

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 10 월 8 일 (08.10.2020) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호
WO 2020/204612 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 15/82 (2006.01) A61P 3/06 (2006.01)
C07K 14/575 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)
A23L 33/18 (2016.01) A61P 9/10 (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01) A61P 9/12 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/004480

(22) 국제출원일: 2020 년 4 월 1 일 (01.04.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2019-0038211 2019 년 4 월 2 일 (02.04.2019) KR

(71) 출원인: 주식회사 바이오애플 (BIOAPPLICATIONS INC.) [KR/KR]; 37668 경상북도 포항시 남구 지곡로 394 (지곡동, 포항테크노파크), Gyeongsangbuk-do (KR).

(72) 발명자: 이용직 (LEE, Yong Jik); 37668 경상북도 포항시 남구 지곡로 394, 테크노빌 1001호, Gyeongsang-

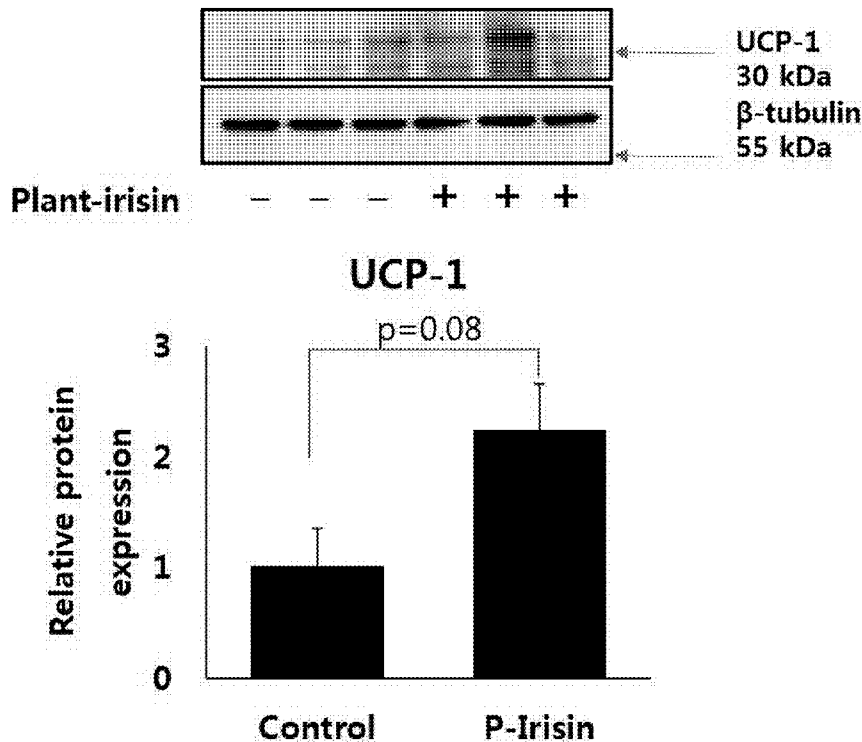
buk-do (KR). 허주영 (HUH, Joo Young); 61128 광주 시 북구 서하로 405, 101동 803호, Gwangju (KR). 박경희 (PARK, Kyung Hee); 14068 경기도 안양시 동안구 관평로170번길 22, 한림대학교 성심병원 가정의학과, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 이명진 (LEE, Myoung-Jin); 06180 서울시 강남구 영동대로85길 28, 6층, Seoul (KR).

(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, 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.

(54) Title: RECOMBINANT IRISIN GENE OPTIMIZED FOR EXPRESSION IN PLANTS AND METHOD FOR PRODUCING RECOMBINANT IRISIN PROTEIN USING SAME

(54) 발명의 명칭: 식물에서의 발현이 최적화된 재조합 이리신 유전자 및 이를 이용한 재조합 이리신 단백질의 생산 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a recombinant irisin gene optimized for expression in plants and comprising a base sequence consisting of SEQ ID NO: 1, a method for producing an irisin protein, and a composition for preventing or treating metabolic diseases, comprising same.

(57) 요약서: 본 발명은 식물에서의 발현이 최적화되며, 서열번호 1로 이루어지는 염기서열을 포함하는 재조합 이리신 유전자, 이리신 단백질의 생산방법 및 이를 포함하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 조성물 등에 관한 것이다.

[다음 쪽 계속]

WO 2020/204612 A1



(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))

명세서

발명의 명칭: 식물에서의 발현이 최적화된 재조합 이리신 유전자 및 이를 이용한 재조합 이리신 단백질의 생산 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 식물에서의 발현이 최적화되며, 서열번호 1로 이루어지는 염기서열을 포함하는 재조합 이리신 유전자, 이리신 단백질의 생산방법 및 이를 포함하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 조성물 등에 관한 것이다.
- [2] 본 출원은 2019년 4월 2일에 출원된 한국특허출원 제10-2019-0038211호에 기초한 우선권을 주장하며, 해당 출원의 명세서 및 도면에 개시된 모든 내용은 본 출원에 원용된다.

[3]

배경기술

- [4] 비만은 열량의 섭취와 소비의 불균형으로 발생하는 대사성 질환으로, 과잉 열량으로 지방 조직이 비정상적으로 증가한 상태를 말한다. 비만의 원인은 유전적 영향, 서구화되는 식생활에 의한 환경적인 영향, 스트레스에 의한 심리적인 영향 등 다양한 요인이 있으나, 정확한 발생과 진행의 기작에 대해서는 명확히 밝혀지지 않는 상태이다. 우리나라에서도 지방 섭취 비율이 빠르게 증가하면서 비만 발생률이 지속적으로 높아지고 있다. 국민건강영양조사에 따르면 우리나라 식단에서의 지방 섭취 비율은 1990년 9.6%에서 2007년 19.5%로 두 배 이상 증가하였는데, 동물성 지방 섭취의 증가가 이러한 지방섭취 증가의 주된 원인으로 밝혀졌다. 2010년 국내 성인 비만 인구는 3명 가운데 1명 꼴인 1200만 명에 이르고 있으며 특히 체질량 지수가 30 이상인 고도비만 인구는 161만 명으로, 불과 십 여년 만에 2배 이상 급증한 상황이다.
- [5] 비만은 그 자체의 문제점 뿐만 아니라, 비만 상태가 지속되면서 고혈압, 고인슐린혈증, 고지혈증, 지방간, 동맥경화증, 심장 혈관 질환, 폐쇄성 수면무호흡증, 특정 암, 관절염 등과 같은 다양한 질병과 합병증이 발생하여 종국적으로 생명을 단축시키기 때문에 더욱 위험하다. 또한 비만과 비만으로 인한 합병증으로 발생하는 사회경제적 비용도 막대하기 때문에 전 세계적으로 비만 치료에 많은 관심이 있지만, 아직까지 효과적인 비만 또는 과다 지방 축적으로 인한 대사성 질환의 치료제는 미비한 상황이다.
- [6] UCP1(Uncoupling protein-1)은 열의 생산을 담당하는 유전자로 갈색지방조직에서 열 발생의 역할을 담당한다. 미토콘드리아막에 존재하는 UCP1은 이 수소이온을 ATP를 합성하는 데 사용되지 못하게 하고, 열을 생산하는 데 이용되도록 하여 에너지를 열로 낭비되게 하는 물질이다. 동물에서는 갈색 지방세포에서 발현되며, 체온을 유지시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. UCP의 열 생산은 자연적으로 에너지 소비를 촉진한다.

- [7] 지방 세포에서 분비되는 아디포넥틴(adiponectin)은 항당뇨 작용을 비롯하여 다양한 효능을 나타내는 것으로 보고되어 있다. 즉, 특히 당뇨병에 있어서 아디포넥틴은 인슐린 감수성을 증가시켜 혈당을 낮춤으로써 당뇨병을 예방하는 효능을 나타낸다. 이러한 아디포넥틴은 지방세포가 분화되면서 발현이 증가하는 단백질로 보고되어 있다. 따라서 지방 세포 분화 과정 중 아디포넥틴의 발현을 증가시키는 물질은 비만, 당뇨를 포함한 대사성 질환의 예방 및 치료에 유용한 효과를 나타낼 수 있다.
- [8] 글리코실화된 112개 아미노산의 단백질 호르몬인 이리신(Irisin)은 FNDC5의 단백질 분해 절단(proteolytic cleavage)에 의해 형성된다. FNDC5의 생성은 근육에서의 운동에 의해 촉진되며, 이는 전사보조활성제인 PGC1a에 의해 이리신으로 전환 될 수 있다. 이리신은 근육에 의해 분비되고 지방 조직을 순환하며 에너지 대사를 조절한다. 이리신은 백색 지방 조직이 갈색 지방 조직으로 갈변하는 과정을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 이리신은 근육 조직에서 합성되어 소뇌의 Purkinje 세포와 세포간 신경 말단에 존재한다.
- [9] 한편, 이러한 질병을 예방하기 위한 단백질들을 생산/개발하고 있지만 단백질의 접힘(folding), 당화과정(glycosylation) 등의 문제로 인하여 박테리아를 이용하지 못하고, 주로 동물 세포를 이용하여 생산되고 있다. 그러나 동물 세포를 이용한 단백질의 생산 방법은 대량 생산을 위한 설비 확충에 큰 비용이 소요되기 때문에 제조가 용이하지 않고, 백신의 가격이 고가인 경우가 대부분이다. 또한, 동물 세포를 이용하여 제조된 단백질들은 저장이 용이하지 않을 뿐만 아니라, 동물에게 감염 가능한 바이러스에 오염될 가능성이 높다는 단점을 가지고 있다. 그러나 식물의 경우에는 동물 세포와 달리 동물에게 감염 가능한 바이러스에 오염될 가능성이 매우 낮고, 경작 면적만 확보되면 언제든지 대량 생산이 가능할 뿐만 아니라, 식물체를 통하여 장기 보관이 가능하기 때문에, 안정적으로 저렴한 단백질의 생산이 가능할 것으로 기대된다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술상의 문제점을 해결하기 위해 도출된 것으로, 식물체를 이용하여 효율적인 생산이 가능할 뿐만 아니라, 높은 생리활성 효과를 나타내는 재조합 이리신 유전자, 그를 이용한 재조합 이리신 단백질의 제조 방법, 상기 단백질의 대사성 질환 예방 또는 치료용 조성물 등을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.
- [12] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[13]

과제 해결 수단

[14]

본 발명은 식물에서의 발현이 최적화되며, 서열번호 1로 이루어지는 염기서열을 포함하는 재조합 이리신 유전자를 제공한다. 상기 재조합 이리신 유전자는 서열번호 1로 이루어지는 염기서열의 기능성 동등물도 본 발명의 권리범위에 포함되며, 상기 기능적 동등물이란, 염기의 부가, 치환, 또는 결실의 결과, 상기 염기서열과 적어도 60 % 이상, 바람직하게는 70 % 이상, 더욱 바람직하게는 80 % 이상, 가장 바람직하게는 90 % 이상의 서열 상동성을 가지는 것으로서, 상기 서열번호 1로 이루어지는 염기서열과 실질적으로 동질의 활성을 나타내는 유전자를 의미하며, 식물체를 이용하여 안정적으로 생산될 수 있는 재조합 이리신 단백질의 유전자 서열이라면 이에 제한되지 않는다.

[15]

또한, 본 발명은 상기 재조합 이리신 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[16]

본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 벡터는 프로모터 유전자 및 서열번호 1로 이루어지는 염기서열의 순서로 작동가능하도록 순차적으로 연결될 수 있다.

[17]

본 발명의 다른 구체예에서, 상기 재조합 벡터는 식물 유래 이리신 단백질을 발현하기 위한 것일 수 있다.

[18]

본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 프로모터는 꽃양배추 모자이크 바이러스(cauliflower mosaic virus) 유래 35S 프로모터, 꽃양배추 모자이크 바이러스(cauliflower mosaic virus) 유래 19S RNA 프로모터, 식물의 액틴 단백질 프로모터, 유비퀴틴 단백질 프로모터, CMV(Cytomegalovirus) 프로모터, SV40(Simian virus 40) 프로모터, RSV(Respiratory syncytial virus) 프로모터, EF-1 α (Elongation factor-1 α) 프로모터, pEMU 프로모터, MAS 프로모터, 히스톤 프로모터, Clp 프로모터 등이나, 이에 제한되지 않는다.

[19]

본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 재조합 발현 벡터는 BiP(Chaperone binding protein)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 6개의 히스티딘으로 이루어진 펩타이드를 코딩하는 유전자 등을 추가로 포함할 수 있다.

[20]

본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 벡터는 도 1에 기재된 개열지도를 포함할 수 있다.

[21]

본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 벡터는 BiP(Chaperone binding protein) 유전자 및 태그용 유전자로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 코딩하는 유전자를 추가로 포함할 수 있다.

[22]

또한, 본 발명은 상기 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

[23]

본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 형질전환체는 바람직하게는 대장균, 바실러스, 살모넬라, 효모 등과 같은 미생물, 곤충 세포, 인간을 포함한 동물 세포, 마우스, 래트, 개, 원숭이, 돼지, 말, 소 등과 같은 동물, 아그로박테리움 튜머패시언스, 식물 등일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩,

감자, 밀, 쌀, 귀리, 및 수수를 포함하는 식량작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파, 및 당근을 포함하는 채소작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩, 및 유채를 포함하는 특용작물류; 및 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 및 바나나를 포함하는 과수류; 및 장미, 카네이션, 국화, 백합, 및 튤립을 포함하는 화훼류 등일 수 있으나, 본 발명의 벡터로 형질전환될 수 있는 생명체라면 이에 제한되지 않는다.

[24] 본 발명의 다른 구체예에 있어서, 상기 형질전환체는 식물 또는 식물 세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[25] 또한, 본 발명은 (a) 상기 형질전환체를 배양하는 단계; 및 (b) 상기 형질전환체 또는 배양액으로부터 재조합 이리신 단백질을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는 재조합 이리신 단백질의 생산 방법을 제공한다. 상기 형질전환체는 바람직하게는 세포 자체, 식물체, 또는 세포를 포함하는 배양물일 수 있으며, 상기 배양액은 바람직하게는 세포를 배양한 후, 세포를 제거한 배양액일 수 있으나, 본 발명의 재조합 단백질을 포함하고 있다면 이에 제한되지 않는다.

[26] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 단계 (b)의 정제는 수용성 분획을 사용하여 정제하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[27] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 생산된 식물 유래 재조합 이리신 단백질을 유효성분으로 포함하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[28] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 생산된 식물 유래 재조합 이리신 단백질을 유효성분으로 포함하는 대사성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[29] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 생산된 식물 유래 재조합 이리신 단백질을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 대사성 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[30] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 생산된 식물 유래 재조합 이리신 단백질의 대사성 질환 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

[31] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 생산된 식물 유래 재조합 이리신 단백질의 대사성 질환 치료용 약제 제조를 위한 용도를 제공한다.

[32] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 대사성 질환은 바람직하게는 비만, 당뇨, 고혈압, 고지혈증, 고중성지방혈증, 고콜레스테롤증, 지방간 또는 동맥경화증 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[33] 본 발명의 다른 구체예에 있어서, 상기 재조합 이리신 단백질은 당화된 재조합 이리신 단백질 및 비당화된 재조합 이리신 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[34] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 재조합 이리신 단백질은 서열번호 4로 이루어지는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [35] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 생산된 식물 유래 재조합 이리신 단백질을 포함하는 갈색 지방 세포 분화 유도용 조성물을 제공한다.
- [36] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 생산된 식물 유래 재조합 이리신 단백질을 백색 지방세포에 처리하는 단계를 포함하는, 백색 지방세포로부터 갈색 지방세포로의 분화 유도 방법을 제공한다.

[37]

발명의 효과

- [38] 본 발명의 재조합 이리신 단백질은 식물체에서도 효과적으로 발현될 뿐만 아니라, 높은 수용해성을 가지고 있어 분리 및 정제가 용이하고, 또한, UCP1 및 아디포넥틴의 발현증가 효과를 나타내므로 대사성질환의 치료에 유용하게 이용가능할 것으로 기대된다.

[39]

도면의 간단한 설명

- [40] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 식물체에서 이리신(Irisin)의 발현을 위한 유전자의 배열을 나타낸 도면이다.
- [41] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 식물체에서 이리신의 발현을 웨스턴 블롯팅으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [42] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 식물유래 재조합 이리신의 분리 정제 결과를 나타낸 도면이다.
- [43] 도 4은 본 발명의 일 실시예에 따른 엔도 H 글라이코시데이즈 처리를 통한 재조합 이리신의 당화여부를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [44] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 3T3-L1 지방세포에 재조합 이리신 단백질을 자극 후 세포 내 UCP-1 단백질의 변화를 웨스턴 블롯팅한 결과이다.
- [45] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 3T3-L1 지방세포에 재조합 이리신 단백질을 자극 후 세포 내 아디포넥틴 단백질의 변화를 웨스턴 블롯팅한 결과이다. (*p<0.05 vs control)

[46]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [47] 본 발명에서는 서열번호 1로 이루어지는 이리신 유전자를 이용하면, 식물체에서도 높은 생리활성을 가지는 이리신 단백질을 효율적으로 생산 및 분리가 가능할 뿐만 아니라, 기존 이리신 단백질의 생리활성을 유지하는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 이리신 단백질은 안정적인고 효율적인 대량 생산이 가능하기 때문에, 저렴하며 안정적인 이리신 단백질을 제공할 수 있을 것으로 기대된다.
- [48] 본 명세서에 있어서, "재조합 이리신 유전자"는 서열번호 1로 이루어지는 유전자 염기서열을 포함하는 것일 수 있고, 바람직하게는 서열번호 1로 이루어지는 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 유전자 변이체가 본

발명의 범위에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열과 70 % 이상, 더욱 바람직하게는 80 % 이상, 가장 바람직하게는 90 % 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%의 서열 상동성을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

- [49] 본 명세서에 있어서, "발현용 벡터(expression vector)"란 벡터 내에 삽입된 이종의 핵산에 의해 코딩되는 펩타이드 또는 단백질을 발현할 수 있는 벡터를 지칭하는 것으로, 바람직하게는 재조합 이리신 단백질을 발현할 수 있도록 제조된 벡터를 의미한다. 상기 "벡터"는 시험관 내, 생체 외 또는 생체 내에서 숙주 세포로 염기의 도입 및/또는 전이를 위한 임의의 매개물을 말하며, 다른 DNA 단편이 결합하여 결합된 단편의 복제를 가져올 수 있는 복제단위(replicon)일 수 있으며, "복제 단위"란 생체 내에서 DNA 복제의 자가 유닛으로서 기능하는, 즉, 스스로의 조절에 의해 복제가능한, 임의의 유전적 단위(예를 들면, 플라스미드, 파지, 코스미드, 염색체, 바이러스 등)를 말한다. 본 발명의 재조합 발현 벡터는 바람직하게는 RNA 중합효소가 결합하는 전사 개시 인자인 프로모터(promoter), 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열과 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열, 터미네이터 등을 포함할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 단백질의 합성량을 증가시키기 위한 M17의 5' UTR 부위 유전자, 목적 단백질을 소포체로 이동시키기 위한 BiP 유전자, 재조합 단백질을 용이하게 분리하기 위한 태그용 유전자 등을 포함할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 형질전환체를 선별하기 위한 항생제 내성 유전자 등의 선별용 마커 유전자 등을 추가로 포함할 수 있다.

- [50] 상기 "BiP 유전자"는 발현된 재조합 단백질을 소포체로 이동시키기 위해 사용되었던 BiP 서열 중 일부로서, 바람직하게는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 유전자이고 가장 바람직하게는 서열번호 2로 이루어지는 유전자이나, 서열번호 2의 염기서열과 80 % 이상, 더욱 바람직하게는 90 % 이상, 더욱 바람직하게는 95 % 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드에 대한 "서열 상동성의 %"는 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서 폴리뉴클레오타이드 서열의 일부는 더 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다. 상기 "BiP 유전자"는 발현 재조합 단백질을 소포체로 이동시키기 위해 사용되는 것으로, 식물세포에서 발현된 후 잘려나가게 된다.

- [51] 상기, "태그용 유전자"는 바람직하게는 1개 내지 10개의 히스티딘(Histidine)으로 이루어진 펩타이드 단편 즉, His-태그를 사용할 수 있다. 가장 바람직하게 6개의 히스티딘으로 이루어진 펩타이드 단편이 부착되는 것일 수 있으며, 서열번호 3의 염기서열로 표시된다. 상기에서 히스티딘 잔기는

제조합 단백질을 발현시킨 후 정제시 필요한 꼬리표(tag)로 가장 많이 이용되는 tag 중나로, 특이성(specificity)이 높아야 하고 원하는 단백질의 구조에 영향을 최대한 적게 주어야 한다. 바람직하게는 Histidine이 1개 내지는 10개가 연속으로 오는 peptide로 구성될 수 있는데, size가 작고 원래의 protein 구조에 영향도 별로 주지 않기 때문에 제조합 단백질을 만든 후 따로 잘라주지 않아도 된다는 편의성이 있다. tag은 vector의 종류에 따라 target protein의 N-terminus(앞쪽), C-terminus(뒤쪽) 어느 쪽에도 만들 수 있고, 단백질의 구조의 영향을 주는 것에 따라 앞 또는 뒤쪽을 결정할 수 있다.

- [52] 상기 선별용 마커 유전자에는 일레로 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스포노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페닐콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자, aadA 유전자 등이 포함될 수 있으며, 상기 프로모터에는 일레로 pEMU 프로모터, MAS 프로모터, 히스톤 프로모터, Clp 프로모터, 꽃양배추 모자이크 바이러스(cauliflower mosaic virus) 유래 35S 프로모터, 꽃양배추 모자이크 바이러스(cauliflower mosaic virus) 유래 19S RNA 프로모터, 식물의 액틴 단백질 프로모터, 유비퀴틴 단백질 프로모터, CMV(Cytomegalovirus) 프로모터, SV40(Simian virus 40) 프로모터, RSV(Respiratory syncytial virus) 프로모터, EF-1 α (Elongation factor-1 alpha) 프로모터 등이 포함될 수 있으며, 상기 터미네이터는 일레로 노팔린 신타아제(NOS), 벼 아밀 라아제 RAmy1 A 터미네이터, 파세올린 터미네이터, 아그로박테리움 투마파시엔스의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터, 대장균의 rrnB1/B2 터미네이터 등이나, 상기 예는 예시일 뿐 이에 제한되지 않는다.
- [53] 본 명세서에 있어서, 상기 "벡터"는 도 1에 개시된 개열지도를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [54] 본 명세서에 있어서, 상기 "벡터"는 바람직하게는 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 유전자이고 가장 바람직하게는 서열번호 8으로 이루어지는 아미노산 서열로 이루어지나, 서열번호 8의 서열과 80 % 이상, 더욱 바람직하게는 90 % 이상, 더욱 바람직하게는 95 % 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [55] 또한, 상기 벡터의 아미노산 서열은 서열번호 7로 이루어지는 유전자 서열로 암호화되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 7의 염기서열과 90 % 이상, 더욱 바람직하게는 95 % 이상, 가장 바람직하게는 98 % 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 더 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

- [56] 본 명세서에 있어서, "형질전환(transformation)"이란 주입된 DNA에 의하여 생물의 유전적인 성질이 변하는 것을 총칭하며, "형질전환체(transgenic organism)"란 분자유전학적 방법으로 외부의 유전자를 주입하여 제조된 생명체로서, 바람직하게는 본 발명의 재조합 발현 벡터에 의하여 형질전환된 생명체이며, 상기 생명체는 미생물, 진핵세포, 곤충, 동물, 식물 등 생명이 있는 생물이라면 제한이 없으며, 바람직하게는 대장균, 살모넬라, 바실러스, 효모, 동물 세포, 마우스, 래트, 개, 원숭이, 돼지, 말, 소, 아크로박테리움 튜머패시언스, 식물 등이나 이에 제한되지 않는다.
- [57] 본 명세서에 있어서, "식물"은 단백질을 대량 생산할 수 있는 식물이라면 제한 없이 사용될 수 있으나, 보다 구체적으로는 담배, 애기장대, 옥수수, 벼, 대두, 카놀라, 알팔파, 해바라기, 알팔파, 수수, 밀, 목화, 땅콩, 토마토, 감자, 상추 및 고추로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으며, 바람직하게는 담배일 수 있다. 본 발명에서의 담배는 담배 속(*Nicotiana* genus) 식물로서 단백질을 과발현할 수 있는 것이라면 특별히 종류의 제한을 받지 않으며, 형질전환 방법과 단백질 대량 생산의 목적에 맞게 적절한 품종을 선택하여 본 발명을 실시할 수 있다. 예를 들어 *Nicotiana benthamiana* L.나 *Nicotiana tabacum* cv. *xanthi* 등의 품종을 이용할 수 있다.
- [58] 본 명세서에 있어서, 상기 형질전환체는 식물 또는 식물의 세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [59] 상기 형질전환체는 형질전환(transformation), 형질감염(transfection), 아그로박테리움(*Agrobacterium*)-매개 형질전환 방법, 입자 총 충격법(particle gun bombardment), 초음파 처리법(sonication), 전기충격법(electroporation) 및 PEG(Polyethylen glycol)-매개 형질전환 방법 등의 방법으로 제조될 수 있으나, 본 발명의 벡터를 주입할 수 있는 방법이라면 제한이 없다.
- [60] 본 명세서에 있어서, "용해성(solubility)"이란 목적 단백질 또는 펩타이드가 인체에 투여하기 적합한 용매에 용해될 수 있는 정도를 의미한다. 구체적으로는 특정 온도에서 주어진 용매에 대하여 용질이 포화된 정도를 나타내는 것일 수 있다. 용해성은 용질의 포화 농도를 결정함으로써 측정할 수 있으며, 예컨대 용매에 용질을 과량으로 첨가하고 이를 교반하고 여과한 다음, 농도를 UV 분광기 또는 HPLC 등을 사용하여 측정할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 높은 용해성은 재조합 단백질의 분리정제에 유리하며, 재조합 단백질의 응집이 억제되어 재조합 단백질의 생리활성 또는 약리적인 활성을 유지하는데 장점을 가진다.
- [61] 본 발명의 "재조합 이리신 단백질"은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하며, 바람직하게는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진다. 본 발명의 일실시예에 따르면, 본 발명의 재조합 이리신 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 식물에서 생산된 재조합 이리신 단백질은 바람직하게는 당화된 재조합 이리신 단백질 및 비당화된 재조합 이리신 단백질로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된

- 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 당화된 재조합 이리신 단백질 및 비당화된 재조합 이리신 단백질을 모두 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [62] 본 발명에서 사용하는 용어 "당화(glycosylation)"는 세포(진핵생물)의 단백질 번역 후 과정으로써 N-당화와 O-당화로 나뉘는데 이는 붙는 작용기에 따라 다르며 세포에서 생성된 단백질에 락토스(lactose) 등의 당이 붙는 과정을 통틀어 "당화"라고 한다. 당화 과정으로 당사슬이 단백질에 연결되면 단백질이 "폴딩"과정을 거쳐 입체적인 구조물을 형성하며 이는 단백질이 풀어지지 않고 오랫동안 유지될 수 있는 안정성을 부여한다. 또한 단백질에 붙어있는 당사슬을 세포막으로 가서 세포막 단백질이 되어 항원과 같은 효과를 내기도 한다. 상기와 같이 당화된 단백질을 당단백질이라고 하는데 대표적인 당단백질에는 면역반응에서 중요한 역할을 하는 항체 등이 있다. 본 발명에 사용된 서열번호 8의 벡터의 아미노산 서열을 이용하여 당화여부 예측 프로그램(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)을 작동시켜 본 결과 16번째 또는 61번째 Asparagine(N)에서 N-당화가 일어날 것으로 예측되었다.
- [63] 따라서, 본 발명에 사용된 재조합 이리신 단백질은 당화된 재조합 이리신 단백질 및 비당화된 재조합 이리신 단백질로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 것일 수 있으며, 상기 당화된 재조합 이리신 단백질은 서열번호 4로 이루어지는 재조합 이리신 단백질의 8번째 및/또는 53번째 Asparagine(N)에서 N-당화가 일어난 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고 본 발명과 동등한 효과를 갖는 범위 내에서 변형이 가능하다.
- [64] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 재조합 이리신 단백질을 포함하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 및 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [65] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 재조합 이리신 단백질을 포함하는 갈색 지방 세포 분화 유도용 조성물을 제공한다.
- [66] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 상기 방법으로 생산된 식물 유래 재조합 이리신 단백질을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 대사성 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [67] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 상기 방법으로 생산된 식물 유래 재조합 이리신 단백질의 대사성 질환 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [68] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 생산된 식물 유래 재조합 이리신 단백질의 대사성 질환 치료용 약제 제조를 위한 용도를 제공한다.
- [69] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 대사성 질환은 바람직하게는 비만, 당뇨, 고혈압, 고지혈증, 고중성지방혈증, 고콜레스테롤증, 지방간 또는 동맥경화증 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [70] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 생산된 식물 유래 재조합 이리신 단백질을 포함하는 갈색 지방 세포 분화 유도용 조성물을 제공한다.
- [71] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 생산된 식물 유래 재조합 이리신 단백질을 백색 지방세포에 처리하는 단계를 포함하는, 백색 지방세포로부터 갈색

지방세포로의 분화 유도 방법을 제공한다.

- [72] 본 명세서에 있어서 "대사성 질환"은 에너지 과잉 섭취 또는 호르몬 불균형 등 다양한 원인으로 체내 에너지 대사가 비정상적으로 일어나 지방이 과다하게 합성되거나 축적되어 발생하는 질환을 의미한다. 상기 대사성 질환은 구체적으로는 비만, 당뇨, 고혈압, 고지혈증, 고중성지방혈증, 고콜레스테롤증, 지방간 또는 동맥경화증일 수 있다.
- [73] 본 발명에서 상기 재조합 이리신 단백질은 세포 내 UCP1(Uncoupling protein 1)의 발현을 증가시킴으로써, 이리신의 기능으로 알려진 백색지방세포를 갈색지방세포로 바꾸어 비만, 당뇨 등 대사성 질환을 치료하는데 효과가 있다.
- [74] 본 발명에서 상기 재조합 이리신 단백질은 세포 내 아디포넥틴(adiponectin)의 발현을 증가시킴으로써, 인슐린 저항성을 개선하는 등 대사성질환을 치료하는데 효과가 있다.
- [75] 본 발명에서, "갈색 지방세포 (Brown Adipocyte; BA)"란 백색지방세포와는 반대로, 지방산을 산화 분해하여 그 에너지를 열로서 방출하는 세포이다. 이것은, 갈색 지방 세포가 특이적으로 발현하는 미토콘드리아 내막 단백질, UCP1(Uncoupling protein 1) 이, 산화적 인산화를 탈공액시키기 때문이다. 마우스 등 설치류에서는, BA 세포는 견갑골간, 후경부, 종격, 신장 주위 등에 존재한다. 또한, UCP1 녹아웃 마우스의 해석 등으로부터, BA 세포는 비만과 내당능 이상을 억제하는 것으로 알려져 있다.
- [76] 본 발명에 따른 조성물의 이리신은 그 자체 또는 염, 바람직하게는 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용될 수 있다. 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용가능한 염"이란 약학적으로 허용되는 무기산, 유기산, 또는 염기로부터 유도된 염을 포함한다.
- [77] 적합한 산의 예로는 염산, 브롬산, 황산, 질산, 과염소산, 푸마르산, 말레산, 인산, 글리콜산, 락트산, 살리실산, 숙신산, 톨루엔-p-설폰산, 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 메탄설폰산, 포름산, 벤조산, 말론산, 글루콘산, 나프탈렌-2-설폰산, 벤젠설폰산 등을 들 수 있다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴과 같은 수혼화성 유기 용매를 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한, 동물량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올을 가열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시켜 제조할 수 있다.
- [78] 적합한 염기로부터 유도된 염은 나트륨, 칼륨 등의 알칼리 금속, 마그네슘 등의 알칼리 토금속, 및 암모늄 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리토 금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻을 수 있다. 이 때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하며, 또한 이에

대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

- [79] 본 발명의 조성물 내의 상기 이리신의 함량은 질환의 증상, 증상의 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 내지 99.9중량%, 또는 0.001 내지 50중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 함량비는 용매를 제거한 건조량을 기준으로 한 값이다.
- [80] 본 발명에 따른 이리신의 약학적으로 유효한 양으로는 0.001 내지 300mg/day/체중kg, 바람직하게는 0.01 내지 200mg/day/체중kg이다. 그러나, 상기 약학적으로 유효한 양은 질환 및 이의 중증정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등과 같은 여러 인자에 따라 적절히 변화될 수 있다.
- [81] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 붕해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅 물질, 및 제어방출첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [82] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정, 경질캡슐제, 연질캡슐제, 서방캡슐제, 장용캡슐제, 환제, 틸크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.
- [83] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [84] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [85] 본 발명에 따른 정제, 산제, 과립제, 캡슐제, 환제, 트로키제의 첨가제로 옥수수전분, 감자전분, 밀전분, 유당, 백당, 포도당, 과당, 디-만니톨, 침강탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘, 염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제 라놀린, 미결정셀룰로오스, 덱스트린, 알긴산나트륨, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 카올린, 요소, 콜로이드성실리카겔, 히드록시프로필스타치, 히드록시프로필메칠셀룰로오스,

1928, 2208, 2906, 2910, 프로필렌글리콜, 카제인, 젯산칼슘, 프리모젤 등 부형제; 젤라틴, 아라비아고무, 에탄올, 한천가루, 초산프탈산셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 포도당, 정제수, 카제인나트륨, 글리세린, 스테아린산, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 덱스트린, 히드록시셀룰로오스, 히드록시프로필스타치, 히드록시메칠셀룰로오스, 정제셀락, 전분호, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제가 사용될 수 있으며, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 옥수수전분, 한천가루, 메칠셀룰로오스, 벤토나이트, 히드록시프로필스타치, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 알긴산나트륨, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 구연산칼슘, 라우릴황산나트륨, 무수규산, 1-히드록시프로필셀룰로오스, 덱스트란, 이온교환수지, 초산폴리비닐, 포름알데히드처리 카제인 및 젤라틴, 알긴산, 아밀로오스, 구아르고무(Guar gum), 중조, 폴리비닐피롤리돈, 인산칼슘, 겔화전분, 아라비아고무, 아밀로펙틴, 펙틴, 폴리인산나트륨, 에칠셀룰로오스, 백당, 규산마그네슘알루미늄, 디-소르비톨액, 경질무수규산 등 봉해제; 스테아린산칼슘, 스테아린산마그네슘, 스테아린산, 수소화식물유(Hydrogenated vegetable oil), 탈크, 석송자, 카올린, 바셀린, 스테아린산나트륨, 카카오지, 살리실산나트륨, 살리실산마그네슘, 폴리에틸렌글리콜 4000, 6000, 유동파라핀, 수소첨가대두유(Lubri wax), 스테아린산알루미늄, 스테아린산아연, 라우릴황산나트륨, 산화마그네슘, 마크로폴(Macrolog), 합성규산알루미늄, 무수규산, 고급지방산, 고급알코올, 실리콘유, 파라핀유, 폴리에틸렌글리콜지방산에테르, 전분, 염화나트륨, 초산나트륨, 올레인산나트륨, dl-로이신, 경질무수규산 등의 활택제;가 사용될 수 있다.

[86] 본 발명에 따른 액제의 첨가제로는 물, 묽은 염산, 묽은 황산, 구연산나트륨, 모노스테아린산슈크로수류,

폴리옥시에틸렌소르비톨지방산에스테르류(트윈에스테르), 폴리옥시에틸렌모노알킬에테르류, 라놀린에테르류, 라놀린에스테르류, 초산, 염산, 암모니아수, 탄산암모늄, 수산화칼륨, 수산화나트륨, 프롤아민, 폴리비닐피롤리돈, 에칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨 등이 사용될 수 있다.

[87] 본 발명에 따른 시럽제에는 백당의 용액, 다른 당류 혹은 감미제 등이 사용될 수 있으며, 필요에 따라 방향제, 착색제, 보존제, 안정제, 현탁화제, 유화제, 점조제 등이 사용될 수 있다.

[88] 본 발명에 따른 유제에는 정제수가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 유화제, 보존제, 안정제, 방향제 등이 사용될 수 있다.

[89] 본 발명에 따른 현탁제에는 아카시아, 트라가칸타, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 미결정셀룰로오스,

알긴산나트륨, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 1828, 2906, 2910 등 현탁화제가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 계면활성제, 보존제, 안정제, 착색제, 방향제가 사용될 수 있다.

- [90] 본 발명에 따른 주사제에는 주사용 증류수, 0.9%염화나트륨주사액, 링겔주사액, 텍스트로스주사액, 텍스트로스+염화나트륨주사액, 피이지(PEG), 락테이티드 링겔주사액, 에탄올, 프로필렌글리콜, 비휘발성유-참기름, 면실유, 낙화생유, 콩기름, 옥수수기름, 올레인산에칠, 미리스트산 이소프로필, 안식향산벤젠과 같은 용제; 안식향산나트륨, 살리실산나트륨, 초산나트륨, 요소, 우레탄, 모노에칠아세트아마이드, 부타졸리딘, 프로필렌글리콜, 트윈류, 니정틴산아미드, 헥사민, 디메칠아세트아마이드와 같은 용해보조제; 약산 및 그 염(초산과 초산나트륨), 약염기 및 그 염(암모니아 및 초산암모늄), 유기화합물, 단백질, 알부민, 펩톤, 검류와 같은 완충제; 염화나트륨과 같은 등장화제; 중아황산나트륨(NaHSO_3)이산화탄소가스, 메타중아황산나트륨($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), 아황산나트륨(Na_2SO_3), 질소가스(N_2), 에칠렌디아민테트라초산과 같은 안정제; 소듐비설파이드 0.1%, 소듐포름알데히드 설포실레이트, 치오우레아, 에칠렌디아민테트라초산디나트륨, 아세톤소듐비설파이트와 같은 황산화제; 벤질알코올, 클로로부탄올, 염산프로카인, 포도당, 글루콘산칼슘과 같은 무통화제; 시엠시나트륨, 알긴산나트륨, 트윈 80, 모노스테아린산알루미늄과 같은 현탁화제를 포함할 수 있다.

- [91] 본 발명에 따른 좌제에는 카카오지, 라놀린, 위텟솔, 폴리에틸렌글리콜, 글리세로젤라틴, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 스테아린산과 올레인산의 혼합물, 수바날(Subanal), 면실유, 낙화생유, 야자유, 카카오버터+콜레스테롤, 레시틴, 라네트왁스, 모노스테아린산글리세롤, 트윈 또는 스팬, 임하우젠(Imhausen), 모놀렌(모노스테아린산프로필렌글리콜), 글리세린, 아덱스솔리두스(Adeps solidus), 부티룸 태고-G(Buytyrum Tego-G), 세베스파마 16 (Cebes Pharma 16), 헥사라이드베이스 95, 코토마(Cotomar), 히드록코테 SP, S-70-XXA, S-70-XX75(S-70-XX95), 히드록코테(Hydrokote) 25, 히드록코테 711, 이드로포스탈 (Idropostal), 마사에스트라리움(Massa estrarium, A, AS, B, C, D, E, I, T), 마사-MF, 마수폴, 마수폴-15, 네오수포스탈-엔, 파라마운드-B, 수포시로(OSI, OSIX, A, B, C, D, H, L), 좌제기제 IV 타입 (AB, B, A, BC, BBG, E, BGF, C, D, 299), 수포스탈 (N, Es), 웨코비 (W, R, S, M, Fs), 테제스터 트리글리세라이드 기제 (TG-95, MA, 57)와 같은 기제가 사용될 수 있다.

- [92] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.

- [93] 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [94] 본 발명에 따른 약학적 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 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [95] 본 발명에 따른 약학적 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 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [96] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 복용, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간(경막내) 주사, 설하 투여, 볼점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 안구 투여, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있다.
- [97] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자와 함께 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.
- [98] 본 명세서에 있어서, "개체(individual)"란 본 발명의 제조합 이리신 단백질이 투여될 수 있는 대상을 말하며, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [99] 본 발명에서 "투여"란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [100] 본 발명의 목적상 용어 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 대사성 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 대사성 질환의 발생 또는 재발 억제, 증상의 완화, 질병의 직접 또는 간접적인 병리학적 결과의 감소, 질병 진행 속도의 감소, 질병 상태의 개선, 호전, 완화 또는 개선된 예후를 의미한다. 본 발명의 용어, '개선'이란, 본 발명의 조성물의 투여로 치료되는

상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

- [101] 본 발명의 식품 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food), 건강기능식품 및 식품 첨가제(food additives) 등의 모든 형태를 포함한다. 상기 유형의 식품 조성물은 당 업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다.
- [102] 예를 들면, 건강식품으로는 본 발명의 이리신을 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용하도록 하거나, 과립화, 캡슐화 및 분말화 하여 섭취할 수 있다. 또한, 본 발명의 이리신을 대사성 질환에 대하여 효과가 있다고 알려진 공지의 물질 또는 활성 성분과 함께 혼합하여 조성물의 형태로 제조할 수 있다. 예를 들어 본 발명의 식품 조성물은 이리신 성분 이외에 미량 의 미네랄, 비타민, 지질, 당류 및 공지의 대사성 질환에 대한 치료 효과를 가진 성분 등을 추가로 함유할 수 있다. 상기 미네랄로는 칼슘, 철 등 성장기에 필요한 영양성분이 함유될 수 있으며 비타민으로는 비타민 C, 비타민 E, 비타민 B1, 비타민 B2, 비타민 B6 등이 함유될 수 있다. 지질로는 알콕시글리세롤 또는 레시틴 등이 함유될 수 있으며 당류로는 프락토올리고당 등이 함유될 수 있다.
- [103] 또한, 기능성 식품으로는 음료(알콜성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마아말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지콘비이프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게티, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 엿, 유제품(예: 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등에 본 발명의 이리신을 첨가하여 제조할 수 있다.
- [104] 또한, 본 발명의 이리신을 식품 첨가제의 형태로 사용하기 위해서는 분말 또는 농축액 형태로 제조하여 사용할 수 있다.
- [105] 본 발명의 식품 조성물 중 이리신의 바람직한 함량은 식품 조성물 총 중량에 대하여 식품의 전체 중량을 기준으로 0.01~100%, 바람직하게는 0.1~50%의 비율로 함유될 수 있다.
- [106] 본 발명에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 판례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.
- [107] 본 발명의 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 본 발명의 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 "약", "실질적으로" 등은 언급된 의미에 고유한

제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본 발명의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다.

[108]

[109]

발명의 실시를 위한 형태

[110] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[111]

[112] [실시예]

[113] 실시예 1: 식물 발현용 이리신(Irisin) 재조합 벡터 제조

[114] 도 1과 같이 식물체에서 이리신을 발현시킬 수 있도록 재조합한 식물 발현 벡터를 제작하였다. 보다 자세하게는, 인간 이리신 호르몬에 대한 유전자 정보를 확보하고, 니코티아나 벤타미아나(Nicotiana benthamiana)에서의 발현에 최적화된 서열로 유전자를 합성하였다(서열번호 1). pCAMBIA1300 벡터의 CaMV 35S 프로모터 유전자와 NOS 종결자(terminator) 사이에 BiP(chaperone binding protein) 신호 펩타이드(signal peptide)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 2), 6개의 연속된 히스티딘(Histidin)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 3) 및 이리신을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 순서대로 연결하여 이리신 식물 발현 벡터를 제작하였다.

[115]

[116] 실시예 2: 재조합 이리신 단백질의 발현 확인

[117] 2.1. 식물 발현 벡터 일과성 발현(transient expression)

[118] 상기의 실시예 1에서 준비한 식물 발현 벡터를 아그로박테리아 균주 LBA4404에 전기충격법(Electroporation)을 이용하여 형질전환 시켰다. 형질 전환된 아그로박테리아를 5ml의 YEP(Yeast Extract Peptone) 액체 배지(효모 추출물 10 g, 펩톤 10 g, NaCl 5 g, 카나마이신 50 mg/L, 리팜피신 25 mg/L)에서 28 °C의 조건에서 16시간 동안 진탕배양 한 후 1차 배양액 1ml을 50ml의 새 YEP 배지에 접종하여 28 °C의 조건에서 6시간 동안 진탕배양 하였다. 이렇게 배양된 아그로박테리아는 원심분리(7,000 rpm, 4°C, 5분)하여 수집한 후, 인필트레이션(Infiltration) 버퍼(10 mM MES (pH 5.7), 10 mM MgCl₂, 200 μM 아세트시링곤)에 600 nm의 파장에서 O.D. 1.0의 농도로 다시 현탁시켰다. 아그로박테리아 현탁액은 주사 바늘을 제거한 주사기를 이용하여 니코티아나 벤타미아나 잎의 뒷면에 주입하는 방법으로 아그로-인필트레이션(Agro-infiltration)을 수행하였다.

[119]

[120] 2.2. 식물체에서 재조합 이리신의 발현 확인

[121] 상기의 실시예 2.1에서 준비한 식물 잎으로부터 단백질을 추출하여 원심 분리한 후에, 용액에 포함되어 있는 수용성 분획(S)에 있는 단백질과 펠릿(pellet; P) 분획에 있는 단백질을 웨스턴 블롯팅으로 확인하였다. 보다 자세하게는, 각 분획 30 μ L를 SDS 시료 버퍼와 혼합한 후에 가열하였다. 그리고 10 % SDS-PAGE 겔에 전기영동하여 크기별로 단백질을 분리하고, 분리된 단백질을 PVDF 막으로 이동시킨 후에, 5 % 스kim밀크(skim milk)를 이용하여 블로킹 단계를 거친 후에, 6개의 His와 반응하는 항체를 결합시키고, ECL 용액을 제조사에서 제공하는 방법대로 처리하여 재조합 이리신의 발현을 확인하였다. 그 결과는 도 2에 나타내었다.

[122] 도 2에 나타난 바와 같이, 식물에서 발현된 재조합 이리신은 수용성 분획에 존재함을 확인했으며 서로 다른 크기를 가진 이리신 세 종류가 동시에 만들어지는 것을 확인하였다.

[123] 상기 결과를 통하여, 본 발명의 이리신 발현용 벡터는 식물체에서 재조합 이리신 단백질을 효과적으로 발현시킬 수 있으며, 상기 벡터를 이용하여 제조된 이리신은 높은 용해성(solubility)을 가지고 있기 때문에, 분리정제가 용이하며, 재조합 단백질의 응집이 억제되어 재조합 단백질의 생리활성 또는 약리적인 활성을 유지하는데 효과적인 것을 확인할 수 있었다.

[124]

[125] 실시예 3: 재조합 이리신의 분리 정제

[126] 상기의 실시예 2.1에서 준비한 니코티아나 벤타미아 40g에 단백질 추출 용액 (50 mM sodium phosphate (pH 8.0), 300 mM NaCl, 20 mM Imidazole, 0.1 % Triton X-100, 1X 단백질가수분해효소 억제제 (protease inhibitor)) 200 mL을 첨가하고 블랜더로 조직을 파쇄한 후 13,000 rpm에서 20분간 4 °C에서 원심분리하여 단백질 추출액을 회수하였다.

[127] 발현된 이리신의 분리 정제를 위해 Ni-NTA 아가로스 레진이 충전된 컬럼으로 친화크로마토그래피를 실시하였다. 컬럼에 레진을 5 mL 충전한 후 세척 용액 (50 mM sodium phosphate (pH 8.0), 300 mM NaCl, 20 mM Imidazole) 50 mL로 평형화 시켰다. 회수한 단백질 추출액을 컬럼에 적용한 후 세척 용액 100 mL을 흘려 보내 레진을 세척하고 용출 용액 (50 mM sodium phosphate (pH 8.0), 300 mM NaCl, 300 mM Imidazole)으로 재조합 단백질을 용출하였다. 재조합 단백질이 포함된 용출 용액은 10 kD 크기의 필터를 사용하여 생리식염수 (PBS) 용액으로 교체 및 농축을 실시하여 분리 정제된 재조합 이리신을 획득하였다. 분리 정제된 단백질은 단백질 전기영동 (SDS-PAGE) 후 쿠마시 염색법 (coomassie staining)을 통해 확인하였다. (도 3)

[128] 도 3에 나타난 바와 같이, 약 13 kD 내지 그 이상의 크기를 가진 3가지 재조합 이리신 단백질들이 정제된 것을 확인하였다.

[129] 본 발명의 재조합 단백질은 기존의 단백질과의 큰 차이 없이 잘 정제되었다.

이러한 결과는 단백질을 식물에서 발현시키는 경우 당구조가 변이되어 생산 효율이 떨어질 수 있는 문제점이 발견되지 않았음을 확인한 것으로, 본 발명에 따른 단백질이 식물에서 잘 생산되는 것을 확인한 결과이다.

[130]

[131] 실시예 4: 엔도 H (Endo H) 글라이코시데이즈 처리를 통한 재조합 이리신 당화 여부 확인

[132] 식물에서 분리 정제한 이리신의 당화 여부를 확인하기 위해 엔도 H 글라이코시데이즈 N-당화 제거 에세이를 수행하였다. 보다 자세하게는 상기의 실시예 3에서 준비한 재조합 이리신 1 µg에 10X 디네추레이팅 버퍼 (5 % SDS, 0.4 M DTT)를 가한 후 100 °C에서 10 분간 가열하였다. 여기에 최종 농도가 50 mM이 되도록 sodium citrate (pH 5.5) 버퍼를 넣어준 후 50 U의 엔도 H 글라이코시데이즈를 첨가하고 37°C 에서 1시간 동안 반응을 진행하였다. 엔도 H 글라이코시데이즈를 포함하지 않은 대조군 반응을 위해서는 엔도 H 글라이코시데이즈 대신 같은 부피의 물을 가하였다. 반응 종료 후 단백질을 전기영동 (SDS-PAGE) 후 쿠마시 염색법 (coomassie staining)을 통해 재조합 이리신의 N-당화 제거에 따른 분자량 변화를 관찰하였다. (도 4)

[133] 도 4에 나타난 바와 같이, Endo-H를 처리했을 경우 이리신의 글리칸(Glycan)들이 절단되어 한가지 크기의 이리신이 관찰되었고, 이를 통해 식물에서 발현된 이리신의 당화여부를 확인할 수 있었다.

[134]

[135] 실시예 5: 식물 유래 이리신 단백질의 생리 활성 확인

[136] 3T3-L1 지방전구세포는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)배지에 10% FBS, 100 units/mL 페니실린(penicillin)과 100 µg/mL 스트렙토마이신을 첨가한 세포 배양액을 사용하여 37°C 습윤한 CO₂ incubator (5% CO₂/95% air)에서 배양하였다. 지방세포의 분화는 세포가 100% 찬 이틀 후 (post-confluence, day 0) 5 µg/ml 인슐린(insulin), 0.25 mM 덱사메타손(dexamethasone), 0.5 mM 1-메틸-3-이소부틸잔틴이 첨가된 10% FBS DMEM으로 교체하고, 이틀 후 5 µg/ml insulin가 첨가된 10% FBS DMEM으로 교체하며, 이틀 후 다시 10% FBS DMEM으로 교체하여 총 10일 동안 분화시킨 후 실험에 사용하였다. 지방분화에 대한 영향을 실험하기 위해 실시예 3에서 제조된 식물유래 이리신은 분화유도가 시작된 날부터 4일간 이틀 간격으로 처리하였다.

[137] 실시예 3에서 제조된 재조합 이리신 단백질은 분화된 지방세포에 10 mg/mL의 농도로 처리하였으며, 48시간 후 세포에서 발현 단백질을 추출하여 웨스턴 블롯을 시행하였다.

[138] 3T3-L1 세포의 단백질 분석을 위해 RIPA lysis buffer를 처리 후 13,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상층액에 있는 총 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질은 Laemmli sample buffer를 섞은 뒤 SDS-PAGE를 이용하여 전기영동으로 분리한 후 PVDF(Polyvinylidene difluoride) membrane으로 전이시켰다. 전이된 PVDF

membrane은 5% skim milk를 처리하여 비특이적인 단백질에 대한 blocking을 실시하고 1차 항체를 4°C에서 밤새 배양한 후 2차 항체를 상온에서 1시간 배양시켜 최종 ECL solution 처리 후 LAS-4000에서 단백질 발현 양을 분석하였다. 사용된 항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)와 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

[139]

[140] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 이리신 처리 후 세포 내 UCP1(Uncoupling protein 1)의 발현 증가를 관찰하였다. UCP 1은 백색지방의 갈색지방으로의 전환 기준이 되는 바이오마커로써 이 결과는 식물유래 이리신이 adipocyte brownin 활성을 그대로 가지고 있음을 의미한다.

[141] 또한, 도 6에 나타난 바와 같이, 이리신 처리 후 세포에서 분비되는 adiponectin의 증가를 관찰하였다. Adiponectin은 지방세포에서 분비되는 대표적인 adipokine의 일종으로, 인슐린 저항성을 개선하는 등의 전신 대사 개선을 통한 항당뇨, 항비만 효과를 가진 것으로 잘 알려져있다. 따라서 식물에서 유래한 irisin이 adipokine 조절을 통해 전신 대사 조절 기능을 지님을 의미한다.

[142]

[143] 상기 결과들을 통하여, 본 발명의 제조합 이리신 단백질은 식물체에서도 효과적으로 발현될 뿐만 아니라, 높은 수용해성을 가지고 있어 분리 및 정제가 용이하고, 또한, UCP1 및 아디포넥틴의 발현증가 효과를 나타내므로 대사성질환의 치료에 유용하게 이용가능하다는 것을 확인할 수 있었다.

[144]

[145] 이하 본 발명의 약학적 조성물 및 식품 조성물의 제제예를 설명하나, 이는 본 발명을 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[146]

[147] **제제예 1. 약학적 조성물의 제조**

[148] **1.1. 산제의 제조**

[149] 제조합 이리신 단백질 20 mg

[150] 유당 100 mg

[151] 탈크 10 mg

[152] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[153]

[154] **1.2. 정제의 제조**

[155] 제조합 이리신 단백질 20 mg

[156] 옥수수전분 100 mg

[157] 유당 100 mg

[158] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[159] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를

제조한다.

[160]

[161] **1.3. 캡슐제의 제조**

[162] 제조합 이리신 단백질 20 mg

[163] 결정성 셀룰로오스 3 mg

[164] 락토오스 14.8 mg

[165] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

[166] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[167]

[168] **1.4. 주사제의 제조**

[169] 제조합 이리신 단백질 20 mg

[170] 만니톨 180 mg

[171] 주사용 멸균 증류수 2,974 mg

[172] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 26 mg

[173] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[174]

[175] **1.5. 액제의 제조**

[176] 제조합 이리신 단백질 20 mg

[177] 이성화당 10 g

[178] 만니톨 5 g

[179] 정제수 적량

[180]

[181] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고, 레몬향을 적정량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음, 정제수를 가하여 전체를 100 mL로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[182]

[183] **제제예 2. 건강 식품의 제조**

[184] 제조합 이리신 단백질 100 mg

[185] 비타민 혼합물 적량

[186] 비타민 A 아세테이트 70 μg

[187] 비타민 E 1.0 mg

[188] 비타민 B1 0.13 mg

[189] 비타민 B2 0.15 mg

[190] 비타민 B6 0.5 mg

[191] 비타민 B12 0.2 μg

[192] 비타민 C 10 mg

- [193] 비오틴 10 μg
- [194] 니코틴산아미드 1.7 mg
- [195] 엽산 50 μg
- [196] 판토텐산 칼슘 0.5 mg
- [197] 무기질 혼합물 적량
- [198] 황산제1철 1.75 mg
- [199] 산화아연 0.82 mg
- [200] 탄산마그네슘 25.3 mg
- [201] 제1인산칼륨 15 mg
- [202] 제2인산칼슘 55 mg
- [203] 구연산칼륨 90 mg
- [204] 탄산칼슘 100 mg
- [205] 염화마그네슘 24.8 mg
- [206] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을
바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도
무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을
제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.
- [207]
- [208] **제제예 2. 건강 음료의 제조**
- [209] 제조합 이리신 단백질 100 mg
- [210] 비타민 C 15 g
- [211] 비타민 E(분말) 100 g
- [212] 젖산철 19.75 g
- [213] 산화아연 3.5 g
- [214] 니코틴산아미드 3.5 g
- [215] 비타민 A 0.2 g
- [216] 비타민 B1 0.25 g
- [217] 비타민 B2 0.3g
- [218] 물 정량
- [219] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안
85°C에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2ℓ 용기에 취득하여
밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.
상기 조성비는 비교적 기호 음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합
조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에
따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.
- [220]
- [221] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의
통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지

않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

[222]

산업상 이용가능성

[223] 본 발명의 재조합 이리신 단백질은 식물체에서도 효과적으로 발현될 뿐만 아니라, 높은 수용해성을 가지고 있어 분리 및 정제가 용이하고, 또한, UCP1 및 아디포넥틴의 발현증가 효과를 나타내므로 대사성질환의 치료에 유용하게 이용가능할 것으로 기대되는 바, 산업상 이용가능성이 있다.

[224]

청구범위

- [청구항 1] 식물에서의 발현이 최적화되며, 서열번호 1로 이루어지는 염기서열을 포함하는 재조합 이리신 유전자.
- [청구항 2] 제1항의 유전자를 포함하는, 재조합 발현 벡터.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 벡터는 도 1에 기재된 개열지도를 포함하는 것을 특징으로 하는, 벡터.
- [청구항 4] 제2항에 있어서,
상기 벡터는 BiP(Chaperone binding protein) 유전자 및 태그용 유전자로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 코딩하는 유전자를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 벡터.
- [청구항 5] 제2항 내지 제4항 중 어느 한 항의 벡터로 형질전환된, 형질전환체.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 형질전환체는 식물 또는 식물 세포인 것을 특징으로 하는, 형질전환체.
- [청구항 7] (a) 제5항의 형질전환체를 배양하는 단계; 및
(b) 상기 형질전환체 또는 배양액으로부터 이리신 단백질을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, 재조합 이리신 단백질의 생산 방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 단계 (b)의 정제는 수용성 분획을 사용하여 정제하는 것을 특징으로 하는, 재조합 이리신 단백질의 생산 방법.
- [청구항 9] 제7항의 방법으로 생산된 식물 유래 재조합 이리신 단백질을 유효성분으로 포함하는, 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 대사성 질환은 비만, 당뇨, 고혈압, 고지혈증, 고중성지방혈증, 고콜레스테롤증, 지방간 및 동맥경화증으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 11] 제9항에 있어서,
상기 재조합 이리신 단백질은 당화된 재조합 이리신 단백질 및 비당화된 재조합 이리신 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 12] 제9항에 있어서,
상기 재조합 이리신 단백질은 서열번호 4로 이루어지는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 13] 제7항의 방법으로 생산된 식물 유래 재조합 이리신 단백질을 유효성분으로 포함하는, 대사성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 14] 제13항에 있어서,

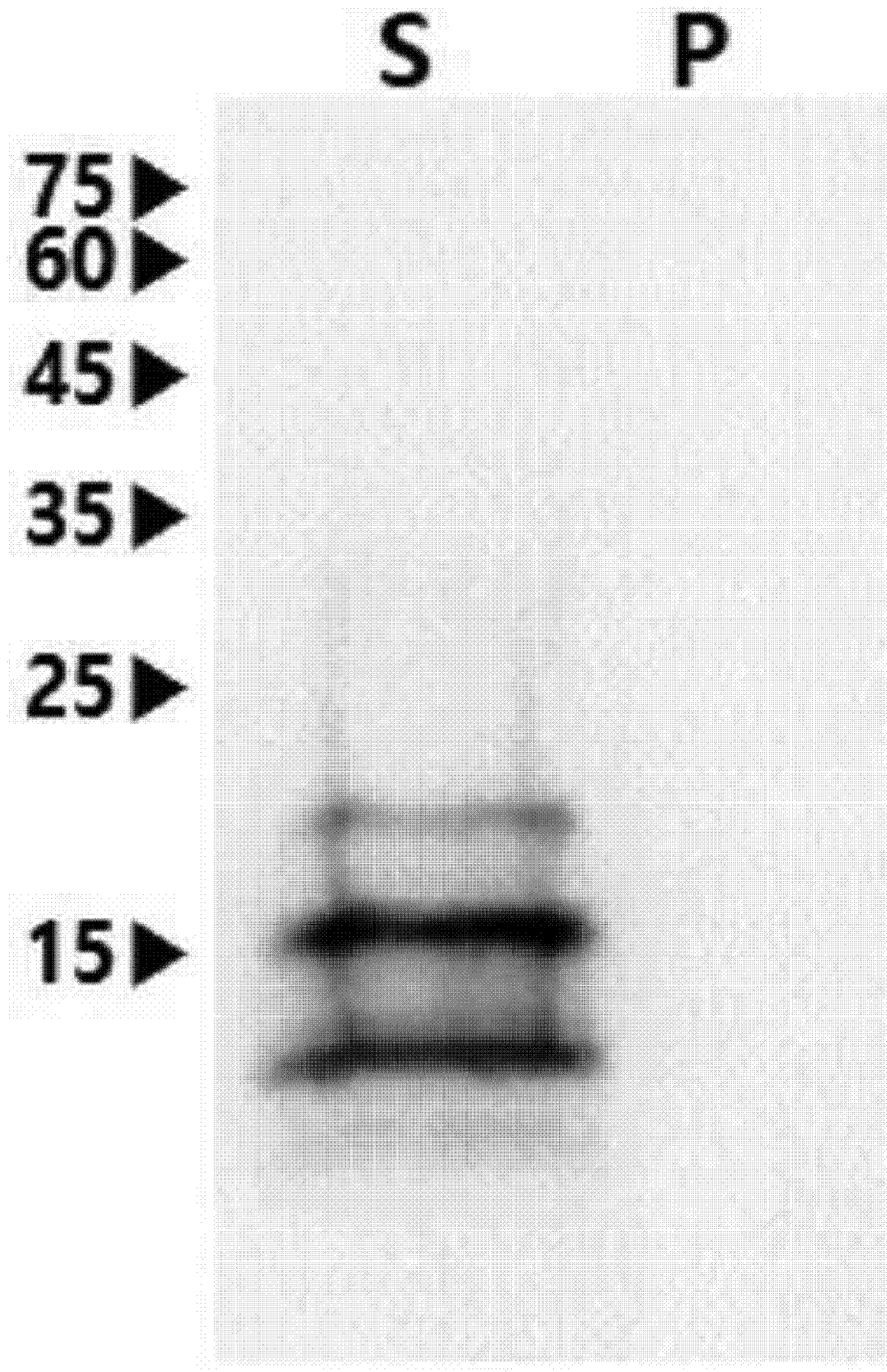
상기 대사성 질환은 비만, 당뇨, 고혈압, 고지혈증, 고중성지방혈증, 고콜레스테롤증, 지방간 및 동맥경화증으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는, 식품 조성물.

- [청구항 15] 제13항에 있어서,
상기 재조합 이리신 단백질은 당화된 재조합 이리신 단백질 및 비당화된 재조합 이리신 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 식품 조성물.
- [청구항 16] 제13항에 있어서,
상기 재조합 이리신 단백질은 서열번호 4로 이루어지는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 식품 조성물.
- [청구항 17] 제7항의 방법으로 생산된 식물 유래 재조합 이리신 단백질을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 대사성 질환을 예방 또는 치료하는 방법.
- [청구항 18] 제7항의 방법으로 생산된 식물 유래 재조합 이리신 단백질의 대사성 질환 예방 또는 치료 용도.
- [청구항 19] 제7항의 방법으로 생산된 식물 유래 재조합 이리신 단백질의 대사성 질환 치료용 약제 제조를 위한 용도.

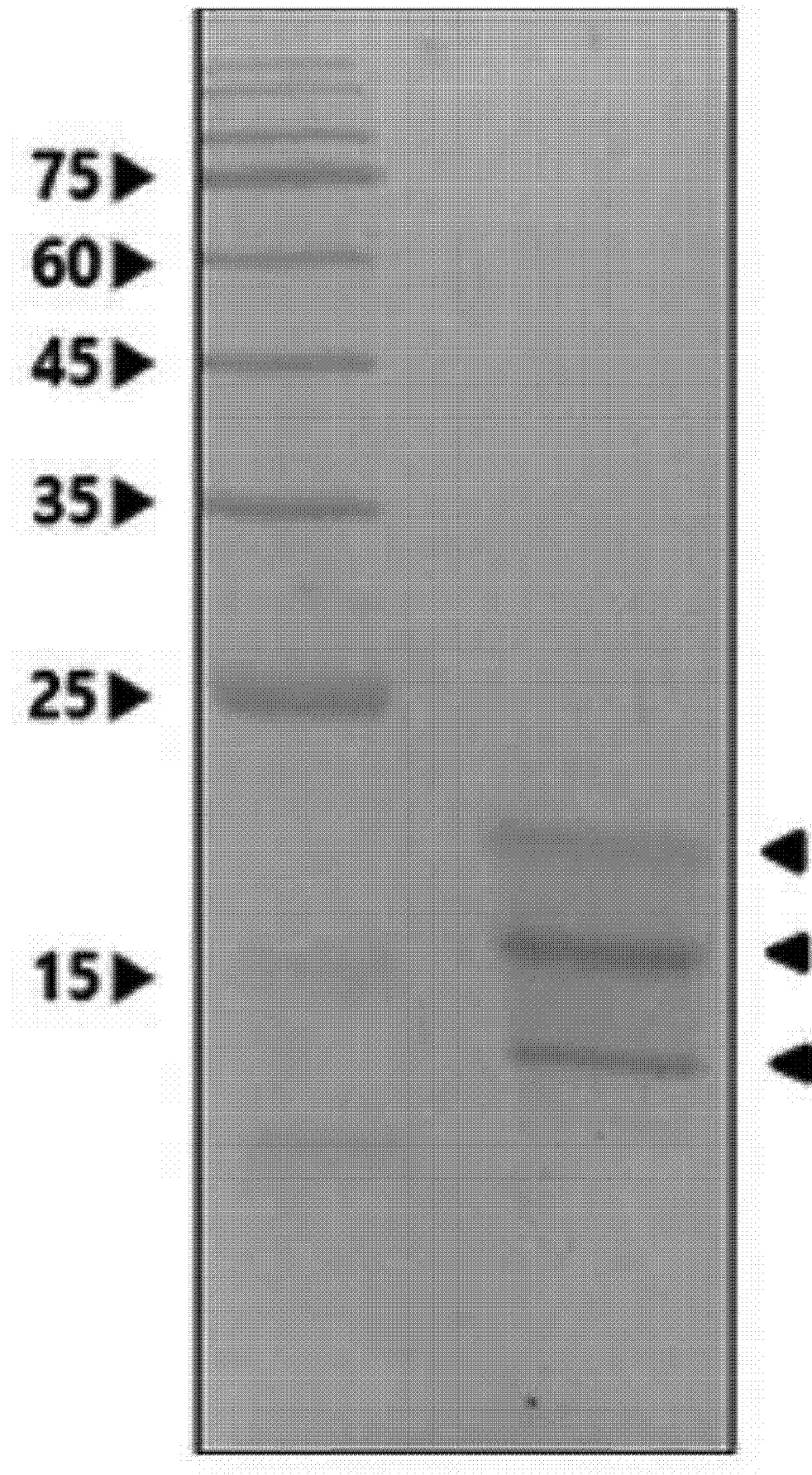
[도1]

BiP	6His	Irisin
-----	------	--------

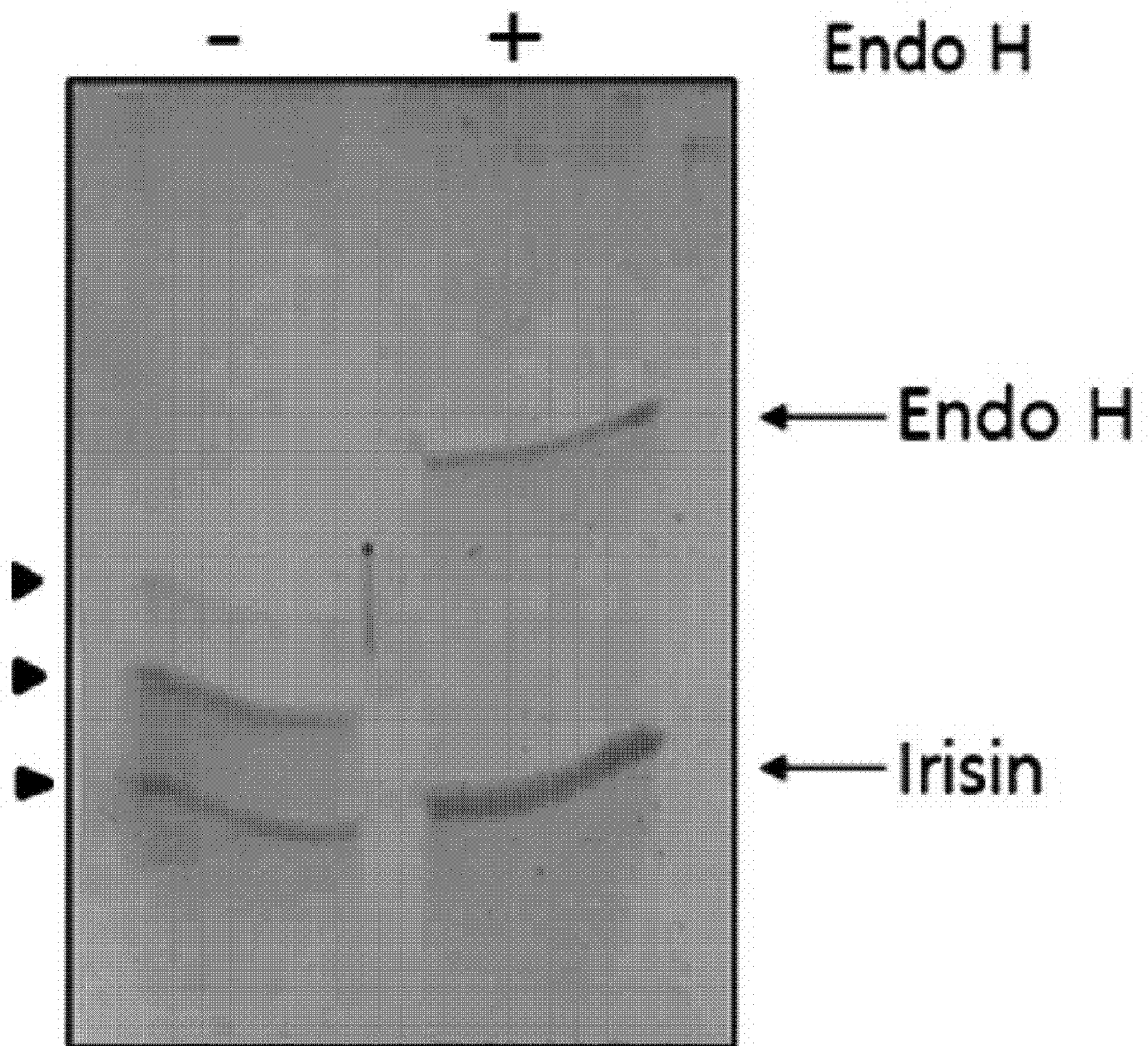
[도2]



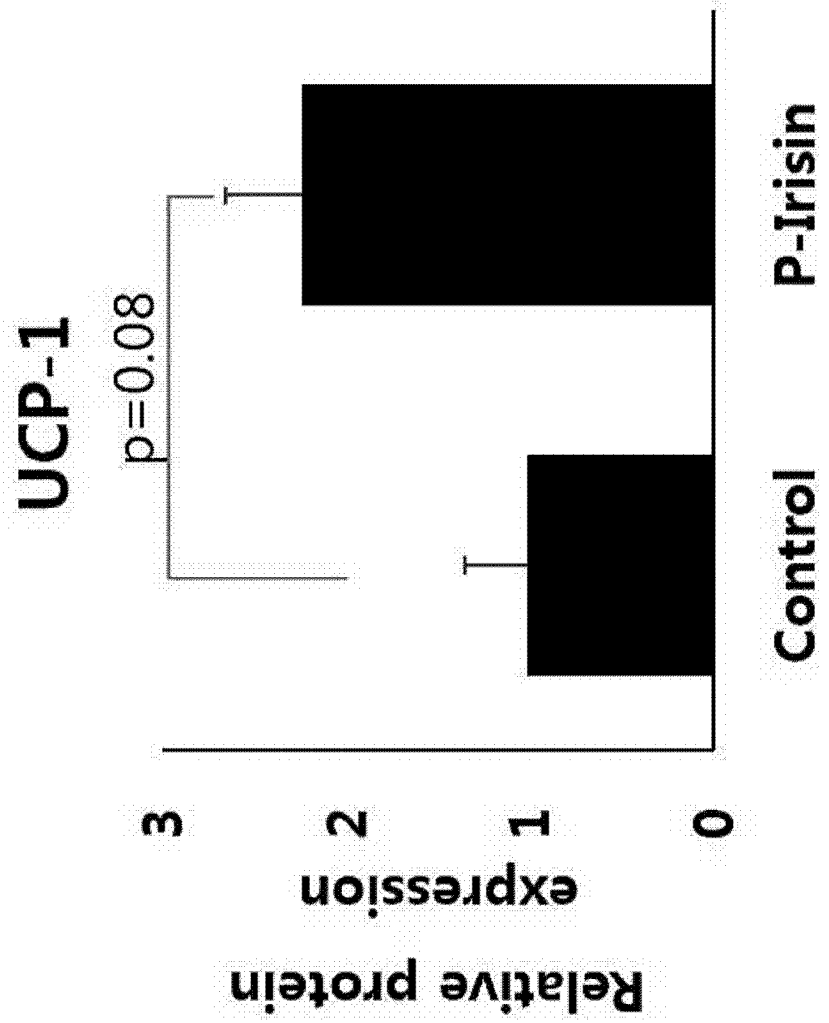
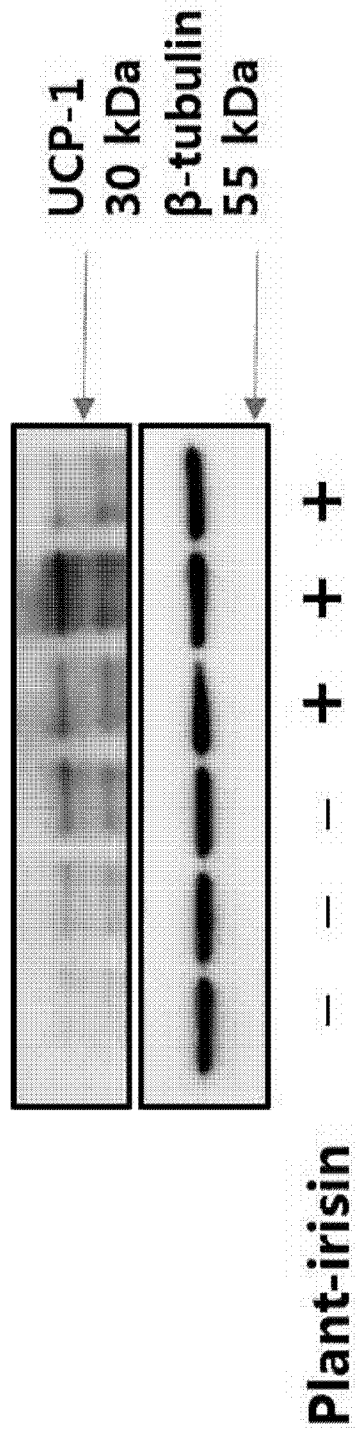
[도3]



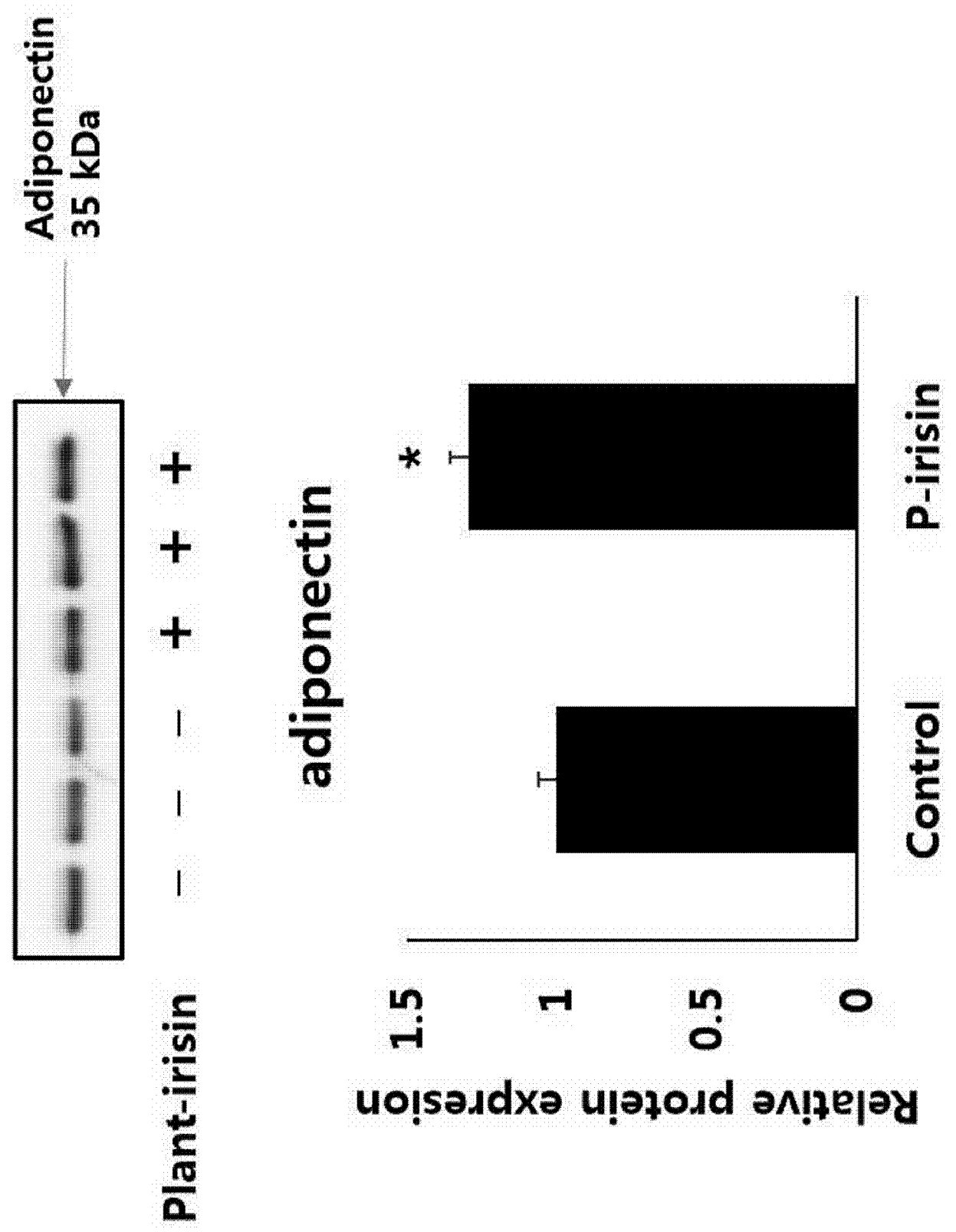
[도4]



[도5]



[도6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/004480

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/82(2006.01)i, C07K 14/575(2006.01)i, A23L 33/18(2016.01)i, A61K 38/22(2006.01)i, A61P 3/04(2006.01)i, A61P 3/06(2006.01)i, A61P 3/10(2006.01)i, A61P 9/10(2006.01)i, A61P 9/12(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)

C12N 15/82; A61K 38/47; C07K 14/435; C07K 14/705; C07K 14/78; C12N 15/12; C12N 9/40; C07K 14/575; A23L 33/18; A61K 38/22; A61P 3/04; A61P 3/06; A61P 3/10; A61P 9/10; A61P 9/12

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: Irisin, recombinant, plant, metabolic disease

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 105200061 A (CHANGSHU INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 30 December 2015 See abstract; sequence identifier no. 2; page 3; claims 1-9.	9-16,18-19
Y		1-8
Y	KR 10-2014-0015330 A (PROTALIX LTD.) 06 February 2014 See abstract; claims 1, 9-10, 13.	1-8
Y	NCBI. NCBI Reference Sequence NO. NM_001171941.2. Homo sapiens fibronectin type III domain containing 5 (FNDC5), transcript variant 1, mRNA. 23 December 2018 See the entire document.	1-8
Y	CN 106167523 A (WEST CHINA SECOND UNIVERSITY HOSPITAL OF SICHUAN UNIVERSITY) 30 November 2016 See abstract; figure 6; claims 1-2.	3-8
Y	KR 10-2018-0084680 A (POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION) 25 July 2018 See abstract; claim 7.	3-8



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

"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

17 JULY 2020 (17.07.2020)

Date of mailing of the international search report

17 JULY 2020 (17.07.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/004480**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.: **17**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 17 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).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/004480

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
CN105200061 A	30/12/2015	None	
KR 10-2014-0015330 A	06/02/2014	AU 2011-222452 A1	27/09/2012
		AU 2011-222452 B2	03/09/2015
		AU 2011-356137 A1	15/08/2013
		BR 112013018516 A2	21/05/2019
		CA 2791461 A1	09/09/2011
		CA 2791461 C	22/10/2019
		CA 2824791 A1	26/07/2012
		CN 102933707 A	13/02/2013
		CN 102933707 B	30/09/2015
		CN 103443270 A	11/12/2013
		CN 103443270 B	06/06/2017
		DK 2665814 T3	11/09/2017
		DK 2865751 T3	09/01/2017
		EP 2542572 A2	09/01/2013
		EP 2542572 B1	06/05/2015
		EP 2542674 A1	09/01/2013
		EP 2542674 B1	15/01/2014
		EP 2542675 A1	09/01/2013
		EP 2542675 B1	17/12/2014
		EP 2665814 A1	27/11/2013
		EP 2665814 B1	17/05/2017
		EP 2865751 A1	29/04/2015
		EP 2865751 B1	14/09/2016
		EP 3088514 A1	02/11/2016
		EP 3088514 B1	28/11/2018
		EP 3272861 A1	24/01/2018
		EP 3272861 B1	18/12/2019
		ES 2606532 T3	24/03/2017
		ES 2708843 T3	11/04/2019
		HK 1180720 A1	17/07/2015
		HU E030959 T2	28/06/2017
		IL 221741 A	29/11/2012
		IL 227552 A	30/09/2013
		IN 2262MUN2012 A	12/06/2015
		JP 2013-520986 A	10/06/2013
		JP 2014-237694 A	18/12/2014
		JP 2014-506450 A	17/03/2014
		JP 5758920 B2	05/08/2015
		JP 5871999 B2	01/03/2016
		JP 5913372 B2	27/04/2016
		KR 10-1928403 B1	14/12/2018
		KR 10-2013-0056216 A	29/05/2013
		LT 3272861 T	25/03/2020
		NZ 602317 A	30/04/2014
		NZ 623294 A	30/10/2015
		PL 2865751 T3	31/03/2017
		RU 2012141651 A	10/04/2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/004480

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		RU 2604795 C2	10/12/2016
		SG 10201502609 A	28/05/2015
		SG 183558 A1	30/10/2012
		SI 2865751 T1	31/01/2017
		SI EP2865751 T1	31/01/2017
		US 10280414 B2	07/05/2019
		US 2012-0230974 A1	13/09/2012
		US 2012-0328589 A1	27/12/2012
		US 2012-0328592 A1	27/12/2012
		US 2013-0017169 A1	17/01/2013
		US 2013-0295065 A1	07/11/2013
		US 2016-0053247 A1	25/02/2016
		US 2019-0256832 A1	22/08/2019
		US 9194011 B2	24/11/2015
		US 9708595 B2	18/07/2017
		US 9732333 B2	15/08/2017
		WO 2011-061736 A1	26/05/2011
		WO 2011-107990 A1	09/09/2011
		WO 2011-107991 A1	09/09/2011
		WO 2011-107992 A2	09/09/2011
		WO 2011-107992 A3	10/11/2011
		WO 2012-098537 A1	26/07/2012
		WO 2012-098537 A8	26/07/2012
		ZA 201206725 B	26/06/2013
CN106167523 A	30/11/2016	None	
KR 10-2018-0084680 A	25/07/2018	JP 2020-503884 A	06/02/2020
		KR 10-2022662 B1	18/09/2019
		WO 2018-135860 A1	26/07/2018

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/82(2006.01)i, C07K 14/575(2006.01)i, A23L 33/18(2016.01)i, A61K 38/22(2006.01)i, A61P 3/04(2006.01)i, A61P 3/06(2006.01)i, A61P 3/10(2006.01)i, A61P 9/10(2006.01)i, A61P 9/12(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/82; A61K 38/47; C07K 14/435; C07K 14/705; C07K 14/78; C12N 15/12; C12N 9/40; C07K 14/575; A23L 33/18; A61K 38/22; A61P 3/04; A61P 3/06; A61P 3/10; A61P 9/10; A61P 9/12

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: 이리신(Irisin), 재조합(recombinant), 식물(plant), 대사성 질환(metabolic disease)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	CN 105200061 A (CHANGSHU INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 2015.12.30 요약; 서열번호 2; 페이지 3; 청구항 1-9	9-16, 18-19
Y		1-8
Y	KR 10-2014-0015330 A (프로탈릭스 리미티드) 2014.02.06 요약; 청구항 1, 9-10, 13	1-8
Y	NCBI, NCBI Reference Sequence NO. NM_001171941.2, `Homo sapiens fibronectin type III domain containing 5 (FNDC5), transcript variant 1, mRNA`, 2018.12.23 전체 문헌	1-8
Y	CN 106167523 A (WEST CHINA SECOND UNIVERSITY HOSPITAL OF SICHUAN UNIVERSITY) 2016.11.30 요약; 도면 6; 청구항 1-2	3-8
Y	KR 10-2018-0084680 A (포항공과대학교 산학협력단) 2018.07.25 요약; 청구항 7	3-8

☐ 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 이후 “X”에 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

2020년 07월 17일 (17.07.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 07월 17일 (17.07.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



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: 17
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 17은 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.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
CN105200061 A	2015/12/30	없음	
KR 10-2014-0015330 A	2014/02/06	AU 2011-222452 A1	2012/09/27
		AU 2011-222452 B2	2015/09/03
		AU 2011-356137 A1	2013/08/15
		BR 112013018516 A2	2019/05/21
		CA 2791461 A1	2011/09/09
		CA 2791461 C	2019/10/22
		CA 2824791 A1	2012/07/26
		CN 102933707 A	2013/02/13
		CN 102933707 B	2015/09/30
		CN 103443270 A	2013/12/11
		CN 103443270 B	2017/06/06
		DK 2665814 T3	2017/09/11
		DK 2865751 T3	2017/01/09
		EP 2542572 A2	2013/01/09
		EP 2542572 B1	2015/05/06
		EP 2542674 A1	2013/01/09
		EP 2542674 B1	2014/01/15
		EP 2542675 A1	2013/01/09
		EP 2542675 B1	2014/12/17
		EP 2665814 A1	2013/11/27
		EP 2665814 B1	2017/05/17
		EP 2865751 A1	2015/04/29
		EP 2865751 B1	2016/09/14
		EP 3088514 A1	2016/11/02
		EP 3088514 B1	2018/11/28
		EP 3272861 A1	2018/01/24
		EP 3272861 B1	2019/12/18
		ES 2606532 T3	2017/03/24
		ES 2708843 T3	2019/04/11
		HK 1180720 A1	2015/07/17
		HU E030959 T2	2017/06/28
		IL 221741 A	2012/11/29
		IL 227552 A	2013/09/30
		IN 2262MUN2012 A	2015/06/12
		JP 2013-520986 A	2013/06/10
		JP 2014-237694 A	2014/12/18
		JP 2014-506450 A	2014/03/17
		JP 5758920 B2	2015/08/05
		JP 5871999 B2	2016/03/01
		JP 5913372 B2	2016/04/27
		KR 10-1928403 B1	2018/12/14
		KR 10-2013-0056216 A	2013/05/29
		LT 3272861 T	2020/03/25
		NZ 602317 A	2014/04/30
		NZ 623294 A	2015/10/30
		PL 2865751 T3	2017/03/31
		RU 2012141651 A	2014/04/10

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		RU 2604795 C2	2016/12/10
		SG 10201502609 A	2015/05/28
		SG 183558 A1	2012/10/30
		SI 2865751 T1	2017/01/31
		SI EP2865751 T1	2017/01/31
		US 10280414 B2	2019/05/07
		US 2012-0230974 A1	2012/09/13
		US 2012-0328589 A1	2012/12/27
		US 2012-0328592 A1	2012/12/27
		US 2013-0017169 A1	2013/01/17
		US 2013-0295065 A1	2013/11/07
		US 2016-0053247 A1	2016/02/25
		US 2019-0256832 A1	2019/08/22
		US 9194011 B2	2015/11/24
		US 9708595 B2	2017/07/18
		US 9732333 B2	2017/08/15
		WO 2011-061736 A1	2011/05/26
		WO 2011-107990 A1	2011/09/09
		WO 2011-107991 A1	2011/09/09
		WO 2011-107992 A2	2011/09/09
		WO 2011-107992 A3	2011/11/10
		WO 2012-098537 A1	2012/07/26
		WO 2012-098537 A8	2012/07/26
		ZA 201206725 B	2013/06/26
CN106167523 A	2016/11/30	없음	
KR 10-2018-0084680 A	2018/07/25	JP 2020-503884 A	2020/02/06
		KR 10-2022662 B1	2019/09/18
		WO 2018-135860 A1	2018/07/26