노산에 변이를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[194] 본 발명에 있어서, 상기 LRG1 당단백질 변이체는 서열번호 1의 N325 아미노산이 단독으로 변이된 것을 특징으로 할 수 있다.

[195] 본 발명에 있어서, 상기 LRG1 당단백질 변이체는 서열번호 1의 N325 아미노산의 변이와 함께 하나 이상의 다른 아미노산이 변이를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[196] 본 발명에 있어서, 상기 LRG1 당단백질 변이체는 서열번호 2의 N290 아미노산이 단독으로 변이된 서열을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[197] 본 발명에 있어서, 상기 LRG1 당단백질 변이체는 N290 아미노산의 변이와 함께 하나 이상의 다른 아미노산이 변이를 포함하는 서열번호 2의 서열을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[198]

[199] 본 발명의 용어 “변이체”는 참조서열(정상 LRG1 당단백질 서열 예, 서열번호 1)의 아미노산 서열에서, 일부 아미노산 잔기의 변이, 바람직하게는 아미노산 잔기의 치환, 결실 및/또는 삽입, 더욱 바람직하게는 아미노산 잔기의 치환을 포함하는 것뿐 아니라, 그러한 아미노산 잔기의 치환, 결실 및/또는 삽입 과 함께, N-말단 또는 C-말단에서의 일부 아미노산 잔기의 결실이 일어난 것을 모두 포함하는 개념으로 사용된다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 변이는 LRG 1의 당단백질의 글리코실화 부위의 아미노산을 아스파르트 산으로 치환하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[200] 본 발명에 있어서, 상기 변이는 아미노산의 치환인 것을 특징으로 할 수 있다.

[201] 본 발명에 있어서, 상기 아미노산의 치환은 아스파르트 산(aspartic acid)로의 치환인 것을 특징으로 할 수 있다.

[202] 본 발명에 있어서, 바람직하게는, 상기 LRG1 당단백질 변이체는 서열번호 1의 N79, N186, N269, 및 N325 에서 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것을 특징으로 할 수 있다.

[203] 본 발명에 있어서, 바람직하게는, 상기 LRG1 당단백질 변이체는 서열번호 2의 N44, N151, N234, 및 N290에서 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 서열을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[204] 본 발명에 있어서, 더욱 바람직하게는 상기 LRG1 당단백질 변이체는 서열번호 1의 N325 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것을 특징으로 할 수 있으며, 가장 바람직하게는 N325 아미노산이 아스파르트 산(aspartic acid, D)으로 치환된 것을 특징으로 할 수 있다.

[205] 본 발명에 있어서, 더욱 바람직하게는, 상기 LRG1 당단백질 변이체는 서열번호 2의 N290 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 서열을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 가장 바람직하게는 서열번호 2의 N290 아미노산이 아스파르트 산(aspartic acid, D)으로 치환된 서열을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[206]

[207] 본 발명에 있어서, 상기 LRG1 당단백질 변이체는 서열번호 1에 있어, N79D, N186D, N269D, 및 N325D로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[208] 본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 LRG1 당단백질 변이체는 서열번호 1에 있어, N325D의 치환을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[209] 본 발명에 있어서, 상기 LRG1 당단백질 변이체는 서열번호 2에 있어, N44D, N151D, N234D, 및 N290D로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환을 포함하는 서열을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[210] 본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 LRG1 당단백질 변이체는 서열번호 1에 있어, N325D의 치환을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[211] 본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 LRG1 당단백질 변이체는 서열번호 2에 있어, N290D의 치환을 포함하는 서열을 포함하는것을 특징으로 할 수 있다.

[212]

[213] 본 발명에 있어서, “N325”과 같이 1 글자(one letter)의 아미노산 잔기명과 숫자(n)가 함께 기재된 표현은 각 아미노산 서열에서의 해당 n번째 위치에서의 아미노산 잔기 및 종류를 의미한다.

[214] 예를 들어 “N325”는 서열번호 1의 아미노산 서열에서의 325번째 위치에서의 아미노산 잔기가 아스파라긴임을 의미한다. “N325D”와 같이, 숫자 뒤의 아미노산 잔기명은 아미노산의 치환을 의미하며, 상기 “N325D”는 서열번호 1의 325번째 위치에서의 아스파라긴(Asn, N)이 아스파르트산(Asp, D)으로 치환된 것을 의미한다.

[215] 본 발명에 있어서, 상기 LRG1 당단백질 변이체의 서열번호 1과 다른 아미노산

서열을 갖는 LRG1 당단백질 기반의 변이체인 경우, 예를 들어 다른 생물유래의 LRG1 당단백질 기반의 변이체인 경우 통상의 기술자는 서열의 정렬(alignment) 및 분석 등을 통해 상기한 글리코실화 부위에 상응하는 아미노산을 용이하게 도출할 수 있다. 이 경우, 본 발명의 LRG1 당단백질 변이체는 상기 기재된 글리코실화 부위에 상응하는 글리코실화 부위에 변이를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있음은 자명하다.

[216] 본 발명에 있어서, 상기 LRG1 당단백질 변이체는 LPHN2(latrophilin-2)에 결합하는 것을 특징으로 할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서 확인한 바와 같이 본 발명의 탈당화된, LRG1 당단백질은 KD 값 500nM 이하 바람직하게는 480nM 이하, 가장 바람직하게는 450nM 이하의 결합 친화도를 나타내는 것을 특징으로 할 수 있다.

[217] 본 발명에 있어서, 상기 LRG1 당단백질 변이체는 정상 LRG1 단백질에 비해 1.3배 이상, 바람직하게는 1.5배 이상, 가장바람직하게는 2배 이상의 LPHN2 발현 세포 표면 결합율을 나타내는 것을 특징으로 할 수 있다.

[218] 본 발명에 있어서, 상기 LRG1 당단백질 변이체는 Lyn, AKT, 및 NF-κB p65 중 어느 하나 이상의 인산화를 유도하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[219] 본 발명에 있어서, 상기 LRG1 당단백질 변이체는 신경 영양 인자, 예를 들어, NGF, BDNF, NTR3 등의 발현을 향상시키는 것을 특징으로 할 수 있다.

[220] 본 발명에 있어서, 상기 LRG1 당단백질 변이체는 이의 절편을 포함하는 의미로 사용된다.

[221]

[222] 본 발명의 LRG1 당단백질 변이체는 LPHN2와 강하게 결합 및 상호작용하고, Lyn, AKT, 및/또는 NF-κB p65 를 포함하는 신호전달 경로를 통해 혈관 및/또는 신경 세포의 성장, 혈관 신생, 신경 재생을 유도하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[223]

[224] 본 발명은 또 다른 관점에서, 본 발명의 LRG1 당단백질 변이체를 코딩하는 핵산에 관한 것이다.

[225] 본 명세서에서 사용되는 핵산은 세포, 세포 용해물(lysate) 중에 존재하거나, 또는 부분적으로 정제된 형태 또는 실질적으로 순수한 형태로 존재할 수도 있다. 핵산은 알칼리/SDS 처리, CsCl 밴드화(banding), 컬럼 크로마토그래피, 아가로스 겔 전기 영동 및 해당 기술분야에 잘 알려진 기타의 것을 포함하는 표준 기술에 의해 다른 세포 성분 또는 기타 오염 물질, 예를 들어 다른 세포의 핵산 또는 단백질로부터 정제되어 나올 경우 "단리"되거나 "실질적으로 순수하게 된" 것이다. 본 발명의 핵산은 예를 들어 DNA 또는 RNA일 수 있다.

[226]

[227] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 핵산을 포함하는 벡터에 관한 것이다.

[228] 본 발명의 LRG1 당단백질 변이체의 발현을 위하여, 본 발명의 LRG1 당단백질 변이체를 코딩하는 핵산(DNA)를 표준 분자 생물학 기술(예를 들어 PCR 증폭

또는 LRG1 당단백질 변이체를 발현하는 하이브리도마를 사용한 cDNA 클로닝)로 수득할 수 있으며, DNA가 전사 및 번역 제어 서열에 "작동되도록 결합"되어 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다.

[229] 본 발명에서 용어 "벡터 (vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드 (plasmid)" 및 "벡터 (vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 그러나, 본 발명은 당업계에 알려진 또는 알려지게 되는 바와 동등한 기능을 갖는 벡터의 다른 형태를 포함한다. 대장균에서 사용되는 단백질 발현 벡터로는 Novagen (미국) 사의 pET 계열; Invitrogen (미국)의 pBAD 계열; Takara (일본)의 pHCE 나 pCOLD; 제노포커스 (대한미국)의 pACE 계열; 등을 사용할 수 있다. 고초균에서는 게놈의 특정부분에 목적 유전자를 삽입하여 단백질 발현을 구현하거나, MoBiTech (독일)의 pHT 계열의 벡터, 등을 사용할 수 있다. 곰팡이나 효모에서도 게놈 삽입이나 자가복제 벡터들 이용하여 단백질 발현이 가능하다. Agrobacterium tumefaciens나 Agrobacterium rhizogenes 등의 T-DNA 시스템을 이용하여 식물용 단백질 발현 벡터를 사용할 수 있다. 포유동물 세포 배양물 발현을 위한 전형적인 발현 벡터는 예를 들면 pRK5 (EP 307,247호), pSV16B (WO 91/08291호) 및 pVL1392 (Pharmingen)을 기초로 한다.

[230] "발현 조절 서열 (expression control sequence)"이라는 표현은 특정한 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필수적인 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보좀 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 예를 들면, 원핵생물에 적합한 조절 서열은 프로모터, 임의로 오퍼레이터 서열 및 리보좀 결합 부위를 포함한다. 진핵세포는 프로모터, 폴리아데닐화 시그날 및 인핸서가 이에 포함된다. 플라스미드에서 유전자의 발현 양에 가장 영향을 미치는 인자는 프로모터이다. 고 발현용의 프로모터로서 SRα 프로모터와 사이토메가로바이러스 (cytomegalovirus) 유래 프로모터 등이 바람직하게 사용된다.

[231] 본 발명의 DNA 서열을 발현시키기 위하여, 매우 다양한 발현 조절 서열중 어느 것이라도 벡터에 사용될 수 있다. 유용한 발현 조절서열의 예에는, 상기 기술한 프로모터 이외에도, 예를 들어, SV40 또는 아데노바이러스의 초기 및 후기 프로모터들, lac 시스템, trp 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T3 및 T7 프로모터들, 파지 람다의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 영역, fd 코드 단백질의 조절 영역, 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 글리콜분해 효소에 대한 프로모터,

상기 포스파타제의 프로모터들, 예를 들어 Pho5, 효모 알파-교배 시스템의 프로모터 및 원핵세포 또는 진핵 세포 또는 이들의 바이러스의 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려진 구성과 유도의 기타 다른 서열 및 이들의 여러 조합이 포함된다. T7 RNA 폴리메라아제 프로모터 Φ10은 E.coli에서 단백질을 발현시키는데 유용하게 사용될 수 있다.

[232] 통상의 기술자는 형질전환시킬 숙주세포의 선택, 단백질의 발현 수준 등과 같은 인자에 따라 조절 서열을 달리 선택하여, 발현 벡터의 디자인이 달라질 수 있음을 인식할 수 있다.

[233] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결(operably linked)"된다. 이것은 적절한 분자 (예를 들면, 전사 활성화 단백질)은 조절 서열(들)에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 조절 서열(들)일 수 있다. 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비 리더 (leader)에 대한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보좀 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보좀 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 배치되는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는것을 의미한다. 그러나, 인핸서 (enhancer)는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 (oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다.

[234] 본원 명세서에 사용된 용어 "발현 벡터"는 통상 이종의 DNA의 단편이 삽입된 재조합 캐리어 (recombinant carrier)로서 일반적으로 이중 가닥의 DNA의 단편을 의미한다. 여기서, 이종 DNA는 숙주세포에서 천연적으로 발견되지 않는 DNA인 이형 DNA를 의미한다. 발현 벡터는 일단 숙주 세포 내에 있으면 숙주 염색체 DNA와 무관하게 복제할 수 있으며 벡터의 수 개의 카피 및 그의 삽입된 (이종) DNA가 생성될 수 있다.

[235] 당업계에 주지된 바와 같이, 재조합 세포에서 형질감염 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가, 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동가능하도록 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점 (replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함되게 된다. 발현 숙주가 진핵세포인 경우에는, 발현 벡터는 진핵 발현 숙주 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함할 수 있다.

[236]

[237] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 핵산 또는 상기 벡터가 도입된 숙주세포에 관한 것이다.

[238] 본 발명에 있어서, 상기 숙주 세포는 LRG1 당단백질 변이체를 생산하기 위해, 이를 코딩하는 핵산 또는 상기 핵산을 포함하는 벡터 등이 도입된 발현용 세포를 의미한다. 상기 재조합 세포는 글리코실화된 LRG1 당단백질을 발현할 수 있는 세포라면 제한없이 사용될 수 있으며, 바람직하게는 진핵세포, 더욱 바람직하게는 효모, 곤충세포, 동물세포, 가장 바람직하게는 동물세포일 수 있다. 예를 들어 재조합 단백질의 발현에 주로 사용되는 CHO 세포주 또는 HEK 세포주 등이 사용될 수 있고, 본 발명의 일 실시예에서는 HEK 세포주인 Freestyle 293-F 세포주를 사용하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[239] 상기 숙주세포는 짧은 시간 내 고농도 균체 배양이 가능하고 유전자 조작이 용이하고 유전학적, 생리적 특징이 잘 밝혀져 있는 대장균 (Escherichia coli), 고초균 (Bacillus subtillis) 등과 같은 원핵세포가 널리 이용되어 왔다. 그러나, 단백질의 번역 후 수식 (post-translational modification), 분비과정 및 활성형의 3차원 구조, 단백질의 활성상태의 문제점들을 해결하기 위해 최근 단세포 진핵세포인 효모 계열(Pichia pastoris, Saccharomyces cerevisiae, Hansenula polymorpha 등), 사상성 진균류 (filamentous fungi), 곤충세포 (insect cells), 식물세포, 포유동물세포 (mammalian cells) 등 고등생물에 이르기까지 재조합 단백질 생산의 숙주세포로 활용하고 있으므로, 실시예에서 예시된 고초균 뿐만 아니라 다른 숙주세포를 이용하는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 용이하게 적용 가능하다.

[240] 본 발명의 LRG1 당단백질 변이체를 발현시키기 위해 매우 다양한 발현 숙주/벡터 조합이 이용될 수 있다. 진핵 숙주에 적합한 발현 벡터에는, 예를 들어 SV40, 소 유두종바이러스, 아네노바이러스, 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus), 시토메갈로바이러스 및 레트로바이러스로부터 유래된 발현 조절 서열을 포함한다. 세균 숙주에 사용할 수 있는 발현 벡터에는 pBluescript, pGEX2T, pUC벡터, col E1, pCR1, pBR322, pMB9 및 이들의 유도체와 같이 E. coli에서 얻는 것을 예시할 수 있는 세균성 플라스미드, RP4와 같이 보다 넓은 숙주 범위를 갖는 플라스미드, λgt10과 λgt11, NM989와 같은 매우 다양한 파지 람다(phage lambda) 유도체로 예시될 수 있는 파지 DNA, 및 M13과 필라멘트성 단일가닥의 DNA 파지와 같은 기타 다른 DNA 파지가 포함된다. 효모 세포에 유용한 발현 벡터는 2μ 플라스미드 및 그의 유도체이다. 곤충 세포에 유용한 벡터는 pVL 941이다.

[241] 본 발명의 일 실시예에서, LRG1 당단백질 변이체를 생산하기 위해, HEK 세포주인 Freestyle 293-F 세포주 및 ppcDNA3.1 벡터의 숙주세포/벡터 조합을 사용하였으나. 이에 제한되는 것은 아니다.

[242] 상기 벡터는 형질전환 또는 형질감염 등의 방법으로 숙주세포에 도입될 수 있다. 본원 명세서에 사용된 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가

염색체외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제가능하게 되는 것을 의미한다. 본원 명세서에 사용된 용어 "형질감염"은 임의의 코딩 서열이 실제로 발현되든 아니든 발현 벡터가 숙주 세포에 의해 수용되는 것을 의미한다. 상기 벡터를 도입하기 위해, 원핵 또는 진핵 숙주세포 내로 외인성 핵산(DNA 또는 RNA)을 도입하는 데에 통상 사용되는 여러 종류의 다양한 기술, 예를 들어 전기영동법, 인산칼슘 침전법, DEAE-덱스트란 트랜스펙션 또는 리포펙션(lipofection) 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[243] 물론 모든 벡터와 발현 조절 서열이 본 발명의 DNA 서열을 발현하는데 모두 동등하게 기능을 발휘하지는 않는다는 것을 이해하여야만 한다. 마찬가지로 모든 숙주가 동일한 발현 시스템에 대해 동일하게 기능을 발휘하지는 않는다. 그러나, 당업자라면 과도한 실험적 부담없이 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 채로 여러 벡터, 발현 조절 서열 및 숙주 중에서 적절한 선택을 할 수 있다. 예를 들어, 벡터를 선택함에 있어서는 숙주를 고려하여야 하는데, 이는 벡터가 그 안에서 복제되어야만 하기 때문이다. 벡터의 복제 수, 복제 수를 조절할 수 있는 능력 및 당해 벡터에 의해 코딩되는 다른 단백질, 예를 들어 항생제 마커의 발현도 또한 고려되어야만 한다. 발현 조절 서열을 선정함에 있어서도, 여러 가지 인자들을 고려하여야만 한다. 예를 들어, 서열의 상대적 강도, 조절 가능성 및 본 발명의 DNA 서열과의 상용성 등, 특히 가능성있는 이차 구조와 관련하여 고려하여야 한다. 단세포 숙주는 선정된 벡터, 본 발명의 DNA 서열에 의해 코딩되는 산물의 독성, 분비 특성, 단백질을 정확하게 폴딩시킬 수 있는 능력, 배양 및 발효 요건들, 본 발명 DNA 서열에 의해 코딩되는 산물을 숙주로부터 정제하는 것의 용이성 등의 인자를 고려하여 선정되어야만 한다. 이들 변수의 범위내에서, 당업자는 본 발명의 DNA 서열을 발효 또는 대규모 동물 배양에서 발현시킬 수 있는 각종 벡터/발현 조절 서열/숙주 조합을 선정할 수 있다. 발현클로닝에 의해 cDNA를 클로닝 하려고 할 때의 스크리닝법으로서 바인딩법(binding법), 페닝법(panning법), 필름 에멀션법(film emulsion 법)등이 적용될 수 있다.

[244] 본 발명에 있어서, 상기 LRG1 당단백질 변이체를 코딩하는 핵산이 직접적으로 숙주세포의 게놈에 도입되어 염색체 상 인자로서 존재할 수 있다. 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 있어 상기 유전자를 숙주세포의 게놈 염색체에 삽입하여서도 재조합 벡터를 숙주세포에 도입한 경우와 동일한 효과를 가질 것은 자명하다 할 것이다.

[245] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 숙주세포를 배양하는 단계를 포함하는 LRG1 당단백질 변이체의 제조방법에 관한 것이다.

[246] 상기 LRG1 당단백질 변이체를 발현할 수 있는 재조합 발현 벡터가 포유류 숙주세포 내로 도입될 경우, LRG1 당단백질 변이체 또는 이의 변이체는 숙주세포에서 발현되기에 충분한 기간 동안, 또는 더 바람직하게는 숙주세포가 배양되는 배양 배지 내로 LRG1 당단백질 변이체가 분비되게 하기에 충분한

기간 동안 숙주세포를 배양함으로써 제조될 수 있다.

[247] 경우에 따라서, 발현된 LRG1 당단백질 변이체는 숙주세포로부터 분리하여 균일하도록 정제할 수 있다. 상기 LRG1 당단백질 변이체의 분리 또는 정제는 통상의 단백질에서 사용되고 있는 분리, 정제 방법, 예를 들어 크로마토그래피에 의해 수행될 수 있다. 상기 크로마토그래피는 예를 들어, 친화성 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피 또는 소수성 크로마토그래피에서 선택된 하나 이상의 조합일 수 있지만, 이에 한정되지는 않는다. 상기 크로마토그래피 이외에, 추가로 여과, 초여과, 염석, 투석 등을 조합되어 사용될 수 있다.

[248]

[249] 본 발명자들은 LRG1 및 Fc 도메인이 융합된 LRG1-Fc 융합 단백질의 발기부전, 허혈성 질환, 신경질환의 치료용도를 등록받은 바 있다(대한민국 등록특허 제2162934호 및 제2002866호).

[250] 본 발명의 일 실시예에서, 또한 LRG1-Fc 융합 단백질을 제조합하였으며, LRG1 당단백질의 탈당화가 발생하는 고-글루코스 조건에서 TGF-β 항체가 존재하는 경우에도, LPHN2를 통해 효과적으로 혈관 신생 및 신경 성장 유도효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[251]

[252] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 본 발명의 탈당화된 LRG1 당단백질, 또는 LRG1 당단백질 변이체에 Fc 도메인이 융합된, 융합 단백질에 관한 것이다.

[253] 본 발명에서 “Fc 도메인”은 Ig(immunoglobulin, 면역글로불린)의 Fc 도메인을 의미한다. 상기 Ig의 Fc 도메인 은 Ig의 중쇄와 경쇄 가변영역, 중쇄 불변영역 1(CH1)과 경쇄 불변영역(CL1)을 제외한, 중쇄 불변영역 2(CH2) 및 중쇄 불변영역 3(CH3) 부분을 의미하며, 중쇄 불변영역에 힌지(hinge) 부분이 포함될 수 있다. 상기 Ig의 Fc 도메인은 천연형과 실질적으로 동등하거나 향상된 효과를 갖는 한, Ig의 중쇄와 경쇄 가변영역만을 제외하고, 일부 또는 전체 중쇄 불변영역 1(CH1) 및/또는 경쇄불변영역 1(CL1)을 포함하는 확장된 Fc 영역일 수 있다. 또한, CH2 및/또는 CH3에 해당하는 상당히 긴 일부 아미노산 서열이 제거된 영역일 수도 있다. 또한, 상기 Ig의 Fc 도메인에는 이황화 결합을 형성할 수 있는 부위가 제거되거나, 천연형 Fc에서 N-말단의 몇몇 아미노산이 제거되거나 또는 천연형 Fc의 N-말단에 메티오닌 잔기가 부가될 수도 있는 등 다양한 종류의 유도체가 포함된다.

[254] 본 발명에서, Ig는 IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM을 포함하며, 바람직하게는 IgG이다. 상기 IgG는 인간 또는 소, 염소, 돼지, 마우스, 토끼, 햄스터, 랫트, 기니피그 등의 포유동물 유래일 수 있으며, 바람직하게는 인간 유래이다. 상기 IgG는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4를 포함하며, 바람직하게는 IgG1이다.

[255] 본 발명에 있어서, 상기 Fc 도메인은 탈당화된 LRG1 당단백질, 또는 LRG1 당단백질 변이체의 N’-말단 및/또는 C’-말단 융합될 수 있다.

[256] 본 발명의 융합 단백질은 LRG1 (Leucine-Rich alpha-2-Glycoprotein 1) 당단백질과 Fc 도메인이 링커로 연결된 형태일 수 있다.

[257] 본 발명의 용어, "링커(linker)"는 기본적으로는 두 개의 서로 다른 융합 파트너(예를 들어, 생물학적 고분자 등)를 수소 결합, 정전기적 상호작용, 반데르 바알스력, 이황화 결합, 염 브릿지, 소수성 상호작용, 공유결합 등을 이용하여 연결할 수 있는 연결체를 의미한다. 본 발명에 있어서, 상기 링커는 바람직하게는 펩타이드 링커이다.

[258] 본 발명의 용어, "펩타이드 링커"는 임의의 아미노산 서열을 가진 펩타이드로서, 기능기를 갖지 않으며 크기가 작은 아미노산이 적합하며, 바람직하게는 알라닌, 글라이신 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산으로 이루어진 펩타이드 링커일 수 있다. 상기 펩타이드 링커는 LRG1 당단백질 및 Fc 도메인과의 결합능을 방해하지 않으며, 적절한 배양성을 유지할 수 있도록 유연성을 줄 수 있는 개수의 아미노산으로 구성될 수 있으며, 예를 들어, 수개 내지 수십개의 아미노산으로 구성될 수 있다.

[259] 본 발명에 있어서, 상기 Fc 도메인은 혈관내피세포 표면의 FcRN(neonatal Fc-receptor)과 결합하는데, 낮은 pH에서는 FcRN에 결합하고 중성 pH에서는 분리되는 특성을 가진다. 이러한 특성에 의하여 Fc 도메인을 포함하는 융합 단백질은 혈관내피세포로 엔도시토시스 되고, 다시 엑소시토시스 되어 혈액 내로 배출되는 특성을 가지고, 이로 인해 융합 단백질의 혈액 내 반감기가 현저히 늘어나는 장점을 가진다. 또한, Fc 도메인을 포함하는 융합 단백질은 Fc 도메인과의 융합에 의해 수용성 및 안전성을 개선하는 효과를 내며, 약물의 생산 측면에서도 정제 및 분리가 간편하여 생산비용을 절약할 수 있는바, LRG1 당단백질만을 이용할 때에 비해 장점을 가지고 있다.

[260]

[261] 본 발명의 탈당화된 LRG1 당단백질, LRG1 당단백질 변이체 및/또는 이의 절편은 LPHN2와 강하게 결합 및 상호작용하고, Lyn, AKT, 및/또는 NF-κB p65 를 포함하는 직접적 신호전달 경로 및/또는 NGF, BDNF 및 NT3을 포함하는 신경 영양인자의 발현 향상을 통해 혈관 및/또는 신경 세포의 성장, 혈관 신생, 신경 재생을 유도하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[262] 본 발명의 일 실시예에서는, 본 발명의 PNGaseF를 처리하여 제조한 탈당화된 LRG1 당단백질 및 글리코실화 부위에 변이를 포함하는 LRG1 당단백질 변이체를 제조하였으며(이하 DG-LRG1으로 통합하여 지칭), 상기 DG-LRG1은 LPHN2 경로의 직접적인 효과 및 신경 영양 인자 발현 향상의 간접적인 효과를 통해 TGF-β 비의존적으로 혈관 내피 및 신경 성장을 현저하게 유도하고, 허혈성 질환 및 신경질환이 합병증으로 나타나는 당뇨병 마우스 모델에서, 혈관 신생, 말초 신경의 재생, 발기부전의 완화효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[263]

[264] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 본 발명의 탈당화된 LRG1 당단백질,

LRG1 당단백질 변이체, 또는 본 발명의 융합단백질을 포함하는 혈관신생, 신경성장 또는 신경재생 유도용 조성물에 관한 것이다.

[265] 본 발명은 또 다른 관점에서, 본 발명의 탈당화된 LRG1 당단백질, LRG1 당단백질 변이체, 또는 본 발명의 융합단백질을 포함하는 허혈성 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[266] 본 발명은 또 다른 관점에서, 본 발명의 탈당화된 LRG1 당단백질, LRG1 당단백질 변이체, 또는 본 발명의 융합단백질을 포함하는 말초 신경계 질환 질환의 예방 또는 치료용 조성물 에 관한 것이다.

[267] 본 발명은 또 다른 관점에서, 본 발명의 탈당화된 LRG1 당단백질, LRG1 당단백질 변이체, 또는 본 발명의 융합단백질을 포함하는 발기부전 의 예방 또는 치료용 조성물 에 관한 것이다.

[268] 본 발명은 또 다른 관점에서, 본 발명의 탈당화된 LRG1 당단백질, LRG1 당단백질 변이체, 또는 본 발명의 융합단백질을 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[269] 본 발명의 용어, “혈관 신생”은 기존의 혈관에서 새로운 혈관이 형성되는 일련의 과정을 총칭하는 용어이다. 상기 혈관 신생은 내피 세포의 분열 등을 통해 새로운 혈관을 형성하는 것을 포함할 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 혈관 신생은 장중적 혈관신생 (intussusceptive angiogenesis) 및 발아 혈관신생 (sprouting angiogenesis)을 포함할 수 있다.

[270] 본 발명의 탈당화된 LRG1 당단백질, LRG1 당단백질 변이체, 또는 융합단백질은 LPHN2의 직접 결합을 통한 신호전달 경로의 활성화를 통해 혈관 신생을 유도할 수 있다.

[271] 본 발명의 용어, “신경 성장”은 새로운 신경돌기의 생성(neurite outgrouth) 및 축삭돌기의 발아(axonal sprouting)를 포함하는 신경 세포 및 네트워크의 성장 및 확장을 의미한다. 본 발명에서, 신경 성장은 손상된 신경세포의 회복의 맥락에서 “신경 재생”으로 사용될 수 있다.

[272] 본 발명의 용어, “신경 재생”은 손상된 신경세포의 회복을 의미한다.

[273] 본 발명의 탈당화된 LRG1 당단백질, LRG1 당단백질 변이체, 또는 융합단백질은 LPHN2의 직접 결합을 통한 신호전달 경로의 활성화(직접 효과) 및 신경 영양 인자의 발현 향상을 통해 신경 성장을 유도할 수 있다.

[274] 본 발명의 용어, “허혈성 질환”은 신체기관, 조직 또는 부위로의 혈류 공급 감소 상태를 나타내는 질환을 의미하는 것으로, 관련되는 신체 기관 또는 원인에 따라 심근경색, 뇌경색, 허혈성 급성신부전증, 허혈성 급성 간부전증, 당뇨성 족부궤양, 당뇨성 신증, 허혈성 대장염, 심근비대증, 외과수술 부작용에 기인한 허혈성 질환 또는 기관 조직 손상 등이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 외과수술 부작용에 기인한 허혈성 질환은 허혈성 심부전, 허혈성 신부전, 허혈성 간부전 또는 허혈성 뇌졸중 등이 포함되며, 이에 제한되지 않는다. 상기 기관 조직 손상은 허혈 후 재관류를 동반하는 장기 수술 또는 이식, 외상성

절단사지 재접합으로 인한 것을 포함한다. 상기 장기는 신장, 간장, 췌장, 폐 또는 심장 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[275] 본 발명의 용어, "말초 신경계 질환"은 다양한 원인으로 인한 말초신경의 손상 또는 사멸에 의해 발생하는 질환을 의미한다. 본 발명에 있어서, 상기 말초 신경계 질환은 말초신경병증, 당뇨병성 신경병증, 영양성 신경병증, 삼차 신경통, 좌골 신경통, 수근관 증후군, 얼굴 마비, (수술/외상 후) 말초 신경 손상, 중증 근무력증, 길랑-바레 증후군, 신경성 틱 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[276] 본 발명의 용어, "발기부전"은 성생활에 충분한 발기가 되지 않거나 유지되지 않은 상태를 의미하며, 일반적으로 이러한 상태가 3개월 이상 지속되었을 경우 발기부전으로 정의된다. 상기 발기부전은 심리적인 요인에 기인하는 심인성 발기부전, 혈관인성 발기부전, 신경인성 발기부전, 내분비성 발기부전, 대사증후군에 의한 발기부전, 약물부작용에 의한 발기부전 등을 모두 포함하는 광범위적 의미로 해석된다. 본 발명의 조성물은 상기 모든 원인에 의한 발기부전의 예방 및/또는 치료에 사용될 수 있으며, 바람직하게는 혈관인성 발기부전 및/또는 신경인성 발기부전에 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[277] 본 발명의 용어, "퇴행성 신경질환"또는 "신경퇴행성 질환"은 중추신경계, 특히 뇌의 신경 세포의 퇴행성 병태를 나타내는 질환으로 퇴행성 부위의 고유 기능의 소실로 인해 여러가지 증상을 유발하는 질환을 의미한다. 상기 퇴행성 신경질환은 예를 들어, 알츠하이머, 파킨슨 병, 근위축성 측색경화증, 헌팅턴 무도병, 크로이츠펠트 야콥병, 퇴행성 뇌질환 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[278] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"은 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[279] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"는 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[280]

[281] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 약학 조성물일 수 있다.

[282] 상기 약학 조성물은 통상적으로 약학 조성물에 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 추가로 포함할 수 있다.

[283] 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통

사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[284] 본 발명에 따른 약학 조성물은 통상의 방법에 따라 다양한 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 적합한 제형으로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 당의정, 경질 또는 연질의 캡슐제, 용액제, 현탁제 또는 유화액제, 주사제, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[285] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적으로 불활성인 유기 또는 무기 담체를 이용하여 적합한 제형으로 제조할 수 있다. 즉, 제형이 정제, 코팅된 정제, 당의정 및 경질 캡슐제인 경우 락토스, 수크로스, 전분 또는 그 유도체, 탈크, 칼슘 카보네이트, 젤라틴, 스테아르산 또는 그 염을 포함할 수 있다. 또한, 제형이 연질 캡슐제인 경우에는 식물성 오일, 왁스, 지방, 반고체 및 액체의 폴리올을 포함할 수 있다. 또한, 제형이 용액 또는 시럽 형태인 경우, 물, 폴리올, 글리세롤, 및 식물성 오일 등을 포함할 수 있다.

[286] 본 발명에 따른 약학 조성물은 상기의 담체 외에도 보존제, 안정화제, 습윤제, 유화제, 용해제, 감미제, 착색제, 삼투압 조절제, 산화방지제 등을 더 포함할 수 있다.

[287] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 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 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 따른 약학 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.

[288] 본 발명의 약학 조성물은 개체에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 상기 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있다. 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장내 투여 등으로 투여할 수 있다. 경구 투여 시, 단백질 또는 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[289] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여방법은 제형에 따라 용이하게 선택될 수 있으며, 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 투여량은 환자의 나이, 성별, 체중, 병증의 정도, 투여경로에 따라 달라질 수 있다.

[290] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 다른 허혈성 질환, 말초 신경계 질환,

발기부전 또는 퇴행성 신경질환의 치료용 조성물 또는 치료 요법과 병용하여 사용될 수 있다.

[291]

[292] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 LRG1 당단백질, LRG1 당단백질 변이체, 또는 융합 단백질을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 혈관신생, 신경성장 및/또는 신경재생 유도방법을 제공한다.

[293] 본 발명은 또한, 상기 LRG1 당단백질, LRG1 당단백질 변이체, 또는 융합 단백질을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 허혈성 질환, 말초신경질환, 발기부전 및/또는 퇴행성 신경질환의 치료방법을 제공한다.

[294]

[295] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 LRG1 당단백질, LRG1 당단백질 변이체, 또는 융합 단백질의 혈관신생, 신경성장 및/또는 신경재생 유도용도를 제공한다.

[296] 본 발명은 또한, 상기 LRG1 당단백질, LRG1 당단백질 변이체, 또는 융합 단백질의 허혈성 질환, 말초신경질환, 발기부전 및/또는 퇴행성 신경질환의 치료방법을 제공한다.

[297]

[298] 본 발명은 또한, 상기 LRG1 당단백질, LRG1 당단백질 변이체, 또는 융합 단백질의 혈관신생, 신경성장 및/또는 신경재생 유도용 조성물의 제조에 있어서의 용도를 제공한다.

[299] 본 발명은 또한, 상기 LRG1 당단백질, LRG1 당단백질 변이체, 또는 융합 단백질의 허혈성 질환, 말초신경질환, 발기부전 및/또는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 조성물의 제조에 있어서의 용도를 제공한다.

[300]

[301] 실시예

[302] 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.

[303]

[304] 실시예 1: 재료 및 방법

[305] 실시예 1-1: 세포 배양

[306] 인간 제대 정맥 내피 세포(HUVECs; Cat#CC-2519, Lonza) 및 인간 배아 신장 293T 세포(HEK293T; Cat#CRL-3216, ATCC)는 ATCC 지침에 따라 인증되었으며 수령 후 6 개월 이내에 사용하였다.

[307] HUVEC은 젤라틴 (Cat# G1890, Sigma-Aldrich; 0.1% in DDW) 사전 코팅된 플레이트 상의 EGM-2 (Cat# CC-3162, Lonza), 2 mM L-glutamine (Cat# 25030081, Gibco), 100 U/ml penicillin)및 100 μg/ml 스트렙토 마이신 (Cat#15140122, Gibco)으로 보충된 EBM-2 (Cat# CC-3156, Lonza)에서 배양하였다.

[308] HEK293T 세포는 10% 소 태아 혈청 (FBS; Cat#10270106, Gibco) 및 100 μg/ml 항생제-항진균제 (Cat#15240062, Gibco)가 보충된 DMEM(Cat#41965039, Gibco)에서 배양하였다. 세포는 가습된 5% CO2 조건에서 37℃로 유지하였다. 모든 실시예에서 계대 2와 7 사이의 세포를 사용하였으며, 모든 실험은 기관 지침에 따라 수행하였다.

[309] 1차 마우스 해면상 내피 세포 (MCEC)를 준비하고, 보체 M199에서 유지하였다(1-3). 음경 조직을 수확하여 HBSS(Hank's balanced salt solution; Cat#14025092, Gibco)가 들어있는 멸균 바이알로 옮겨 PBS(phosphate-buffered saline)로 두 번 세척하였다. 음경에서 귀두, 요도 및 등 신경 혈관 다발을 제거하고 MCEC 배양을 위해 해면체 조직만을 사용하였다. 모든 실험에서 계대 2와 4 사이의 세포를 사용하였다.

[310] 당뇨병 유도된 혈관병증은 밤새 혈청 결핍 세포로 모방하였으며, 가습된 5% CO2 분위기에서 37℃에서 72 시간 동안 고 글루코스 (30mM 글루코스) 조건에 노출시켰다(Diabetes 54, 2179-2187 (2005).). 정상 글루코스(5mM 글루코스, Cat#G7021, Sigma-Aldrich) 조건을 대조군으로 사용하였다.

[311]

[312] 실시예 1-2: 실시예에서 사용된 동물

[313] 8주령의 수컷 C57BL/6 (한국 오리엔트 바이오) 및 LRG1-Tg 수컷 (Macrogen Inc., 서울, 한국) 마우스를 사용하였다. 모든 실험에서 마우스는 연령을 일치시켰으며, 야생형 한배 새끼(littermate)를 대조군으로 사용하였다. 실험은 인하 대학교 동물 관리 및 사용위원회 (검증 번호: INHA 180523-570)의 승인을 받아 진행하였다. 당뇨병은 앞에서 설명한대로 연속 5일 동안 스트렙토조토신 (STZ; 50mg/kg 체중)의 복강 내 주사에 의해 유도하였다 (The journal of sexual medicine 6, 3289-3304 (2009)). 당뇨병 유도 8주 후, 케타민(ketamine, 100mg/kg)과 자일라진(xylazine, 5mg/kg)의 근육 주사로 마우스를 마취시켰다.

[314]

[315] 실시예 1-3: 재조합 단백질의 발현 및 정제

[316] 재조합 LRG1 단백질의 발현을 위해, 인간 LRG1(잔기 V36-Q347) 유전자를 을 친화성 정제에 사용하기 위한 트롬빈 인식 서열을 코딩하는 변형된 pcDNA3.1 벡터의 BamHI 및 NotI 부위에 클로닝시켰으며, 이어서 인간 IgG의 Fc 도메인을 클로닝시켰다. 재조합 LRG1 단백질은 Freestyle 293-F 세포 (Invitrogen)에서 일시적으로 발현시켰다. 세포를 PEI (polyethylenimine; linear, MW 25000; Polysciences)를 사용하여 DNA:PEI 비율 1:4로, 형질 감염시키고 37℃의 가습된 8% CO2 인큐베이터에서 4일 동안 인큐베이션했다. 그 후, 세포를 원심 분리에 의해 펠렛화하고 Fc-융합 된 LRG1 단백질을 함유하는 상등액을 protein A 수지(Cat#1010025, Amicogen)에 로딩하였다. 0.2M 글리신 버퍼 (pH 2.7)을 사용하여 LRG1-Fc를 용출하고, 1M Tris-HCl 버퍼(pH 9.0)으로 중화 후, 투석을 통해 샘플 버퍼를 PBS로 교환 하였다. 태그가 없는 인간 LRG1의 경우, LRG1-Fc

결합 protein A 수지를 4℃에서 밤새 트롬빈(0.5% [v/v] in 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl)으로 처리하고 LRG1 단백질을 용출했다. 용출된 LRG1은 20mM Tris-HCl (pH 8.0) 및 200mM NaCl로 구성된 버퍼를 사용하여 Superdex 200 증가 10/300 GL 컬럼 (GE Healthcare Life Sciences)에서 크기 배제 크로마토그래피로 정제하였다. LRG1 단백질을 함유하는 분획을 풀링하고 결정화를 위해 7.4 mg/ml로 농축시켰다.

[317] Fc-태그된 재조합 LPHN2 엑토 도메인 변이체의 발현을 위해 잔기 F26-Q95 (Lec 도메인), 잔기 V135-P394 (Olf 도메인), 잔기 F26-P394 (Lec-Olf 도메인) 또는 잔기 F26-R796 (Lec-Olf-GAIN/GPS 도메인)은 친화성 정제에 사용하기 위한 protein A 태그 또는 인간 IgG의 Fc 도메인이 뒤 따르는 트롬빈 인식 서열을 코딩하는 변형된 pcDNA3.1 벡터의 BamHI/NotI 부위로 클로닝하였다. YFP-His-태그된 인간 LRG1 (LRG1-YFP) 및 Fc-태그된 LPHN2 엑토도메인 변이체 (Lec, OlF, Lec-Olf 또는 Lec-Olf-GAIN/GPS)는 다음에 따라 Expi293F 발현 시스템 (Thermo Fisher)을 사용하여 제조업체의 지침에 따라 생산하였다.

[318] 세포를 ExpiFectamine (Cat#A14524, Thermo Fisher)을 사용하여 발현 플라스미드로 형질 감염시키고 37℃의 가습된 8% CO2 배양기에서 2일 동안 배양했다. 배양액을 원심 분리한 후, 상등액을 LRG1-YFP를 위한 Ni-NTA 수지 (Cat#30230, Qiagen) 및 Fc 태그가 부착 된 LPHN2 엑토도메인 변이체를 위한 protein A 수지 (Cat#1010025, Amicogen)에 로딩했다. LRG1-YFP를 20mM Tris-HCl (pH 8.0) 및 200mM NaCl내 의 250mM 이미다졸로 용출하고, 태그가 없는 LPHN2 엑토도메인 변이체를 수지상 트롬빈 분해(0.5% [v/v] in 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl후 4℃에서 밤새 용출시켰다. 용출된 LRG1-YFP 및 LPHN2 엑토도메인 단백질은 20mM Tris-HCl (pH 8.0) 및 200mM NaCl로 구성된 버퍼를 사용하여 Superdex 200 증가 10/300 GL 컬럼 (GE Healthcare Life Sciences)에서 크기 배제 크로마토그래피로 추가로 정제하였다. 단백질의 분자량은 표준 방법을 사용하여 SDS-PAGE 및 Coomassie Brilliant blue R-250 염색(BIO-RAD)으로 평가하였다.

[319]

[320] 실시예 1-4: 관 형성 분석

[321] 관 형성 분석은 종래 공지된 방법에 따라 수행하였다 (The journal of sexual medicine 9, 1760-1772 (2012)). 약 100 μl의 성장 인자 감소된 Matrigel (Cat#354230, Becton Dickinson)을 4℃에서 48-웰 조직 배양 플레이트에 분배했습니다. 37℃에서 30분 이상 겔화 후, HUVEC 또는 MCEC를 300μl의 M199 배지에서 4x104 세포/웰로 겔에 접종하였다. 세포를 즉시 1μg/ml의 LRG1-Fc, LRG1, 탈당화된 LRG1 (DG-LRG1), LRG1 변이체 (N269D, N325D, N269D/N325D), TGF-β1 (5 ng/ml), LRG1-Fc + TGF-β1 (5ng/ml), LRG1-Fc + 항-TGF-β1 항체 (10μg/ml) 및/또는 LRG1-Fc + TGF-β1 (5ng/ml) + 항-TGF-β1 항체 (10μg/ml)로 처리하였다. 관 형성을 위상차 현미경으로 12~16 시간 동안 모니터링하고 Image

J 소프트웨어를 사용하여 블라인드 방식으로 4 개의 개별 실험에서 마스터 접합의 수를 계산하여 정량화했다. (National Institutes of Health [NIH] 1.34, http://rsbweb.nih.gov/ij/).

[322]

[323] 실시예 1-5: 세포 이동 분석

[324] 트랜스웰 이동(Transwell migration) 분석의 경우, 200μl의 무 혈청 M199에 들어있는 1x10^{5}개의 HUVEC를 12 웰 플레이트(Cat#353182, Corning)의 상부 삽입물(8μm 기공)에 접종하고 20% FBS로 보충된 600μl의 M199를 하부 챔버에 첨가하였다. 1μg/ml Fc (대조군), 1μg/ml LRG1-Fc, 5ng/ml TGF-β1 (Cat#240-B, R & D Systems), 10μg/ml 항-TGF-β1 항체(Cat#MAB1835, R & D Systems), 5ng/ml TGF-β1 + 10 μg/ml 항-TGF-β1 항체 (중화를 위해 밤새 미리 혼합), 및 1μg/ml DG-LRG1을 각각 HUVEC에 처리하였다. 37℃에서 18시간 동안 배양한 후, 삽입물 윗면의 이동하지 않은 세포를 면봉으로 제거했다. 이동된 세포를 고정하고 크리스탈 바이올렛 (Cat#V5265, Sigma)으로 염색한 뒤, 10 % 아세트산으로 용출시켰다. 4 개의 무작위 필드에서 이동 또는 침투 세포를 계수하였다. 신호를 시각화 하였으며, 공초점 형광 현미경(K1-Fluo; Nanoscope Systems, Inc.)에서 디지털 이미지를 획득하였다.

[325]

[326] 실시예 1-6: TriCEPS 기반 리간드 수용체 포획(LRC-TriCEPS)

[327] TriCEPS 기반 리간드 수용체 포획(LRC-TriCEPS; cat# P05203, Dualsystems Biotech)을 사용하여 제조사의 지침에 따라 LRG1에 대한 수용체 후보를 동정하였다. 300μg의 재조합 LRG1 단백질 또는 트랜스페린(대조군 리간드)을 150μl의 25mM HEPES 버퍼 (pH 8.2)에 용해시킨 후, 1.5μl의 TriCEPS 시약을 각 샘플에 첨가하고 일정하게 교반하며 22℃에서 90 분 동안 배양했다. PBS (pH 6.5)에서 1.5mM NaIO4와 함께 HEK293T 세포(1.2x10^8)를 4℃의 암실에서 15 분 동안 부드럽게 회전하여 인큐베이션함으로써 약하게 산화시켰다. 이어서 세포를 300xg에서 5분 동안 2회 세척하고 1% FBS(pH 6.5)를 포함하는 18ml PBS를 함유하는 두 개의 별도 튜브에 재현탁 시킨 뒤, TriCEPS-커플링된 트랜스페린 또는 TriCEPS-커플링된 LRG1 150μl을 각 튜브에 첨가했다 지속적으로 부드럽게 교반하면서 4℃에서 90 분 동안 배양하였다. 커플링 반응이 완료된 후, 세포를 수집하고 세포 펠렛을 LC-MS/MS 분석을 위해 Dualsystems로 보냈다.

[328]

[329] 실시예 1-7: 렌티 바이러스를 이용한 shRNA 전달(녹다운)

[330] 케타민(ketamine, 100 mg/kg) 및 자일라진(xylazine, 5 mg/kg)으로 근육내 주사를 통해 동물을 마취한 뒤, 스크램블된 대조군 shRNA(shCon) 렌티바이러스 입자(Cat# SC-108080, Santa Cruz) 또는 LPHN2 표적 shRNA(shLPHN2; Cat# V3SM7603-234963095, Dharmacon)를 함유하는 SMART 벡터 마우스

렌티바이러스를 마우스당 1 TU(Transforming units)의 용량으로 근육 내 주사를 통해 투여하였다. In vitro (HUVEC, HEK293T 및 MCECs) 및 ex vivo (MPGs 및 DEGs) 세포 배양 실험의 경우, shCon 또는 shLPHN2 렌티바이러스 입자를 5×10^4 TU/ml의 농도로 배양 배지에 첨가하였다. 마우스 LPHN2를 표적으로하는 shRNA 및 인간 LPHN2를 표적으로 하는 shRNA 서열은 아래 표 1과 같으며, 실시예의 실험은 렌티 바이러스 감염 후 3일차에 수행되었다.

[331]

[332] [표1]

구분	서열(5' ->3')	서열번호
인간 LPHN2 표적 shRNA	ACGGCTTATGGGTCATTTA	3
마우스 LPHN2 표적 shRNA	TCAACTGCTAGGTCGATAT	4

[333]

[334] 실시예 1-8: 세포 표면 결합 분석

[335] HEK293T 세포 및 HUVEC를 표준 성장 배지의 8-well Lab-Tek 챔버 슬라이드 상에 플레이팅하였다. 37가습된 5% CO2 조건에서 1시간동안 LRG1-YFP 또는 YFP와 함께 배양하였다. 그 뒤, PBS로 두번 세척하고 15분동안 PBS중 4%의 포름알데히드로 고정시켰다. 웰을 PBS로 2회 세척한 뒤 슬라이드를 ProLonged Antifade Kit mounting solution (Cat# P10144, Molecular Probes)으로 마운팅하였다. 형광표지된 LRG1의 세포 흡수는 공 초점 레이저 스캐닝 현미경((Zeiss LSM 780)으로 관찰하였다.

[336]

[337] 실시예 1-9: 면역볼롯 및 면역침전법

[338] 세포 및 조직을 프로테아제 억제제 (Cat# P3100-001, GenDEPOT) 및 포스파타아제 억제제 (Cat# P3200-001, GenDEPOT)로 보충된 RIPA 버퍼(Sigma-Aldrich)에 용해시켰다. 각 전체 세포 또는 조직 용 해물로부터 동일한 양의 단백질(레인 당 30μg)을 SDS-PAGE에 의해 8% 내지 12% 겔에서 분리하고 PVDF(polyvinylidene fluoride) 막으로 옮겼다. 실온에서 1 시간 동안 5% 무 지방 건조 우유(non-fat dried milk)로 블로킹한 후, 텍스트에 표시된대로 막을 4℃에서 밤새 다음의 1차 항체와 함께 배양했다:

[339] anti-LPHN2 (Cat# ab209548, Abcam; 1:500), anti-LRG1 (Cat# HPA001888, Sigma; 1:500), anti-TGFβ1 (Cat# sc-146, Santa Cruz Biotechnology; 1:500), anti-phospho-eNOS (Cat# 9571, Cell Signaling; 1:500), anti-eNOS (Cat# 610297, Becton Dickinson; 1:1000), anti-phospho-Smad1/5 (Cat# 9516, Cell Signaling; 1:500), anti-phospho-Smad2/3 (Cat# 8828, Cell Signaling; 1:500), anti-BDNF (Cat# sc-546, Santa Cruz; 1:500), anti-NGF (Cat# sc-548, Santa Cruz; 1:500), anti-NT-3 (Cat# sc-547, Santa Cruz; 1:500), anti-phospho-Akt (Cat# 9271, Cell Signaling; 1:500), anti-Akt (Cat# 9272, Cell Signaling; 1:500), anti-phospho-PI3 kinase p85 (Cat# 4282,

Cell Signaling; 1:500), anti-PI3 kinase p85 (Cat# 4292, Cell Signaling; 1:500), anti-phosphotyrosine clone 4G10 (Cat# 05-321, Sigma; 1:500), anti-VEGF (Cat# sc-152, Santa Cruz; 1:100), and anti-ANG1 (Cat# sc-74528, Santa Cruz; 1:100). 면역침전을 위해 1,000μg의 용 해물을 지시된 항체(1-2 μg)와 함께 4℃에서 3-4 시간 동안 배양하고, Protein A/G PLUS-Agarose (Cat# SC-2003, Santa Cruz Biotechnology)와 함께 밤새 배양했다. 면역침전물을 RIPA 버퍼로 5회 세척한 뒤, SDS-PAGE로 분리하고 지시된 항체로 면역블롯팅하였다. CM을 1500rpm에서 5분 동안 원심분리하여 세포 파편을 제거하고 1차 수확한 뒤, 트리클로로 아세트산(TCA)과 아세톤 혼합물 (10% TCA 및 10mM 아세톤 중 DTT(dithioTeitol))로 -20℃에서 밤새 CM 샘플을 침전시켜 컨디셔닝된 배지 (CM)의 TGF-β1을 검출했다 (Brain Res 1265, 158-170 (2009)). 침전된 단백질을 아세톤 중 20 nM DTT로 2회 세척하고 프로테아제 억제제 (Cat# P3100-001, GenDEPOT) 및 포스파타아제 억제제 (Cat# P3200-001, GenDEPOT)로 보충된 RIPA 버퍼(Sigma-Aldrich)에 용해시켰다. SDS-PAGE에 의해 각 용해물에서 동일한 양의 단백질(레인 당 30μg)을 분리하고 anti-TGF-β1 (Cat#sc-146, Santa Cruz Biotechnology; 1:500)으로 면역블롯팅하였다. 이미지 J 1.34를 사용하여 웨스턴 블롯 밴드의 밀도 측정 분석을 수행했다.

[340]

[341] 실시예 1-10: 면역 침전물의 LC-MS/MS 분석

[342] HUVEC는 6 시간 동안 혈청을 결핍시켰으며, 그 후 LRG1-Fc (1μg/ml)로 0, 10, 30 및 60 분 동안 처리하였다. RIPA 버퍼(Cat#89900, Sigma)로 용해하고, 총 세포 용해물을 LPHN2 항체 (Cat#sc-514197, Santa Cruz; 1:50)로 면역침전시키고 SDS-PAGE 및 Coomassie Blue 염색으로 분석했다. 표시된 밴드(도 2B, 빨간색 프레임)를 SDS-PAGE 젤에서 잘라내고, Nano LC-MS/MS 분석은 Easy n-LC (Thermo Fisher, San Jose, CA, USA) 및 nano-electrospray source가 장착된 LTQ Orbitrap XL 질량 분석기(Thermo Fisher)를 사용하여 수행되었습니다 (7) (대한민국 서울 연세 프로테옴 연구소). 샘플은 C18 나노 보어 컬럼 (150mm × 0.1mm, 3μm 기공 크기, Agilent)에서 분리시켰다.

[343] LC 분리를위한 이동상 A(Mobile phase A)는 탈 이온수 중 0.1% 포름산(0.1% formic acid) + 3 % 아세토니트릴(3% acetonitrile)이었으며, 이동상 B(Mobile phase B)는 아세토니트릴 중 0.1% 포름산(0.1% formic acid in acetonitrile)이었다. 크로마토그래피 구배는 23 분 안에 0% B에서 32% B로, 3 분 안에 32% B에서 60% B로, 3 분에 95% B, 6분에 0% B로 선형 증가를 달성하도록 설계하였다. 유속은 1500nl/min으로 유지하였다. 전체 질량 스캔 (350-1800 m/z)에 이은 10 MS/MS 스캔을 사용한 데이터 의존적 수집으로 질량 스펙트럼을 획득하였다. MS1 전체 스캔의 경우 orbitrap 해상도는 15,000이고 AGC는 2×10^5였다. LTQ에서 MS/MS의 경우 AGC는 1×10^4였다. Mascot 알고리즘 (Matrix Science, USA)을 사용하여 단백질 서열 데이터베이스에 존재하는 펩티드 서열을 확인하였다.

데이터베이스 검색 기준은 다음과 같다:

[344] taxonomy, Homo sapiens, Mus musculus; fixed modification, carbamidomethylated at cysteine residues; variable modification, oxidized at methionine residues; maximum allowed missed cleavages, 2; MS tolerance, 10 ppm; MS/MS tolerance, 0.8 Da.

[345] 트립신 소화된 펩티드만 고려하였으며, 펩타이드는 P <0.05의 유의성 임계값으로 필터링하였다.

[346]

[347] 실시예 1-11: 대동맥 고리 분석(Aortic ring assay)

[348] 8주령의 C57BL/6 마우스에서 수확한 대동맥을 8 웰 Nunc Lab-Tek 챔버 슬라이드 시스템 (Sigma-Aldrich)에 배치하고 50μl Matrigel의 오버레이로 자리를 고정시켰다. 대동맥 고리는 정상 글루코스(5mM) 또는 고 글루코스(30mM) 배지에서, RG1-Fc (1 μg/ml), shCon 또는 shLPHN2 (5×104 TU/ml culture medium)와 함께 또는 없이, anti-TGF-β1 항체(10 μg/ml)와 함께 또는 없이 5일간 complement M199에서 배양되었다. 대동맥 절편과 발아 세포를 4% 파라포름알데히드에 30분 이상 고정하고, PECAM-1 (Cat# MAB1398Z, Millipore; 1:50)의 면역형광 검출에 사용하였다(J Vis Exp, (2009)).

[349]

[350] 실시예 1-12: Ex vivo 내피 세포 발아 분석

[351] 마우스 내체 해면체 조직(corpus cavernosum tissue)을 2개 또는 3개의 조각으로 절단한 뒤, Matrigel 스톡 용액으로 코팅된 6-웰 세포 배양 플레이트에 위치시켰다. Matrigel은 37℃에서 15 분 동안 배양하고 1μg/ml LRG1 및 shRNA (1μg/ml의 shCon 또는 LRG1 포함 또는 제외) 3ml의 정상 글루코스 (5mM) 또는 고 글루코스 (30mM) 컨디셔닝 된 보체 M199에서 중합시켰다. shLPHN2; 5 × 104 TU/ml 배양 배지), 항 -TGF-β1 항체 (10 μg/ml)를 세포 배양 플레이트에 첨가하였다. 이어서 세포를 2 일마다 조절된 complement M199의 교체와 함께 37℃의 가습된 5% CO2 환경에서 배양하였다. 7 일 후 위상차 현미경으로 영상을 얻었고, 발아 세포 밀도는 Image J 1.34를 사용하여 분석했다.

[352]

[353] 실시예 1-13: 발기 기능 측정

[354] 발기 기능은 종래 잘 알려진 방법에 의해 측정되었다(The journal of sexual medicine 6, 3289-3304 (2009)). 해면 신경 주위에 양극성 백금 와이어 전극을 배치하였다. 자극 매개 변수는 1 또는 5V, 12Hz의 주파수, 1ms의 펄스 폭 및 1 분간의 지속시간이었다. 최대 해면 내압 (ICP)은 자극 동안 기록하였다. 총 ICP는 해면 신경 자극 시작부터 자극 종료 후 20 초까지의 곡선 아래 면적으로 결정하였다. 각 전기 자극은 최소 10 분 간격으로 반복하였다. 전신 혈압(Systemic blood pressure)은 이전 연구에서 검증된 비 침습적 꼬리 커프 시스템 (non-invasive tail-cuff system, Visitech Systems)을 사용하여 측정하였다(Hypertension 25, 1111-1115 (1995)). 전기 자극 중 진동이 혈압 평가에

영향을 미칠 수 있기 때문에 ICP를 측정하기 전에 전신 혈압을 측정했다. 전신 혈압의 변화를 반영하기 위해 평균 수축기 혈압 (MSBP)에 대한 최대 ICP 및 총 ICP의 비율을 계산하였다. 대조군 및 STZ- 유도 당뇨병 마우스의 생리 학적 및 대사 적 매개 변수는 표 2와 같다.

[355]

[356] [표2]

	2 weeks after treatment of indicated protein together with shCon lentivirus (n=6).				
	Fc	LRG1-Fc	STZ-induced diabetic mice		
			Fc	LRG1-Fc	LRG1-Fc+Anti-TGFβ1
Body weight (g)	35.7±0.9	36.5±0.6	25.4±0.5*	24.9±0.8*	24.2±0.8*
Fasting glucose (mg/dl)	108.0±2.3	103.4±1.7	392.8±25.9*	399.4±29.5*	412.8±21.9*
Postprandial glucose (mg/dl)	172.8±4.9	164.6±4.9	519.0±29.8*	543.2±20.3*	559.2±19.7*
MSBP (mm Hg)	102.4±1.4	103.8±2.2	102.6±1.1	104.8±1.9	107.4±3.3
	2 weeks after treatment of indicated protein together with shLPHN2 lentivirus (n=6).				
	Fc	LRG1-Fc	STZ-induced diabetic mice		
			Fc	LRG1-Fc	LRG1-Fc+Anti-TGFβ1
Body weight (g)	34.7±0.5	36.7±0.5	22.7±0.4*	24.9±0.7*	22.2±0.9*
Fasting glucose (mg/dl)	103.8±1.9	103.4±2.2	347.4±18.3*	353.2±34.4*	400.2±28.7*
Postprandial glucose (mg/dl)	165.8±4.1	162.0±14.3	567.6±21.6*	587.4±8*	580±14.4*
MSBP (mm Hg)	98.8±3	105.0±2.5	102.8±1.9	104.2±2.4	106.8±3.0
	8 weeks after induction of diabetes with STZ in LRG1-Tg mice (n=5).				
	WT	LRG1-Tg	STZ-induced diabetic mice		
			LRG1-Tg+shCON	LRG1-Tg+shLPHN2	
Body weight (g)	36.4±0.8	33.1±0.3	23.9±0.7*	22.7±0.7*	
Fasting glucose (mg/dl)	103.2±3.1	114.0±2.8	436.0±15.0*	402±33.1*	
Postprandial glucose (mg/dl)	153.4±5.2	199.6±11.9	575.8±11.6*	566.6±18.5*	
MSBP (mm Hg)	105.0±1.6	115.0±1.6	111.0±3.3	116.0±2.4	
Values are the means ± SEM for n = 5 or 6 animals per group. *P < 0.05 vs. Fc or WT group. STZ, streptozotocin; MSBP, mean systolic blood pressure.					

[357]

[358] 실시예 1-14: MPG 및 DRG 외식편 배양 및 발아 분석

[359] 마우스 주 골반 신경절(MPG) 및 등측 뿌리 신경절(DRG) 조직을 종래 보고된 방법으로 해부하고 유지시켰다(BJU international 92, 631-635 (2003), Andrology 5, 327-335 (2017)). 전립선의 배측 부분에 밀착된 MPG 조직과 L3-L5유래의 DRG 조직을 현미경을 사용하여 수컷 마우스로부터 분리하고, HBSS 함유 멸균 바이알에 옮겨 담아 PBS로 두 번 헹구고 세척하였다. MPG 및 DRG 조직을 작은 조각으로 자르고 poly-D-lysine hydrobromide(Sigma-Aldrich)로 코팅된 8-웰 Nunc Lab-Tek 챔버 슬라이드 시스템에 위치시켰다. MPG 및 DRG 조직을 Matrigel로

완전히 덮고 37℃의 5% CO_2 환경에서 10-15 분 동안 배양 플레이트를 배양하였다. 그 뒤, 2% 무 혈청 B-27 (Cat#17504-044, Gibco) 및 0.5nM GlutaMAX-I (Cat#35-050-061, Gibco)가 보충 된 1ml의 완전 Neurobasal 배지(Gibco)를 첨가하고, 정상 글루코스(5mM) 또는 고 글루코스(30mM) 배지에서, LRG1-Fc (1 μg/ml) 및 shRNA(shCon 또는 shLPHN2 (5×10^4 TU/ml culture medium))와 함께 또는 없이, anti-TGF-β1 항체(10 μg/ml)와 함께 또는 없이 37℃의 가습된 5% CO_2 환경에서 배양하였다. 7 일 동안 배양 한 후, 신경돌기 성장 조각(segment)을 4% 파라 포름알데히드에 30 분 이상 고정하고 항-βIII 튜불린 항체(Cat#ab107216, Abcam; 1:100)로 면역염색했다.

[360]

[361] 실시예 1-15: 1차 피질 뉴런 배양

[362] 1 차 마우스 피질 뉴런은 timed-pregnant C57BL/6N 마우스 (오리엔트 바이오, 한국)에서 얻은 E15 야생형 배아에서 유래한 것이다. 두 성별의 배아에서 피질 조직을 절개하고 얼음으로 냉각시킨 HBSS(Hanks' balanced salt solution)으로 세 번 세척했다. 피질 조각을 0.125% 트립신/EDTA (Cat#25200056, Gibco)로 37℃에서 5분 동안 주기적으로 흔들면서 소화시켰다. 5% FBS (Cat#10270106, Gibco)를 첨가하여 트립신/EDTA를 중화시킨 후, 10회 부드럽게 피펫팅하여 피질 뉴런을 해리시켰다. 생성된 세포 현탁액을 70-μm 메쉬 크기 (Cat#352350, Becton Dickinson)의 세포 스트레이너를 통해 여과하고 800xg에서 3분 동안 원심분리했다. 2% 무 혈청 B-27 (Cat#17504-044, Gibco) 및 0.5nM GlutaMAX-I (Cat#35-050-061, Gibco)로 보충된 완전한 Neurobasal 배지 (Cat#21103049, Gibco)에 재현탁하고, poly-D-lysine hydrobromide(0.1mg/ml; Cat#P0899, Sigma-Aldrich) 및 라미닌 (10ng/ml; Cat#23017015, Gibco)으로 미리 코팅된 커버슬립에서 피질 뉴런을 배양하였다.

[363] 면역형광 분석을 위해 24 웰 플레이트에 웰당 $1x10^5$개의 세포를 도말하고 5일 동안 다음의 프로세스와 같이 처리했다:

[364] - 1차 도말 후, 1일차에 세포를 렌티바이러스로 감염시킴

[365] - 1차 도말 후, 2 및 4일차에 항체, 단백질 또는 억제제로 2회 처리함

[366] - 발아된 축삭돌기를 4% 파라포름알데히드에 30분 이상 고정한 뒤, 0.3% 트리톤 X-100과 함께 5분간 배양하여 세포와 축삭을 투과시킴

[367] - βIII tubulin 항체 (Cat# ab107216, Abcam; 1:100)를 사용하여 면역염색을 수행함

[368] 정량화를 위해 Image J를 사용하여 필드 당 200 개 세포를 정량화하였다. 웨스턴 블롯 분석을 위해 세포를 6 웰 플레이트에 웰당 $2x10^6$개 세포를 분배하고 렌티바이러스 또는 항체, 단백질 및/또는 억제제를 처리하였다.

[369]

[370] 실시예 1-16: BrdU 라벨링

[371] 0일차 및 3일차에 Fc 또는 LRG1-Fc(5μg/20μl)으로 반복적으로 해면체 내 주사

2주 후의 각 그룹의 마우스(대조군 및 STZ 유도된 당뇨병 마우스)에 BrdU (50mg/kg 체중; Cat# 19-160, Sigma-Aldrich)를 연속 3일동안 매일 1회 복강 내 주사하고, BrdU 주사 후 1일 뒤에 희생시켰다. 추가 항원 검색 단계는 5'-bromo-2'-deoxyuridine 항체 (BrdU; Cat. MCA2060, AbD Serotec; 1:50)를 사용하여 수행하였다. BrdU 양성 내피 세포의 수는 4개의 다른 영역에서 계수하였으며, 값은 고출력 필드(high-power field) 당으로 표현되었다.

[372]

[373] 실시예 1-17: TUNEL 분석

[374] TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling) 분석을 사용하여, 0 및 3일에 Fc 또는 LRG1-Fc(5μg/20μl)으로 반복적으로 해면체 내 주사 2주 후의 각 그룹의 마우스(대조군 및 STZ 유도된 당뇨병 마우스)로부터의 해면조직의 세포 사멸(Apoptosis)을 평가하였다. ApopTag Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit (Cat# S7160, Chemicon)는 제조사의 지침에 따라 사용하였다. 공초점 형광 현미경을 사용하여 디지털 이미지와 사멸된 세포의 수를 결정했다. In vitro 연구를 위해 TUNEL 양성 세포의 수와 비율을 평가하였다.

[375]

[376] 실시예 1-18: 면역형광염색된 조직의 조직학적 검사

[377] 음경 조직을 4% 파라포름알데히드에 4℃에서 24시간 고정한 뒤, 냉동하고 12μm 크기의 절편으로 잘랐다.

[378] 배양 된 MPG 조직, DRG 조직 및 대동맥 고리를 4 % 파라 포름 알데히드에 상온에서 10 분 동안 고정한 후 블로킹 용액과 함께 실온에서 2 시간 동안 배양하였다. 그 후, 다음의 항체와 함께 4℃에서 샘플을 밤새 배양하였다:

[379] anti-LPHN2 (Cat# ab138498, Abcam; 1:100),

[380] anti-PECAM-1 (Cat# MAB1398Z, Millipore; 1:50),

[381] anti-NG2 (Cat# AB5320, Millipore; 1:50), 및

[382] anti-βIII tubulin (Cat# ab107216, Abcam; 1:100)

[383] PBS로 여러 번 세척 한 후, 샘플을 TRITC(tetramethylrhodamine)-접합 당나귀 항-닭 2차 항체 (Cat# 703-025-155, Jackson ImmunoResearch Laboratories; 1:200), FITC(fluorescein isothiocyanate)-접합 염소항 아르메니아 헴스터 2차 항체 (Cat# 127-095-160, Jackson ImmunoResearch Laboratories; 1:200), 또는 DyLight 550-접합 당나귀 항 토끼 2차 항체 (Cat# ab98489, Abcam; 1:200)와 함께 실온에서 2 시간 동안 배양하였다.신호를 시각화하고 공 초점 형광 현미경 (K1-Fluo; Nanoscope Systems, Inc.)을 사용하여 디지털 이미지를 얻었다. Immunofluorescence 염색 강도는 Image J 1.34를 사용하여 정량화하였다.

[384]

[385] 실시예 1-19: Solid-phase binding assay

[386] 고체상 결합 분석은 종래 알려진 방법으로 수행하였다 (Mol Cancer Ther 14,

470-479 (2015)). LPHN2 세포 외 도메인 변이체(Lec, Olf, GAIN/GPS domain; 100nM)를 MaxiSorp 96-웰 플레이트 (Nunc)에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 웰을 PBS로 2회 세척한 다음 1% BSA(bovine serum albumen)과 함께 2 시간 동안 배양하였다. 블로킹 후, 다양한 양 (0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 또는 10μM)의 천연 LRG1 또는 DG-LRG1을 표시된 LPHN2 세포 외 도메인 변이체로 코팅된 96 웰 플레이트에 첨가하였다. 항-LRG1 항체 (Cat# sc517443, Santa Cruz) 및 peroxidase-접합 된 항-마우스 2 차 항체 (Cat# 62-6520, Thermo Fisher Scientific)를 사용한 ELISA으로 코팅된 단백질에 결합된 LRG1을 검출하였다.

[387]

[388] 실시예 1-20: HUVECs 및 HEK293T 세포에 대한 LRG1의 결합 친화도

[389] 정상(parental) 및 LPHN2 녹다운 HUVEC 및 HEK293T세포에 대한 LRG1의 결합 친화도는 $1.0x10^6$ 세포/200μl에 1μM의 Alexa 647-접합 LRG1 또는 Alex647 접합 DG-LRG1을 사용하여 측정하였다. PBS로 세척한 뒤, FACS(fluorescence-activated cell sorting)로 형광신호를 모니터링하여 세포 표면에 결합된 LRG1 또는 DG-LRG1을 검출하고, FlowJo 10 소프트웨어(FlowJo, LLC)를 사용하여 분석하였다.

[390]

[391] 실시예 1-21: 결정화 및 구조 분석

[392] 결정은 1μl의 LRG1 단백질 (7.4mg/ml)과 1μl의 결정화 버퍼(200mM 황산 리튬, 100mM 아세트산 나트륨 pH4.5, 48% PEG400[v/v])을 혼합한 후, 행잉-드롭 증기 확산법(hanging-drop vapor diffusion method)을 사용하여 291K에서 성장시켰다(BIODESIGN 8, 60-63 (2020)). 100K에서 데이터 수집을 위해, 결정을 동결 방지 버퍼(200mM 황산 리튬, 100mM 아세트산 나트륨 pH4.5, 48% PEG400[v/v], 30% 글리세롤 [v/v])에 담근 후, 액체 질소에서 급속-냉동(flash frozen)하였다.

[393] 회절 데이터는 포항 가속기 연구소의 7A 빔 라인에서 수집되었으며 HKL2000 프로그램을 사용하여 가공되었다(Methods Enzymol 276, 307-326 (1997)). LRG1 결정은 공간 그룹 P6322에 속하며 다음과 같은 단위 셀 치수를 갖는다:

[394] a=143.0Å; b=143.0Å; c=113.7Å; α=90 °; β=90 °; 및 γ=120 °.

[395] 초기 단계는 PHASER를 사용한 분자 대체에 의해 계산하였으며(J Appl Crystallogr 40, 658-674 (2007)), 구조 결정을 위한 탐색 프로브로 NGL3 (Protein Data Bank 코드: 3ZYN)의 구조를 사용했습니다. 원자 모델은 프로그램 COOT(Acta Crystallogr D 60, 2126-2132 (2004))를 사용하여 여러 라운드의 모델 구축을 반복하고 PHENIX(Acta Crystallogr D 58, 1948-1954 (2002)) 프로그램으로 보완하여 구축되었다. 최종 모델은 PHENIX의 Molprobity를 사용하여 검증되었으며, Rwork=18.58% / Rfree=21.94% 이다. LGR1 구조의 Ramachandran 플롯 분석은 잔기의 92.51%와 0.00 %가 각각 선호 영역(favored regions)과 비선호

영역(outlier regions)에 있음을 보여주었습니다. 구조 인자와 좌표 파일은 Protein Data Bank에 보관하였다(accession codes: 7D67).

[396]

[397] 실시예 1-22: Cignal Finder GPCR 신호 10-경로 리포터 어레이(Cignal Finder GPCR signaling 10-pathway reporter array) 및 포스포 어레이(phospho array)

[398] Cignal Finder GPCR 신호 10-경로 리포터 어레이(Cignal Finder GPCR signaling 10-pathway reporter array) 분석의 경우, 5% FBS 및 0.1mM 비 필수 아미노산으로 보충된 80 μl의 Opti-MEM에 희석된 HUVEC ($5x10^3$ 세포/웰)을 사전-배양 형질 감염 혼합물과 혼합하여 형질 감염시킨 뒤, 37℃의 5% CO_2 환경에서 24 시간 동안 배양했다. 사전-배양 형질 감염 혼합물의 경우, 0.5μl의 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 및 리포터 DNA 구조물(GPCR signaling 10-Pathway용 Cignal Finder Reporter Array; CCA-109L-2, Qiagen)을 실온에서 30분간 배양하였다. 4시간 동안의 혈청 고갈 후, 리포터 DNA로 형질 감염된 HUVEC를 1μg/ml의 LRG1 또는 DG-LRG1로 6시간 동안 처리했다. 그 뒤, 제조사의 지침에 따라 Cignal 10-Pathway Reporter Array 키트를 사용하여 발광 신호를 정량화하여 세포 내 10 개의 신호 전달 경로 리포터를 분석했다. 발현 값은 실제 세포 반응(genuine cellular responses, 반딧불 발광 신호)과 비특이적 반응(Renilla luminescence signal)을 구별한 샘플 비율 값을 설정하여 정규화하고 상대 발광 신호의 폴드-변화(fold-change)로 플롯팅하였다.

[399] 포스포 어레이(phospho array)의 경우, HUVEC를 8시간 동안 혈청 고갈 후, 항-TGFβ1 항체와 1 시간 동안 배양하고 1μg/ml DG-LRG1로 30분 동안 HUVEC를 자극하였다. HUVEC의 전체 세포 용해물을 제조하고, 제조사의 지침에 따라 항체 어레이 분석 키트 (Cat# KAS02, Fullmoon Biosystems, Sunnyvale, CA, USA)를 이용한 Phospho Explorer 항체 분석에 50μg의 단백질을 함유하는 용해물의 앨리퀏을 사용하였다. Phospho Explorer 항체 어레이 (Full Moon Biosystems, Inc.)는 1318개의 항체로 구성되며, 각 항체는 여러 양성 및 음성 대조군과 함께 코팅된 유리 현미경 슬라이드에 프린트된 두 개의 복제물로 존재합니다. E-Biogen (Ebiogen Inc., Seoul, Korea)의 맞춤형 서비스로 Phospho Explorer 항체 어레이 실험 및 분석을 수행하였다.

[400]

[401] 실시예 1-23: 네트워크 분석

[402] 먼저, DG-LRG1 처리에 의해 인산화 수준이 25% 이상 증가한 단백질을 확인했다. 그 뒤, BioGRID (Nucleic Acids Res 34, D535-539 (2006)), HuRI (Nature 580, 402-408 (2020)), IntAct (Nucleic Acids Res 32, D452-455 (2004)), HitPredict (Nucleic Acids Res 39, D744-749 (2011)), IID (Nucleic Acids Res 47, D581-D589 (2019)), MINT (Nucleic Acids Res 35, D572-574 (2007)), DIP (Nucleic Acids Res 30, 303-305 (2002)), HPRD (Nucleic Acids Res 37, D767-772 (2009)), HTRIdb (BMC Genomics 13, 405 (2012)), 및 STRING (Nucleic Acids Res 43, D447-452 (2015))을

포함한 10 개의 상호작용체(interactome) 데이터베이스에서 인산화된 단백질에 대한 단백질-단백질 상호 작용 (PPI)을 얻었다. 획득한 PPI를 사용하여 확인된 인산화 단백질 간의 상호 작용을 설명하는 네트워크 모델을 구축했습니다. DG-LRG1 관련 신호 전달 경로의 활성화를 이해하는 데 도움이 될 수 있는 많은 단백질을 네트워크 모델에 추가하였다. 네트워크 모델에서 우리는 KEGG 경로 데이터베이스에서 얻은 지역화 및 활성화/억제 정보를 기반으로 인산화된 단백질을 배열하였다 (Nucleic Acids Res 28, 27-30 (2000)).

[403]

[404] 실시예 1-24: 통계 분석

[405] 특별한 언급이 없는한 데이터는 최소 세번의 독립적 실험에서 얻은 값의 평균±SEM 이다. Prism 8 소프트웨어(Graph Pad Software)를 사용하여 두 그룹간의 유의미한 차이를 결정하는데 Student's t-test를 사용하였다. P-values < 0.05 는 통계학적으로 유의한 값으로 간주되었다. 각각의 P-values 는 도면에서 별표로 표시하였다(*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001).

[406]

[407] 실시예 2: LRG1의 TGF-β 비의존적 신규 수용체로서, LPHN2의 확인

[408] 종래 LRG1의 TGF-β 및 이의 보조 수용체인 엔도글린(ENG)을 기반으로 하는 혈관 및 신경 재생 효과가 알려져 있었으나, LRG1과 ENG의 약한 결합 친화성(~2.9 μM)은 TGF-β 기반 메커니즘만으로 LRG1의 혈관 및 신경 재생 효과를 충분히 설명하기 어렵다. 따라서, 본 발명자들은 TGF-β/ENG 기반의 경로 외에, LRG1의 또 다른 혈관 및 신경 형성 경로의 존재할 것이라 예상하였다.

[409] TGF-β1 비의존적 LRG1의 새로운 혈관신생 경로를 확인하기 위해, 프로테오믹스(proteomics)기반의 접근법을 사용하였다. 인간 세포주 (HUVEC 및 HEK293T 세포)에 대한 LRG1의 세포 표면 결합을 확인하였으며, 이는 두 세포주에서 LRG1에 대한 알려지지 않은 세포 표면 수용체가 존재함을 의미한다 (도 2C), 새로운 LRG1 세포 수용체를 동정하기 위해, 대규모 배양이 가능한 살아있는 HEK293T 세포에서 리간드-기반 수용체 포획법(ligand-based receptor capture (LRC))을 수행하였다. 이를 위해, 각각 리간드 접합 및 수용체 포획 및 정제를 위한 3개의 모이어티를 갖는 글리코실화된 표적 수용체의 동정이 가능한 화학 단백체 시약(chemoproteomic reagent)인 TriCEPS를 사용했다 (Nat Protoc 8, 1321-1336 (2013)).

[410] 구체적으로, sodium metaperiodate로 산화된 HEK293T 세포를 TriCEPS 커플링된 LRG1과 함께 배양한 후, LC-MS/MS(liquid chromatography-tandem mass spectrometry) 분석으로 포획된 당단백질을 친화성 정제(affinity purified) 및 동정하였다 (도 1A 및 2D).

[411] 선택 기준(enrichment factor > 4, false-discovery rate [FDR]-adjusted P-value < 0.05)을 기반으로 다음의 LRG1 결합 파트너 후보를 도출하였다(도 1B):

[412] - LEG3 (galectin-3),

[413] - NDUA5 (NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex subunit 5)

[414] - LPHN2 (latrophilin-2)

[415]

[416] 상기 세 가지 결합 파트너 후보 중 LPHN2는 HUVEC 및 HEK293T 세포 모두에서 발현하는 유일한 세포막 단백질이기 때문에 LRG1 수용체에 대한 가장 강력한 후보로 선택되었다 (도 2E). 특히 LPHN2는 칼슘 비의존적 알파-latrotoxin 수용체 2 (CIRL2)로도 알려진 부착 G- 단백질 결합 수용체 (GPCR)로(J Biol Chem 273, 32715-32724 (1998)), 최근 시냅스 형성에서 양방향 신호 전달을 매개하는 것으로 보고되었다(Science 363, (2019)).

[417] 스크램블된 shRNA(scrambled small hairpin RNA) 렌티바이러스(shControl)로 처리된 대조군 세포에 비해 LPHN2 녹다운된 HUVEC 및 HEK293T 세포 모두에서 LRG1-YFP의 세포 표면 결합이 현저하게 감소했음을 확인했다 (도 1C 및 2E). 더욱이, 수용성 LRG1으로 처리된 HUVECs에서의 LPHN2 면역 침전법 및 LC-MS/MS에서는 LPHN2와 LRG1이 공동 면역 침전되어(도 1D 및 2F-2G), HUVEC 세포막에서 LRG1과 LPHN2의 특이적이고 직접적인 연관성을 나타내었다.

[418] 당뇨병(DM)의 관리가 잘되지 않는 경우, 고혈당증은 해면 신경과 혈관에 돌이킬 수 없는 손상을 입히며, 이는 발기부전 (ED)으로 이어질 수 있다. DM의 내피 기능 장애는 손상된 내피 세포 (EC) 증식 및 이동으로 나타난다(Int J Vasc Med 2012, 918267 (2012)). 예상한 바와 같이, 높은 농도의 글루코스는 마우스 해면 내피 세포(mouse cavernous endothelial cells; MCEC)의 in vitro 튜브 형성을 저해했으며, 대동맥 고리(aortic rings) 및 음경 해면체 조직(penile cavernosum tissues)에서 자라나는 미세 혈관을 감소시키는 것을 확인했다 (도 1E-1F 및 2H).

[419] 그러나 이러한 높은 농도의 글루코스에 의해 유도된 표현형은 모두 LRG1-Fc 처리에 의해 완전히 회복되었으며, 렌티 바이러스 매개 LPHN2 녹다운은 LRG1 의존적 효과를 현저하게 감소시켰다 (도 1E 및 1F, 2H 및 2I). 종래의 보고와 일치하게도(Sci Rep 8, 11920 (2018)), 고-글루코스 배양 배지 조건의 MCEC, 대동맥 고리 및 음경 해면체 조직에서 분비된 TGF-β1 단백질 수준이 약간 증가했음을 발견했다(도 2J). 그러나, TGF-β1 차단 항체의 존재 아래에서도 LRG1-Fc는 효과적으로 혈관 신생을 촉진했다(도 1E 및 1F).

[420] 상기 결과는 LPHN2는 LRG1에 대한 TGF-β 비의존적인 세포 표면 수용체이며, 고혈당 조건에서 LRG1과 LPHN2의 직접 결합이 혈관 신생을 촉진하는 새로운 메커니즘 경로임을 의미한다.

[421]

[422] 실시예 3: LRG1과 LPHN2에 결합에 의한 STZ 유발 당뇨병 마우스에서 혈관 신생을 유도 및 발기 부전을 완화효과

[423] 본 발명자들은 혈관 신생 단백질인 재조합 COMP-Ang1의 해면 내 전달이 내피 재생을 강화하여 STZ 유발 당뇨병 마우스 모델 (이하 '당뇨병 마우스'라고

함)에서 발기 기능을 회복시킬 수 있음을 보고한 바 있다(Diabetes 60, 969-980 (2011), Sci Rep 5, 9222 (2015)). 이에 기반하여, LRG1-Fc의 해면 내 주입 후 당뇨병 마우스의 발기 기능을 평가하여 in vivo 혈관 신생에 대한 LRG1 의존적 효과를 평가했습니다. 대조군 마우스에 비해 당뇨병 마우스에서 해면 신경의 전기적 자극에 따라 또는 평균 수축기 혈압 (MSBP) 대비 최대 해면 내압(maximal intra-cavernous pressure(ICP)) 또는 총 해면 내압 (total ICP)의 비율이 현저하게 감소하는 것을 확인했다.

[424] 그러나, LRG1 주입은 발기 파라미터를 대조군 값의 약 92% 수준으로 복원했다. LRG1 의존적 회복 효과는 shLPHN2 렌티 바이러스 감염에 의해 현저하게 사라졌지만, shControl 렌티 바이러스 감염은 유의미한 효과가 없었다 (도 3A 및 표 2).

[425] 또한, LRG1 매개 발기 기능의 회복이 TGF-β1 차단 항체의 존재 하에서 약간 감소한 반면, shLPHN2 렌티 바이러스에 의한 추가 감염은 LRG1 매개 발기기능을 현저하게 감소시키는 것을 확인했다(도 3A). 이러한 결과와 일관되게, 발기 기능은 여러회의 STZ 주사 후에도 LRG1-Tg 마우스에서 손상되지 않았으나, shRNA 매개 LPHN2 녹다운을 시키는 경우 폐지되었다(도 4A).

[426] 이와 유사하게, 해면체 조직에서 PECAM-1(platelet/endothelial cell adhesion molecule-1) 및 주피세포(pericyte) 마커 NG-2(neuron-glial antigen 2)에 대한 면역형광염색은 STZ에 의해 유도된 당뇨병 마우스의 해면 내피 세포 및 당뇨병 주변 세포 함량 감소가 LRG1에 의해 회복된 반면, shLPHN2 렌티 바이러스와 LRG1의 공동투여 조건(LRG1 + shLPHN2 그룹)에서는 회복되지 않았음을 나타낸다(도 3B).

[427] PECAM-1 및 NG-2의 발현 수준은 LRG1의 존재 여부에 관계없이 shControl 및 shLPHN2 렌티 바이러스에 감염된 야생형 마우스 모두에서 비슷하게 나타났다. 대조적으로, 당뇨병 마우스의 LRG1 처리는 내피 NO 합성효소 인산화 (endothelial NO synthase phosphorylation; eNOS)의 증가(도 3C-3D), 내피 세포 증식 증가(BrdU incorporation assay;도 3E 및 3I) 및 내피 세포의 세포 접합 단백질인 claudin-5의 발현 증가를 유도했다(도 3F 및 3I). 반면, 해면상 내피 투과성(extravasation of oxidized-LDL, 도 3G 및 3I) 및 아폽토시스 (TUNEL 분석, 도 3H 및 3I)는 감소했다. 발기 기능 모델 과 유사하게(도 4A), 해면상 내피 세포 함량과 투과성은 여러번의 STZ 주입 후에도 LRG1-Tg 마우스에서 보존되었지만 LPHN2-녹다운 조건에서는 폐지되었다 (도 4B).

[428]

[429] 실시예 4: 고혈당증에서 LPHN2와 LRG1의 결합에 의한 신경돌기 성장(neurite outgrowth) 및 말초 신경 재생 유도효과

[430] 내피 기능 장애(Endothelial dysfunction)와 자율 신경 병증(autonomic neuropathy)은 당뇨병성 발기부전의 병태 생리학적 특징이다 (Neurol Res 23,

651-654 (2001), Int J Impot Res, 129-138 (2007)). LPHN 패밀리가 성장 원뿔 이동(growth cone migration) 및 시냅스 형성에 중요한 역할을 한다는 점을 감안할 때(Front Neurosci 13, 700 (2019), Elife 9, (2020)), LRG1/LPHN2 축이 음경 조직의 신경 세포 및/또는 말초 신경에도 영향을 미칠 수 있을 것으로 예상하였다.

[431] 항-LPHN2 항체를 사용한 면역 형광 염색은 LPHN2가 음경 해면체 조직의 혈관 구조와 유사하게 (corpus cavernosum (CC), the dorsal vein (DV), the cavernous artery (CA), 및 dorsal artery (DA)), 등측 신경 다발 (dorsal nerve bundle, DNB)에서 높은 수준으로 발현됨을 나타낸다(도 5A 및 도 6A). 흥미롭게도 DNB, 전체 음경 조직 및 MCEC에서 LPHN2 발현은 당뇨병 및 고 글루코스 조건에서 현저하게 증가했다 (도 5B 및 도 6B-6C). 대조적으로, DNB에서 신경섬유(neurofilament;NF) 발현은 당뇨병 마우스에서 현저하게 감소했다. 놀랍게도, LRG1의 해면 내 주사는 당뇨병 생쥐에서 음경 뉴런 함량과 뉴런 NOS (nNOS)-함유 신경 섬유를 완전히 회복 시켰지만, 이러한 LRG1 의존적 효과는 LPHN2 녹다운에 의해 폐지되었다 (도 5C 및 5D). 해면상 내피 세포 함량과 유사하게(도 4B), DNB의 신경 함량은 STZ 유도된 당뇨병 조건의 LRG1-Tg 마우스에서 보존되었다 (도 6D). 이러한 결과는 LRG1이 당뇨병 마우스에서 음경 신경 재생을 촉진한다는 것을 의미한다.

[432] 신경돌기 성장의 결함(Defective neurite outgrowth)과 축삭돌기 재생의 손상(impaired axonal regeneration)은 당뇨병성 말초 신경 병증과 광범위하게 연관되어 있다(Front Endocrinol (Lausanne) 8, 12 (2017)). 따라서, LRG1이 주 골반 신경절 (MPG, 골반 장기를 자극하는 부교감 신경절과 교감 신경절이 혼합됨)과 등측 뿌리 신경절 (DRG, 감각 정보를 뇌로 전달하는 세포체 군집)에서 축삭 생성에 영향을 미치는지 여부를 확인하였다.

[433] 구체적으로, MPG 및 DRG 마우스 외식편(explants)을 고혈당증에 노출시키고 βIII-튜불린 면역형광 염색(βIII-tubulin immunofluorescence staining)을 사용하여 신경 조직을 분석했다. 이전 보고와 일치하여(28), 우리는 고 글루코스 조건이 MPG 및 DRG 외식편 모두에서 신경돌기의 생성을 현저하게 감소 시켰다는 것을 확인했다 (도 5F 및 도 6E). 대조적으로, LRG1-Fc 처리는 MPG 및 DRG 고혈당 외식편에서 신경돌기의 생성을 자극했으며, 이는 렌티 바이러스 매개 LPHN2 녹다운에 의해 폐지되었다 (도 5F 및 도 6E). 고 글루코스 조건이 MPG 및 DRG 외식편 모두에서 TGF-β1 및 LPHN2 발현을 증가 시켰지만 (도 5E, 도 6B 및 6F), LRG1 관련 신경 영양 효과는 TGF-β1 차단 항체의 영향을 받지 않았다. 종합하면, 이러한 데이터는 LRG1 유도된 신경돌기 성장이 TGF-β1 비의존적인 LPHN2 경로에 의한 것임을 의미한다.

[434]

[435] 실시예 5: 고혈당 조건의 LRG1 및 LPHN2 결합에 있어서, LRG1 탈당화의 중요성

[436] 상기 실시예들의 데이터는 LRG1이 당뇨병 생쥐에서 혈관 신생과 신경 재생을

모두 촉진하지만 대조군 생쥐의 음경 조직 혈관이나 뉴런에는 유의미한 영향을 미치지 않는다는 것을 나타낸다. 따라서, LRG1이 높은 글루코스 조건에서 기능적 활성화 메커니즘의 존재를 예상하였으며, 이를 확인하기 위해 무-글루코스, 정상 글루코스 또는 고 글루코스(G/F, NG, HG)를 함유하는 HUVEC 배양 배지에서 LRG1를 배양하고 샘플을 SDS-PAGE로 분석하였다.

[437] 그 결과, HG 배지에서 LRG1을 배양한 경우에만 분자량이 50 kDa에서 ~ 30-40 kDa로 이동한 것으로 나타냈다(도 7A 및 도 8A). LRG1이 당 단백질이라는 점을 감안할 때, 이러한 변화는 LRG1이 고 글루코스 조건 하에서 탈당화되어 발생하는 현상이라 예상하였다. 이를 확인하기 위해, 우리는 고 글루코스 조절 배지로 배양 된 LRG1과 병렬로 PNGase F (N-글리칸 분리효소)로 처리 된 LRG1의 SDS-PAGE를 실행했습니다. 실제로, 두 밴드가 일치하는 것으로 나타났으며, 이는 고 글루코스 배양 조건에서 HUVEC에 의해 LRG1의 탈당화를 유도함을 의미한다.

[438]

[439] 다음으로 LRG1의 탈당화(DG-LRG1)가 in vitro (도 7B) 및 ex vivo (도 7C 및 도 8C)에서 LPHN2에 대한 결합 친화도에 영향을 미치는지 조사했다. LRG1 (네이티브 및 탈당화 형태) 및 LPHN2의 세포 외 도메인을 사용한 고체상 결합 분석은 LPHN2의 Olf 도메인이 LRG1에 대한 최소 결합 도메인이며, LPHN2 Lec/Olf 도메인에 대한 LRG1의 결합 친화도(KD=920 nM)가 LRG1의 탈당화에 의해 현저하게 증가(KD=450 nM) 하는 것을 확인하였다(도 7B 및 도 8B). HUVEC 및 HEK293T 세포에서 LRG1 및 DG-LRG1의 세포 표면 결합율을 평가하여 재검증하였다(표 3, 도 7C 및 도 8C).

[440]

[441] [표3]

LRG1 및 DG-LRG1의 세포 표면 결합율

	HUVEC	HEK293T
LRG1	59.6%	42.8%
DG-LRG1	94.5%	91.7%

[442]

[443] 그러나, LRG1 및 DG-LRG1 세포 표면 결합은 LPHN2-녹다운된 HUVEC 및 HEK293T 세포에서 현저하게 감소했다 (도 7C 및 도 8C). 세포 표면 결합과 달리 네이티브 LRG1 또는 DG-LRG1은 재조합 ecto-full LPHN2와 약하게 결합한다 (도 7B). 이는 세포막에서 LPHN2 GPS 모티프의 적절한 단백질 분해 처리가 LRG1 결합 및 LPHN2 매개된 세포의 기능에 중요 할 수 있음을 시사한다(Handb Exp Pharmacol 234, 83-109 (2016)). 흥미롭게도 LRG1과 DG-LRG1은 LPHN2의 Lec/Olf 도메인과 87%의 서열 유사성을 갖는 LPHN1 및 LPHN3의 Lec/Olf

도메인에는 결합할 수 없는 것으로 확인되었다 (도 8D 및 8E).

[444]

[445] 실시예 6: 탈당화된 LRG1(DG-LRG1)의 혈관 신생 및 신경 영양효과

[446] 정상 글루코스 조건에서, HUVEC 및 DRG 외식편뿐만 아니라 중앙 뉴런 (마우스 피질 뉴런)에 대한 DG-LRG1의 혈관 신생 및 신경 영양 효과를 확인하였다. DG-LRG1이 네이티브 LRG1과 달리, TGF-β1 차단 항체의 존재 여부와 관계 없이 HUVEC의 튜브 형성 및 세포 이동과(도 7D, 7F, 도 8G 및 8H), DRG 외식편으로부터의 축삭돌기의 발아(axonal sprouting) 및 배양된 피질 뉴런에서 신경돌기의 생성(neurite outgrowth) (도 7E, 7F, 도 8I 및 J)을 현저히 촉진한다는 것을 확인하였다. 그러나 HUVEC, DRG 외식편 및 배양된 피질 뉴런에서 shLPHN2 렌티 바이러스를 사용한 LPHN2 녹다운은 상기한 촉진효과를 현저하게 감소시켰다 (도 7F 및 도 8G-8J). 상기 결과는 고혈당증에서 LRG1의 탈당화가 LPHN2에 대한 높은 친화도 결합에 필수적이며, 내피 세포에 대한 혈관 신생 효과와 말초 및 중추 신경 세포 모두에서 신경 영양 효과의 향상을 나타내는 메커니즘임을 의미한다.

[447]

[448] 실시예 7: LRG1의 결정 구조 및 LRG1 기능에 대한 주요 글리코실화 부위 동정

[449] 류신 풍부 반복 (LRR) 도메인은 일반적으로 말굽 모양을 형성하며 단백질-단백질 상호 작용의 형성에 중요한 구조적 모티프로 알려져있다(Cell Mol Life Sci 65, 2307-2333 (2008), Proc Natl Acad Sci U S A 108 Suppl 1, 4631-4638 (2011)). LRG1상의 글리칸이 기능에 미치는 영향을 확인하기 위해 인간 LRG1 (NCBI 수탁 번호: NP_443204, 잔기 V36-Q347)을 결정화하고 2.5A의 해상도에서 구조를 결정하였다(도 9A).

[450] 결정학적 정보는 표 4와 같다.

[451]

[452] [표4]

	human LRG1
Data collection	
Space group	$P6_322$
Cell dimensions	
a, *b*, *c* (Å)	143.02, 143.02, 113.73
α, β, γ (°)	90, 90, 120
Resolution (Å)	20-2.50 (2.59-2.50)[a]
R_{sym} or R_{merge} (%)[b]	14.6 (60.8)
$I/\sigma I$	46.4 (10.3)
Completeness (%)	100.0 (100.0)
Redundancy	36.6 (35.3)
Refinement	
Resolution (Å)	20.0-2.50
No. reflections	24066
R_{work}/R_{free} (%)[c]	18.58/21.94
Average *B*-factor (Å^2)	38.57
R.M.S. deviations	
Bond length (Å)	0.01
Bond angle (°)	1.24
Ramachandran favored (%)	92.51%
Ramachandran outliers (%)	0.00%
PDB entry	7D67

[453] [a]Values in parentheses refer to the highest resolution shell.

[b]$R_{merge} = \sum_{hkl}\sum_i | I_{hkli} - \langle I_{hkl} \rangle | / \sum_{hkl}\sum_i \langle I_{hkli} \rangle$

[c]$R_{cryst} = \sum_{hkl}||F_o|-|F_c||/\sum|F_o|$

[454]

[455] 결정된 LRG1의 구조는 양 측면의 N-말단(LRRNT) 및 C-말단 (LRRCT) 사이의 8개의 중앙 LRR 반복(LRR1-LRR8)을 포함하는 말굽 모양의 솔레노이드 구조이다(도 9A). 포유류 LRG1의 서열 얼라인먼트 결과 고도로 보존되어 있는 주요 잔기를 확인하였다 (도 10A):

[456] - LxxLxLxxNxL 모티프의 공통 류신 잔기 및 아스파라긴 래더; 및

[457] - LRRNT 및 LRRCT의 페닐알라닌 스파인 및 4개의 시스테인.

[458]

[459] 그러나, LRG1 LRRNT 및 LRRCT 구조가 전형적인 LRR 패밀리 단백질의 구조와 다소 다르다는 것을 발견했다. LRG1의 LRRNT는 Cys43과 Cys56을 연결하는 단일 이황화 브릿지만으로 안정화된 N-말단 β-헤어핀을 갖는 3 개의 β-가닥을 함유한다. LRG1 LRRCT는 Cys-303과 Cys-329를 연결하는 하나의

이황화 결합를 포함하므로 CF2 클래스에 속한다 (도 9A 및 도 10B) (Cell Mol Life Sci 65, 2307-2333 (2008)).

[460] LRG1은 단일 폴리펩티드 사슬 (분자량, 약 50kDa)로 구성되며 약 23 중량% 탄수화물을 포함한다 (1). LRG1 결정 구조의 전자 밀도 맵은 N-아세틸 글루코사민이 LRRNT의 N79, LRR 반복의 볼록한 표면에있는 N186, LRR 반복의 오목한 표면에 있는 N269, LRRCT에있는 N325의 네 가지 아스파라긴에 부착되어 있음을 명확하게 나타낸다(도 9B). 3 개의 아스파라긴 (N79, N269 및 N325)에 부착된 글리칸은 동일한 오목한 표면에 존재한다. 이 중에서도 N269와 N325는 모두 고도로 보존되어 있다 (도 9C). 상기한 NRG1의 글리칸 중 어느 글리칸(들)이 LRG1의 혈관 신생 및 신경 영양 활성을 약화시키는 지 결정하기 위해, NRG1의 각각의 글리코실화 부위를 아스파라긴의 탈당화 된 형태를 모방(mimic)하는 아스파르트 산(aspartic acid, D)으로 변이 시켰다 (도 8F). DRG 외식편과 배양된 피질 뉴런을 사용하여 HUVEC 관(tube) 형성 및 신경돌기 성장을 평가할 때, 오직 LRG1 N325D 변이만이 정상 글루코스 조건에서도 DG-LRG1과 유사한 정도로 관(tube) 형성 및 신경돌기 성장(neurite outgrowth)을 유도할 수 있음을 확인했다 (도 9D-9F).

[461] 결과적으로, 고도로 보존된 LRG1 N325 잔기의 글리칸이 LRG1/LPHN2 매개 혈관 신생 및 신경돌기 성장을 제어하고 알 수 없는 인자에 의해 N325 잔기에서 글리칸이 제거되는 경우, 혈관 신생 및 신경 영양이 더욱 활성화 되도록 전환됨을 의미한다.

[462]

[463] 실시예 8: 혈관 신생 및 신경 생성 촉진 메커니즘 LRG1-LPHN2 신호 전달 경로 구축

[464] LPHN2 인산화의 중요성은 알려지지 않았지만, 프로테오믹 스크리닝을 통해 LPHN2에서 두 개의 티로신 잔기 (Tyr1406 및 Tyr1421)가 후보 인산화 부위로 알려져 있다(Science 326, 1502-1509 (2009)). 따라서, 고 글루코스 조건에서 LRG1 결합시 LPHN2가 인산화되는지 여부를 확인하였다. LPHN2의 면역 침전 및 항-포스포-티로신 항체를 사용한 면역 블롯팅 결과, 천연 LRG1 또는 DG-LRG1를 처리한 뒤 10 분 이내에 LPHN2의 인산화를 자극하는 것으로 확인되었으며, DG-LRG1이 천연 LRG1보다 LPHN2의 실질적으로 더 큰 인산화를 나타내는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 LPHN2 인산화를 매개하는 실제 리간드가 DG-LRG1이고 그 결합이 LPHN2 매개 세포 내 신호 전달을 유도 할 수 있음을 시사한다 (도 11A).

[465] LRG1/LPHN2 매개 세포 내 신호 전달 경로를 구축하기 위해, 먼저 LRG1 또는 DG-LRG1로 처리 된 HUVEC에서 Cignal Finder GPCR Signaling 10-Pathway Reporter 분석을 수행하였다. 테스트 된 10 가지 경로 중 고혈당 배양 조건에서 LRG1 또는 DG-LRG1 처리에 의해 핵 NF-κB (활성화된 B 세포의 핵 인자 카파-경쇄-인핸서)만 활성화되었다. LPHN2 인산화에 대한 결과와 일치하여,

DG-LRG1은 천연 LRG1에 비해 NF-κB 신호 전달의 활성화를 현저하게 증가시켰다(도 11B).

[466] DG-LRG1의 영향을 받는 신호 전달 경로를 체계적으로 이해하기 위해 DG-LRG1 처리 후 HUVEC에서 363개의 주요 신호 단백질의 인산화 프로파일링을 수행했습니다. 어레이 상의 688개의 인산화 부위 중 51개의 부위는 DG-LRG1 처리시 인산화 수준이 25% 이상 증가하였으며, 다른 51개 부위는 DG-LRG1 처리시 인산화 수준이 각각 25% 이상 감소한 것으로 나타났다 (도 12A). 다음으로 이러한 단백질 간의 상호 작용을 설명하는 신호 네트워크 모델을 구축했다. 네트워크 모델은 DG-LRG1이 NF-κB p65 및 이의 상류 키나아제인 Lyn과 AKT의 인산화를 유도한다고 예측하였으며, 이는 HUVEC 및 마우스 피질 뉴런의 웨스턴 블롯 분석에 의해 확인된 것과 동일하다(도 11C 및 11D).

[467] 웨스턴 블롯 분석은 또한 포스포 어레이에서 검출되지 않은 상류 AKT 키나아제인 PI3K 인산화를 확인하였다. Lyn, PI3K, AKT 및 NF-κB p65의 인산화 수준은 DG-LRG1 처리 후 약 10-30분의 구간에서 증가하였으며, 60분 후에 감소했다(도 11D). 전반적으로 DG-LRG1은 네이티브 LRG1보다 더 강한 인산화 활성을 유도하였다. HUVEC와 1차 피질 뉴런 모두에서 shRNA 매개의 LPHN2 녹다운은 DG-LRG1로 처리하는 경우에도 Lyn, PI3K, AKT 및 NF-κB p65의 인산화가 감소되는 것으로 나타났다(도 12B).

[468] 더욱이 DG-LRG1에 의해 유도된 Lyn의 인산화는 Lyn 키나제 억제제 인 PP2(Src 키나제 계열)에 의해 현저히 감소했으며, DG-LRG1의 처리에도 불구하고, PP2와 LY294002 (PI3K 억제제)의 존재 아래에서 PI3K, AKT 및 NF-κB p65 인산화가 모두 실질적으로 억제되었다. (도 12C). 결과적으로 PP2와 LY294002는 DG-LRG1의 존재에서도 HUVEC에서 관 형성, DRG 외식 편에서 발아하는 축삭, 대뇌 피질 뉴런에서 축삭돌기의 발아를 억제했다 (도 11E).

[469] 종래의 보고와 일치하여(Nature 499, 306-311 (2013)), LRG1 (또는 DG-LRG1)과 TGF-β1 공동 처리는 HUVEC의 Smad1/5의 인산화를 효과적으로 유도했다 (도 11F). 그러나 DG-LRG1 단독에 의해 유도 된 Lyn, PI3K, AKT 및 NF-κB p65의 인산화와는 달리, 이러한 효과는 shLPHN2 렌티 바이러스를 사용한 LPHN2 녹다운에 의해 변경되지 않았다 (도 12D). 또한, LRG1 (또는 DG-LRG1)에 의해 유도 된 Lyn 및 NF-κB p65 인산화의 증가는 TGF-β1과의 공동 처리에 의해 영향을 받지 않았다 (도 11F). 이러한 결과는 Lyn, PI3K, AKT 및 NF-κB p65 신호 경로를 통한 LRG1/LPHN2 축이 LRG1/TGF-β1 신호 전달과 비의존적으로 고혈당증에서 LRG1/LPHN2 매개 혈관 신생 및 신경돌기 성장에 대한 주요 신호 전달 경로에 해당함을 의미한다. 또한, LRG1이 탈당화되면 정상적인 글루코스 조건에서도 동일한 세포 신호 메커니즘을 통해 LPHN2 매개 혈관 신생 및 신경돌기의 성장을 유도한다.

[470]

[471] 마지막으로, DG-LRG1이 직접 또는 간접적으로 혈관 신생 및 신경 영양 효과를 발휘하는지를 확인하였다. 전형적인 혈관 신생 및 신경 영양 인자의 단백질 수준을 분석 할 때, LRG1 처리 또는 비처리된 HUVEC 간에 VEGF-A, angiopoietin-1 또는 섬유아세포 성장 인자 2(fibroblast growth factor 2, FGF2) 의 수준 차이가 없었다(도 11G). 대조적으로, 일차 피질 뉴런의 DG-LRG1 처리는 신경 성장 인자 (NGF), 뇌 유래 신경 영양 인자 (BDNF) 및 뉴로트로핀-3 (neurotrophin-3, NT-3)의 발현을 현저히 증가시켰으며(도 11H), 이는 LPHN2 녹다운에 의해 폐지되었다. 이러한 데이터는 내피 세포 증식 및 이동이 주로 Lyn/PI3K/AKT/NF-κB p65를 통한 DG-LRG1/LPHN2 매개 신호 경로의 직접적인 효과에서 비롯되는 반면, 신경돌기의 성장은 DG-LRG1/LPHN2 신호 전달에 의한 직접적인 효과 및 NGF, BDNF 및 NT3와 같은 다른 신경 영양 인자의 발현 향상을 통한 간접적인 효과에서 비롯된 것 임을 의미한다.

[472] 결정된 LRG1의 구조는 양 측면의 N-말단(LRRNT) 및 C-말단 (LRRCT) 사이의 8개의 중앙 LRR 반복(LRR1-LRR8)을 포함하는 말굽 모양의 솔레노이드 구조이다(도 9A). 포유류 LRG1의 서열 얼라인먼트 결과 고도로 보존되어 있는 주요 잔기를 확인하였다 (도 10A):

[473] - LxxLxLxxNxL 모티프의 공통 류신 잔기 및 아스파라긴 래더; 및

[474] - LRRNT 및 LRRCT의 페닐알라닌 스파인 및 4개의 시스테인.

[475]

[476] 그러나, LRG1 LRRNT 및 LRRCT 구조가 전형적인 LRR 패밀리 단백질의 구조와 다소 다르다는 것을 발견했다. LRG1의 LRRNT는 Cys43과 Cys56을 연결하는 단일 이황화 브릿지만으로 안정화된 N-말단 β-헤어핀을 갖는 3 개의 β-가닥을 함유한다. LRG1 LRRCT는 Cys-303과 Cys-329를 연결하는 하나의 이황화 결합를 포함하므로 CF2 클래스에 속한다 (도 9A 및 도 10B) (Cell Mol Life Sci 65, 2307-2333 (2008)).

[477] LRG1은 단일 폴리펩티드 사슬 (분자량, 약 50kDa)로 구성되며 약 23 중량% 탄수화물을 포함한다 (1). LRG1 결정 구조의 전자 밀도 맵은 N-아세틸 글루코사민이 LRRNT의 N79, LRR 반복의 볼록한 표면에있는 N186, LRR 반복의 오목한 표면에 있는 N269, LRRCT에있는 N325의 네 가지 아스파라긴에 부착되어 있음을 명확하게 나타낸다(도 9B). 3 개의 아스파라긴 (N79, N269 및 N325)에 부착된 글리칸은 동일한 오목한 표면에 존재한다. 이 중에서도 N269와 N325는 모두 고도로 보존되어 있다 (도 9C). 상기한 NRG1의 글리칸 중 어느 글리칸(들)이 LRG1의 혈관 신생 및 신경 영양 활성을 약화시키는 지 결정하기 위해, NRG1의 각각의 글리코실화 부위를 아스파라긴의 탈당화 된 형태를 모방(mimic)하는 아스파르트 산(aspartic acid, D)으로 변이 시켰다 (도 8F). DRG 외식편과 배양된 피질 뉴런을 사용하여 HUVEC 관(tube) 형성 및 신경돌기 성장을 평가할 때, 오직 LRG1 N325D 변이만이 정상 글루코스 조건에서도 DG-LRG1과 유사한 정도로 관(tube) 형성 및 신경돌기 성장(neurite outgrowth)을

유도할 수 있음을 확인했다 (도 9D-9F).

[478] 결과적으로, 고도로 보존된 LRG1 N325 잔기의 글리칸이 LRG1/LPHN2 매개 혈관 신생 및 신경돌기 성장을 제어하고 알 수 없는 인자에 의해 N325 잔기에서 글리칸이 제거되는 경우, 혈관 신생 및 신경 영양이 더욱 활성화 되도록 전환됨을 의미한다.

[479]

[480] 실시예 8: 혈관 신생 및 신경 생성 촉진 메커니즘 LRG1-LPHN2 신호 전달 경로 구축

[481] LPHN2 인산화의 중요성은 알려지지 않았지만, 프로테오믹 스크리닝을 통해 LPHN2에서 두 개의 티로신 잔기 (Tyr1406 및 Tyr1421)가 후보 인산화 부위로 알려져 있다(Science 326, 1502-1509 (2009)). 따라서, 고 글루코스 조건에서 LRG1 결합시 LPHN2가 인산화되는지 여부를 확인하였다. LPHN2의 면역 침전 및 항-포스포-티로신 항체를 사용한 면역 블롯팅 결과, 천연 LRG1 또는 DG-LRG1를 처리한 뒤 10 분 이내에 LPHN2의 인산화를 자극하는 것으로 확인되었으며, DG-LRG1이 천연 LRG1보다 LPHN2의 실질적으로 더 큰 인산화를 나타내는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 LPHN2 인산화를 매개하는 실제 리간드가 DG-LRG1이고 그 결합이 LPHN2 매개 세포 내 신호 전달을 유도 할 수 있음을 시사한다 (도 11A).

[482] LRG1/LPHN2 매개 세포 내 신호 전달 경로를 구축하기 위해, 먼저 LRG1 또는 DG-LRG1로 처리 된 HUVEC에서 Cignal Finder GPCR Signaling 10-Pathway Reporter 분석을 수행하였다. 테스트 된 10 가지 경로 중 고혈당 배양 조건에서 LRG1 또는 DG-LRG1 처리에 의해 핵 NF-κB (활성화된 B 세포의 핵 인자 카파-경쇄-인핸서)만 활성화되었다. LPHN2 인산화에 대한 결과와 일치하여, DG-LRG1은 천연 LRG1에 비해 NF-κB 신호 전달의 활성화를 현저하게 증가시켰다(도 11B).

[483] DG-LRG1의 영향을 받는 신호 전달 경로를 체계적으로 이해하기 위해 DG-LRG1 처리 후 HUVEC에서 363개의 주요 신호 단백질의 인산화 프로파일링을 수행했습니다. 어레이 상의 688개의 인산화 부위 중 51개의 부위는 DG-LRG1 처리시 인산화 수준이 25% 이상 증가하였으며, 다른 51개 부위는 DG-LRG1 처리시 인산화 수준이 각각 25% 이상 감소한 것으로 나타났다 (도 12A). 다음으로 이러한 단백질 간의 상호 작용을 설명하는 신호 네트워크 모델을 구축했다. 네트워크 모델은 DG-LRG1이 NF-κB p65 및 이의 상류 키나아제인 Lyn과 AKT의 인산화를 유도한다고 예측하였으며, 이는 HUVEC 및 마우스 피질 뉴런의 웨스턴 블롯 분석에 의해 확인된 것과 동일하다(도 11C 및 11D).

[484] 웨스턴 블롯 분석은 또한 포스포 어레이에서 검출되지 않은 상류 AKT 키나아제인 PI3K 인산화를 확인하였다. Lyn, PI3K, AKT 및 NF-κB p65의 인산화 수준은 DG-LRG1 처리 후 약 10-30분의 구간에서 증가하였으며, 60분 후에

감소했다(도 11D). 전반적으로 DG-LRG1은 네이티브 LRG1보다 더 강한 인산화 활성을 유도하였다. HUVEC와 1차 피질 뉴런 모두에서 shRNA 매개의 LPHN2 녹다운은 DG-LRG1로 처리하는 경우에도 Lyn, PI3K, AKT 및 NF-κB p65의 인산화가 감소되는 것으로 나타났다(도 12B).

[485] 더욱이 DG-LRG1에 의해 유도된 Lyn의 인산화는 Lyn 키나제 억제제 인 PP2(Src 키나제 계열)에 의해 현저히 감소했으며, DG-LRG1의 처리에도 불구하고, PP2와 LY294002 (PI3K 억제제)의 존재 아래에서 PI3K, AKT 및 NF-κB p65 인산화가 모두 실질적으로 억제되었다. (도 12C). 결과적으로 PP2와 LY294002는 DG-LRG1의 존재에서도 HUVEC에서 관 형성, DRG 외식 편에서 발아하는 축삭, 대뇌 피질 뉴런에서 축삭돌기의 발아를 억제했다 (도 11E).

[486] 종래의 보고와 일치하여(Nature 499, 306-311 (2013)), LRG1 (또는 DG-LRG1)과 TGF-β1 공동 처리는 HUVEC의 Smad1/5의 인산화를 효과적으로 유도했다 (도 11F). 그러나 DG-LRG1 단독에 의해 유도 된 Lyn, PI3K, AKT 및 NF-κB p65의 인산화와는 달리, 이러한 효과는 shLPHN2 렌티 바이러스를 사용한 LPHN2 녹다운에 의해 변경되지 않았다 (도 12D). 또한, LRG1 (또는 DG-LRG1)에 의해 유도 된 Lyn 및 NF-κB p65 인산화의 증가는 TGF-β1과의 공동 처리에 의해 영향을 받지 않았다 (도 11F). 이러한 결과는 Lyn, PI3K, AKT 및 NF-κB p65 신호 경로를 통한 LRG1/LPHN2 축이 LRG1/TGF-β1 신호 전달과 비의존적으로 고혈당증에서 LRG1/LPHN2 매개 혈관 신생 및 신경돌기 성장에 대한 주요 신호 전달 경로에 해당함을 의미한다. 또한, LRG1이 탈당화되면 정상적인 글루코스 조건에서도 동일한 세포 신호 메커니즘을 통해 LPHN2 매개 혈관 신생 및 신경돌기의 성장을 유도한다.

[487]

[488] 마지막으로, DG-LRG1이 직접 또는 간접적으로 혈관 신생 및 신경 영양 효과를 발휘하는지를 확인하였다. 전형적인 혈관 신생 및 신경 영양 인자의 단백질 수준을 분석 할 때, LRG1 처리 또는 비처리된 HUVEC 간에 VEGF-A, angiopoietin-1 또는 섬유아세포 성장 인자 2(fibroblast growth factor 2, FGF2) 의 수준 차이가 없었다(도 11G). 대조적으로, 일차 피질 뉴런의 DG-LRG1 처리는 신경 성장 인자 (NGF), 뇌 유래 신경 영양 인자 (BDNF) 및 뉴로트로핀-3 (neurotrophin-3, NT-3)의 발현을 현저히 증가시켰으며(도 11H), 이는 LPHN2 녹다운에 의해 폐지되었다. 이러한 데이터는 내피 세포 증식 및 이동이 주로 Lyn/PI3K/AKT/NF-κB p65를 통한 DG-LRG1/LPHN2 매개 신호 경로의 직접적인 효과에서 비롯되는 반면, 신경돌기의 성장은 DG-LRG1/LPHN2 신호 전달에 의한 직접적인 효과 및 NGF, BDNF 및 NT3와 같은 다른 신경 영양 인자의 발현 향상을 통한 간접적인 효과에서 비롯된 것 임을 의미한다.

[489]

[490] 이상으로 본 발명의 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.

[491]

산업상 이용가능성

[492] 본 발명의 탈당화된 LRG1 당단백질 및 LRG1 당단백질 변이체는 기존의 LRG1 당단백질 신호 전달체계인 TGF-β에 비의존적인 신규한 LRG1 당단백질 수용체인 LPHN2와 결합 및 상호작용하여 Lyn, AKT, NF-κB p65 등으로 구성된 하위 신호 전달체계의 활성화를 통해 혈관 내피세포 및 신경세포의 성장, 이동, 분화를 유도할 수 있다. 또한, 신경세포에서 신경 영양인자의 발현 향상을 통한 간접적 신경 재생효과를 또한 나타낸다. 따라서, 본 발명의 탈당화된 LRG1 당단백질 및 LRG1 당단백질 변이체는 기존의 LRG1 당단백질보다 현저히 우수한 혈관 신생, 신경 성장 및 신경 재생 효과를 나타내며, 따라서, 이를 포함하는 조성물은 혈관성 발기부전, 허혈성 심장/뇌/말초 혈관 질환, 당뇨성 혈관 합병증, 신경인성 발기부전, 당뇨성 신경합병증, 수술/외상 후 말초신경 손상, 퇴행성 신경질환을 포함하는 허혈성 질환, 말초신경질환, 발기부전 및/또는 퇴행성 신경질환의 예방 및 치료에 유용하다.

[493]

서열목록 Free Text

[494] 전자파일 첨부하였음.

청구범위

[청구항 1] 하나 이상의 글리코실기(glycosyl group)가 탈당화된, LRG1 당단백질(Leucine rich α-2 glycoprotein).

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 LRG1은 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 LRG1 당단백질.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 LRG1은 서열번호 1로 표시되는 것을 특징으로 하는 LRG1 당단백질.

[청구항 4] 제2항에 있어서, N44, N151, N234, 및 N290에서 선택되는 아미노산에 결합된 글리코실기 중 어느 하나 이상이 탈당화된 것을 특징으로 하는 LRG1 당단백질.

[청구항 5] 제2항에 있어서, N290에 결합된 글리코실기가 탈당화된 것을 특징으로 하는 LRG1 당단백질.

[청구항 6] 제1항에 있어서, LPHN2(latrophilin-2)에 결합하는 것을 특징으로 하는 LRG1 당단백질.

[청구항 7] 하나 이상의 글리코실화 부위에 변이를 포함하는 LRG1 당단백질(Leucine rich α-2 glycoprotein) 변이체.

[청구항 8] 제7항에 있어서, 서열번호 2의 N44, N151, N234, 및 N290에서 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산에 변이를 포함하는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 LRG1 당단백질 변이체.

[청구항 9] 제8항에 있어서, N290에 변이를 포함하는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 LRG1 당단백질 변이체.

[청구항 10] 제7항에 있어서, 상기 변이는 서열번호 2에 있어, N44D, N151D, N234D, 및 N290D로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환을 포함하는 것을 특징으로 하는 LRG1 당단백질 변이체.

[청구항 11] 제7항에 있어서, 서열번호 1의 N79, N186, N269, 및 N325에서 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산에 변이를 포함하는 것을 특징으로 하는 LRG1 당단백질 변이체.

[청구항 12] 제7항의 LRG1 당단백질 변이체를 코딩하는 핵산.

[청구항 13] 제12항의 핵산을 포함하는 재조합 벡터.

[청구항 14] 제12항의 핵산 또는 제13항의 벡터가 도입된 숙주세포.

[청구항 15] 제14항의 숙주세포를 배양하여 LRG1 당단백질 변이체를 생성하는 단계; 및

상기 생성된 LRG1 당단백질 변이체를 수득하는 단계를 포함하는 LRG1 당단백질 변이체의 제조방법

[청구항 16] 제1항의 LRG1 당단백질, 또는 제7항의 LRG1 당단백질 변이체에 Fc 도메인이 융합된, 융합 단백질.

[청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 IgG(Immunoglobulin G)로부터 유래한

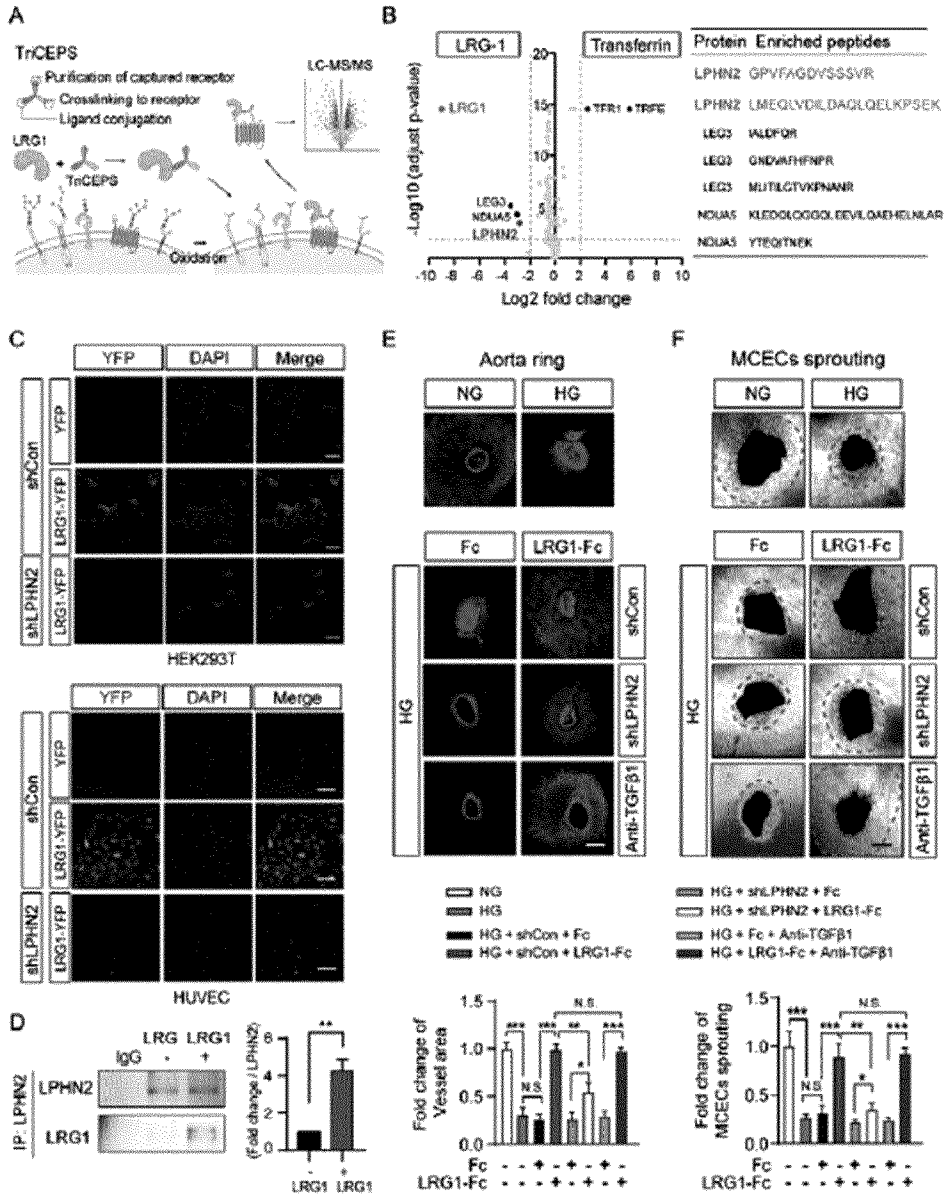
것을 특징으로 하는 융합 단백질.

[청구항 18] 제1항의 LRG1 당단백질, 제7항의 LRG1 당단백질 변이체, 또는 제16항의 융합 단백질을 포함하는 혈관신생 또는 신경성장 유도용 조성물.

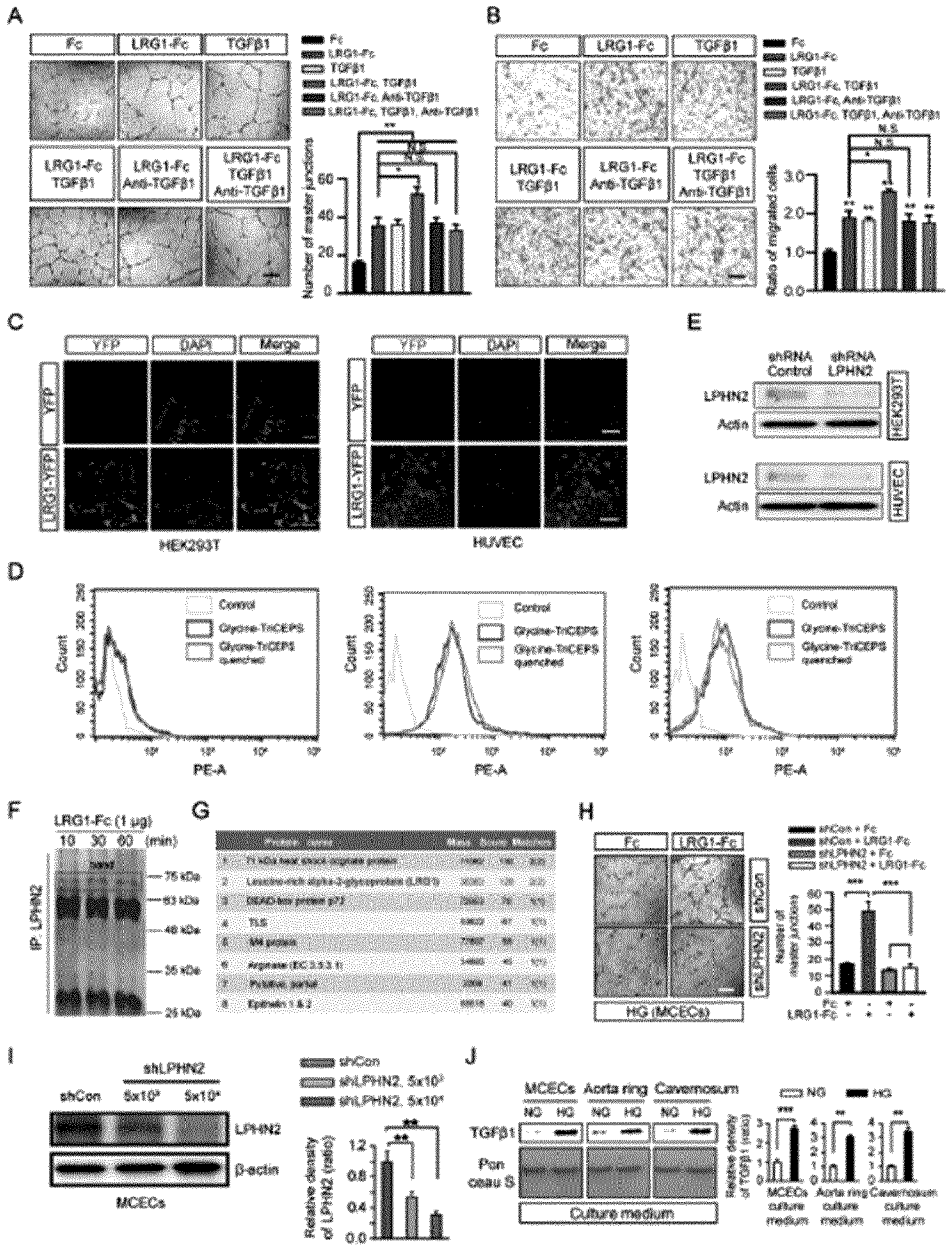
[청구항 19] 제1항의 LRG1 당단백질, 제7항의 LRG1 당단백질 변이체, 또는 제16항의 융합 단백질을 포함하는 허혈성 질환, 말초 신경계 질환, 발기부전 또는 퇴행성 신경 질환의 예방 및/또는 치료용 조성물.

[청구항 20] 제1항의 LRG1 당단백질, 제7항의 LRG1 당단백질 변이체, 또는 제16항의 융합 단백질을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 허혈성 질환, 말초 신경계 질환, 발기부전 및/또는 퇴행성 신경 질환의 예방 또는 치료방법.

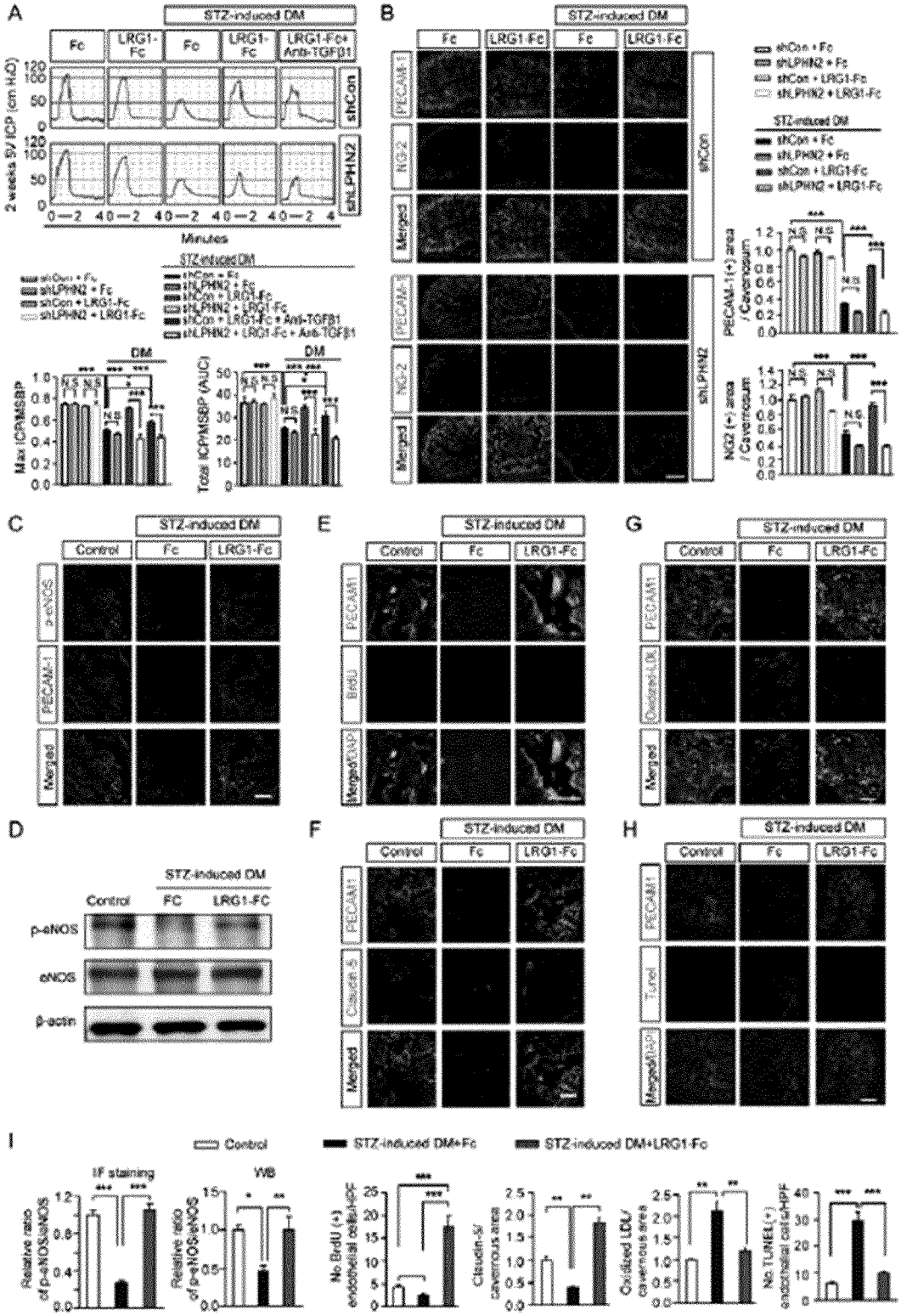
[도1]


A
TriCEPS
Purification of captured receptor
Crosslinking to receptor
Ligand conjugation
LRG1
TriCEPS
LC-MS/MS
Oxidation
B
LRG-1
Transferrin
Protein Enriched peptides
LPHN2 GPVFAGDVSSSVR
LPHN2 LMEQLVDILDAGLQELKPSEK
LEG3 VALDFQR
LEG3 GNDVAFHFNPR
LEG3 MLITILCTVKPNANR
NOA5 KLEDDLQGGQLEEVLQAEHELNLAR
NOA5 YTEQITNEK
-Log10 (adjust p-value)
Log2 fold change
C
YFP
DAPI
Merge
shCon
shLPHN2
LRG1-YFP
HEK293T
HUVEC
D
LRG LRG1
IgG
IP: LPHN2
LPHN2
LRG1
(fold change / LPHN2)
E
Aorta ring
NG
HG
Fc
LRG1-Fc
shCon
shLPHN2
Anti-TGFβ1
NG
HG
HG + shCon + Fc
HG + shCon + LRG1-Fc
HG + shLPHN2 + Fc
HG + shLPHN2 + LRG1-Fc
HG + Fc + Anti-TGFβ1
HG + LRG1-Fc + Anti-TGFβ1
Fold change of Vessel area
N.S.
F
MCECs sprouting
Fold change of MCECs sprouting

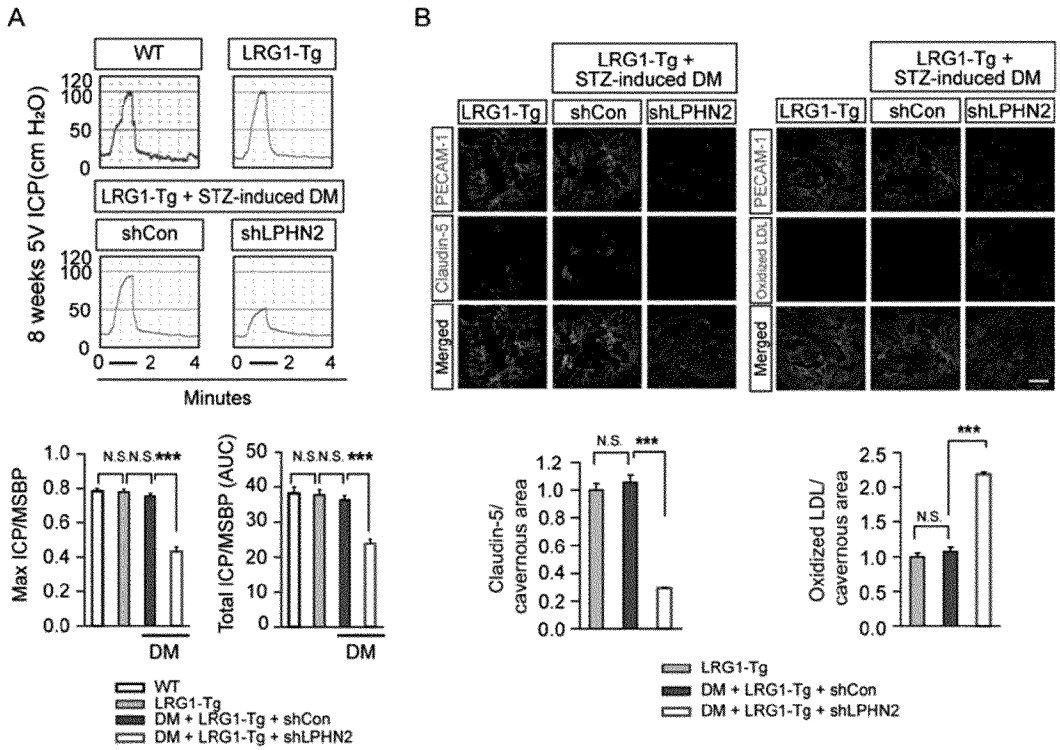
[도2]


A
Fc
LRG1-Fc
TGFβ1
LRG1-Fc TGFβ1
LRG1-Fc Anti-TGFβ1
LRG1-Fc TGFβ1 Anti-TGFβ1
Number of master junctions
B
Ratio of migrated cells
C
YFP
DAPI
Merge
LRG1-YFP
HEK293T
HUVEC
D
Control
Glycine-TriCEPS
Glycine-TriCEPS quenched
Count
PE-A
E
shRNA Control
shRNA LPHN2
LPHN2
Actin
F
LRG1-Fc (1 μg)
10 30 60 (min)
IP: LPHN2
75 kDa
63 kDa
48 kDa
35 kDa
26 kDa
G
H
shCon
shLPHN2
HG (MCECs)
I
shLPHN2
shCon
5x10³
5x10⁴
LPHN2
β-actin
MCECs
Relative density of LPHN2 (ratio)
J
MCECs
Aorta ring
Cavernosum
NG
HG
TGFβ1
Culture medium

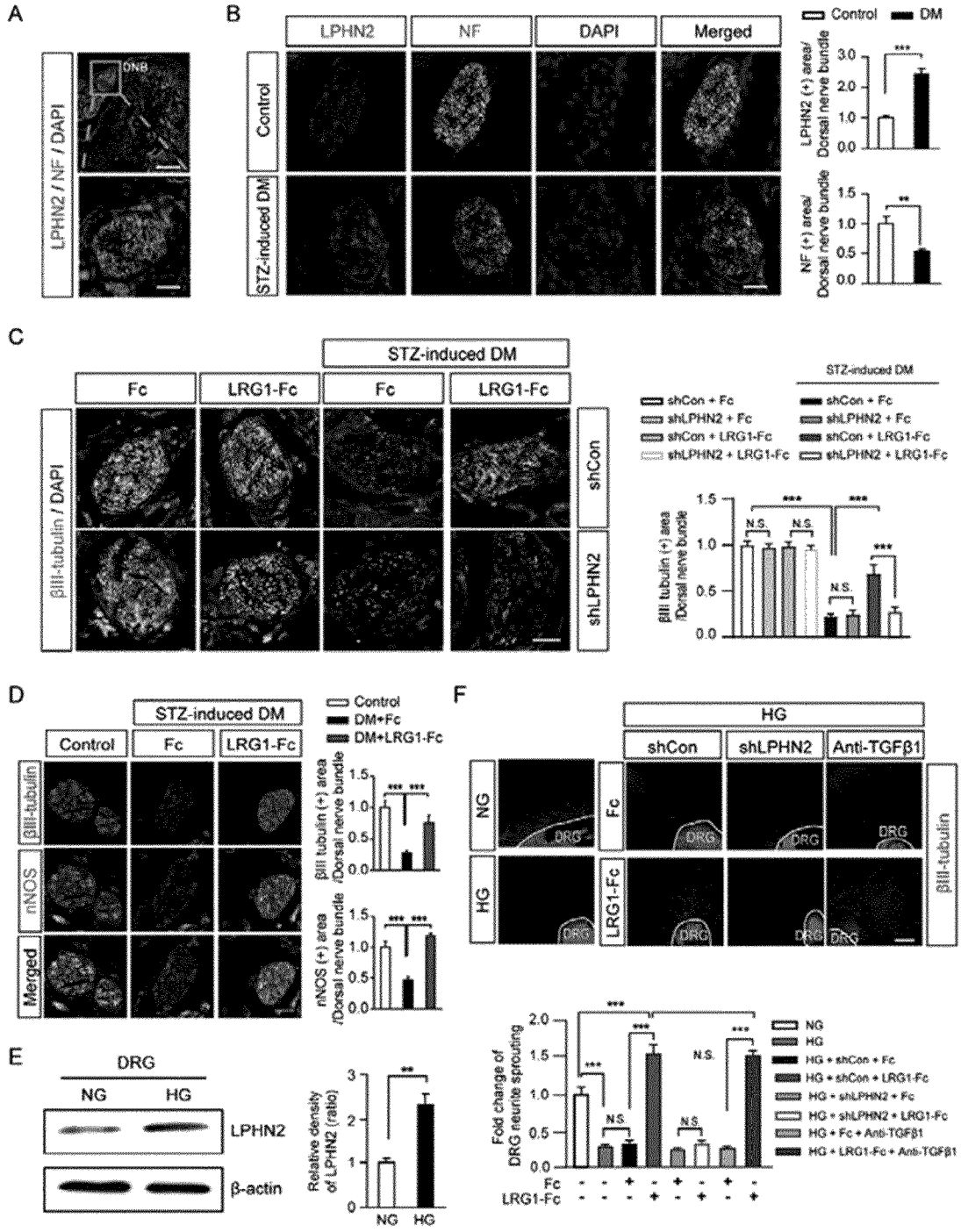
[도3]


A
STZ-induced DM
Fc
LRG1-Fc
Fc
LRG1-Fc
LRG1-Fc+ Anti-TGFβ1
shCon
shLPHN2
2 weeks 5V ICP (cm H2O)
Minutes
shCon + Fc
shLPHN2 + Fc
shCon + LRG1-Fc
shLPHN2 + LRG1-Fc
shCon + LRG1-Fc + Anti-TGFβ1
shLPHN2 + LRG1-Fc + Anti-TGFβ1
DM
Max ICP/MSBP
Total ICP/MSBP (AUC)
B
STZ-induced DM
Fc
LRG1-Fc
PECAM-1
NG2
Merged
shCon
shLPHN2
PECAM-1(+) area / Cavernosum
NG2 (+) area / Cavernosum
C
STZ-induced DM
Control
Fc
LRG1-Fc
p-eNOS
PECAM-1
Merged
D
STZ-induced DM
Control
FC
LRG1-FC
p-eNOS
eNOS
β-actin
E
STZ-induced DM
Control
Fc
LRG1-Fc
PECAM1
BrdU
Merge/DAPI
F
STZ-induced DM
Control
Fc
LRG1-Fc
PECAM1
Claudin-5
Merged
G
STZ-induced DM
Control
Fc
LRG1-Fc
PECAM1
Oxidized-LDL
Merged
H
STZ-induced DM
Control
Fc
LRG1-Fc
PECAM1
Tunel
Merge/DAPI
I
Control
STZ-induced DM+Fc
STZ-induced DM+LRG1-Fc
IF staining
WB
Relative ratio of p-eNOS/eNOS
No. BrdU (+) endothelial cells/HPF
Claudin-5/ cavernous area
Oxidized LDL/ cavernous area
No. TUNEL(+) endothelial cells/HPF

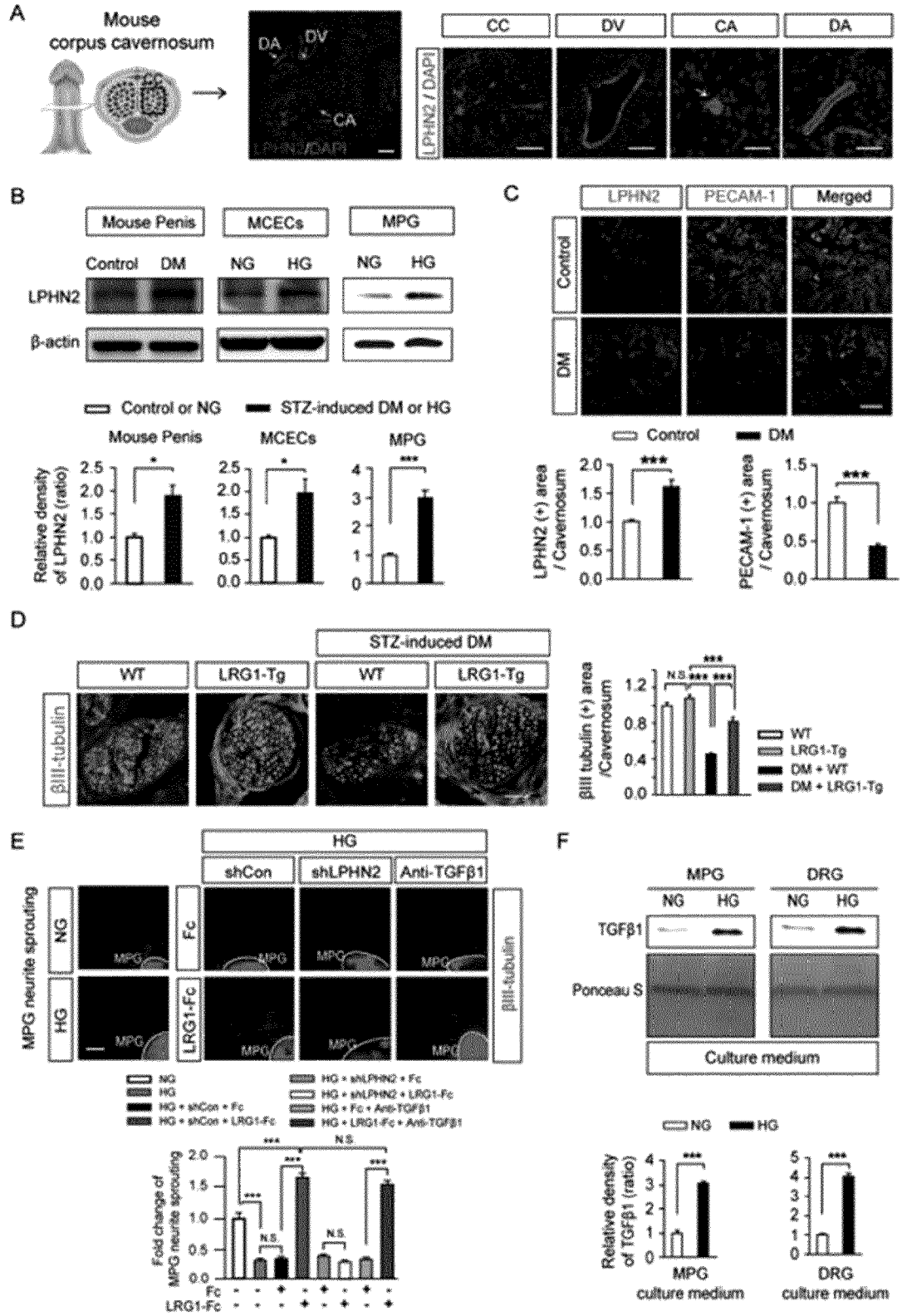
[도4]


A
WT
LRG1-Tg
LRG1-Tg + STZ-induced DM
shCon
shLPHN2
8 weeks 5V ICP(cm H2O)
Minutes
Max ICP/MSBP
Total ICP/MSBP (AUC)
N.S.N.S.***
DM
WT
LRG1-Tg
DM + LRG1-Tg + shCon
DM + LRG1-Tg + shLPHN2
B
LRG1-Tg + STZ-induced DM
LRG1-Tg
shCon
shLPHN2
PECAM-1
Claudin-5
Oxidized LDL
Merged
Claudin-5/ cavernous area
Oxidized LDL/ cavernous area
N.S.
***
LRG1-Tg
DM + LRG1-Tg + shCon
DM + LRG1-Tg + shLPHN2

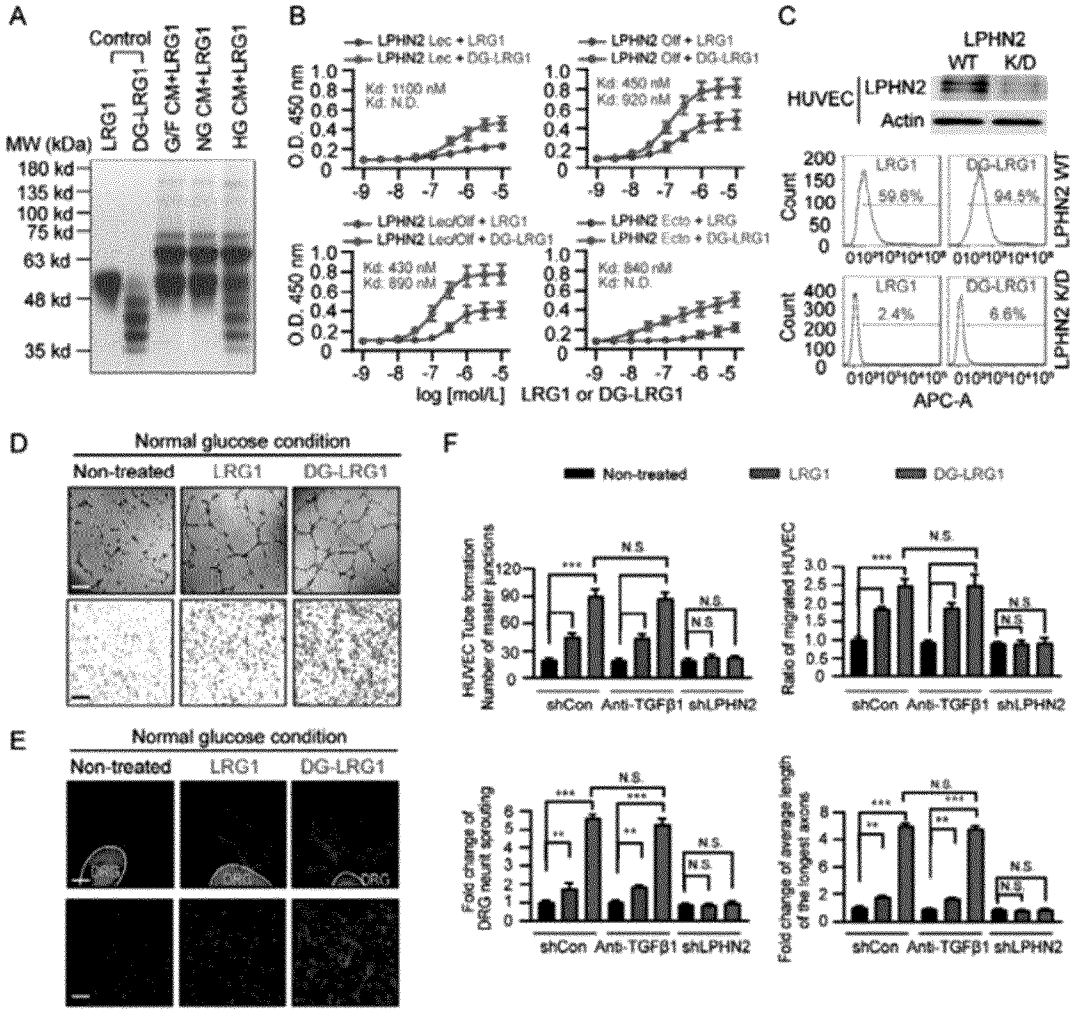
[도5]


A
LPHN2 / NF / DAPI
DNB
B
LPHN2
NF
DAPI
Merged
Control
STZ-induced DM
Control
DM
LPHN2 (+) area/ Dorsal nerve bundle
NF (+) area/ Dorsal nerve bundle
C
STZ-induced DM
Fc
LRG1-Fc
βIII-tubulin / DAPI
shCon
shLPHN2
shCon + Fc
shLPHN2 + Fc
shCon + LRG1-Fc
shLPHN2 + LRG1-Fc
βIII tubulin (+) area /Dorsal nerve bundle
N.S.
D
STZ-induced DM
Control
Fc
LRG1-Fc
βIII-tubulin
nNOS
Merged
Control
DM+Fc
DM+LRG1-Fc
βIII tubulin (+) area /Dorsal nerve bundle
nNOS (+) area /Dorsal nerve bundle
E
DRG
NG
HG
LPHN2
β-actin
Relative density of LPHN2 (ratio)
F
HG
shCon
shLPHN2
Anti-TGFβ1
NG
HG
Fc
LRG1-Fc
DRG
βIII-tubulin
Fold change of DRG neurite sprouting
NG
HG
HG + shCon + Fc
HG + shCon + LRG1-Fc
HG + shLPHN2 + Fc
HG + shLPHN2 + LRG1-Fc
HG + Fc + Anti-TGFβ1
HG + LRG1-Fc + Anti-TGFβ1
Fc
LRG1-Fc

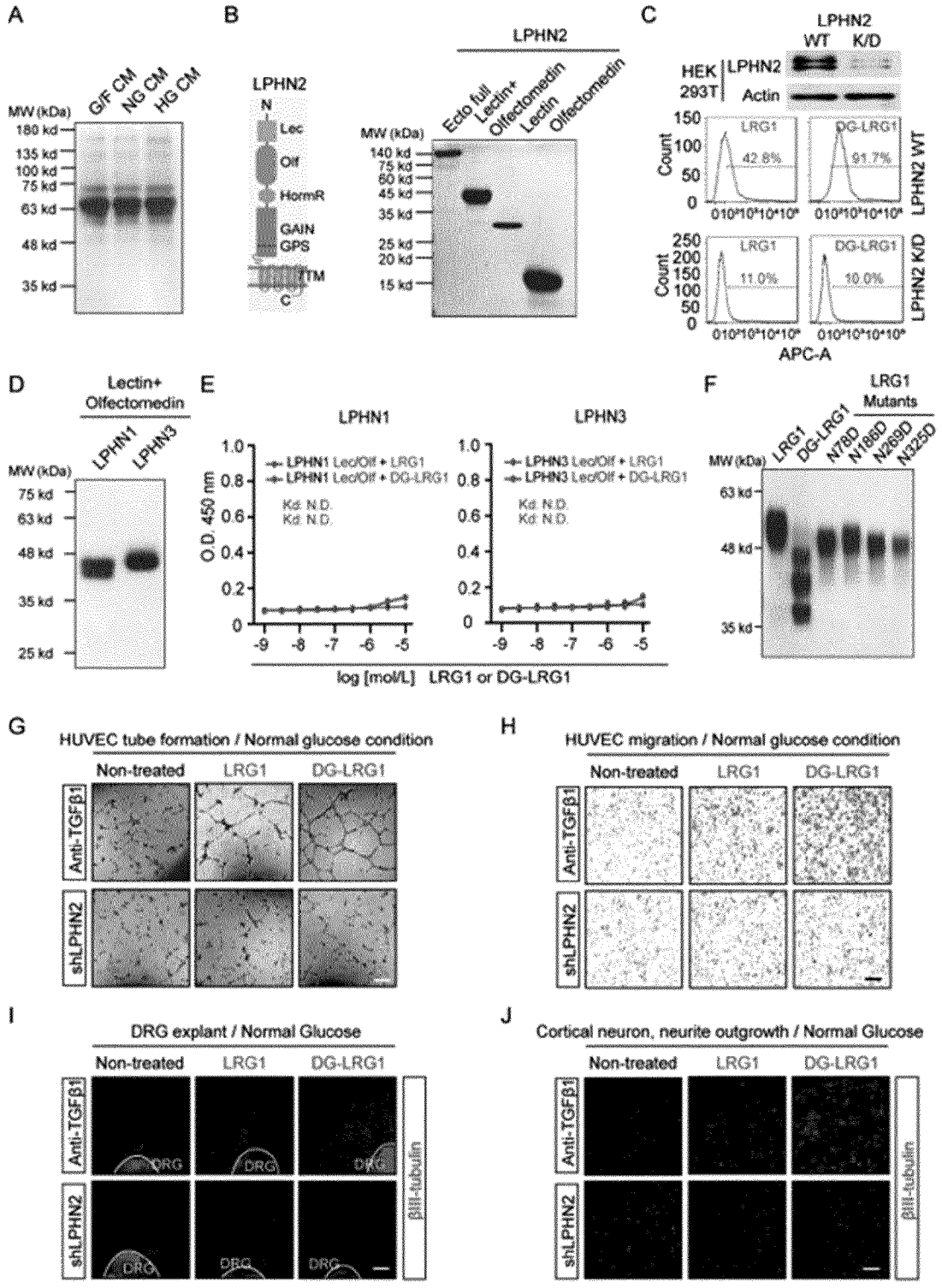
[도6]


A
Mouse corpus cavernosum
CC
DA
DV
CA
LPHN2 / DAPI
CC
DV
CA
DA
B
Mouse Penis
MCECs
MPG
Control
DM
NG
HG
LPHN2
β-actin
Control or NG
STZ-induced DM or HG
Relative density of LPHN2 (ratio)
C
LPHN2
PECAM-1
Merged
Control
DM
LPHN2 (+) area / Cavernosum
PECAM-1 (+) area / Cavernosum
D
STZ-induced DM
WT
LRG1-Tg
βIII-tubulin
βIII tubulin (+) area /Cavernosum
N.S
DM + WT
DM + LRG1-Tg
E
HG
shCon
shLPHN2
Anti-TGFβ1
MPG neurite sprouting
Fc
LRG1-Fc
HG + shCon + Fc
HG + shCon + LRG1-Fc
HG + shLPHN2 + Fc
HG + shLPHN2 + LRG1-Fc
HG + Fc + Anti-TGFβ1
HG + LRG1-Fc + Anti-TGFβ1
Fold change of MPG neurite sprouting
F
MPG
DRG
TGFβ1
Ponceau S
Culture medium
Relative density of TGFβ1 (ratio)
MPG culture medium
DRG culture medium

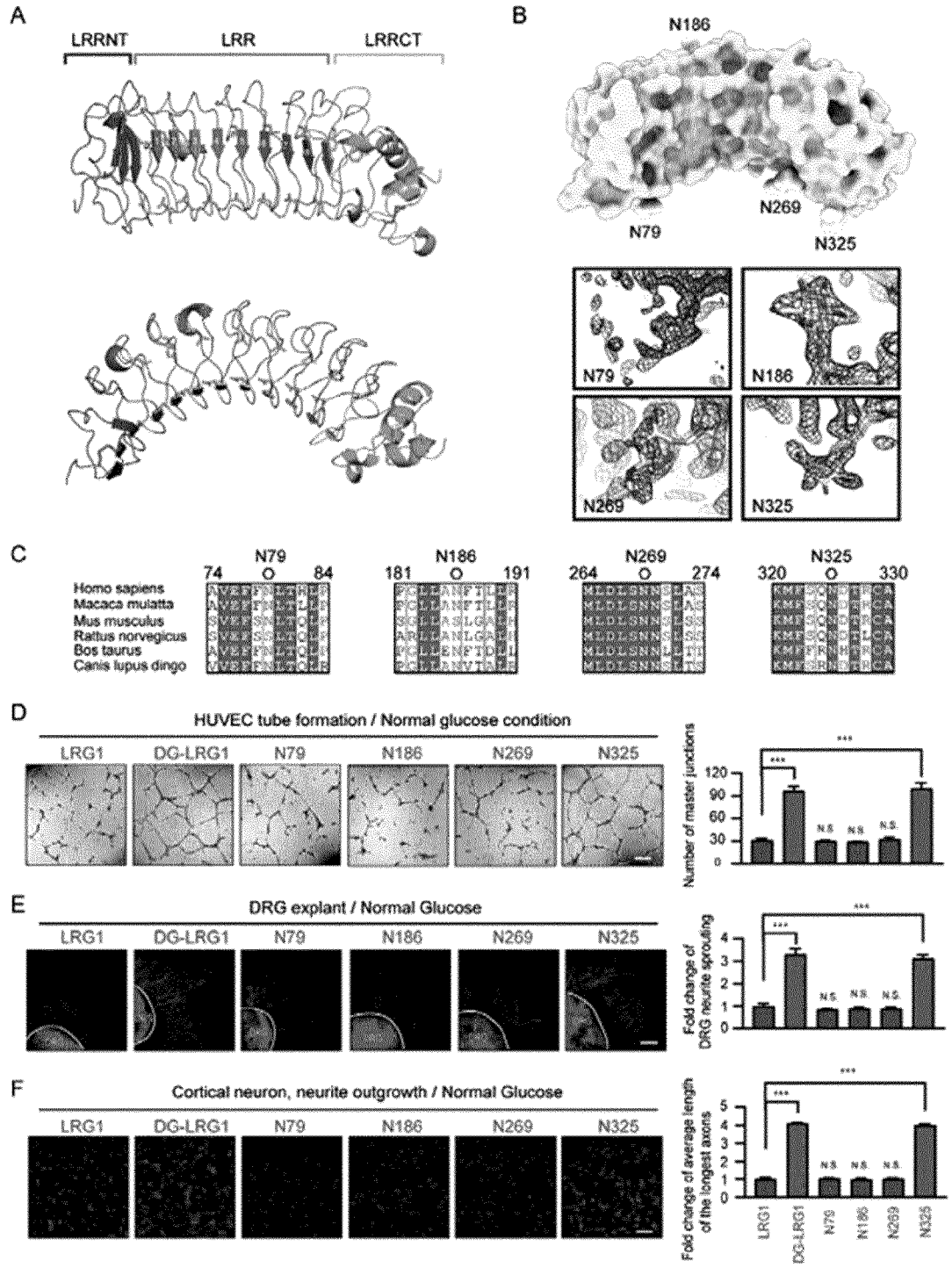
[도7]


A
Control
LRG1
DG-LRG1
G/F CM+LRG1
NG CM+LRG1
HG CM+LRG1
MW (kDa)
180 kd
135 kd
100 kd
75 kd
63 kd
48 kd
35 kd
B
LPHN2 Lec + LRG1
LPHN2 Lec + DG-LRG1
Kd: 1100 nM
Kd: N.D.
LPHN2 Olf + LRG1
LPHN2 Olf + DG-LRG1
Kd: 450 nM
Kd: 920 nM
LPHN2 Lec/Olf + LRG1
LPHN2 Lec/Olf + DG-LRG1
Kd: 430 nM
Kd: 890 nM
LPHN2 Ecto + LRG
LPHN2 Ecto + DG-LRG1
Kd: 840 nM
Kd: N.D.
O.D. 450 nm
log [mol/L] LRG1 or DG-LRG1
C
LPHN2
WT K/D
HUVEC
LPHN2
Actin
Count
LRG1
DG-LRG1
59.6%
94.5%
LPHN2 WT
2.4%
6.6%
LPHN2 K/D
APC-A
D
Normal glucose condition
Non-treated
LRG1
DG-LRG1
E
Normal glucose condition
Non-treated
LRG1
DG-LRG1
DRG
F
Non-treated
LRG1
DG-LRG1
HUVEC Tube formation
Number of master junctions
Ratio of migrated HUVEC
Fold change of DRG neurit sprouting
Fold change of average length of the longest axons
N.S.
shCon
Anti-TGFβ1
shLPHN2

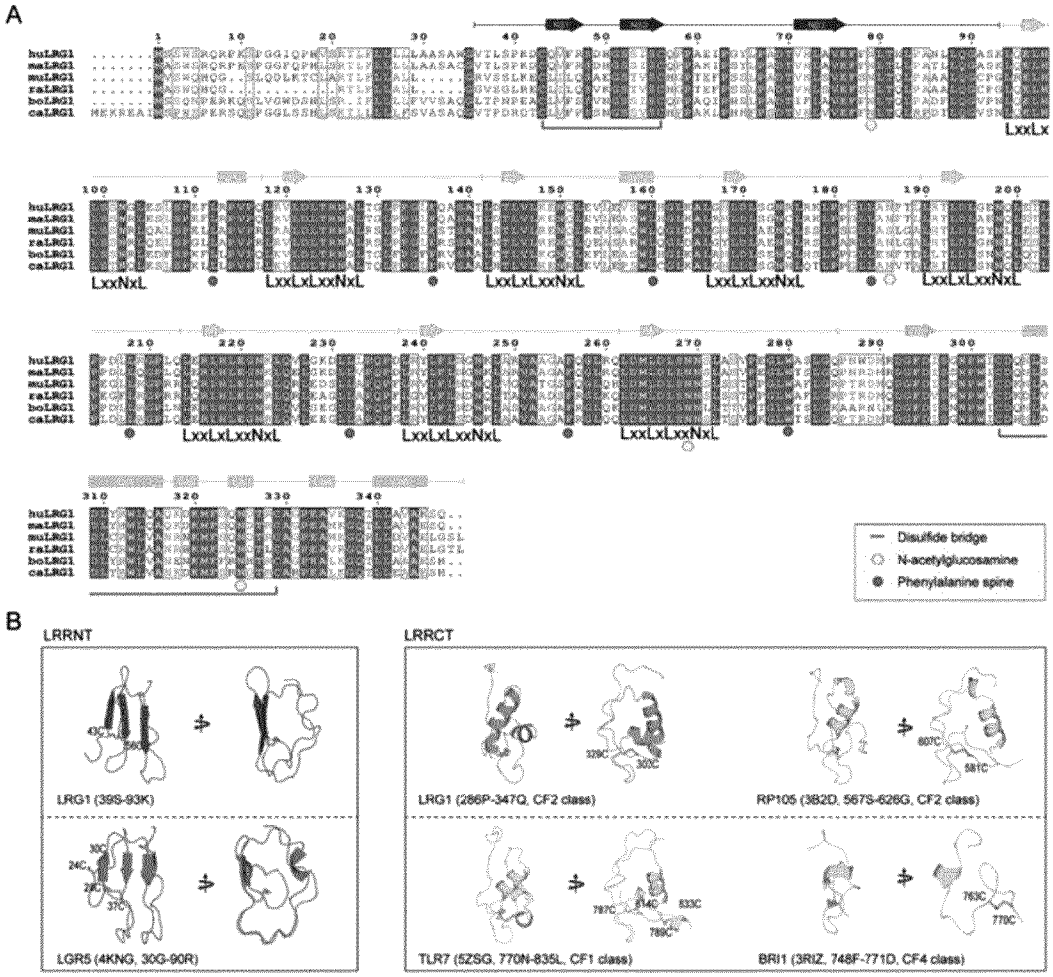
[도8]


A
G/F CM
NG CM
HG CM
MW (kDa)
180 kd
135 kd
100 kd
75 kd
63 kd
48 kd
35 kd
B
LPHN2
N
Lec
Olf
HormR
GAIN
GPS
TM
C
LPHN2
Ecto full
Lectin+ Olfectomedin
Lectin
Olfectomedin
MW (kDa)
140 kd
75 kd
60 kd
45 kd
35 kd
25 kd
20 kd
15 kd
C
LPHN2
WT
K/D
HEK 293T
LPHN2
Actin
LRG1
DG-LRG1
42.8%
91.7%
11.0%
10.0%
Count
LPHN2 WT
LPHN2 K/D
APC-A
D
Lectin+ Olfectomedin
LPHN1
LPHN3
MW (kDa)
75 kd
63 kd
48 kd
35 kd
25 kd
E
LPHN1
LPHN3
LPHN1 Lec/Olf + LRG1
LPHN1 Lec/Olf + DG-LRG1
LPHN3 Lec/Olf + LRG1
LPHN3 Lec/Olf + DG-LRG1
Kd: N.D.
Kd: N.D.
O.D. 450 nm
log [mol/L] LRG1 or DG-LRG1
F
LRG1 Mutants
LRG1
DG-LRG1
N78D
N186D
N269D
N325D
MW (kDa)
63 kd
48 kd
35 kd
G
HUVEC tube formation / Normal glucose condition
Non-treated
LRG1
DG-LRG1
Anti-TGFβ1
shLPHN2
H
HUVEC migration / Normal glucose condition
Non-treated
LRG1
DG-LRG1
Anti-TGFβ1
shLPHN2
I
DRG explant / Normal Glucose
Non-treated
LRG1
DG-LRG1
Anti-TGFβ1
shLPHN2
DRG
βIII-tubulin
J
Cortical neuron, neurite outgrowth / Normal Glucose
Non-treated
LRG1
DG-LRG1
Anti-TGFβ1
shLPHN2
βIII-tubulin

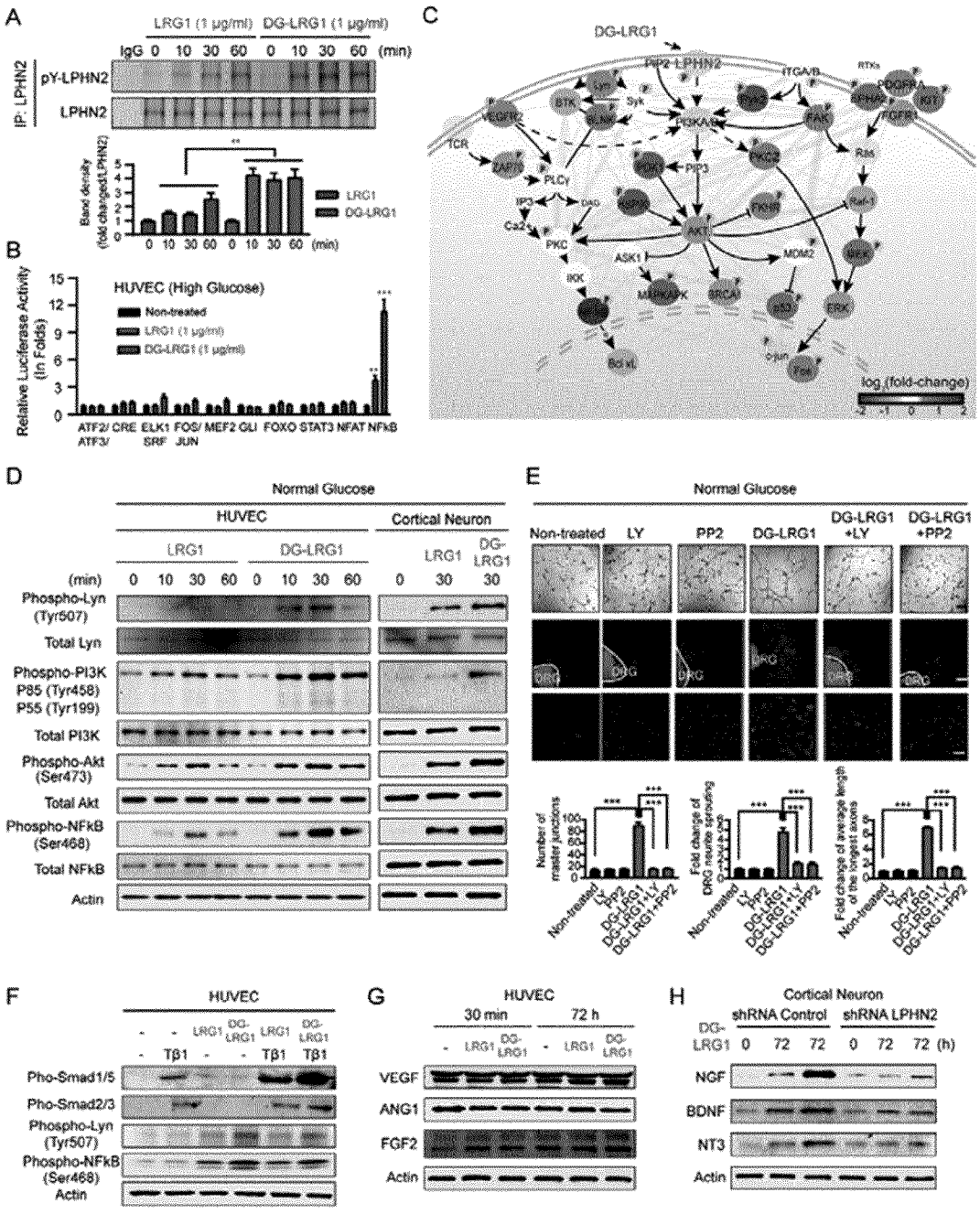
[도9]


A
LRRNT
LRR
LRRCT
B
N186
N79
N269
N325
C
N79
N186
N269
N325
Homo sapiens
Macaca mulatta
Mus musculus
Rattus norvegicus
Bos taurus
Canis lupus dingo
D
HUVEC tube formation / Normal glucose condition
LRG1
DG-LRG1
N79
N186
N269
N325
Number of master junctions
E
DRG explant / Normal Glucose
Fold change of DRG neurite sprouting
F
Cortical neuron, neurite outgrowth / Normal Glucose
Fold change of average length of the longest axons
N.S.
***

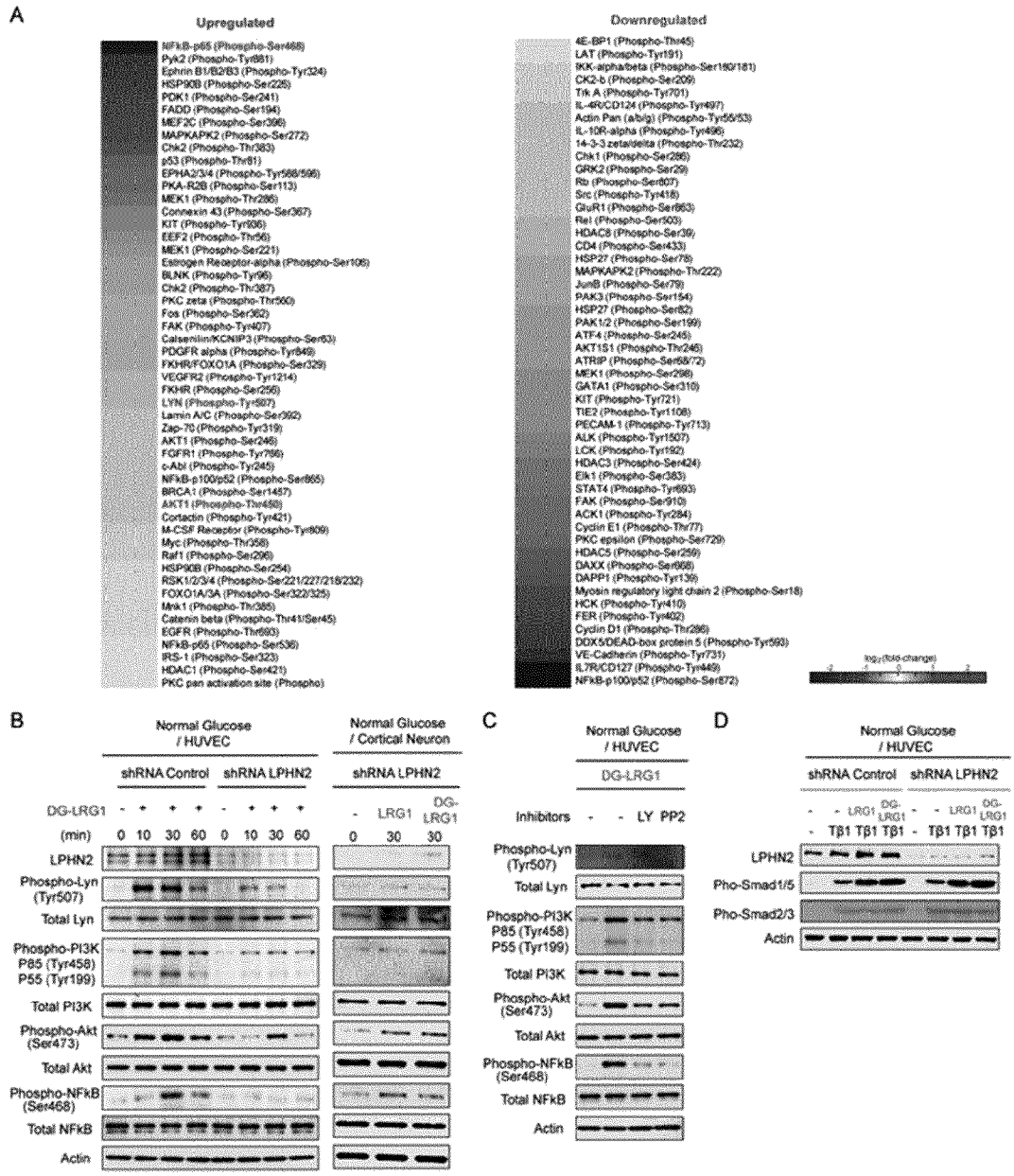
[도10]


A
huLRG1
maLRG1
muLRG1
raLRG1
boLRG1
caLRG1
LxxLx
LxxNxL
LxxLxLxxNxL
LxxLxLxxNxL
LxxLxLxxNxL
LxxLxLxxNxL
LxxLxLxxNxL
Disulfide bridge
N-acetylglucosamine
Phenylalanine spine
B
LRRNT
LRG1 (39S-93K)
LGR5 (4KNG, 30G-90R)
LRRCT
LRG1 (286P-347Q, CF2 class)
RP105 (3B2D, 567S-626G, CF2 class)
TLR7 (5ZSG, 770N-835L, CF1 class)
BRI1 (3RIZ, 748F-771D, CF4 class)

[도11]


A
LRG1 (1 μg/ml)
DG-LRG1 (1 μg/ml)
IgG 0 10 30 60 0 10 30 60 (min)
IP: LPHN2
pY-LPHN2
LPHN2
Band density (fold changed/LPHN2)
LRG1
DG-LRG1
B
HUVEC (High Glucose)
Non-treated
LRG1 (1 μg/ml)
DG-LRG1 (1 μg/ml)
Relative Luciferase Activity (In Folds)
ATF2/ ATF3/ CRE ELK1 SRF FOS/ JUN MEF2 GLI FOXO STAT3 NFAT NFkB
C
DG-LRG1
LPHN2
ITGA/B
RTKs
PDGFRA
KIT
FGFR1
VEGFR2
BTK
Lyn
Syk
PI3K
FAK
TCR
ZAP70
PLCγ
PDK1
PIP3
PKCδ
Ras
IP3
DAG
Ca2+
PKC
AKT
FKHR
Raf-1
ASK1
MDM2
IKK
MAPKAPK
BRCA1
p53
ERK
Bcl-xL
c-Jun
Fos
log (fold-change)
D
Normal Glucose
HUVEC
Cortical Neuron
LRG1
DG-LRG1
(min) 0 10 30 60 0 10 30 60 0 30 30
Phospho-Lyn (Tyr507)
Total Lyn
Phospho-PI3K P85 (Tyr458) P55 (Tyr199)
Total PI3K
Phospho-Akt (Ser473)
Total Akt
Phospho-NFkB (Ser468)
Total NFkB
Actin
E
Normal Glucose
Non-treated
LY
PP2
DG-LRG1
DG-LRG1 +LY
DG-LRG1 +PP2
DRG
Number of master junctions
Fold change of DRG neurite sprouting
Fold change of average length of the longest axons
F
HUVEC
Tβ1
Pho-Smad1/5
Pho-Smad2/3
Phospho-Lyn (Tyr507)
Phospho-NFkB (Ser468)
Actin
G
HUVEC
30 min
72 h
VEGF
ANG1
FGF2
Actin
H
Cortical Neuron
shRNA Control
shRNA LPHN2
DG-LRG1 0 72 72 0 72 72 (h)
NGF
BDNF
NT3
Actin

[도12]


A
Upregulated
NFkB-p65 (Phospho-Ser468)
PyK2 (Phospho-Tyr881)
Ephrin B1/B2/B3 (Phospho-Tyr324)
HSP90B (Phospho-Ser225)
PDK1 (Phospho-Ser241)
FADD (Phospho-Ser194)
MEF2C (Phospho-Ser396)
MAPKAPK2 (Phospho-Ser272)
Chk2 (Phospho-Thr383)
p53 (Phospho-Thr81)
EPHA2/3/4 (Phospho-Tyr588/596)
PKA-R2B (Phospho-Ser113)
MEK1 (Phospho-Thr286)
Connexin 43 (Phospho-Ser367)
KIT (Phospho-Tyr936)
EEF2 (Phospho-Thr56)
MEK1 (Phospho-Ser221)
Estrogen Receptor-alpha (Phospho-Ser106)
BLNK (Phospho-Tyr96)
Chk2 (Phospho-Thr387)
PKC zeta (Phospho-Thr560)
Fos (Phospho-Ser362)
FAK (Phospho-Tyr407)
Calsenilin/KCNIP3 (Phospho-Ser63)
PDGFR alpha (Phospho-Tyr849)
FKHR/FOXO1A (Phospho-Ser329)
VEGFR2 (Phospho-Tyr1214)
FKHR (Phospho-Ser256)
LYN (Phospho-Tyr507)
Lamin A/C (Phospho-Ser392)
Zap-70 (Phospho-Tyr319)
AKT1 (Phospho-Ser246)
FGFR1 (Phospho-Tyr766)
c-Abl (Phospho-Tyr245)
NFkB-p100/p52 (Phospho-Ser865)
BRCA1 (Phospho-Ser1457)
AKT1 (Phospho-Thr450)
Cortactin (Phospho-Tyr421)
M-CSF Receptor (Phospho-Tyr809)
Myc (Phospho-Thr358)
Raf1 (Phospho-Ser296)
HSP90B (Phospho-Ser254)
RSK1/2/3/4 (Phospho-Ser221/227/218/232)
FOXO1A/3A (Phospho-Ser322/325)
Mnk1 (Phospho-Thr385)
Catenin beta (Phospho-Thr41/Ser45)
EGFR (Phospho-Thr693)
NFkB-p65 (Phospho-Ser536)
IRS-1 (Phospho-Ser323)
HDAC1 (Phospho-Ser421)
PKC pan activation site (Phospho)
Downregulated
4E-BP1 (Phospho-Thr45)
LAT (Phospho-Tyr191)
IKK-alpha/beta (Phospho-Ser180/181)
CK2-b (Phospho-Ser209)
Trk A (Phospho-Tyr701)
IL-4R/CD124 (Phospho-Tyr497)
Actin Pan (a/b/g) (Phospho-Tyr55/53)
IL-10R-alpha (Phospho-Tyr496)
14-3-3 zeta/delta (Phospho-Thr232)
Chk1 (Phospho-Ser286)
GRK2 (Phospho-Ser29)
Rb (Phospho-Ser807)
Src (Phospho-Tyr418)
GluR1 (Phospho-Ser863)
Rel (Phospho-Ser503)
HDAC8 (Phospho-Ser39)
CD4 (Phospho-Ser433)
HSP27 (Phospho-Ser78)
MAPKAPK2 (Phospho-Thr222)
JunB (Phospho-Ser79)
PAK3 (Phospho-Ser154)
HSP27 (Phospho-Ser82)
PAK1/2 (Phospho-Ser199)
ATF4 (Phospho-Ser245)
AKT1S1 (Phospho-Thr246)
ATRIP (Phospho-Ser68/72)
MEK1 (Phospho-Ser298)
GATA1 (Phospho-Ser310)
KIT (Phospho-Tyr721)
TIE2 (Phospho-Tyr1108)
PECAM-1 (Phospho-Tyr713)
ALK (Phospho-Tyr1507)
LCK (Phospho-Tyr192)
HDAC3 (Phospho-Ser424)
Elk1 (Phospho-Ser383)
STAT4 (Phospho-Tyr693)
FAK (Phospho-Ser910)
ACK1 (Phospho-Tyr284)
Cyclin E1 (Phospho-Thr77)
PKC epsilon (Phospho-Ser729)
HDAC5 (Phospho-Ser259)
DAXX (Phospho-Ser668)
DAPP1 (Phospho-Tyr139)
Myosin regulatory light chain 2 (Phospho-Ser18)
HCK (Phospho-Tyr410)
FER (Phospho-Tyr402)
Cyclin D1 (Phospho-Thr286)
DDX5/DEAD-box protein 5 (Phospho-Tyr593)
VE-Cadherin (Phospho-Tyr731)
IL7R/CD127 (Phospho-Tyr449)
NFkB-p100/p52 (Phospho-Ser872)
log2(fold-change)
B
Normal Glucose / HUVEC
Normal Glucose / Cortical Neuron
shRNA Control
shRNA LPHN2
shRNA LPHN2
DG-LRG1
LRG1
(min)
LPHN2
Phospho-Lyn (Tyr507)
Total Lyn
Phospho-PI3K P85 (Tyr458) P55 (Tyr199)
Total PI3K
Phospho-Akt (Ser473)
Total Akt
Phospho-NFkB (Ser468)
Total NFkB
Actin
C
Normal Glucose / HUVEC
DG-LRG1
Inhibitors
LY
PP2
Phospho-Lyn (Tyr507)
Total Lyn
Phospho-PI3K P85 (Tyr458) P55 (Tyr199)
Total PI3K
Phospho-Akt (Ser473)
Total Akt
Phospho-NFkB (Ser468)
Total NFkB
Actin
D
Normal Glucose / HUVEC
shRNA Control
shRNA LPHN2
LRG1
DG-LRG1
Tβ1
LPHN2
Pho-Smad1/5
Pho-Smad2/3
Actin

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2022/001179

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/47(2006.01)i; **A61K 38/17**(2006.01)i; **A61P 25/00**(2006.01)i; **A61P 9/00**(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 14/47(2006.01); A61K 39/395(2006.01); A61K 47/68(2017.01); A61K 48/00(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: LRG1(Leucine-Rich alpha-2-Glycoprotein 1), Fc, 융합(fusion), LPHN2(latrophilin-2), 탈당(deglycosylation), 변이체(variant)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	ANDERSEN, J. D. et al. Leucine-rich alpha-2-glycoprotein-1 is upregulated in sera and tumors of ovarian cancer patients. Journal of ovarian research. 2010, vol. 3, thesis no. 21, pp. 1-14.	
X	See abstract; and pages 4 and 8.	1
Y		2-3,16-19
A		4-15
	KR 10-2019-0082697 A (INHA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION et al.) 10 July 2019 (2019-07-10)	
DY	See abstract; SEQ ID NO: 1; paragraph [0010]; and claims 1, 3 and 13-16.	2-3,16-19
	ZHENG, Q. et a;l. Study of Cancer Related Proteins: LRG-1 and PD-L1. 2017. PhD Thesis, Cleveland State University. pp. 1-115.	
X	See pages 28 and 67.	7,11-15
Y		16-19
	US 2016-0184458 A1 (SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES, INC.) 30 June 2016 (2016-06-30)	
A	See abstract; table 1; and paragraphs [0065]-[0068].	1-19

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
04 May 2022	**04 May 2022**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 8790647 B2 (GREENWOOD, J. et al.) 29 July 2014 (2014-07-29) See entire document.	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2022/001179

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2022/001179

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

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

1. ☑ Claims Nos.: **20**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 20 pertains to a method for treatment of the human body, and thus pertains to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2022/001179

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2019-0082697 A	10 July 2019	KR 10-2002866 B1	23 July 2019
		KR 10-2018-0013738 A	07 February 2018
		KR 10-2162934 B1	07 October 2020
		WO 2018-021778 A1	01 February 2018
US 2016-0184458 A1	30 June 2016	EP 2970940 A1	20 January 2016
		EP 2970940 B1	25 July 2018
		EP 3431592 A1	23 January 2019
		ES 2692363 T3	03 December 2018
		US 2019-0388563 A1	26 December 2019
		WO 2014-152940 A1	25 September 2014
US 8790647 B2	29 July 2014	AU 2010-290986 A1	05 April 2012
		AU 2010-290986 B2	11 February 2016
		CA 2771965 A1	10 March 2011
		CA 2771965 C	11 December 2018
		CN 102596998 A	18 July 2012
		CN 102596998 B	16 March 2016
		EP 2473526 A1	11 July 2012
		EP 2473526 B1	09 August 2017
		ES 2647359 T3	21 December 2017
		JP 2013-503621 A	04 February 2013
		JP 2016-104757 A	09 June 2016
		JP 6242847 B2	06 December 2017
		US 2012-0231002 A1	13 September 2012
		US 2014-0377277 A1	25 December 2014
		US 9708397 B2	18 July 2017
		WO 2011-027129 A1	10 March 2011
		WO 2011-027129 A9	14 June 2012

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2022/001179

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 14/47(2006.01)i; **A61K 38/17**(2006.01)i; **A61P 25/00**(2006.01)i; **A61P 9/00**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 14/47(2006.01); A61K 39/395(2006.01); A61K 47/68(2017.01); A61K 48/00(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드:LRG1 (Leucine-Rich alpha-2-Glycoprotein 1), Fc, 융합(fusion), LPHN2(latrophilin-2), 탈당(deglycosylation), 변이체(variant)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	ANDERSEN, J. D. et al., `Leucine-rich alpha-2-glycoprotein-1 is upregulated in sera and tumors of ovarian cancer patients', Journal of ovarian research, 2010, 3권, 논문번호 21, 페이지 1-14 초록; 페이지 4, 8	1
Y		2-3,16-19
A		4-15
DY	KR 10-2019-0082697 A (인하대학교 산학협력단 등) 2019.07.10 요약; 서열번호 1; 단락 [0010]; 청구항 1, 3, 13-16	2-3,16-19
X	ZHENG, Q. 등, `Study of Cancer Related Proteins: LRG-1 and PD-L1', 2017, PhD Thesis, Cleveland State University, 페이지 1-115 페이지 28, 67	7,11-15
Y		16-19
A	US 2016-0184458 A1 (SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES, INC.) 2016.06.30 요약; 표 1; 단락 [0065]-[0068]	1-19

☑ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2022년05월04일(04.05.2022)	**2022년05월04일(04.05.2022)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관
대한민국 특허청 **(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)**	**허주형**
팩스 번호 **+82-42-481-8578**	전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2022/001179

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 8790647 B2 (GREENWOOD, J. 등) 2014.07.29 전체 문헌	1-19

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2022/001179

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

   a. ☑ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
      - ☑ 부록 C/ST.25 텍스트 파일
      - ☐ 서면 혹은 이미지 파일

   b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록

   c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
      - ☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
      - ☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2022/001179

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

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

1. ☑ 청구항: **20**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

청구항 20은 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제 17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2022/001179

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2019-0082697 A	2019/07/10	KR 10-2002866 B1	2019/07/23
		KR 10-2018-0013738 A	2018/02/07
		KR 10-2162934 B1	2020/10/07
		WO 2018-021778 A1	2018/02/01
US 2016-0184458 A1	2016/06/30	EP 2970940 A1	2016/01/20
		EP 2970940 B1	2018/07/25
		EP 3431592 A1	2019/01/23
		ES 2692363 T3	2018/12/03
		US 2019-0388563 A1	2019/12/26
		WO 2014-152940 A1	2014/09/25
US 8790647 B2	2014/07/29	AU 2010-290986 A1	2012/04/05
		AU 2010-290986 B2	2016/02/11
		CA 2771965 A1	2011/03/10
		CA 2771965 C	2018/12/11
		CN 102596998 A	2012/07/18
		CN 102596998 B	2016/03/16
		EP 2473526 A1	2012/07/11
		EP 2473526 B1	2017/08/09
		ES 2647359 T3	2017/12/21
		JP 2013-503621 A	2013/02/04
		JP 2016-104757 A	2016/06/09
		JP 6242847 B2	2017/12/06
		US 2012-0231002 A1	2012/09/13
		US 2014-0377277 A1	2014/12/25
		US 9708397 B2	2017/07/18
		WO 2011-027129 A1	2011/03/10
		WO 2011-027129 A9	2012/06/14