



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년02월15일
(11) 등록번호 10-1110313
(24) 등록일자 2012년01월19일

(51) Int. Cl.
A61K 39/395 (2006.01) A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0043664
(22) 출원일자 2011년05월09일
심사청구일자 2011년05월09일
(65) 공개번호 10-2011-0135332
(43) 공개일자 2011년12월16일
(30) 우선권주장
1020100055000 2010년06월10일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
Pharmacogenet. Genomics. 19(11):
884-892(2009.11)*
Comp. Biochem. Physiol. Part A. 131(3):
569-574 (2002.3)*
Bioconj. Chem. 10(3): 496-501 (1999.5-6)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
주식회사 바이오셀트란
강원도 춘천시 한림대학길 1, 내 한림창업보육센터 12211호 (옥천동, 한림대학교)
(주)에드바이오텍
강원도 춘천시 동내면 거두리 1144
(72) 발명자
장상호
경기도 용인시 수지구 만현로 127, 두산위브아파트 804동 201호 (상현동)
최수영
강원도 춘천시 서부대성로 327, 105동 706호 (후평동, 동아아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 6 항

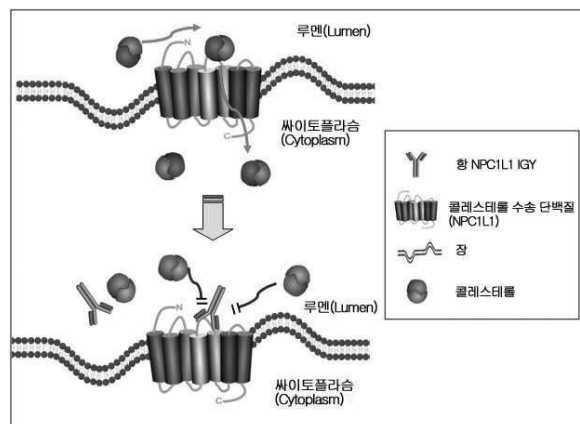
심사관 : 이예리

(54) 장 내 콜레스테롤 흡수 억제제를 통한 고지혈증 및 비만 억제용 식품 조성물

(57) 요약

본 발명은 장 내 콜레스테롤 흡수 억제제를 통한 고지혈증 및 비만 억제용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 조성물에 유효성분으로 포함되는 NPC1L1(Niemann-Pick C1-Like1)에 대한 난항 유래의 IgY 타입 항체는 장 내에서 콜레스테롤 수송단백질인 NPC1L1(Niemann-Pick C1-Like1)에 부착하여 콜레스테롤과 그 수송 단백질의 결합을 방해하기 때문에, 콜레스테롤의 체내 흡수를 원천 차단하고 그에 따라 고지혈증 및 비만을 예방할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이엽표

서울특별시 중랑구 동일로 501, 삼익아파트 101동 901호 (면목동)

안재진

강원도 춘천시 마장길 60, 롯데캐슬 201-603 (사농동)

정홍걸

서울특별시 광진구 구의강변로 102, 101동 801호 (구의동, 현대13차폴라트리움)

권혁세

강원도 춘천시 운천길 28-29, 403호 (운교동)

박정금

경기도 가평군 가평읍 가화로 223, 파란채아파트 103동 601호

백두연

강원도 춘천시 석사동 현진에버빌2차 202-105호

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

장 내 콜레스테롤 수송 단백질로서, 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 NPC1L1(Niemann-Pick C1-Like1) 중 373번부터 634번까지의 아미노산 서열을 에피토프(epitope)로 포함하는 항원에 대한 IgY 타입 항체를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 비만 예방용 식품 조성물.

청구항 6

장 내 콜레스테롤 수송 단백질로서, 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 NPC1L1(Niemann-Pick C1-Like1) 중 416번부터 635번까지의 아미노산 서열을 에피토프(epitope)로 포함하는 항원에 대한 IgY 타입 항체를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 비만 예방용 식품 조성물.

청구항 7

장 내 콜레스테롤 수송 단백질로서, 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 NPC1L1(Niemann-Pick C1-Like1) 중 509번부터 633번까지의 아미노산 서열을 에피토프(epitope)로 포함하는 항원에 대한 IgY 타입 항체를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 비만 예방용 식품 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

장 내 콜레스테롤 수송 단백질로서, 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 NPC1L1(Niemann-Pick C1-Like1) 중 373번부터 634번까지의 아미노산 서열을 에피토프(epitope)로 포함하는 항원에 대한 IgY 타입 항체를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 고지혈증 예방용 식품 조성물.

청구항 10

장 내 콜레스테롤 수송 단백질로서, 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 NPC1L1(Niemann-Pick C1-Like1) 중 416번부터 635번까지의 아미노산 서열을 에피토프(epitope)로 포함하는 항원에 대한 IgY 타입 항체를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 고지혈증 예방용 식품 조성물.

청구항 11

장 내 콜레스테롤 수송 단백질로서, 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 NPC1L1(Niemann-Pick C1-Like1) 중 509번부터 633번까지의 아미노산 서열을 에피토프(epitope)로 포함하는 항원에 대한 IgY 타입 항체를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 고지혈증 예방용 식품 조성물.

청구항 12

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 고지혈증 및 비만 억제용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 장 내 콜레스테롤 흡수 억제를 통한 고지혈증 및 비만 억제용 식품 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 콜레스테롤은 관상동맥성 심혈관 질환을 유발하는 원인물질로 알려져 있는데, 관상동맥성 심혈관 질환은 현재 모든 사망원인의 30% 이상을 차지하는 것으로 알려져 있다.

[0003] 심혈관 질환은 종래에 지방 섭취가 많고 비만 인구가 많은 선진국의 질환으로 인식되었으나, 경제수준의 발달에 따른 식생활의 서구화, 운동부족, 과로 등의 원인으로 우리나라에서 그 발병률이 현저히 증가하고 있다. 특히, 혈액 속에서 콜레스테롤 운반에 관여하는 저밀도 지단백질(LDL)은 동맥경화증 유발에 특이 인자로 간주되고 있으며, 산화된 LDL은 동맥경화증 유발작용이 강한 것으로 알려져 있다.

[0004] 한편, 비만은 대부분 섭취한 열량 중 소모되고 남는 부분이 지방세포(adipocyte)로 전환되어 체내의 여러 부분, 특히 피하조직과 복강 내에 축적되는 현상을 지칭하는데, 비만의 원인으로는 유전적 요인, 환경적 요인, 에너지 대사 이상 등이 있으며, 비만의 종류에는 제공되는 원인에 따라 단순성(1차성) 비만과 증후성(2차성) 비만으로 분류할 수 있다.

[0005] 단순성(1차성) 비만은 비만 환자의 대부분을 차지하는데, 칼로리의 과다 섭취와 이의 체 내 소비 부족으로 잉여 에너지가 몸 안의 지방으로 축적돼 나타나는 현상으로 알려져 있다.

[0006] 증후성(2차성) 비만은 갑상선 기능 저하증, 부신 피질 호르몬 과다분비, 다낭성 난소 증후군 등과 같은 질병이나 경구용 피임약, 신경안정제, 스테로이드 호르몬제, 항히스타민 성분이 포함된 약물 등으로 인해 유발되는 것으로 알려져 있다.

[0007] 비만은 지방조직에 의한 복부 압박으로 인하여 변비와 소화불량, 위장장애 등을 일으키고 당뇨, 고혈압, 동맥경화, 심장병, 암 등의 성인병과 그 합병증을 유발할 뿐만 아니라, 자신의 신체에 대한 불평, 불안, 인격장애, 우울증 등의 정신적인 병까지 유발하기 때문에 만병의 근원이라고 할 수 있다.

[0008] 따라서, 체 내 콜레스테롤의 양을 줄여 심혈관 질환을 사전에 예방하고, 만병의 근원인 비만을 미리 예방할 필요가 있는데, 이를 위해서는 콜레스테롤의 흡수 자체를 차단하는 것이 가장 효율적인 방안이라 할 수 있다.

[0009] 한편, 종래에 콜레스테롤의 흡수를 저해하는 것으로 제티아(Zetia)로 알려진 이제티미베(Ezetimibe)라는 화합물이 알려져 있는데, 점차적으로 그 수요가 증대하고 있는 비만 관련 시장을 고려할 때, 새로운 대체 소재의 개발이 요구된다 할 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 이에 본 발명은 원천적으로 장 내에서 흡수되는 콜레스테롤의 양을 줄여, 고지혈증 및 비만을 억제 또는 예방할 수 있는 새로운 조성물을 개발하여 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 제1형태로, 장 내 콜레스테롤 수송 단백질인 NPC1L1(Niemann-Pick C1-Like1) 중 내강(lumen) 쪽으로 돌출되어 형성된 루프(loop) 부분의 아미노산 서열 전부 또는 일부분을 에피토프(epitope)로 포함하는 항원에 대한 IgY 타입 항체를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 콜레스테롤 흡수 억제용 식품 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 제2형태로, 장 내 콜레스테롤 수송 단백질인 NPC1L1(Niemann-Pick C1-Like1) 중 내강(lumen) 쪽으로 돌출되어 형성된 루프(loop) 부분의 아미노산 서열 전부 또는 일부분을 에피토프(epitope)로 포함하는 항원에 대한 IgY 타입 항체를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 비만 예방 또는 억제용 식품 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 장 내 콜레스테롤 수송 단백질인 NPC1L1(Niemann-Pick C1-Like1) 중 내강(lumen) 쪽으로 돌출되어 형성된 루프(loop) 부분의 아미노산 서열 전부 또는 일부분을 에피토프(epitope)로 포함하는 항원에 대한 IgY 타입 항체를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 고지혈증 예방 또는 억제용 식품 조성물을 제공한다.

[0014] 이하, 본 발명의 내용을 하기에서 더욱 상세히 설명하고자 한다.

[0015] 본 발명은 제1형태, 제2형태 및 제3형태로, 콜레스테롤 흡수 억제용 조성물, 비만 예방 또는 억제용 조성물 및 고지혈증 예방 또는 억제용 식품 조성물을 제공하는데, 3가지 형태 모두 장 내 콜레스테롤 수송 단백질인 NPC1L1(Niemann-Pick C1-Like1) 중 내강(lumen) 쪽으로 돌출되어 형성된 루프(loop) 부분의 아미노산 서열 전부 또는 일부분을 에피토프(epitope)로 포함하는 항원에 대한 IgY 타입 항체를 유효성분으로 포함한다.

[0016] 하기 본 발명의 실험에 의한 경우, 장 내 콜레스테롤 수송 단백질인 NPC1L1(Niemann-Pick C1-Like1) 중 내강(lumen) 쪽으로 돌출되어 형성된 루프(loop) 부분의 아미노산 서열 전부 또는 일부분을 에피토프로 포함하는 항원에 대해 제조된 IgY 타입 항체는 장 내에서 콜레스테롤의 흡수를 유효하게 저해함이 확인되었다(저해 기작은 도 1 참조 요망).

[0017] 이상과 같은 콜레스테롤의 흡수 저해 효과로부터 본 발명의 장 내 콜레스테롤 수송 단백질인 NPC1L1(Niemann-Pick C1-Like1) 중 내강(lumen) 쪽으로 돌출되어 형성된 루프(loop) 부분의 아미노산 서열 전부 또는 일부분을 에피토프(epitope)로 포함하는 항원에 대해 제조된 IgY 타입 항체는 콜레스테롤 흡수 억제 및 콜레스테롤의 과다 섭취로 발생하는 비만 및 고지혈증의 예방 또는 억제용 조성물로 제조되어 활용될 수 있는 것이다.

[0018] 한편, 본 발명에서 사용되는 NPC1L1(Niemann-Pick C1-Like1) 단백질은 장 내에 존재하는 콜레스테롤 수송 단백질로서, 일 예로서 인간은 서열번호 1에 기재된 핵산 서열 및 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는다. NPC1L1은 소장 내 콜레스테롤의 흡수에 있어 중요한 역할을 수행하고 있는 것으로 알려져 있는데, NPC1L1 단백질의 엔도사이틱 리사이클링(endocytic recycling)에 의한 콜레스테롤의 흡수는 콜레스테롤의 단일방향(체 내) 흡수를 담당할 뿐만 아니라 HDL, 세포 내 콜레스테롤 흡수도, 혈중 농도에 영향을 받지 않는다. 또한, NPC1L1은 비-에스테르화된(non-esterified) 유리 (free) 콜레스테롤을 선택적으로 인식하여 간세포 내로 단방향 수송(unidirectional transport)을 촉진한다는 것으로 알려져 있다. (J.Mark Brown *et. al.*, Biochem. J.(2007) 406,273-283).

[0019] 본 발명에서는 상기와 같은 역할을 하는 NPC1L1의 역할을 차단하고자 이에 결합할 수 있는 항체를 제조하는데, NPC1L1(Niemann-Pick C1-Like1) 중 내강(lumen) 쪽으로 돌출되어 형성된 루프(loop) 부분의 아미노산 서열 전부 또는 일부분을 에피토프로 하는 항원에 대한 IgY 타입의 항체를 제조하여 사용한다. NPC1L1(Niemann-Pick C1-Like1) 중 내강(lumen) 쪽으로 돌출되어 형성된 루프(loop)는 그 서열이 이미 알려져 있기 때문에 생합

성 또는 유전자 재조합을 통해 펩타이드로 제조되어 에피토프로 사용될 수도 있다.

[0020] 한편, IgY는 난황에 포함되어 있는 항체로서, IgY 형태로 개발된 항체는 인체에 섭취시 부작용이 거의 없는 것으로 알려져 있다. IgY는 항원을 닭에 주사하여 제조될 수 있는데, 이는 기존에 알려진 공지의 방법으로 본 발명에서는 그 설명을 생략하고자 한다.

[0021] 한편, 본 발명에서 사용된 "유효성분"의 의미는 조성물 중 콜레스테롤 흡수 저해, 고지혈증 억제 또는 비만 억제 등의 효과가 본 발명에서 제공하는 "IgY 타입 항체"로부터 말미암는 것을 의미하며, 이 성분 외에 다양한 보조성분들이 보존성, 흡수 촉진 등의 목적으로 첨가될 수 있음을 의미한다.

[0022] 한편, NPC1L1(Niemann-Pick C1-Like1) 중 내강(lumen) 쪽으로 돌출되어 형성된 루프(loop)는 총 7개로, 서열번호 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16에 기재된 아미노산 서열을 갖는데, 이를 에피토프로 하여 항체가 제조될 수 있다. 따라서, 본 발명에서 에피토프로 사용될 수 있는 내강(lumen) 쪽으로 돌출되어 형성된 루프 부분의 아미노산 서열은 서열번호 4, 6, 8, 10, 12, 14 및 16에 기재된 아미노산 서열 중 하나이다.

[0023] 한편, 본 발명에 있어서, IgY 타입 항체의 제조를 위해 사용되는 항원은 항원성을 유도할 수 있는 담체(carrier) 단백질이 NPC1L1 중 내강 쪽으로 돌출되어 형성된 루프 부분의 아미노산 서열 전부 또는 일부분에 결합되어 형성된 것일 수 있는데, 이와 같이 분자량을 크게 하면, 항원성을 증대시킬 수 있다. 이때, 상기 항원성을 유도할 수 있는 담체(carrier) 단백질은 일 예로 BSA(bovine serum albumin), KLH(keyhole limpet haemocyanine) 및 OVA(ovalbumin) 중 선택되는 어느 하나를 사용할 수 있다.

발명의 효과

[0024] 본 발명의 조성물에 유효성분으로 포함되는 NPC1L1(Niemann-Pick C1-Like1)에 대한 난황 유래의 IgY 타입 항체는 장 내에서 콜레스테롤 수송단백질인 NPC1L1(Niemann-Pick C1-Like1)에 부착하여 콜레스테롤과 그 수송 단백질의 결합을 방해하기 때문에, 콜레스테롤의 체내 흡수를 원천 차단하고, 그에 따라 고지혈증 및 비만을 예방할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 본 발명의 항-NPC1L1 IgY가 콜레스테롤 흡수를 저해하는 기작을 보여주는 모식도이다.
- 도 2는 IgY 생산을 위한 재조합 항원의 생산 및 생산된 항원의 항원성을 보여주는 실험결과이다.
- 도 3은 생산된 재조합 항체 IgY의 전기영동 결과이다.
- 도 4는 생성된 재조합 항체 IgY의 항원에 대한 결합능력을 보여주는 웨스턴 블랏 결과이다.
- 도 5는 백신의 항체 IgY 형성 여부를 정량적으로 보여주는 ELISA 결과이다.
- 도 6은 HepG2 세포주를 이용하여 NPC1L1 단백질에 대한 IgY의 결합을 확인시켜 주는 시험관 내(*in vitro*) 이뮤노플루오레센스(Immunofluorescence) 결과이다. 400배 배율로 관찰한 결과이며, 콘포칼(Confocal) 현미경을 통해서 확인한 결과이다.
- 도 7은 마우스 소장 조직 내 NPC1L1 단백질에 대한 IgY의 결합을 확인시켜 주는 생체 내(*in vivo*) 이뮤노히스토케미스트리(Immunohistochemistry) 결과이다. 200배 배율로 관찰한 결과이며, 광학 현미경으로 관찰한 결과이다.
- 도 8은 마우스 소장 조직 내 NPC1L1 단백질에 대한 IgY의 결합을 확인시켜 주는 생체 내(*in vivo*) 이뮤노플루오레센스(Immunofluorescence) 결과이다. 200배율로 관찰한 결과이며, 형광 현미경으로 관찰한 결과이다.
- 도 9는 HepG2 세포주를 이용한 콜레스테롤 흡수 억제 시험 결과이다. 도 9에서 'COM' 과 'ISA'는 어쥘반트(Adjuvant)의 종류를 의미하는 것으로, ISA는 'ISA 70 어쥘반트(Adjuvant)'를 사용하여 만든 항-NPC1L1 IgY 샘플을 의미하고, 'COM'은 'Complete Freund adjuvant(Difco, USA)'를 사용하여 만든 항-NPC1L1 IgY 샘플을 의미한다.
- 도 10은 고 콜레스테롤 식이 섭취 8주 동안 체중의 변화율을 보여주는 결과이다. * ; $p < 0.05$, ** ; $p < 0.01$.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예를 들어 설명하지만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.
- [0027] **제조예 1: 재조합 항원의 제조의 제조 및 적합성 확인**
- [0028] 하기에서는 NPC1L1 전체 아미노산 서열(서열번호 2) 중 서열번호 4에 기재된 루프 1(loop 1, NPC1L1이 루멘 방 향으로 갖는 총 7개의 루프 중 두번째 루프)의 아미노산을 포함하도록 373번부터 634번까지 262개 아미노산을 클로닝하여 재조합 항원(이하, '373 단백질'로 명명)을 제조하고자 하였다.
- [0029] 또한, NPC1L1 전체 아미노산 서열 중 416번부터 635번까지 220개 아미노산을 클로닝하여 재조합 항원(이하, '416 단백질'로 명명)을 제조하고자 하였다.
- [0030] 또한, NPC1L1 전체 아미노산 서열 중 509번부터 633번까지 125개 아미노산(이하, '509 단백질'로 명명)을 제조 하고자 하였다.
- [0031] IgY의 생산을 위한 항원을 제조하기 위해 상기의 클로닝한 DNA 시퀀스 각각을 정제용 His-tag를 가진 pET-15b 벡터의 Xho I / BamH I 클로닝 사이트에 라이게이션시킨 후 대장균 BL21(DE3) 호스트에서 IPTG를 이용 하여 발현시켰다.
- [0032] 과대 발현시킨 후, His6 어피니티 컬럼을 통해 정제하였고, 가용화시킨 후, 각각 얻어진 재조합 단백질 에 대해 SDS-PAGE를 수행하고, 웨스턴 블랏을 수행하였다.
- [0033] 웨스턴 브랏을 위해 사용된 항체는 시판되는 anti-NPC1L1 마우스 단항체와 HRP가 결합된 항마우스 염소 항체를 사용하였다.
- [0034] 실험 결과는 도 2와 같았다. 과대 발현 후 정제된 재조합 NPC1L1 항원(373 단백질, 416 단백질, 509 단백질)이 마우스에서 만들어진 항-NPC1L1 항체에 의해 반응함에 따라, 주요 에피토프를 가지고 있는 재조합 단백질로 제 조되었음이 확인되었고, NPC1L1 단백질의 기능을 억제하는 IgY를 생산하기 항원으로서의 성질도 확인되었다.
- [0035] **실시예: 재조합 항원의 백신을 통한 IgY 항체 생산**
- [0036] (1) 백신 준비
- [0037] 상기 제조예 1에서 제조된 것으로, 재조합된 펩타이드 형태의 NPC1L1 항원과 프룬트스 컴플리트 어쥬 반트(Freund's complete adjuvant, Difco 263810, USA)를 동량의 부피를 혼합하여 제조하였으며, 어쥬반트 (adjuvant)에 따른 항체 형성에 대한 차이를 알아보기 위하여 일반적인 어드주반트인 ISA70과 항원을 동량으로 실린지를 이용하여 혼합하고 특이난항항체 생산을 위한 백신을 준비하였다.
- [0038] 재조합된 펩타이드와 담체(Carrier)의 접합(conjugation)은 말레이미드 액티베이트드 BSA, KLH 컨주게 이션 키트(Maleimide Activated BSA, KLH conjugation Kit, Sigma-Aldrich, MBK1, USA)를 이용하여 시도하였으 며, 그 방법은 제공된 설명서에 의거 진행하였다. 방법을 간단히 설명을 하면, 담체 단백질을 20mM 소듐 포스 페이트(sodium phosphate), 230mM NaCl, 2mM EDTA, 80mM 수크로오스(Sucrose), pH6.6에 녹이고, 재조합된 펩타 이드는 20mM 소듐 포스페이트, 100mM EDTA, 80mM EDTA, pH 6.6에 녹여 이 둘을 섞어 12시간 이상 냉장 교반 하였으며, 최종적으로 세파덱스(Sepadex) G-25M 겔 필터레이션 컬럼을 이용하여 분리하였다.
- [0039] (2) 산란계 면역
- [0040] 제조된 백신을 22주령된 하이-라인 브라운(Hy-Line Brown) 산란계에 1ml씩 가슴에 근육 주사하였으며 3 주 간격으로 1차 접종 후 2회 부스팅(Boosting)을 실시하였다.
- [0041] (3) 면역난항항체의 분리 및 확인

[0042] ① 면역난황항체의 분리

[0043] 면역화된 산란계로부터 생산된 계란에서 IgY의 분리는 암모니움 설페이트(Ammonium sulfate, sigma USA)를 이용하여 분리하였다. 암모니움 설페이트법은 아키타 등의 방법(Akita, E. M. and Nakai, S. Immunoglobulins from egg yolk : isolation and purification. J. Food. Sci., 57 : 629-633, 1992)에 따라서 난황의 난막을 제거하고, 1:4의 비율로 pH 2.5 D.W와 희석하여, -20℃에 2일간 냉동시킨 후 7000rpm에서 30분간 원심분리하고 상층액을 여과하여 수용성 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질을 과포화된 암모니움 설페이트 용액으로 순수 단백질을 4℃ 오버나이트하여 침전시켰다. 침전된 용액을 원심 분리하여 펠렛을 얻고 PBS로 재부유한 후 4℃ PBS 버퍼에서 투석 후 분리된 항체 샘플을 수거하였다.

[0044] ② 전기영동

[0045] SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)는 5% 스택킹 겔(stack gel)과 10% 세퍼레이팅 겔(seperating gel)을 사용하여 램리의 방법(Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227(5259) : 680-685, 1970)에 따라 실시하였으며, 전기영동 후 겔을 쿠마시 브릴란트 블루(Coomassie brilliant blue) R-250 용액으로 30분간 염색하고, 디스테이닝 버퍼(destaining buffer)를 이용하여 분리된 IgY 항체를 확인하였다. 도 3은 생산된 재조합 항체 IgY의 전기영동 결과이다.

[0046] (4) 분리된 IgY의 항원과의 결합능 확인

[0047] 웨스턴 블랏팅을 통해 분리된 IgY 항체의 펩타이드 항원과의 결합능을 확인하였는데, 그 결과 도 4에서 보는 바와 같이 면역에 의해 생성된 IgY가 NPC1L1의 C 루프 부분을 포함하는 재조합 단백질을 인식하여 결합하는 것이 확인되었다.

[0048] 실험예 1: ELISA 시험 방법을 이용한 항체 형성 여부 확인

[0049] 본 실험예에서는 ELISA 시험 방법을 이용하여 상기에서 컴플리트 어쥬반트(Complete adjuvant)와 ISA 70 어쥬반트(adjuvant)를 사용하여 만든 백신에 의한 항체 형성 여부를 정량적으로 확인하였다.

[0050] ① NPC1L1-BSA가 붙어 있는 항원을 카보네이트 버퍼(Carbonate buffer)를 이용하여 96-웰 ELISA 플레이트에 400ng/ml의 농도로 코팅하고 37℃ 1시간 배양하여 항원을 코팅하였다.

[0051] ② PBST로 3회 세척하고, 1%-BSA로 블라킹(blocking)을 37℃에서 1시간 동안 수행하였다.

[0052] ③ PBST로 3회 세척하고, 샘플을 100ul씩 처리하고 37℃에서 1시간 동안 배양하였다.

[0053] ④ PBST로 3회 세척하고, 2차 항체로 항-닭-IgY-HRP를 100ul씩 처리하고 37℃에서 1시간 동안 배양하였다.

[0054] ⑤ PBST로 3회 세척하고, 기질 용액을 제조한 후, 100ul 넣고 발색반응을 10분간 진행하고 2N 황산으로 반응을 정지시켰다.

[0055] ⑥ ELISA 리더기로 결과 값을 확인하였다.

[0056]

[0057] 실험 결과(도 5), 항체 샘플을 1:10,000배 희석한 결과의 경우, 블랭크(Blank) 값과 ISA70-IgY, COM-IgY 비교하여 볼 때 약 10~15배의 O.D 값의 차이가 나타났다. 일반 IgY의 샘플 O.D 값의 경우, 블랭크 값과 차이가 나지 않는 것으로 보아 항-NPC1L1-IgY 항체가 형성된 것을 알 수 있었다.

[0058] 또한, 어쥬반트(Adjuvant) 간의 차이에 의한 항체 형성 여부에는 미생물의 OMP가 함유된 프룬드스 컴플리트 어쥬반트(Freund's complete adjuvant, Difco 263810, USA)가 ISA 70 어쥬반트(adjuvant)보다 우수한 역할을 나타내었다.

[0059] 이상 실시예 1의 웨스턴-블랏 실험과 본 ELISA 실험 결과로 미루어 볼 때, 항-NPC1L1-IgY 항체가 잘 이루어져 형성되었고, 항원에 항체가 결합하는 것을 확인할 수 있었다.

[0060] 실험예 2: 시험관 내(*in vitro*) NPC1L1의 이뮤노플루오레센스(Immunofluorescence)

[0061] 난황으로부터 분리한 항-NPC1L1 IgY 항체가 항원인 NPC1L1 단백질에 결합하는지 여부를 알아보기 위하여 NPC1L1을 과발현하고 있는 것으로 알려져 있는 간암세포주인 HepG2 세포주를 가지고 시험관 내(*In vitro*) 상에서 이뮤노플루오레센스(Immunofluorescence)를 시행하였다. (Davies JP, Scott C, Oishi K, Liapis A, Ioannou YA. Inactivation of NPC1L1 causes multiple lipid transport defects and protects against diet-induced hypercholesterolemia. J Biol Chem. 2005 Apr 1;280(13):12710-20. Epub 2005 Jan 25.)

[0062] 1×10^4 /ml로 슬라이드 챔버(slide chamber)에 세포를 깔고, 18시간 배양 후에 시험을 진행하였다. 세포 배양액(cell medium)을 걷어내고 3.7% 포름알데히드(formaldehyde)로 고정(fixation)을 하고 PBST로 세척한 후, 퍼미어빌리제이션 버퍼(Permeabilization buffer, 0.2% Triton X-100)로 20분간 처리하고, 일차항체로 항-NPC1L1-IgY 2.5ug/ml와 상업용 항체(commercial antibody)인 토끼-항-NPC1L1(Rabbit-Anti-NPC1L1, Santa Cruz, USA)를 1/50희석하여 각 각 1시간 처리하였다. PBS로 세척한 후 이차항체로 항-치킨 IgY-Alexa488(Anti-Chicken IgY-Alexa488, Biotium, USA)과 항-토끼 IgG-Alexa488(Anti-Rabbit IgG-Alexa488, Invitrogen, USA)를 각 각 1/100으로 희석하여 실온(RT)에서 1시간 처리 후 PBS로 세척하고 Hoechst33258로 핵을 30분간 카운터스테인(Counterstain)한 후 마운팅(Mounting)하였고, 멀티-포톤 콘포칼 레이저 스캐닝 마이크로스코프(Multi-photon Confocal Laser Scanning Microscope, LSM 510 META NLO, Carl Zeiss, Germany)를 이용하여 결과를 관찰하였다.

[0063] 이뮤노플루오레센스(Immunofluorescence, IF) 결과(도 6)를 보면, 일차항체를 처리하지 않은 음성 대조군(Negative control)을 제외하고, 항-NPC1L1 IgY 항체가 항원인 NPC1L1에 결합하여 세포질(Cytoplasm) 부분에서 발현하고 있는 것을 알 수가 있었으며, 난황을 통해 생산한 항체가 타겟 단백질(Target protein)에 잘 결합하는 것을 확인할 수 있었다.

[0064] 실험예 3: 생체 내(*in vivo*) 이뮤노히스토케미스트리(Immunohistochemistry) 및 이뮤노플루오레센스(Immunofluorescence)

[0065] 상기 결과로부터 시험관 내(*In vitro*)에서 항-NPC1L1-IgY가 NPC1L1 단백질에 결합하는 것을 확인하였고, 실제 소장 내 존재하는 NPC1L1 단백질에 결합 여부를 확인하기 위하여 마우스 소장 조직을 가지고, 이뮤노히스토케미스트리(IHC)와 이뮤노플루오레센스(IF)를 각 각 시행하였다.

[0066] (1) 생체 내(*in vivo*) 이뮤노히스토케미스트리(Immunohistochemistry) 방법

[0067] 난황으로부터 분리한 항-NPC1L1-IgY가 NPC1L1 단백질에 결합하는지 여부를 알아보기 위하여 마우스 소장 조직에서 이뮤노히스토케미스트리(Immunohistochemistry)를 시행하였다.

[0068] 알트만 등(Altmann SW, Davis HR Jr, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N, Graziano MP. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. Science. 2004 Feb 20;303(5661):1201-4)은 소장 내 NPC1L1의 분포가 소장 중심부(Small Intestine Proximal) 부분에 많이 존재한다고 보고하였다.

[0069] 따라서, 마우스 소장을 채취하여 십이지장 부분을 제외한 중심부 부분의 공장(Jejunum) 부위를 채취하여 PBS로 세척하여 장관 내 음식물을 제거한 후 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 고정하고, 자동조직처리기(Leica, Germany)를 이용하여 파라핀 고정 후 포매(Leica, Germany)하여 파라핀 블록을 만든 후, 조직미세 절편기로(Leica, Germany) 5 μ m 절편하여, 면역염색용 슬라이드 샘플을 제작하였다.

[0070] 슬라이드는 자일렌(Xylene)으로 탈 파라핀 처리 후 에탄올 시리즈(100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 50%)에서 함수하였고, PBS로 세척한 후 엔도지니아스 퍼옥시다제(Endogenous peroxidase)를 제거하기 위하여 0.3% H₂O₂ 처리 후 5% 노말 시럼(Normal Serum, Vector, USA)으로 블로킹(Blocking) 처리하고, 일차항체는 난황에서 분리한 항-NPC1L1-IgY (2.5ug/ml)와 상업용 항체(토끼-항-NPC1L1, 1/50, Santa Cruz, USA)를 각 각 농도별로 처리하고, 4℃ 오버나이트 배양하였다. PBS로 세척하고, 이차 항체를(Anti-Chicken Biotin, Anti-Rabbit Biotin, Vector, USA) 1/100으로 희석하여 실온(RT)에서 2시간 처리 후 PBS로 세척하고 VECTASTAIN ABC

Kit(Vetor, USA)를 이용하여 ABC를 2시간 배양시켰다. DAB(Vetor, USA) 용액을 2-5분간 반응시키고 PBS로 세척한 후 헤마톡실렌(Hematoxylin, Vetor, USA)으로 카운터 스테인(Counter stain)을 하고, D.W로 세척한 후 에탄올 시리즈로 탈수와 자일렌처리 후 마운팅(mounting)하였고, 광학현미경(Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 결과를 관찰하였다.

[0071] (2) 생체 내(*in vivo*) 이뮤노플루오레센스(Immunofluorescence) 방법

[0072] 난황으로부터 분리한 항-NPC1L1-IgY가 NPC1L1 단백질에 결합하는 여부를 알아보기 위하여 마우스 소장 조직에서 이뮤노플루오레센스를 시행하였다. 조직 파라핀 슬라이드는 자일렌으로 탈 파라핀 처리 후 에탄올 시리즈(100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 50%)에서 함수 하였고, PBS로 세척한 후 엔도지니아스 퍼옥시다아제를 제거하기 위하여 0.3% H₂O₂ 처리 후 5% 노말 시럼(Vector, USA)으로 블로킹 처리하고, 일차항체는 난황에서 분리한 NPC1L1-IgY(2.5ug/ml)와 상업용 항체(Rabbit-Anti-NPC1L1, 1/50, Santa Cruz, USA)를 각 각 농도별로 처리하고 4℃ 오버나이트 인큐베이션하였다. PBS로 세척하하고, 이차항체로 항-치킨 IgY-Alexa488(Biotium, USA)과 항-토끼 IgG-Alexa488(Invitrogen, USA)를 각 각 1/100으로 희석하여 실온에서 2시간 처리 후 PBS로 세척하고 Hoechst33258로 핵을 카운터 스테이닝한 후 마운팅하였고, 형광 현미경(Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 결과를 관찰하였다.

[0073] (3) 실험 결과

[0074] 도 7 및 8의 결과를 보면, 전체적으로 회장 용모 말단 부분에 강하게 발현하고 있는 것을 확인할 수가 있었으며, 용모 말단 부분 외에도 안쪽에서도 발현하고 있는 것이 확인이 되었고, IF의 경우 용모 말단 상피세포 부분에서 강하게 선의 형태로 형광 발현을 하고 있는 것을 확인할 수가 있었다.

[0075] 이상의 결과로부터 본 발명에서 생산된 IgY가 실제 소장 조직에서도 결합하는 사실을 확인할 수 있었다.

[0076] **실험예 4: 항-NPC1L1 IgY 항체의 콜레스테롤 흡수능 측정(Cholesterol uptake Assay)**

[0077] 항-NPC1L1 IgY의 효능 효과를 알아보기 위하여, Hep G2 세포를 이용하여 콜레스테롤 흡수능 시험을 시행하였다.

[0078] Hep G2 세포를 2 X 10⁵/ml의 밀도로 24 웰 플레이트에 10% FBS(Difco, USA)가 첨가된 DMEM(Difco, USA) 배지를 이용하여 18시간 배양한 후 항-NPC1L1 IgY를 농도 별로(5, 25, 50ug/ml) 처리하였고, 양성 대조군으로 콜레스테롤 흡수 저해제로 알려진 이제티미베(Ezetimibe)를 10ug/ml로 처리하여 비교하였다. 샘플은 각 각 37℃에서 1시간 전배양한 후 건어내고 새로운 배양액을 첨가하여 세척하였다. 방사선 동위원소가 부착된 [³H]-콜레스테롤을 50uM농도로 첨가하고 3시간을 처리하였다. 세포를 0.1% 지방산-프리(fatty acid-free) BAS가 첨가된 PBS로 세척하고 HBSS(Difco, USA)로 세포로 모은 후에 1% Triton X-100(Sigma, USA)이 첨가된 HBSS로 세포 용해(cell lysis)를 시키고, 방사선량을 베크먼(Beckmen) LS6500 신틸레이션 카운터(Scintillation Counter)로 측정하여, IgY 미처리구를 대조군으로 하여 비교분석하였다.

[0079] 도 9의 결과를 보면 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비하여 양성 대조군으로 사용한 이제티미베가 10ug/ml의 농도에서 유의적으로(p<0.05) 감소된 결과가 나타났으며, IgY 역시 25ug/ml의 농도부터 콜레스테롤 흡수를 유의적으로(p<0.05) 감소한 결과를 보여준다. 도 9에서 'COM' 과 'ISA'는 어쥬반트(adjuvant)의 종류를 의미하는 것으로, ISA는 'ISA 70 어쥬반트(adjuvant)'를 사용하여 만든 항-NPC1L1 IgY 처리구를 의미하고, 'COM'는 'Complete Freund adjuvant(Difco, USA)'를 사용하여 만든 항-NPC1L1 IgY 처리구를 의미한다.

[0080] 이와 같은 결과는 생산된 항-NPC1L1 IgY 항체가 NPC1L1 단백질에 효과적으로 결합을 하며, 결합된 IgY에 의하여 NPC1L1에 의한 콜레스테롤의 흡수가 유의적으로 억제하는 것을 의미한다. 즉, 본 발명의 항-NPC1L1 IgY가 기존에 콜레스테롤 흡수 억제제로 알려져 있는 약물인 이제티미베와 동일한 효과를 가지는 항체임을 의미하는 것이다.

실험예 5: 항-NPC1L1 IgY 항체의 동물 시험

장 내 콜레스테롤 수송 단백질인 NPC1L1(Niemann-Pick C1 Like1)에 결합하는 항-NPC1L1 IgY 항체의 효능을 알아보기 위한 동물실험을 진행 하였다.

(1) 시험동물

시험동물은 (주) 코아텍(KOATECH, Korea)로부터 구입한 5주령의 C57BL/6 암컷 마우스를 사용하였고, 동물 입수 후 검역과 7일간의 순화기간을 거쳐 시험실시 하루 전 그룹별로 10마리씩 분리하여 모든 시험군 간의 평균 체중을 동일하게 맞추어 군 분리를 시행하였다. 시험동물은 폴리카르보네이트 케이지(polycarbonate cage, 폭 26cm, 길이 42cm, 높이 18cm)에서 사육하였으며, 멸균된 정제수와 시험동물용 사료(퓨리나 코리아)를 자유 섭식시키면서 사육하였고, 정상군을 제외한 나머지 모든 그룹은 중앙실험동물(주)에서 구입한 아테로제닉 식이(Atherogenic diet, D12336, Research diets, INC. USA)를 자유 섭식시켜, 고농도의 콜레스테롤을 시험기간 중에 섭취하도록 하였다. 시험동물은 춘천바이오산업진흥원의 실험동물 윤리위원회의 방침에 의하여 시험을 진행 하였다.

(2) 시험군 및 시험물질 투여

모든 시험군 간의 평균 체중을 동일하게 맞춘 후 시험 그룹을 나누었다. 시험그룹은 모두 5그룹으로 분리하였으며, 크게 아무것도 처리하지 않은 정상군과 고 콜레스테롤 사료 투여군으로 나누었으며, 고 콜레스테롤 사료에 대한 대조군 및 IgY 투여에 따른 IgY 대조군과 IgY 투여군으로 나누었다. IgY는 동물 체중 kg당 50mg과 250mg을 투여 하였으며, IgY 대조군은 항-헬리코박터 파이로리(Anti-Helicobacter pylori) IgY를 동물 체중 kg당 250mg을 투여 하였고, 정상군 및 대조군은 PBS를 투여 하였다.

(3) 체중측정

시험동물은 개체 식별법에 따라 동물용 이어 펀치를 이용하여 귀에 개체 식별 표식을 했으며, 체중은 시험 개시 당시 체중을 100%로 보고 체중 증가율을 측정하였다. 체중은 매번 같은 시간에 측정하였으며, 시험기간 중 1주일에 한번 체중을 측정 하였다.

(4) 통계처리

시험 결과에 대한 유의성 검증은 GraphPad 4.0 prism 프로그램을 이용하여 One Way ANOVA-Test를 진행 하였으며, 고 콜레스테롤 식이를 투여한 대조군에 대하여 유의성을 표시하였다.

(5) 시험결과

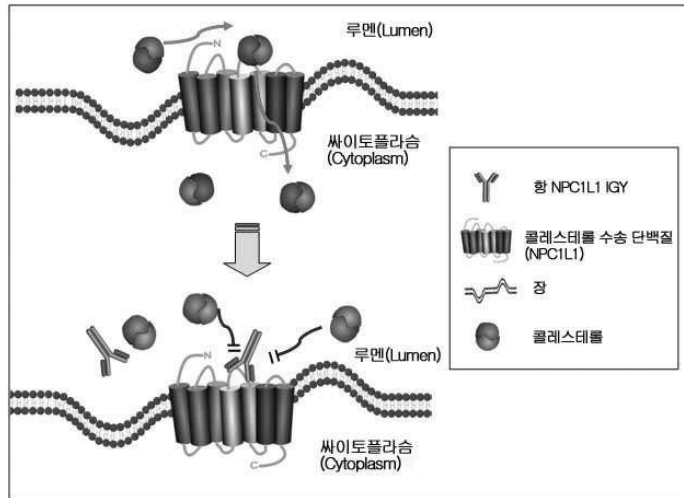
도 10에서 보는 바와 같이 고 콜레스테롤 식이를 투여한 결과 시험 3주차부터 체중 증가율이 급격하게 올라가는 경향을 나타내며 그 후 6주차 이후에 완만한 곡선을 나타내는 체중증가율을 나타냈으며, 시험 개시체중을 100%로 봤을 때 고 콜레스테롤 식이 섭취군인 대조군 그룹이 41%의 체중증가를 나타냈으며, 그에 비하여 항-NPC1L1-IgY를 투여한 그룹에서는 30%와 29%의 증가율을 나타내어 식이에 의한 체중증가율을 유의적으로 감소시켜 주었다($p<0.01$).

또한, IgY의 투여에 의한 영향을 알아보기 위하여 항-헬리코박터 파이로리 IgY를 투여한 그룹에서는 IgY의 투여에 기인한 체중증가 억제 효과는 나타나지 않았다.

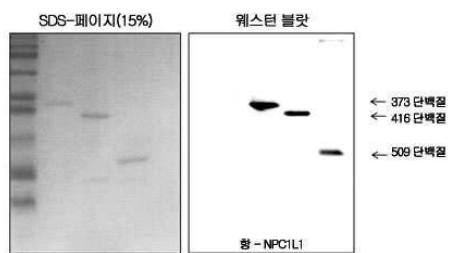
따라서, 장내 콜레스테롤 수송 단백질인 NPC1L1에 대해 IgY가 효과적으로 작용하여 증가되는 체중을 유의적으로 억제 시켜준 것으로 판단할 수 있었다.

도면

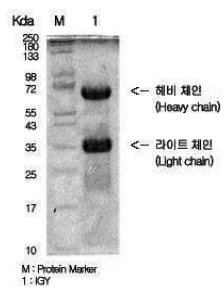
도면1



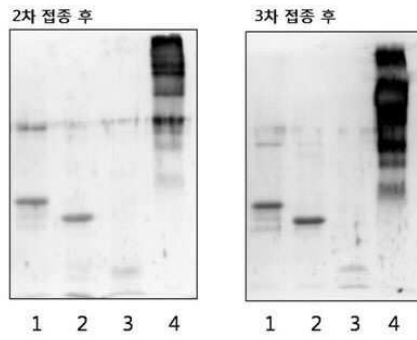
도면2



도면3



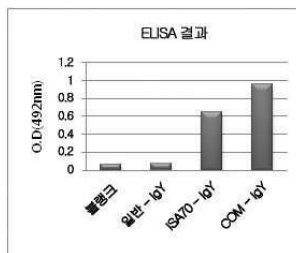
도면4



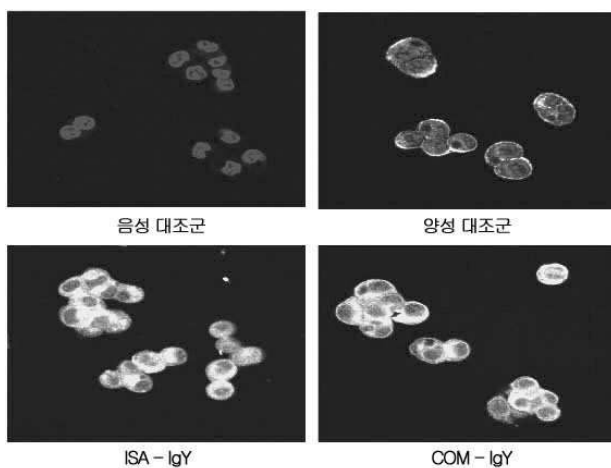
1 : 373 NPC1L1 재조합 단백질
 2 : 416 NPC1L1 재조합 단백질
 3 : 509 NPC1L1 재조합 단백질
 4 : KLH 컨쥬게이트드 신세틱 NPC1L1 펩타이드
 (KLH conjugated synthetic NPC1L1 Peptide)

1st Ab (정제된 IgY: 2ug/ml O/N at 4°C)
 2nd Ab : 항-치킨 IgY (sigma A9046)
 1hr at RT 1:10,000 (recomandation 1:16,000)

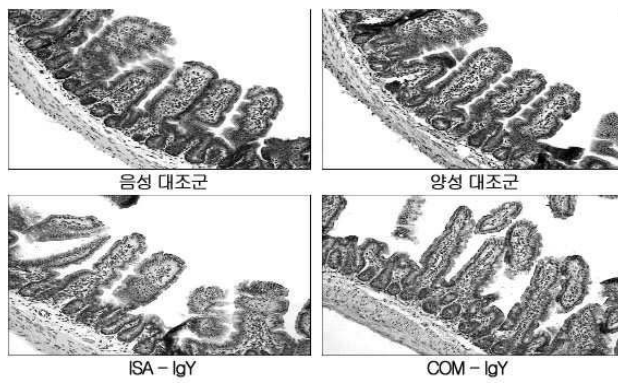
도면5



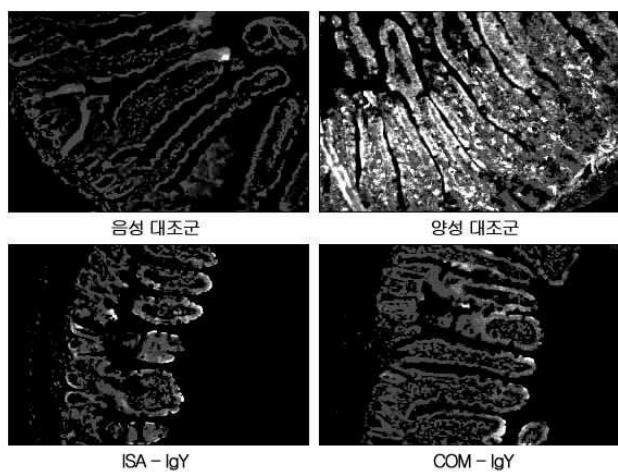
도면6



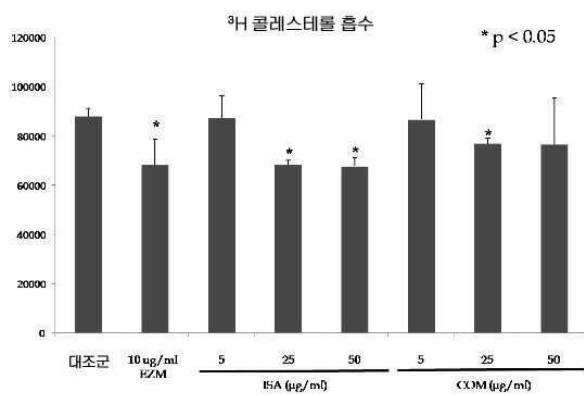
도면7



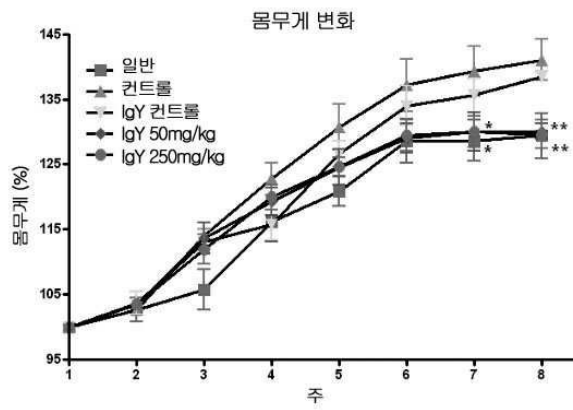
도면8



도면9



도면10



서열목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)