

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018년 2월 1일 (01.02.2018)

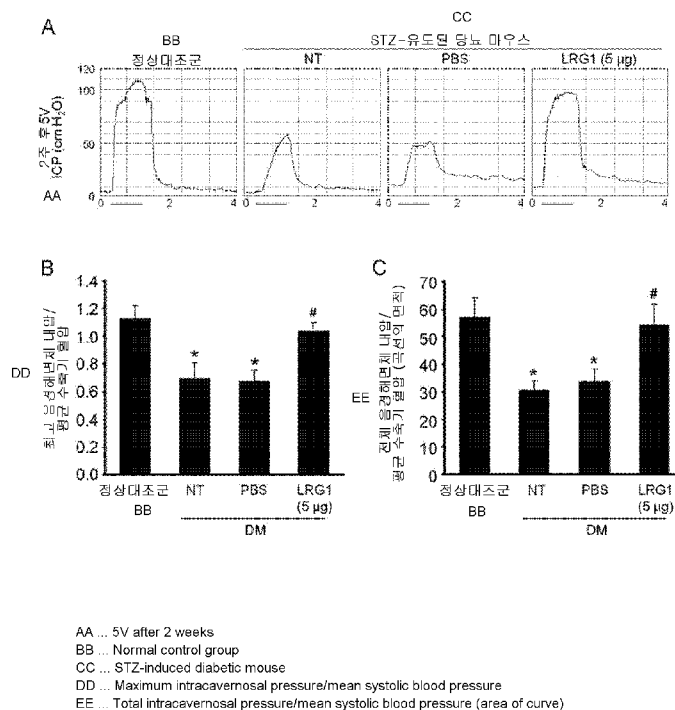


(10) 국제공개번호
WO 2018/021778 A1

- (51) 국제특허분류: **C07K 14/47** (2006.01) **A61K 47/50** (2017.01)
A61K 38/17 (2006.01) **A23L 33/18** (2016.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/007949
- (22) 국제출원일: 2017년 7월 24일 (24.07.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2016-0096355 2016년 7월 28일 (28.07.2016) KR
- (71) 출원인: 인하대학교 산학협력단 (INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE) [KR/KR]; 22212 인천시 남구 인화로 100, Incheon (KR). 한국과학기술원 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 34141 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 서준규 (SUH, Jun Kyu); 06285 서울시 강남구 영동대로 230, 3동803호, Seoul (KR). 류지간 (RYU, Ji Kan); 22001 인천시 연수구 컨벤시아대로42번길 77, 902동 701호, Incheon (KR). 김호민 (KIM, Ho Min); 34141 대전시 유성구 대학로 291 한국과학기술원 의과학대학원 1110호, Daejeon (KR). 윤국남 (YIN, Guo Nan); 22333 인천시 중구 인항로 30,108동 201호, Incheon (KR). 강지인 (KANG, Ji In); 06318 서울시 강남구 개포로 311, 902동 601호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 08380 서울시 구로구 디지털로 31길 20 (구로동) 601호, 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,

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING IMPOTENCE, ISCHEMIC DISEASES OR PERIPHERAL NERVE DISEASES, CONTAINING FUSION PROTEIN COMPRISING LRG1 GLYCOPROTEIN

(54) 발명의 명칭: LRG1 당단백질을 포함하는 융합 단백질을 함유하는 발기부전, 허혈성 질환 또는 말초 신경 질환의 예방 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a fusion protein comprising an LRG1 glycoprotein and a composition for preventing or treating impotence, ischemic diseases or peripheral nerve diseases, containing the same as an active ingredient. The LRG1 glycoprotein or an LRG1-Fc fusion protein according to the present invention increases the level of endothelial cell-specific and nerve cell-specific proteins, and thus has an excellent effect of improving impotence such as inducing the regeneration of the endothelial cells and nerve cells of the corpus cavernosum and increasing penile erection, thereby being usefully used for the prevention or treatment of impotence.



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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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))

Further, the LRG1 glycoprotein or LRG1-Fc fusion protein according to the present invention has the effect of regenerating blood vessels and nerves, and thus can be usefully used for the prevention or treatment of ischemic diseases or peripheral nerve diseases.

(57) 요약서: 본 발명은 LRG1 당단백질을 포함하는 융합 단백질 및 이를 유효성분으로 포함하는 발기부전, 허혈성 질환 또는 말초 신경질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 LRG1 당단백질 또는 LRG1-Fc 융합 단백질은 내피세포 및 신경세포 특이적인 단백질의 수준을 증가시켜 음경 해면체 내피세포 및 신경세포의 재생을 유도하고 음경 발기력을 증가시키는 등 우수한 발기부전 개선 효과를 가지고 있는바, 발기부전의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 LRG1 당단백질 또는 LRG1-Fc 융합 단백질은 혈관 및 신경 재생 효과를 가지고 있어, 허혈성 질환 또는 말초 신경질환의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: LRG1 당단백질을 포함하는 융합 단백질을 함유하는 발기부전, 허혈성 질환 또는 말초 신경질환의 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 LRG1 당단백질을 포함하는 융합 단백질 및 이를 유효성분으로 포함하는 발기부전, 허혈성 질환 또는 말초 신경질환의 예방 또는 치료용 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 발기부전은 남성 성기능 장애의 일종으로서, 남성의 성기가 발기되지 않거나 발기 상태가 지속되지 않아 성행위를 할 수 없는 현상이다. 발기부전의 원인은 크게 심인성 원인과 기질성 원인으로 구별된다. 심인성 발기부전은 심리적, 정신적 영향에 의한 교감신경의 과도한 작용으로 인한 노르아드레날린(noradrenaline)의 과도한 분비, 음경해면체 평활근 긴장도 증가, 신경 전달물질의 분비 억제 등에 기인한다.
- [3] 기질성 발기 부전은 그 원인에 따라, 신경인성, 혈관성 및 내분비성 발기부전으로 분류된다. 상기 혈관성 및 신경인성 발기부전은 고지질혈증, 당뇨, 고혈압, 흡연, 전신 심혈관질환, 척수손상, 음경신경손상 등으로 인해서 음경 해면체 및 혈관내피세포, 음경신경세포가 손상되어 이들 세포에서 일산화질소(nitric oxide: NO) 등의 이완성 물질의 분비가 원활하지 않아 생기는 장애이다.
- [4] 최근 발기부전에 관한 연구는 기질성 원인에 더 비중을 두고 있고, 그의 치료로서 주로 비아그라(viagra, 성분명: 실데나필)를 포함한 경구용 PDE-5(phosphodiesterase-5) 저해제가 전세계적으로 사용되고 있다. 이러한 경구용 약물은 음경해면체에 특이적으로 분포하는 PDE-5의 저해에 의한 cGMP의 농도를 증가시킴으로써 음경해면체 내 혈류를 증대시켜 발기를 유도하여 발기부전의 치료효과가 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 비아그라와 같은 PDE-5 저해제 계열의 약물들은 두통, 안면홍조, 소화불량, 및 심장마비 등 여러 가지 부작용을 가지고 있다고 보고되고 있을 뿐만 아니라, 분자적 수준에서 일시적인 단백질 발현 및 관련 인자들을 조절하는 것으로 근본적인 치료라 할 수 없다. 더욱이 당뇨 또는 음경신경손상에 의한 발기부전의 경우, 이와 같은 치료 효과가 잘 나타나지 않을 뿐만 아니라, 설령 효과가 있다 해도 그 효능이 장기간 지속되지 못한다는 단점이 있다. 따라서, 발기부전 음경 내의 비정상화된 해면체 구조를 근본적으로 치료하고, 그 효능도 장시간 지속되는 발기부전 치료제의 필요성이 요구되고 있는 실정이다.
- [5] 한편, 허혈(Ischemia)이란 신체기관, 조직 또는 부위로의 혈류 공급 감소 상태를

말하며, 궁극적으로 비가역적인 손상, 즉 세포 및 조직의 괴사로 이어지게 된다. 특히, 심장, 신장, 뇌는 혈류 공급 부족에 가장 민감한 신체 기관으로서, 예를 들어, 뇌졸중 또는 두부 손상 등에 의하여 뇌 조직 상에 허혈이 발생하면 허혈성 캐스케이드라고 불리는 일련의 과정들이 촉발되어 뇌 조직이 영구적으로 손상된다. 허혈은 여러 가지 원인에 의하여 야기될 수 있으며, 예를 들면, 심장의 비정상적인 빠른 박동, 저혈압, 혈관 외부로부터의 혈관 압박(예를 들어, 혈관 외부의 압에 의한 혈관 압박), 혈전, 색전증, 일과성 허혈 발작(transient ischemic attack), 일과성 심장발작, 사고로 인한 뇌혈관 손상, 뇌일혈, 뇌경색, 동정맥 기형, 말초 동맥 폐색 질환 등에 의하여 허혈 증상이 나타날 수 있다.

- [6] 허혈성 질환이란, 상기와 같은 허혈 증상을 나타내는 질환으로서, 관련되는 신체기관에 따라 뇌허혈, 심장허혈, 망막허혈, 심한사지허혈(critical limb ischemia), 허혈성 대장염, 허혈성 급성 신부전증 및 심근비대증 등을 포함할 수 있다. 구체적으로, 심장 근육에 혈류 공급이 불충분할 때 발생하는 심장 허혈은 협심증과 같은 가슴 통증, 심부전(cardiac failure)을 일으킬 수 있고, 뇌에 불충분한 혈류 공급으로 인하여 발생하는 뇌 허혈은 급성 허혈성 뇌졸중 또는 만성 뇌 허혈로 인한 혈관성 치매(vascular dementia)의 원인이 될 수 있다. 대장 또는 소장의 허혈은 허혈성 대장염 또는 장간막허혈을 야기할 수 있고, 피부로의 혈류 공급이 감소한 경우 반점성 피부 변색이 발생할 수 있다. 또한, 혈관이 부실함에 기인하여 신체 말단으로의 혈류공급이 불충분하여 사지절단술을 받아야만 하는 심한 사지 허혈(critical limb ischemia)을 야기할 수 있고, 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 당뇨병성 신경장애(diabetic neuropathy), 당뇨병성 혈관심장질환을 포함할 수 있다. 상기와 같은 허혈성 질환의 치료를 위하여 신체기관, 조직 또는 부위로의 혈류 공급 감소 상태를 해소하기 위한 혈관생성(angiogenesis)을 이용하는 방법이 연구되어 왔다.

- [7] 한편, 신경병증이란 신경계의 구조적 혹은 기능적 이상으로 발생하는 질환이다. 신경계는 뇌, 척수에 분포하여 그 기능의 조절에 관여하는 중추신경계와 뇌, 척수를 제외한 체내의 거의 모든 기관에 분포하여 그 기능의 조절에 관여하는 말초신경계로 나뉘어 진다. 말초신경계는 다시 운동신경계, 감각신경계, 자율신경계로 분류된다. 뇌와 척수에서 신경돌기(neurite)들이 뻗어나와 몸통, 팔, 다리로 가게 되는데 이를 말초신경이라고 한다. 말초신경은 손, 발, 청각기관에서 느낀 감각을 중추신경(뇌와 척수)에 전하고, 중추신경의 명령을 근육에 전달하는 역할을 한다.

- [8] 말초신경은 여러 가지 원인에 의해서 손상을 받게 되는데 이러한 경우를 통칭하여 말초 신경병증(peripheral neuropathy)이라고 한다. 하나의 말초신경만 손상을 받는 경우를 단신경병증(mono neuropathy)이라고 하고, 여러 말초신경이 비슷한 정도로 손상되는 경우를 다발성 신경병증(multiple neuropathy)이라고 한다. 신경병증의 원인은 여러 가지가 있는데 크게 나누어 보면 대사성 질환(당뇨병, 신부전증, 갑상선 기능저하증), 약물(항암제, 결핵약)이나

독성물질중독(납, 유기용매), 영양결핍(비타민 부족, 알코올중독),
결체조직질환(류마티스성 관절염, 전신성 홍반성 낭창 등), 염증성
질환(길랑-바레 증후군), 유전성 신경병 등이 있다. 그 외에 암과도 연관되어
나타나기도 한다.

- [9] 한편, LRG1은 8개의 류신 중복성 부위 (leucine-rich repeat; LRR)를 가지는 혈청
당단백질로, LRR 모티프를 가진 단백질의 경우, 신호전달 및 세포 부착 등
다양한 세포 내 작용에 관여함이 알려져 있다. 세포 내 여러 다양한 작용을 하는
다른 LRR 패밀리를 가진 단백질과는 달리, LRG1 당단백질에 대한 기능은 거의 알려진
바가 없고, 다양한 염증성 질환 및 과립구 (granulocyte)의 분화 과정 동안 그
발현이 증가됨이 보고되어 있을 뿐이다. 최근에는 마우스 망막혈관에서 LRG1
당단백질이 TGF를 매개로 하는 신호전달 경로에 작용하여 혈관 내피세포의
증식 및 이동을 통한 혈관생성을 유도함이 보고되었다 (X Wang et al., Nature, 499
(7458), pp306-311, 2013). 그러나 LRG1 당단백질과 음경발기의 관계 및 이의
발기부전 예방 또는 치료 효과에 대해서는 알려진 바 없으며, 이에 대한 연구도
전무한 상태이다.

- [10] 이에 본 발명자들은 새로운 단백질 의약품 개발하기 위해 연구를 수행한 결과,
LRG1 당단백질 및 Fc 도메인과 융합된 LRG1-Fc 융합 단백질이 음경 해면체
내피세포 및 신경 세포의 재생을 유도하여 음경 발기력을 증가시키고, 우수한
혈관 및 신경 재생 효과를 보임을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 본 발명의 목적은 LRG1 (Leucine-Rich alpha-2-Glycoprotein 1) 당단백질과 Fc
도메인이 융합된 LRG1-Fc 융합 단백질을 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 LRG1 당단백질 또는 LRG1-Fc 융합 단백질을
포함하는 발기부전, 허혈성 질환 또는 말초 신경질환의 예방 또는 치료용
조성물을 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 또 다른 목적은 LRG1 당단백질 또는 LRG1-Fc 융합 단백질을 이를
필요로하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 발기부전, 허혈성 질환 또는 말초
신경질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [14] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 LRG1 (Leucine-Rich
alpha-2-Glycoprotein 1) 당단백질과 Fc 도메인이 융합된 LRG1-Fc 융합 단백질을
제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은 상기 LRG1-Fc 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를
제공한다.
- [16] 또한, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [17] 또한, 본 발명은 상기 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.

- [18] 또한, 본 발명은 LRG1 당단백질 또는 상기 LRG1-Fc 융합 단백질을 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [19] 또한, 본 발명은 LRG1 당단백질 또는 상기 LRG1-Fc 융합 단백질을 포함하는 발기부전 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [20] 또한, 본 발명은 LRG1 당단백질 또는 상기 LRG1-Fc 융합 단백질을 포함하는 발기부전 예방 또는 개선용 의약외품 조성물을 제공한다.
- [21] 또한, 본 발명은 LRG1 당단백질 또는 상기 LRG1-Fc 융합 단백질을 포함하는 허혈성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [22] 또한, 본 발명은 LRG1 당단백질 또는 상기 LRG1-Fc 융합 단백질을 포함하는 허혈성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [23] 또한, 본 발명은 LRG1 당단백질 또는 상기 LRG1-Fc 융합 단백질을 포함하는 말초 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [24] 또한, 본 발명은 LRG1 당단백질 또는 상기 LRG1-Fc 융합 단백질을 포함하는 말초 신경질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [25] 또한, 본 발명은 LRG1 당단백질 또는 상기 LRG1-Fc 융합 단백질을 이를 필요로하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 발기부전의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [26] 또한, 본 발명은 LRG1 당단백질 또는 상기 LRG1-Fc 융합 단백질을 이를 필요로하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 허혈성 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [27] 또한, 본 발명은 LRG1 당단백질 또는 상기 LRG1-Fc 융합 단백질을 이를 필요로하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 말초 신경질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [28] 본 발명에 따른 LRG1 당단백질 또는 LRG1-Fc 융합 단백질은 내피세포 및 신경세포 특이적인 단백질의 수준을 증가시켜 음경 해면체 내피세포 및 신경세포의 재생을 유도하고 음경 발기력을 증가시키는 등 우수한 발기부전 개선 효과를 가지고 있는바, 발기부전의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 LRG1 당단백질 또는 LRG1-Fc 융합 단백질은 혈관 및 신경 재생 효과를 가지고 있어, 허혈성 질환 또는 말초 신경질환의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [29] 도 1은 재조합 벡터를 곤충세포에서 발현시킨 후, 분리한 LRG1-Fc 융합 단백질을 SDS-PAGE를 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [30] 도 2는 재조합 벡터를 포유동물 세포에서 발현시킨 후, 분리한 LRG1-Fc 융합 단백질을 SDS-PAGE를 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [31] 도 3은 인간 유래 LRG1 당단백질을 인간 IgG1의 Fc 도메인과 링커로 연결한

- LRG1-Fc 융합 단백질의 개략도이다 (신호 펩타이드(1~28)-인간 LRG1(29~340)-링커 (AAA)(341~343)-Fc 도메인(344~570, 인간 IgG1)).
- [32] 도 4는 마우스 유래 LRG1 당단백질을 인간 IgG1의 Fc 도메인과 링커로 연결 한 LRG1-Fc 융합 단백질의 개략도이다 (신호 펩타이드(1~28)-마우스 LRG1(29~338)- 링커(AAA)(339~341)-Fc 도메인(342~568, 인간 IgG1)).
- [33] 도 5는 당뇨병 발기부전 마우스 모델에서 인간 LRG1-Fc 융합 단백질 투여에 의한 음경신경 전기자극에 따른 음경해면체 내압(발기력) 측정 결과를 나타낸 도이다.
- [34] 도 6은 음경신경손상 발기부전 마우스 모델에서 인간 LRG1-Fc 융합 단백질 투여에 의한 음경신경 전기자극에 따른 음경해면체 내압(발기력) 측정 결과를 나타낸 도이다.
- [35] 도 7은 당뇨병 발기부전 마우스 모델의 음경해면체 조직에서 인간 LRG1-Fc 융합 단백질 투여에 의한 혈관내피세포 특이적 단백질인 혈소판-내피세포 부착 분자- 1(PECAM-1: Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) 및 증식 세포 표지 인자인 BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine)의 발현 정도를 공초점 현미경으로 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [36] 도 8은 당뇨병 발기부전 마우스 모델 음경 조직의 배부신경에서 인간 LRG1-Fc 융합 단백질 투여에 의한 신경성산화질소생성효소(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)의 발현 정도를 공초점 현미경으로 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [37] 도 9는 당뇨병 발기부전 마우스 모델 음경 조직의 음경해면체 내에서 인간 LRG1-Fc 융합 단백질 투여에 의한 신경성산화질소생성효소(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)의 발현 정도를 공초점 현미경으로 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [38] 도 10은 당뇨병 발기부전 마우스 모델 음경 조직의 음경해면체 내에서 인간 LRG1-Fc 융합 단백질 투여에 의한 다양한 신경재생 특이적 단백질 및 그 수용체의 발현 정도를 웨스턴블롯으로 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [39] 도 11은 고혈당으로 허혈을 유도한 HUVEC 및 마우스 음경해면체 내피세포(MCECs: Mouse Cavernous Endothelial Cells)에서 인간 LRG1-Fc 융합 단백질 처리에 따른 튜브 형성 정도를 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 도이다.
- [40] 도 12는 고혈당으로 허혈을 유도한 대동맥 절편 (aortic ring)에서 인간 LRG1-Fc 융합 단백질 처리에 따른 미세 혈관신생 정도를 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 도이다.
- [41] 도 13은 정상 마우스의 주골반신경절(major pelvic ganglion, MPG)을 고혈당 조건에서 배양함으로써 말초 신경질환 모델을 만든 후, 인간 LRG1-Fc 융합 단백질 처리에 따른 신경세포 특이적인 단백질인 신경미세섬유(neurofilament) 및 베타-III 튜불린의 발현 정도를 공초점 현미경으로 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [42] 도 14는 정상 마우스의 후근신경절(dorsal root ganglion, DRG)을 고혈당

조건에서 배양함으로써 말초 신경질환 모델을 만든 후, 인간 LRG1-Fc 융합 단백질 처리에 따른 신경세포 특이적인 단백질인 베타-III 튜블린의 발현 정도를 공초점 현미경으로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [43] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [44] 본 발명은 LRG1 (Leucine-Rich alpha-2-Glycoprotein 1) 당단백질과 Fc 도메인이 융합된 LRG1-Fc 융합 단백질을 제공한다.
- [45] 본 발명에서 “LRG1(Leucine-Rich alpha-2-Glycoprotein 1)”은 8개의 류신 중복성 부위 (leucine-rich repeat; LRR)를 가지는 혈청 당단백질을 의미하는 것으로, 인간, 마우스 등 다양한 포유동물 유래의 LRG1 당단백질을 모두 포함하며, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 따른 LRG1 당단백질은 바람직하게는 인간 또는 마우스 유래로서 예를 들어, 서열번호 1 또는 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있으며, 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다.
- [46] 상기 "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 1 또는 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 1 또는 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다.
- [47] 본 발명의 LRG1 당단백질에는 이의 천연형 아미노산 서열을 갖는 단백질뿐만 아니라 이의 아미노산 서열 변이체가 본 발명의 범위에 포함된다. 상기 LRG1 당단백질의 변이체란 LRG1 당단백질의 천연 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다. 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩타이드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다. 상기 LRG1 당단백질 또는 이의 변이체는 천연에서 추출하거나 합성 (Merrifield, J. Amer. chem. Soc. 85:2149-2156, 1963) 또는 DNA 서열을 기본으로 하는 유전자 재조합 방법에 의해 제조될 수 있다 (Sambrook et al, Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 2판, 1989).
- [48] 본 발명의 LRG1 당단백질은 서열번호 4 또는 5로 표시되는 염기서열로 암호화될 수 있으며, 상기 뉴클레오티드와 기능적으로 동등한 작용을 할 수 있는 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다.
- [49] 상기 “기능적으로 동등한”이란 염기의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 서열번호 4 또는 5로 표시되는 염기서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 4 또는 5로 표시되는 염기서열에 의해 코딩된 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 코딩할 수 있는 염기서열을

의미한다. 예를 들어, 일부 염기서열이 결실(deletion), 치환(substitution) 또는 삽입(insertion)에 의해 변형되었지만, 상기 LRG1 당단백질을 코딩하는 핵산 분자와 기능적으로 동일한 작용을 할 수 있는 변이체(variants)를 포함하는 개념이다.

- [50] 본 발명에서 “Fc 도메인”은 Ig(immunoglobulin, 면역글로불린)의 Fc 도메인을 의미한다. 상기 Ig의 Fc 도메인은 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.
- [51] 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.
- [52] 본 발명에 따른 일실시예에서는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 인간 IgG1의 Fc 도메인을 이용하였다. 상기 인간 IgG1의 Fc 도메인은 서열번호 6으로 표시되는 염기서열로 암호화될 수 있으며, 상기 뉴클레오티드와 기능적으로 동등한 작용을 할 수 있는 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다.
- [53] 본 발명의 융합 단백질은 LRG1 (Leucine-Rich alpha-2-Glycoprotein 1) 당단백질과 Fc 도메인이 링커로 연결된 형태일 수 있다.
- [54] 본 발명에서, “링커(linker)”란 기본적으로는 두 개의 서로 다른 융합 파트너(예를 들어, 생물학적 고분자 등)를 수소 결합, 정전기적 상호작용, 반데르발스력, 이황화 결합, 염 브릿지, 소수성 상호작용, 공유결합 등을 이용하여 연결할 수 있는 연결체를 의미하는데, 바람직하게는 펩타이드 링커이다.
- [55] 상기 펩타이드 링커는 임의의 아미노산 서열을 가진 펩타이드로서, 기능을 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 이루어질 수 있으며, 예를 들어, 1 내지 수십개의 아미노산으로 이루어질 수 있고, 바람직하게는 1 내지 10개의 아미노산으로 이루어질 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

- [56] 본 발명에 따른 LRG1-Fc 융합 단백질은 예를 들어, 서열번호 7 또는 8로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있으며, 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다.
- [57] 본 발명에 따른 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.
- [58]
- [59] 또한, 본 발명은 상기 LRG1-Fc 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [60] 상기 폴리뉴클레오티드는 전사, 번역 과정을 거쳐 본 발명의 LRG1-Fc 융합 단백질을 암호화하는 것이라면 제한 없이 본 발명의 범위 내에 포함된다.
- [61] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 추가적으로 발현된 단백질의 분비를 위한 신호 펩타이드를 암호화하는 서열을 포함할 수 있다. 상기 신호 펩타이드 서열은 단백질의 발현 및 정제 과정 후에는 절단되어 제거되는 것이 바람직하다.
- [62] 본 발명에 따른 LRG1-Fc 융합 단백질은 예를 들어, 서열번호 9 또는 10으로 표시되는 염기서열로 이루어질 수 있으며, 상기 폴리뉴클레오티드와 기능적으로 동등한 작용을 할 수 있는 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다.
- [63]
- [64] 또한, 본 발명은 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [65] 본 발명의 벡터는 바람직하게는 발현벡터이며, 상기 발현벡터란, 목적하는 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 제조용 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 제작물을 의미한다. 상기 발현 벡터는 개시코돈, 종결코돈, 프로모터, 오퍼레이터 등의 발현조절 요소들을 포함하는데, 상기 개시 코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 제작물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다.
- [66] 상기 발현 벡터는 융합 단백질의 검출을 용이하게 하기 위하여, 임의로 엔도펩타아이제를 사용하여 제거할 수 있는 단백질 태그를 추가로 포함할 수 있다.
- [67] 본 발명에서 "태그(tag)"란, 정량 가능한 활성 또는 특성을 나타내는 분자를

의미하며, 플로오레세인과 같은 화학적 형광물질(fluoracer), 형광 단백질(GFP) 또는 관련 단백질과 같은 폴리펩타이드 형광물질을 포함한 형광 분자일 수도 있고; Myc 태그, 플래그(Flag) 태그, 히스티딘 태그, 루신 태그, IgG 태그, 스트렙타비딘 태그 등의 에피토프 태그일 수도 있다. 특히, 에피토프 태그를 사용할 경우, 바람직하게는 6개 이상의 아미노산 잔기로 구성되고, 보다 바람직하게는 8개 내지 50개의 아미노산 잔기로 구성된 펩타이드 태그를 사용할 수 있다.

[68] 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(pUC18, pBAD, pIDTSAMRT-AMP 등), 대장균 유래 플라스미드(pYG601BR322, pBR325, pUC118, pUC119 등), 바실러스 서브틸리스 유래 플라스미드(pUB110, pTP5 등), 효모-유래 플라스미드(YEp13, YEp24, YCp50 등), 파지 DNA(Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λ gt10, λ gt11, λ ZAP 등), 동물 바이러스 벡터(레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 백신시아 바이러스(vaccinia virus) 등), 곤충 바이러스 벡터(배큘로바이러스(baculovirus) 등)를 조작하여 제작될 수 있다.

[69] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[70]

[71] 또한, 본 발명은 상기 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.

[72] 상기 형질전환은 다양한 방법에 의하여 수행될 수 있는데, 본 발명의 융합 단백질을 생산할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, CaCl_2 침전법, CaCl_2 침전법에 DMSO(dimethyl sulfoxide)라는 환원물질을 사용함으로써 효율을 높인 Hanahan 방법, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리아 매개된 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 사용될 수 있다.

[73] 상기 세포는 본 발명의 융합 단백질을 생산할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 대장균(*E. coli*), 스트렙토마이세스, 살모넬라 티피뮤리움 등의 박테리아 세포; 사카로마이세스 세레비지에, 스킨조사카로마이세스 폼베 등의 효모 세포; 피치아 파스토리스 등의 균류 세포; 드로조필라, 스포도프테라 Sf9 세포 등의 곤충 세포; CHO, COS, NSO, 293, 보우 멜라노마 세포 등의 동물 세포; 또는 식물 세포가 될 수 있다.

[74]

[75] 본 발명에 따른 LRG1 당단백질 또는 LRG1-Fc 융합 단백질은 내피세포 및 신경세포 특이적인 단백질의 수준을 증가시켜 음경 해면체 내피세포 및 신경세포의 재생을 유도하고 음경 발기력을 증가시키는 등 우수한 발기부전 개선 효과를 가지고 있다. 또한, 본 발명에 따른 LRG1 당단백질 또는 LRG1-Fc

융합 단백질은 혈관 및 신경 재생 효과를 가지고 있다. 따라서, 본 발명의 LRG1 당단백질 또는 LRG1-Fc 융합 단백질은 발기부전, 허혈성 질환 또는 말초 신경질환의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

- [76] 이에 본 발명은 LRG1 당단백질을 유효성분으로 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [77] 또한, 본 발명은 LRG1 당단백질 또는 상기 LRG1-Fc 융합 단백질을 포함하는 허혈성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [78] 또한, 본 발명은 LRG1 당단백질 또는 상기 LRG1-Fc 융합 단백질을 포함하는 말초 신경질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [79] 상기 조성물은 약학적 조성물, 의약품 조성물 또는 식품 조성물을 포함한다.
- [80] 또한, 본 발명은 LRG1 당단백질 또는 상기 LRG1-Fc 융합 단백질을 이를 필요로하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 발기부전의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [81] 또한, 본 발명은 LRG1 당단백질 또는 상기 LRG1-Fc 융합 단백질을 이를 필요로하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 허혈성 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [82] 또한, 본 발명은 LRG1 당단백질 또는 상기 LRG1-Fc 융합 단백질을 이를 필요로하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 말초 신경질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [83] 본 발명에서 용어, "예방"은 본 발명의 LRG1 당단백질 또는 LRG1-Fc 융합 단백질을 포함하는 조성물을 이용하여 발기부전, 허혈성 질환 또는 말초 신경질환의 증상을 차단하거나, 발기부전, 허혈성 질환 또는 말초 신경질환의 증상을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.
- [84] 본 발명에서 용어, "치료"는 본 발명의 LRG1 당단백질 또는 LRG1-Fc 융합 단백질을 포함하는 조성물을 이용하여 발기부전, 허혈성 질환 또는 말초 신경질환의 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 말한다.
- [85] 본 발명에서 용어, "발기부전"은 성생활에 충분한 발기가 되지 않거나 유지되지 않은 상태를 의미하며, 일반적으로 이러한 상태가 3개월 이상 지속되었을 경우 발기부전으로 정의한다. 상기 발기부전은 심리적인 요인에 기인하는 심인성 발기부전과 육체적인 장애에 기인하는 기질성 발기부전으로 크게 나눌 수 있으며, 본 발명의 LRG1 당단백질 또는 LRG1-Fc 융합 단백질은 궁극적으로 음경의 기능을 개선시켜 심인성 및 기질성 발기부전을 모두 치료할 수 있다. 상기 기질성 발기부전은 당뇨병, 음경조직손상, 관상동맥질환, 신장병증, 신경병증, 고혈압, 동맥경화 또는 고지혈증 등의 질병에 의한 것일 수 있으나, 상기 예시에 한정되는 것이 아니며 발기에 영향을 줄 수 있는 질병이라면 제한 없이 포함된다.
- [86] 본 발명에서 용어, "해면체"는 포유류의 음경이나 음핵의 주체를 이루는 발기조직으로, 주위가 탄성섬유를 함유하는 두껍고 튼튼한 결합조직의 막으로

쌓여 있으며, 이 막이 내부로 들어가 있어 해면상의 작은 방을 이루고 있다. 남성의 음경 내부에는 좌우에 2개의 음경 해면체와 그 아래쪽에 1개의 요도 해면체가 있고, 여성에게는 음경 해면체와 비슷한 구조를 가진 음핵 해면체와 요도 해면체가 있다. 해면체에 정맥혈이 가득차게 되면 음경이 발기하게 된다. 음경 해면체 평활근과 음경 혈관은 평상시 아드레날린성 교감 신경에 의해 수축 상태에 있으며, 이완에 의한 발기 반응 후, 아드레날린성 교감 신경계의 자극에 의해 다시 수축 상태로 되돌아온다. 이렇듯 발기조직은 평상시 수축 상태를 유지하지만, 성적 각성시 뇌 중추에서 보내는 신호와 신경계의 자극, 체 내 및 발기조직 내의 여러 신경 전달 물질 및 호르몬 등에 의해 발기조직이 이완되고, 발기가 시작되며, 발기가 유지된다. 이러한 발기반응이 끝난 후, 다시 발기조직은 수축 상태를 유지하게 된다.

[87] 본 발명에서 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 급성간부전증, 당뇨병 족부궤양, 당뇨병 신증, 허혈성 대장염, 심근비대증, 외과수술 부작용에 기인한 허혈성 질환 또는 기관 조직 손상 등이 포함되며, 이에 제한되지 않는다. 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 포함하며, 이에 제한되지 않는다.

[88] 본 발명에서 용어, “말초 신경질환”은 말초 신경의 손상 또는 사멸에 의해 발생하는 질환을 의미하는 것으로, 말초신경손상, 당뇨병 신경병증(당뇨성 말초신경병증) 등이 포함되며, 이에 제한되지 않는다. 상기 당뇨병 신경병증은 당뇨 합병증의 하나로 고혈당에 동반되는 신경세포의 대사 이상 또는 영양 혈관의 장애 등에 의해 발생하며, 대칭성 말초성 다발신경장애, 당뇨병성 근육위축증, 단신경장애형 신경장애, 자율신경장애, 무통성 심근허혈, 운동 장애등의 증상을 나타낸다.

[89] 본 발명의 조성물이 발기부전, 허혈성 질환 또는 말초 신경질환의 예방 또는 치료를 목적으로 약학적 조성물로 제형화 될 경우, 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌 (Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 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 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔 (witepsol), 마크로콜, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

- [90] 본 발명에서 용어, "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [91] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 상기 조성물의 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다.
- [92] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장, 정맥, 근육, 피하, 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다. 그러나 경구 투여 시, 단백질은 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화하는 것이 바람직하다. 본 발명의 조성물은 바람직하게는 주사제 형태로 투여될 수 있다.
- [93] 본 발명의 조성물은 LRG1 당단백질과 함께 발기부전, 허혈성 질환 또는 말초 신경질환의 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.
- [94] 본 발명의 조성물은 발기부전, 허혈성 질환 또는 말초 신경질환의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [95]
- [96] 본 발명의 조성물은 발기부전, 허혈성 질환 또는 말초 신경질환의 예방 또는

개선을 목적으로 의약품 조성물에 첨가될 수 있다.

[97] 본 발명의 조성물을 의약품 조성물로 사용할 경우, 상기 유효성분을 그대로 첨가하거나 다른 의약품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[98]

[99] 또한, 본 발명의 조성물은 발기부전, 허혈성 질환 또는 말초 신경질환의 예방 또는 개선을 목적으로 건강기능식품에 첨가될 수 있다.

[100] 본 발명에서 용어, '건강기능식품'이란 질병의 예방 및 개선, 생체방어, 면역, 병후의 회복, 노화 억제 등 생체조절기능을 가지는 식품을 말하는 것으로, 장기적으로 복용하였을 때 인체에 무해하여야 한다.

[101] 상기 건강기능식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 건강기능식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[102] 본 발명의 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 유효성분을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15중량 % 이하, 바람직하게는 10중량 % 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[103] 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[104]

[105] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예 및 실험예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[106]

[107] 실시예 1. LRG1 당단백질의 제조

[108] LRG1 당단백질은 공지된 인간 유래 LRG1 당단백질 또는 마우스 유래 LRG1 당단백질의 아미노산 서열 정보를 기반으로 합성 및 정제하여 이용하였다.

실험에 이용된 인간 유래 LRG1 당단백질의 아미노산 서열은 서열번호 1로 표시되며, 마우스 유래 LRG1 당단백질의 아미노산 서열은 서열번호 2로 표시된다. 이때, LRG1 당단백질의 오리지널 신호 펩타이드의 서열은 MSSWSRQRPKSPGGIQPHVSRTLFLLLLLLAASAWG(서열번호 13)인데, 발현을 용이하게 하기 위해 발현벡터의 신호 펩타이드인 MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGGS(서열번호 11)를 상기 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열에 붙여 사용하였다.

[109]

[110] 실시예 2. LRG1 당단백질 및 Fc 도메인을 포함하는 융합 단백질의 제조

[111] 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.

[112] 상기와 같은 배경하에서, 실시예 1의 LRG1 당단백질의 의약 용도로서의 활용 가능성을 높이기 위하여 Fc 도메인과의 융합 단백질을 제조하였으며, 이를 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[113]

[114] 2-1. 곤충 세포에서의 발현 및 분리

[115] 먼저, 신호 펩타이드, LRG1 당단백질 및 인간 IgG1의 Fc 도메인을 포함하는 유전자를 pVL1391 벡터에 삽입하였다. 이때 LRG1 당단백질과 인간 IgG1의 Fc 도메인은 링커(AAA)로 연결하였다. 신호 펩타이드로는 발현벡터의 신호 펩타이드인 MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGGS(서열번호 11)를 이용하였다. 상기 융합 단백질을 코딩하는 제조합 유전자가 삽입된 제조합 벡터 및 SF9 세포를 활용하여 LRG1-Fc 도메인의 융합 단백질 생산용 배컬로바이러스를 제작하였다. 상기 제조합 배컬로바이러스를 단백질 발현용 Hi5 세포에 감염시켰다. 4일 후 Hi5 세포에서 발현된 LRG1-Fc 도메인의 융합 단백질이 배지로 분비되었으며, 이를 분리, 정제하였다. 보다 구체적으로, LRG1-Fc 도메인의 융합 단백질이 포함된 Hi5 세포의 배양배지를 Protein A 레진에 로딩하였다. 레진에 결합한 LRG1-Fc 도메인의 융합 단백질을 0.1M 글라이신 완충액(pH 2.7)으로 용출하였다. LRG1-Fc 도메인의 융합 단백질이 포함된 용출 분획을 1M Tris 완충액(pH 8.0)으로 중화하였다(최종 Tris pH 8.0 완충액의 농도는 100mM임). 정제 분리된 LRG1-Fc 도메인의 융합 단백질을 농축하고, 탈염 컬럼(desalting column)을 이용하여 PBS로 완충액 교환을

수행하였다. 최종적으로 농도 2mg/ml의 LRG1-Fc 도메인의 융합 단백질을 이후 실험에 이용하였다. 상기 레진에 결합한 LRG1-Fc 도메인의 융합 단백질을 용출한 후, SDS-PAGE를 통해 확인하였다. 이를 도 1에 나타내었다.

[116]

[117] 2-2. 포유동물 세포에서의 발현 및 분리

[118] 먼저, 신호펩타이드, LRG1 당단백질 및 인간 IgG1의 Fc 도메인을 포함하는 유전자를 pcDNA3.1 벡터에 삽입하였다. 이때 LRG1 당단백질과 인간 IgG1의 Fc 도메인은 링커(AAA)로 연결하였다. 신호 펩타이드로는 발현벡터의 신호 펩타이드인 MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGGS (서열번호 11)를 이용하였다. 상기 융합 단백질을 코딩하는 재조합 유전자가 삽입된 재조합 벡터를 Expi293F 세포에 트랜스펙션하였다. 4일 후, Expi293F 세포에서 발현된 LRG1-Fc 도메인의 융합 단백질이 배지로 분비되었으며, 이를 분리, 정제하였다. 보다 구체적으로, LRG1-Fc 도메인의 융합 단백질이 포함된 Expi293F 세포의 배양배지를 Protein A 레진에 로딩하였다. 레진에 결합한 LRG1-Fc 도메인의 융합 단백질을 0.1M 글라이신 완충액(pH 2.7)으로 용출하였다. LRG1-Fc 도메인의 융합 단백질이 포함된 용출 분획을 1M Tris 완충액(pH9.0)으로 중화하였다(최종 Tris pH9.0 완충액의 농도는 100mM임). 정제 분리된 LRG1-Fc 도메인의 융합 단백질을 투석을 통해 PBS로 완충액 교환을 수행하였으며, 최종적으로 농도 2.8mg/ml가 되도록 농축하고 이후 실험에 이용하였다. 상기 용출한 LRG1-Fc 도메인의 융합 단백질을 SDS-PAGE를 통해 확인하였다. 이를 도 2에 나타내었다.

[119]

[120] 2-3. 서열 분석

[121] 상기 실시예 2-1 또는 2-2와 동일한 방법으로 인간 유래 LRG1 당단백질(서열번호 1) 및 인간 IgG1의 Fc 도메인(서열번호 3)을 포함하는 융합 단백질과, 마우스 유래 LRG1 당단백질(서열번호 2) 및 인간 IgG1의 Fc 도메인(서열번호 3)을 포함하는 융합 단백질을 각각 제조하였으며, 이의 아미노산 서열 분석을 수행하였다.

[122] 인간 유래 LRG1 당단백질을 인간 IgG1의 Fc 도메인과 링커로 연결한 융합 단백질은 서열번호 7의 아미노산 서열로 표시되며, 마우스 유래 LRG1 당단백질을 인간 IgG1의 Fc 도메인과 링커로 연결한 융합 단백질은 서열번호 8의 아미노산 서열로 표시된다. 상기 서열에는 28개의 아미노산(MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGGS, 서열번호 11)으로 구성된 신호 펩타이드는 포함되어 있지 않으며, 신호 펩타이드는 LRG1 당단백질의 N-말단의 앞쪽에 위치해있다. 상기 융합 단백질의 개략도를 도 3 및 도 4에 나타내었다.

[123]

[124] 실험예 1. LRG1 당단백질의 발기부전 치료 효과 검증

[125] **1-1. 당뇨병 발기부전 동물모델의 디자인**

- [126] 생후 2개월 된 수컷 마우스(C57BL/6)에 스트렙토조토신 (streptozotocin)을 투여하여 당뇨병에 의한 발기부전을 유도하였으며, 하기와 같이 총 4 개의 군으로 나누어 실험을 진행하였다 (N = 10/군):
- [127] 1군- 정상 마우스;
- [128] 2군- 스트렙토조토신을 이용한 당뇨 유도[50 mg/kg 농도로 5일 연속으로 복강 내 투여 후 8주째 된 마우스];
- [129] 3군- 스트렙토조토신을 이용한 당뇨 유도[50 mg/kg 농도로 5일 연속으로 복강 내 투여 후 8주째 된 마우스] + 음경해면체에 PBS(phosphate-buffered solution)[20 μ L]를 투여한 마우스;
- [130] 4군- 스트렙토조토신을 이용한 당뇨 유도[50 mg/kg 농도로 5일 연속으로 복강 내 투여 후 8주째 된 마우스] + 음경해면체에 실시예 2에서 수득한 인간 LRG1-Fc 도메인의 융합 단백질을 2번 주사[day -3, 0; 5 μ g/20 μ L]한 마우스.

[131]

[132] **1-2. 음경 신경손상 발기부전 동물모델의 디자인**

- [133] 생후 3개월 된 수컷 마우스(C57BL/6)에 겸자로 양측 음경신경에 약 2분간 압착손상을 가해서 음경신경손상에 의한 발기부전을 유도하였으며, 하기와 같이 총 3 개의 군으로 나누어 실험을 진행하였다 (N = 6/군):
- [134] 1군- sham 수술 [sham operation] 마우스;
- [135] 2군- 음경신경손상 마우스 + 음경해면체에 PBS(phosphate-buffered solution)[20 μ L]를 투여한 마우스;
- [136] 3군- 음경신경손상 마우스 + 음경해면체에 실시예 2에서 수득한 인간 LRG1-Fc 도메인의 융합 단백질을 2번 주사[day -3, 0; 5 μ g/20 μ L]한 마우스.

[137]

[138] **1-3. 전기 자극에 따른 발기력 측정**

- [139] 상기 실시예 1-1 및 1-2과 같이 발기부전 동물모델의 음경해면체에 인간 LRG1-Fc 도메인의 융합 단백질을 주사하고 2주 후에 음경해면체의 신경을 자극하고 발기력을 측정하였다. 보다 구체적으로, 발기력 측정을 위하여, 각 마우스의 하복부에서 좌측 표피부분을 개복하고, 전립선의 후외측에 위치한 음경해면체신경(음경신경)이 잘 보이도록 준비하였다. 음경신경의 전기자극을 위해서 백금 전극을 음경신경에 위치시킨 후, 5 볼트, 12 헤르츠의 강도로 약 1분 동안 전기 자극을 가하였다. 전기자극을 가하게 되면, 음경은 발기를 하게 된다. 이때 발기 시 음경 내부의 압력(음경해면체 내압)을 음경해면체에 삽입된 카테터를 통해 컴퓨터와 연결되어 있는 압력 전달기(바이오스펙 시스템, 미국)를 이용하여 측정하였다. 그 결과를 도 5 및 도 6에 나타내었다.
- [140] 도 5A 및 6A에서의 세로축의 ICP (Intracavernous Pressure: 음경해면체내 압력)는 발기 시 음경 내부의 압력(음경해면체 내압)을 의미하며, 일반적으로 발기력을 나타내는 지표이다. 도 5A 및 6A에서의 가로축은 전기자극 후의

시간을 나타내며, 1분간의 전기자극 기간은 가로축에 검정색 막대로 표시하였다.

- [141] 또한, 도 5B 및 6B는 최고 음경해면체 내압 (Maximal ICP)을 평균 수축기 혈압 (MSBP)으로 나눈 값을 나타낸 것이고, 도5C 및 6C는 음경해면체 내압 곡선의 면적 (Total ICP[area under the curve])을 평균 수축기 혈압 (MSBP)으로 나눈 값을 나타낸 것으로 이는 혈압 자체가 음경해면체 내압에 영향을 줄 수 있기 때문에 발기력을 측정하기 위해 확인하는 값이다.
- [142] 도 5에 나타낸 바와 같이, 인간 LRG1-Fc 도메인의 융합 단백질을 투여한 군(LRG1)은 비처리 당뇨군(NT) 및 PBS 투여군(PBS)에 비해 높은 발기력 개선효과를 보였으며, 정상 대조군(Control)의 약 90% 정도까지 발기력이 회복됨을 확인하였다. 특히, 음경발기와 관련한 두 가지 변수, 즉 최고 음경해면체 내압과 음경압력곡선의 면적이 LRG1 당단백질 투여 후 현저한 상승 효과를 나타냄을 확인하였다.
- [143] 또한, 도 6에 나타낸 바와 같이, 인간 LRG1-Fc 도메인의 융합 단백질을 투여한 군(LRG1)은 음경신경손상 발기부전 동물모델에서도 당뇨성 발기부전 동물모델의 결과와 마찬가지로 최고 음경해면체 내압과 음경압력곡선의 면적이 증가하는 등 삼 (Sham) 수술군에 비해 현저하게 개선된 발기력을 보임을 확인하였다.
- [144]
- [145] 1-4. 음경해면체 및 음경 배부 신경에서 혈관내피세포 특이적 단백질 및 신경성산화질소생성효소의 발현에 미치는 영향 분석
- [146] 음경은 음경발기의 기능을 담당하는 해면체 조직과 이에 영양을 공급하는 소혈관들로 이루어져 있다. 그러나 당뇨, 고지질증, 신경손상 등에 의한 병적 조건하에서는 이러한 혈관과 신경을 포함한 해면체 조직에 병변이 생기고 상기 조직의 구조가 비정상적으로 되어 발기부전을 초래한다.
- [147] 상기 실시예 1-1의 당뇨성 발기부전 동물모델의 음경해면체 및 음경 배부 신경에서 혈관내피세포 특이적 단백질인 혈소판-내피세포 부착 분자-1(PECAM-1), 세포 증식 표지 인자인 BrdU(5-bromo-2-deoxyuridine), 및 신경성산화질소생성효소(nNOS)의 발현 정도를 분석하기 위하여, 면역조직화학염색 후 공초점 현미경을 이용하여 혈관내피세포의 양적 변화, 혈관내피세포의 핵 속에 표지 된 BrdU의 양적 변화 및 신경성산화질소생성효소의 양적 변화를 조사하였다.
- [148] 보다 구체적으로, 각 마우스의 음경 조직으로부터 음경 배부 신경 및 음경 해면체를 분리한 후, 이를 4% 파라포름알데히드에서 4°C, 24 시간 동안 고정하였다. 상기 조직을 동결용 포매제를 이용하여 고정시킨 후, 동결 절편기에서 7 μ m 두께로 잘라 조직 절편을 준비하였다. 다음으로, 준비된 조직 절편을 슬라이드 상에 올리고 PECAM-1, BrdU 및 nNOS의 발현 분석을 위해 4% 파라포름알데히드에서 약 5분간 고정시켰다. 고정된 음경조직 절편을 세척

버퍼(2% FBS + 0.1% Sodium Azide in PBS)로 3회 세척한 후, 비특이적 단백질을 차단 버퍼(5% BSA in PBS)로 1시간 동안 블락킹하였다. 그 후, 1차 항체(항-PECAM-1 햄스터 항체, 항-BrdU 랫트 항체, 1:100, 항-nNOS 랫트 항체)와 함께 4°C에서 16시간 동안 반응시킨 후, 남아 있는 항체를 제거하기 위해서 세척 버퍼로 3회 세척한 다음, 2차 항체(FITC-표지된 항-햄스터 항체 또는 TRITC-표지된 항-랫트 항체, 1:1000)와 함께 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 남아있는 항체를 제거하기 위해 세척 버퍼로 다시 2회 세척한 후 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; 2 μ g/ml)를 넣고 5분간 상온에서 반응시켜서 세포 핵을 염색시켰다. 다시 세척 완충액으로 2 회 세척한 후에 공초점 현미경을 이용하여 분석하였다. 그 결과를 도 7 내지 9에 나타내었다.

[149] 도 7에 나타낸 바와 같이, 비처리 당뇨군(DM) 또는 PBS 투여군(DM+PBS)의 음경해면체 조직에서는 정상 마우스 (Control)에 비해 혈관내피세포의 수가 현저하게 감소되어 있으나, 인간 LRG1-Fc 도메인의 융합 단백질을 투여한 군(DM+LRG1)의 음경해면체 조직에서는 대조군(DM 또는 DM+PBS)에 비해 혈관내피세포 특이적 단백질인 PECAM-1의 발현이 증가함을 확인하였다.

[150] 또한, 도 8 및 도 9에 나타낸 바와 같이, 비처리 당뇨군(DM) 또는 PBS 투여군(DM+PBS)의 음경 배부신경과 음경해면체 조직에서는 정상 마우스(Control)에 비해 신경성산화질소생성효소(nNOS)의 발현이 현저하게 감소되어 있으나, 인간 LRG1-Fc 도메인의 융합 단백질을 투여한 군(DM+LRG1)의 음경 배부신경과 음경해면체 조직에서는 대조군(DM 또는 DM+PBS)에 비해 신경성산화질소생성효소의 발현이 증가함을 확인하였다.

[151]

[152] **1-5. 음경해면체 조직에서 신경 재생 관련 단백질 발현에 미치는 영향 분석**

[153] 인간 LRG1-Fc 도메인의 융합 단백질이 신경재생에 미치는 영향을 규명하기 위하여, 상기 실험예 1-1의 당뇨성 발기부전 동물모델의 음경해면체 조직에서 신경성장인자 (nerve growth factor, NGF), 뉴로트로핀-3 (neurotrophin-3, NT-3), 뇌-유래 신경영양인자 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), 및 신경성장인자의 수용체인 TrkA 단백질 발현 정도를 확인하였다.

[154] 보다 구체적으로, 각 마우스로부터 분리한 음경 해면체 조직을 PBS로 완전하게 세척한 다음 단백질 분해효소 저해제 혼합물(protease inhibitor cocktail)이 포함된 세포 분해 완충액(RIPA buffer)을 넣고 용해시킨 후, 4°C에서 13,000rpm으로 15분간 원심분리하여 상층액만 회수하였다. 소혈청알부민(bovine serum albumin, BSA)을 이용하여 상기 용해물 내 단백질 농도를 측정하였다. 추출된 단백질들을 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 전기영동한 후, 겔 속에 있던 단백질들을 니트로셀로로오스 막(nitrocellulose membrane)으로 이동시키고, 5% 탈지유(skim milk)로 차단(blocking) 하였다. 그리고 신경성장인자 (nerve growth factor, NGF), 뉴로트로핀-3 (neurotrophin-3, NT-3), 뇌-유래 신경영양인자 (brain-derived

neutrophic factor, BDNF), 및 신경성장인자의 수용체인 TrkA에 대한 1차 항체와 함께 4°C에서 16시간 반응시켰다. 그 후 남아 있는 항체를 제거하기 위해서 세척 완충액으로 다시 3회 세척한 다음, 2차 항체(HRP-labeled anti-mouse or HRP-labeled anti-rabbit antibody, 1:200)와 함께 상온에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 남아있는 항체를 제거하기 위해 세척 완충액으로 다시 3회 세척한 후에 발색시켰다. 단백질 발현 정량을 위한 하우스키핑 단백질로는 β -액틴을 이용하였다. 그 결과를 도 10에 나타내었다.

- [155] 도 10에 나타낸 바와 같이, PBS 투여군(DM+PBS)의 음경해면체 조직에서는 정상 마우스 (Control)에 비해 신경성장인자, 뉴로트로핀-3, 뇌-유래 신경영양인자 및 신경성장인자의 수용체인 TrkA의 발현이 감소되어 있으나, 인간 LRG1-Fc 도메인의 융합 단백질을 투여한 군(DM+LRG1)의 음경해면체 조직에서는 상기 신경재생 특이적 단백질의 발현이 현저하게 증가함을 확인하였다.
- [156] 이상의 실험 결과를 통하여, LRG1 당단백질은 당뇨 또는 음경 손상 등에 의하여 감소된 신경세포의 재생을 유도함으로써, 그에 따라 발기력 회복 효과를 나타냄을 확인하였다.
- [157]
- [158] **실험예 2. LRG1 당단백질의 허혈성 질환 치료 효과 검증**
- [159] **2-1. 혈관내피세포를 이용한 혈관 형성 유도 효과 분석**
- [160] 관형성 (tube formation) 단계는 혈관신생 과정 중 이동, 증식한 내피세포들이 분열을 계속하여 속이 빈 튜브 모양으로 성장하여 최종 혈관으로 분화하고 여기에 혈액이 들어가 혈관 생성이 완성되는 단계이다.
- [161] LRG1 당단백질이 발기부전뿐 아니라 다른 다양한 허혈성 질환의 치료에 이용될 수 있는지를 확인하기 위하여, 관형성능(tube formation)에 미치는 영향을 분석하였다. 이를 위해 HUVEC과 마우스 음경해면체 내피세포 (MCECs: Mouse Cavernous Endothelial Cells)를 사용하여 실험을 수행하였다. 각 세포는 정상 범위의 혈당 수치와 유사한 5mM 글루코스 (Normal glucose), 및 고혈당 수치에 해당하는 30 mM 글루코스(High glucose) 조건에서 48 시간 동안 노출시켰으며, 인간 LRG1-Fc 도메인의 융합 단백질($0.2 \mu\text{g/ml}$ 또는 $2 \mu\text{g/ml}$)을 글루코스와 동시에 48 시간 동안 처리하였다. 대조군은 글루코스와 동시에 PBS를 처리하였다. 여기서 고농도 글루코스는 허혈성 질환의 원인 중 하나로서 *in vitro* 에서 허혈성 질환 모델을 제조하기 위한 공지 방법 중의 하나이다.
- [162] 보다 구체적으로, 매트릭젤(Matrigel)이 코팅된 세포 배양 접시에 정상 농도 글루코스, 고농도 글루코스, 그리고 고농도 글루코스와 인간 LRG1-Fc 도메인의 융합 단백질에 노출시킨 HUVEC 및 마우스 음경해면체 내피세포를 3×10^5 cells/cm²만큼 넣고, 튜브 형성을 위해 각각 8 시간 또는 16 시간 동안 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한 후, 현미경을 통해 관찰하였다. 그 결과를 도 11에 나타내었다.

[163] 도 11에 나타난 바와 같이, 고농도 글루코스에 노출된 HUVEC 및 마우스 음경해면체 내피세포(MCECs)는 정상 농도 글루코스(Normal glucose) 처리군에 비해 튜브 형성 정도가 현저하게 감소되어 있었다. 반면, 고농도 글루코스와 인간 LRG1-Fc 도메인의 융합 단백질에 함께 노출된 HUVEC 및 마우스 음경해면체 내피세포(MCECs)에서는 튜브 형성이 현저하게 증가하였다. 이는 LRG1 당단백질이 당뇨로 인해 활성이 저해된 혈관내피세포 또는 해면체 내피세포의 분화에 영향을 주어 혈관 및 해면체 형성을 유도한다는 것을 의미한다.

[164]

[165] **2-2. 대동맥 절편을 이용한 혈관 형성 유도 효과 분석**

[166] 대동맥 절편을 이용한 혈관신생 효과 평가(arotic ring angiogenesis assay)는 치료 후보물질의 혈관신생 능력을 평가하는데 널리 사용되고 있는 방법이며, 이 결과를 토대로 치료 후보물질이 다양한 허혈성 질환에 사용될 수 있는지를 객관적으로 평가할 수 있는 중요한 실험방법이다 (Baker M et al, Nature Protocol, 7: 89, 2012).

[167] LRG1 당단백질의 허혈성 질환 치료 효과를 확인하기 위하여, 대동맥 절편에서 혈관신생에 미치는 영향을 분석하였다. 이를 위해 생후 2개월 된 수컷 마우스(C57BL/6)의 대동맥 절편을 사용하여 실험을 수행하였다. 각 대동맥 절편을 정상 범위의 혈당 수치와 유사한 5 mM 글루코스 (Normal glucose) 및 고혈당 수치에 해당하는 30 mM 글루코스 (High glucose)의 조건에 3일 및 6일간 동안 노출시켰으며, 인간 LRG1-Fc 도메인의 융합 단백질(0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 글루코스와 동시에 3일 또는 6일간 처리하였다. 대조군은 글루코스와 동시에 PBS를 처리하였다.

[168] 보다 구체적으로, 매트리지겔(Matrigel)이 코팅된 조직 배양 접시에 정상 농도 글루코스, 고농도 글루코스, 그리고 고농도 글루코스와 인간 LRG1-Fc 도메인의 융합 단백질에 노출시킨 대동맥 절편을 넣고, 각각 3일 또는 6일 동안 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한 후, 현미경을 통해 대동맥 절편으로부터 미세 혈관신생을 관찰하였다. 그 결과를 도 12에 나타내었다.

[169] 도 12에 나타난 바와 같이, 고농도 글루코스에 노출된 대동맥 절편(PBS)은 정상 농도 글루코스(Normal glucose) 처리군에 비해 미세 혈관신생 정도가 현저하게 감소되어 있음을 알 수 있었다. 반면, 고농도 글루코스와 인간 LRG1-Fc 도메인의 융합 단백질에 함께 노출 시켰던 대동맥 절편에서는 미세 혈관신생이 현저하게 증가하였음을 확인하였다.

[170] 이상의 실험 결과를 통하여, LRG1 당단백질은 우수한 혈관신생 유도 효과를 가지고 있는바, 발기부전 치료뿐만 아니라 다양한 허혈성 질환의 치료에도 이용될 수 있음을 확인하였다.

[171]

[172] **실험예 3. LRG1 당단백질의 말초 신경질환 치료 효과 검증**

- [173] 주골반신경절 (major pelvic ganglion, MPG)으로부터 음경발기조직을 지배하는 음경신경이 유래되며 이는 발기신호와 관련된 신호전달의 주된 역할을 한다. 한편, 척수의 후근신경절 (dorsal root ganglion)은 중추 구심성 (afferent) 신경경로로서 치료 후보물질의 신경재생 또는 보호 능력을 평가하는 데 널리 사용되고 있는 방법이며, 이 결과를 토대로 치료 후보물질이 다양한 말초 신경질환에 사용될 수 있는지를 객관적으로 평가할 수 있는 중요한 실험방법이다 (Jin GZ et al., Neuroscience Letter, 501: 10, 2011).
- [174] LRG1 당단백질이 발기부전뿐 아니라 다른 다양한 허혈성 질환의 치료에 이용될 수 있는지를 확인하기 위하여, 주골반신경절 및 후근신경절에서 신경 재생 효과를 확인하였다. 이를 위해, 정상 마우스로부터 주골반신경절 및 후근신경절을 분리하였다. 적출한 주골반신경절 및 후근신경절을 배양 접시에 놓고 매트릭젤을 덮어 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 15분간 배양하여 매트릭젤을 굳혔다. 매트릭젤이 굳으면 정상 농도 글루코스 (5 mM 글루코스, normal glucose)를 처리하거나, 고농도 글루코스 (30 mM 글루코스, high glucose) 하에 PBS와 인간 LRG1-Fc 도메인의 융합 단백질 (0.2 µg/mL)을 각각 처리하였다. 여기서 고농도 글루코스는 말초 신경질환의 원인 중 하나로서 *in vitro*에서 말초 신경질환 모델을 제조하기 위한 공지 방법 중의 하나이다. 여기에 2% B-27 혈청-프리 보충제(Supplement), 0.5 mM GlutaMAX-I 보충제가 포함된 neurobasal 배지를 첨가한 후 3일 (주골반신경절) 또는 7일 (후근신경절) 동안 배양하였다. 배양 후 신경미세섬유(neurofilament) 및 βIII-튜불린의 발현 분석을 위해 4% 파라포름알데히드에서 약 15분간 고정하였다. 고정 후 비특이적 단백질을 차단 버퍼 (5% BSA in PBS)로 1시간 동안 블락킹 하였다. 그 후 1차 항체 (항-neurofilament 마우스 항체, 항-βIII-tubulin 치킨 항체)와 함께 4°C에서 16시간 동안 반응시킨 후, 남아 있는 항체를 제거하기 위해서 세척 버퍼로 3회 세척한 다음, 2차 항체(FITC-표지된 항-마우스 항체 또는 TRITC-표지된 항-치킨 항체, 1:200)와 함께 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 남아있는 항체를 제거하기 위해 세척 버퍼로 다시 2회 세척한 후, 공초점 현미경을 이용하여 분석하였다. 그 결과를 도 13 및 14에 나타내었다.
- [175] 도 13에 나타낸 바와 같이, 고농도 글루코스(High glucose)에 노출된 주골반신경절은 정상 농도 글루코스(Normal glucose) 처리군에 비해 신경세포의 증식이 현저하게 감소되어 있음을 확인하였다. 반면, 고농도 글루코스과 인간 LRG1-Fc 도메인의 융합 단백질에 함께 노출된 주골반신경절은 신경세포의 증식이 현저하게 증가하였다.
- [176] 또한, 도 14에 나타낸 바와 같이, 고농도 글루코스(High glucose)에 노출된 후근신경절은 정상 농도 글루코스(Normal glucose) 처리군에 비해 신경세포의 증식이 현저하게 감소되어 있음을 확인하였다. 반면, 고농도 글루코스과 인간 LRG1-Fc 도메인의 융합 단백질에 함께 노출된 후근신경절은 신경세포의 증식이 현저하게 증가하였다. 이는 LRG1 당단백질이 당뇨병에 의해 저해된 신경세포의

분화에 영향을 주어 신경세포의 재생을 유도한다는 것을 의미하다.

[177] 이상의 실험 결과를 통하여, LRG1 당단백질은 고농도 글루코스에 의해 유도되는 신경 손상 및 사멸을 억제하는바, 발기부전 치료뿐만 아니라 다양한 말초 신경질환의 치료에도 이용될 수 있음을 확인하였다.

[178]

[179] 종합적으로 본 발명에 따른 LRG1 당단백질 및 Fc 도메인이 융합된 융합 단백질은 내피세포 및 신경세포 특이적인 단백질의 수준을 음경 해면체 내피세포 및 신경세포의 재생을 유도하고 음경 발기력을 증가시키는 등 우수한 발기부전 개선 효과를 가지고 있다. 또한, 본 발명에 따른 LRG1 당단백질 및 Fc 도메인이 융합된 융합 단백질은 혈관 및 신경 재생 효과를 가지고 있다. 따라서 본 발명에 따른 LRG1 당단백질 및 Fc 도메인이 융합된 융합 단백질은 발기부전, 허혈성 질환 및 말초 신경질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

[180]

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

[182]

[183] 제제예 1. 약학적 조성물의 제조

[184] 1-1. 캡슐제의 제조

[185] LRG1 당단백질 10 mg

[186] 결정성 셀룰로오스 3 mg

[187] 락토오스 14.8 mg

[188] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

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

[190]

[191] 1-2. 주사제의 제조

[192] LRG1 당단백질 10 mg

[193] 만니톨 180 mg

[194] 주사용 멸균 증류수 2974 mg

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

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

[197]

[198] 1-3. 액제의 제조

[199] LRG1 당단백질 20 mg

[200] 이성화당 10 g

[201] 만니톨 5 g

[202] 정제수 적량

[203] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[204]

[205] 제제예 2. 식품 조성물의 제조

[206] **2-1. 건강식품의 제조**

[207] LRG1 당단백질 100 mg

[208] 비타민 혼합물 적량

[209] 비타민 A 아세테이트 70 µg

[210] 비타민 E 1.0 mg

[211] 비타민 B1 0.13 mg

[212] 비타민 B2 0.15 mg

[213] 비타민 B6 0.5 mg

[214] 비타민 B12 0.2 µg

[215] 비타민 C 10 mg

[216] 비오틴 10 µg

[217] 니코틴산아미드 1.7 mg

[218] 엽산 50 µg

[219] 판토텐산 칼슘 0.5 mg

[220] 무기질 혼합물 적량

[221] 황산제1철 1.75 mg

[222] 산화아연 0.82 mg

[223] 탄산마그네슘 25.3 mg

[224] 제1인산칼륨 15 mg

[225] 제2인산칼슘 55 mg

[226] 구연산칼륨 90 mg

[227] 탄산칼슘 100 mg

[228] 염화마그네슘 24.8 mg

[229] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 강식품에 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.

청구범위

- [청구항 1] LRG1 (Leucine-Rich alpha-2-Glycoprotein 1) 당단백질과 Fc 도메인이 융합된 LRG1-Fc 융합 단백질.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 LRG1 당단백질은 서열번호 1 또는 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, LRG1-Fc 융합 단백질.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 LRG1 당단백질은 서열번호 4 또는 5로 표시되는 염기서열로 암호화되는 것을 특징으로 하는, LRG1-Fc 융합 단백질.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 IgG(Immunoglobulin G)로부터 유래한 것을 특징으로 하는, LRG1-Fc 융합 단백질.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 IgG는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, LRG1-Fc 융합 단백질.
- [청구항 6] 제4항에 있어서, 상기 IgG의 Fc 도메인은 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, LRG1-Fc 융합 단백질.
- [청구항 7] 제4항에 있어서, 상기 IgG의 Fc 도메인은 서열번호 6으로 표시되는 염기서열로 암호화되는 것을 특징으로 하는, LRG1-Fc 융합 단백질.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 융합 단백질은 링커를 포함하는 것을 특징으로 하는, LRG1-Fc 융합 단백질.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 융합 단백질은 서열번호 7 또는 8로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, LRG1-Fc 융합 단백질.
- [청구항 10] 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 LRG1-Fc 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 9 또는 10으로 표시되는 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 12] 제10항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.
- [청구항 13] 제12항의 벡터로 형질전환된 세포.
- [청구항 14] LRG1 (Leucine-Rich alpha-2-Glycoprotein 1) 당단백질 또는 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 LRG1-Fc 융합 단백질을 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 15] LRG1 (Leucine-Rich alpha-2-Glycoprotein 1) 당단백질 또는 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 LRG1-Fc 융합 단백질을 포함하는 발기부전 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 16] LRG1 (Leucine-Rich alpha-2-Glycoprotein 1) 당단백질 또는 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 LRG1-Fc 융합 단백질을 포함하는 발기부전 예방 또는 개선용 의약품 조성물.
- [청구항 17] LRG1 (Leucine-Rich alpha-2-Glycoprotein 1) 당단백질 또는 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 LRG1-Fc 융합 단백질을 포함하는 허혈성 질환의

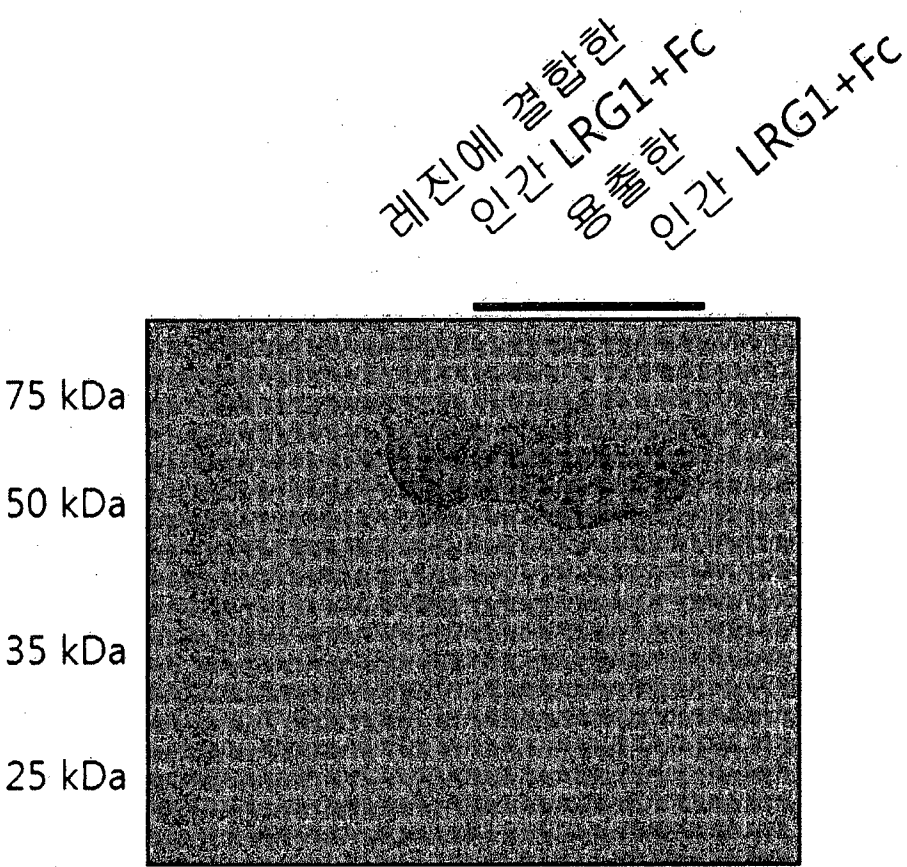
예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 18] LRG1 (Leucine-Rich alpha-2-Glycoprotein 1) 당단백질 또는 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 LRG1-Fc 융합 단백질을 포함하는 허혈성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

[청구항 19] LRG1 (Leucine-Rich alpha-2-Glycoprotein 1) 당단백질 또는 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 LRG1-Fc 융합 단백질을 포함하는 말초 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

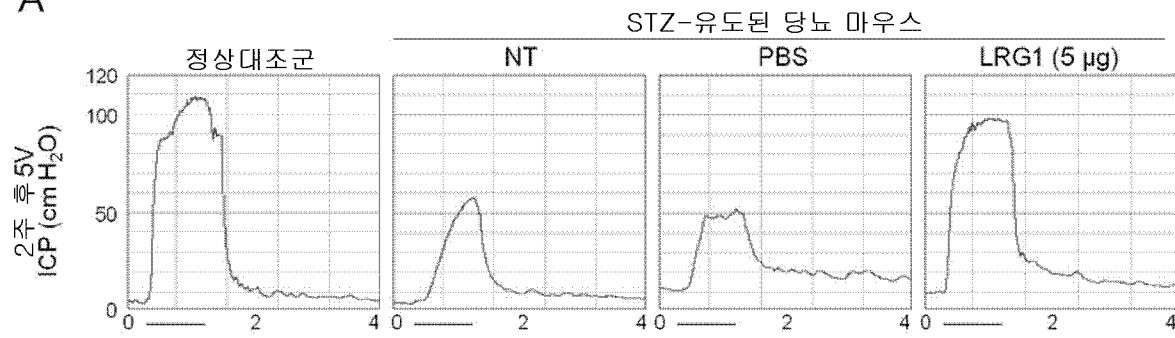
[청구항 20] LRG1 (Leucine-Rich alpha-2-Glycoprotein 1) 당단백질 또는 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 LRG1-Fc 융합 단백질을 포함하는 말초 신경질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

[도 1]

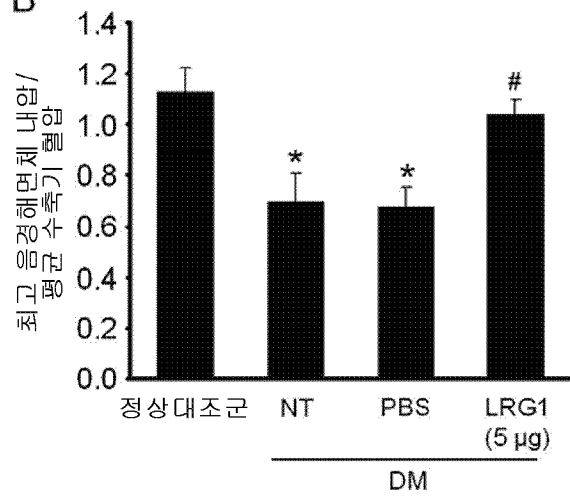


[도5]

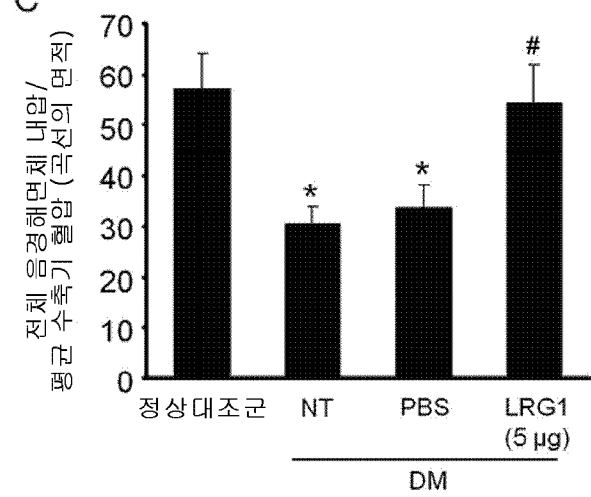
A



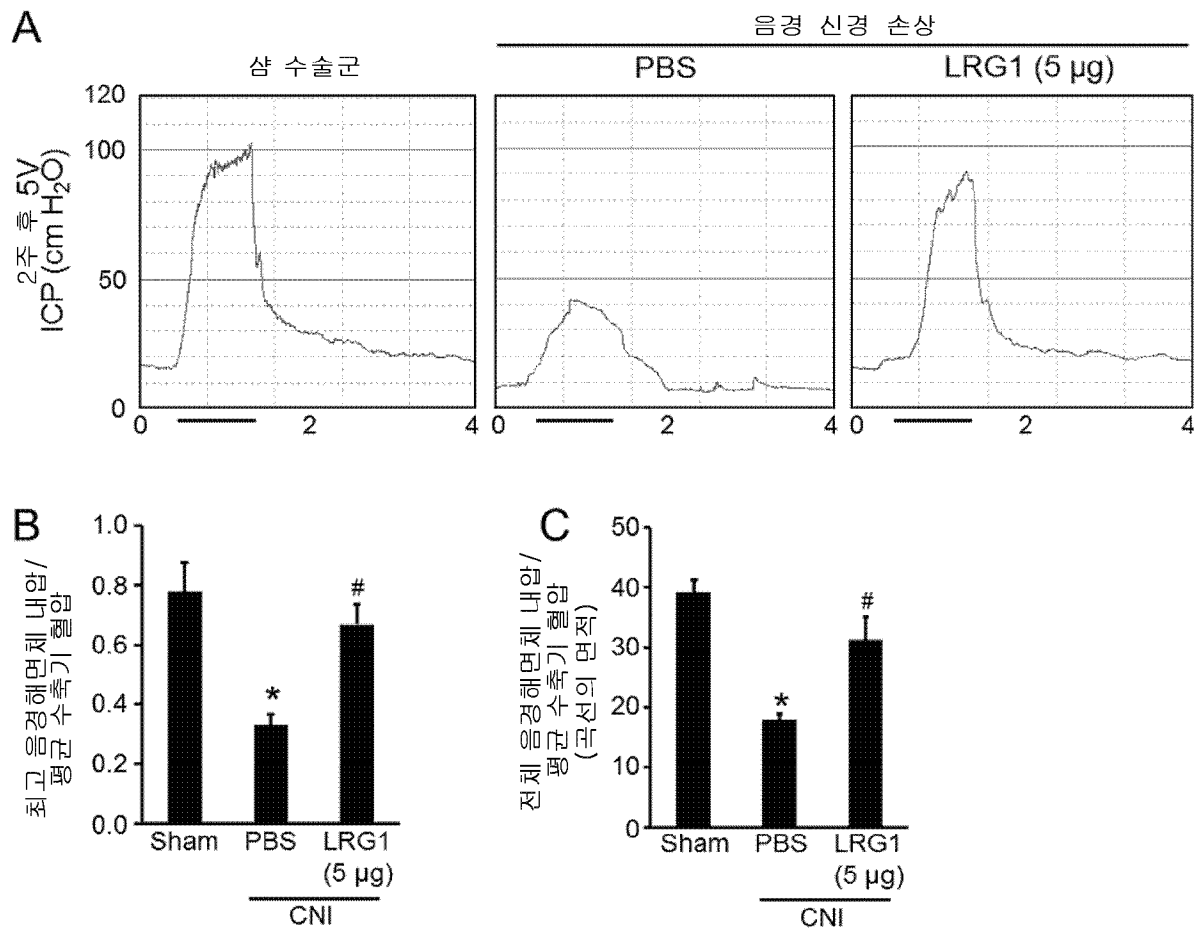
B



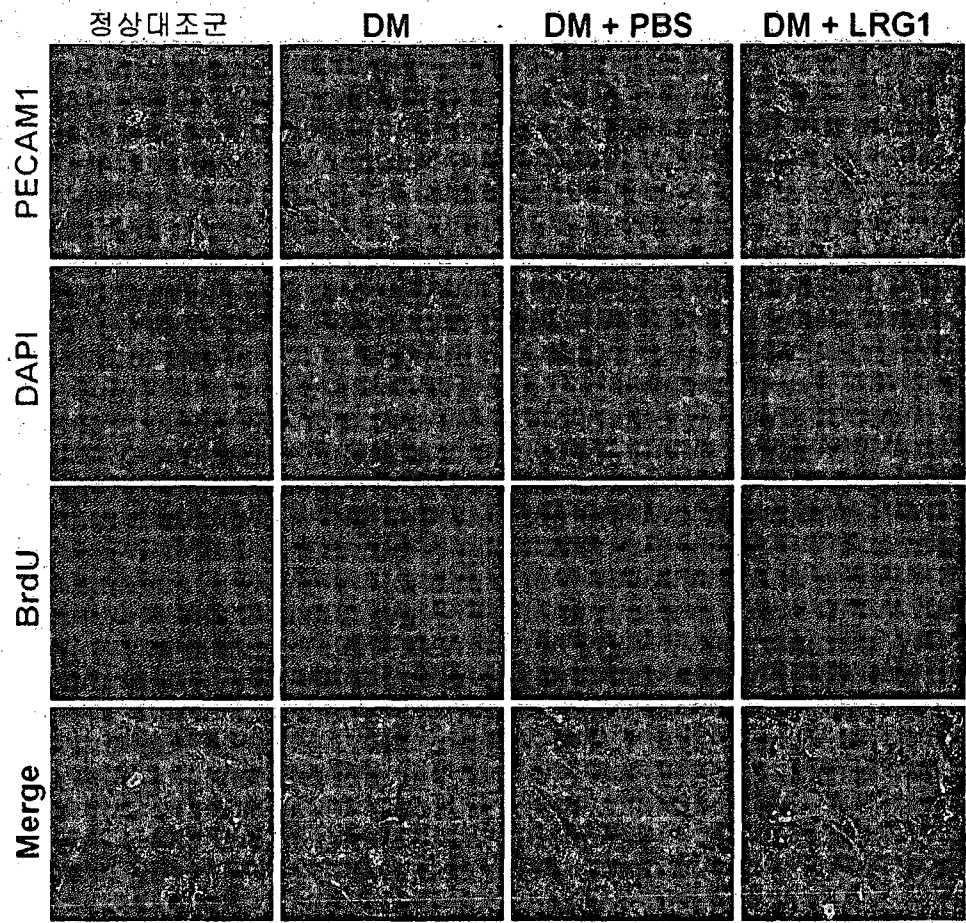
C



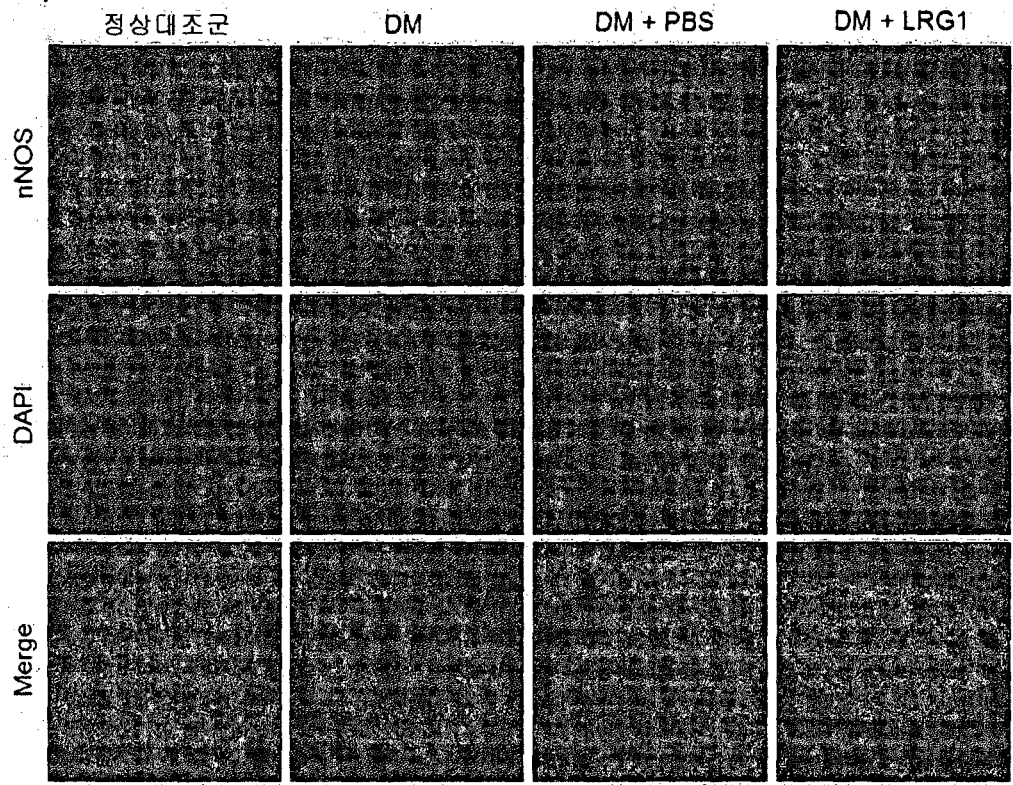
[도6]



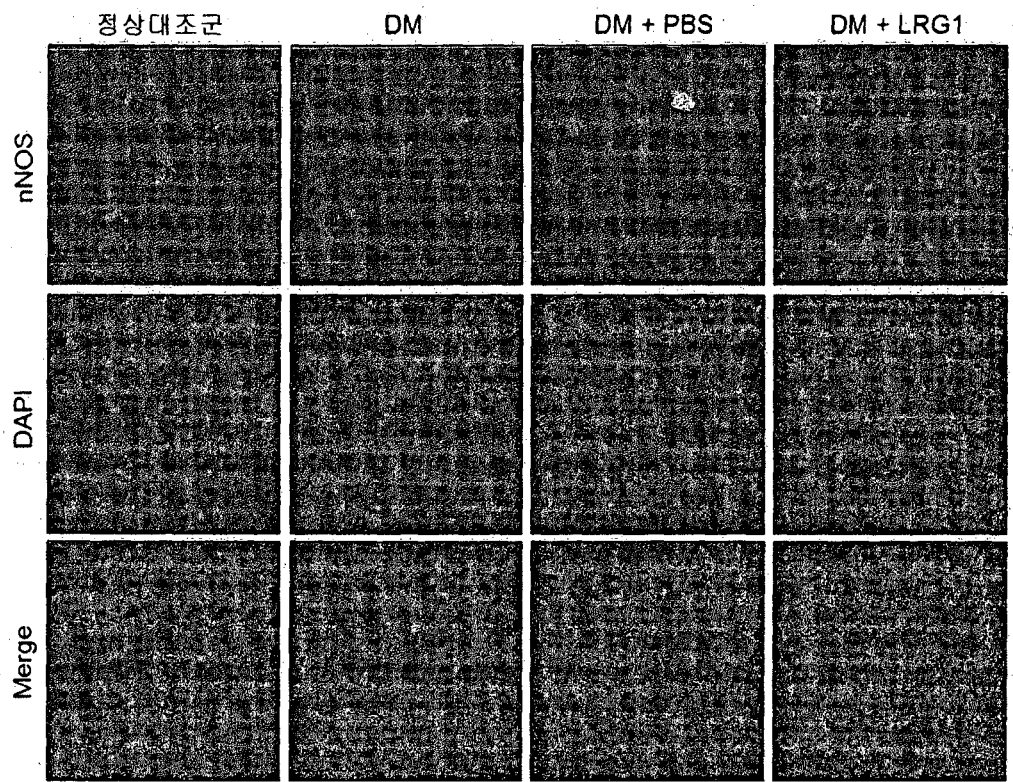
[도 7]



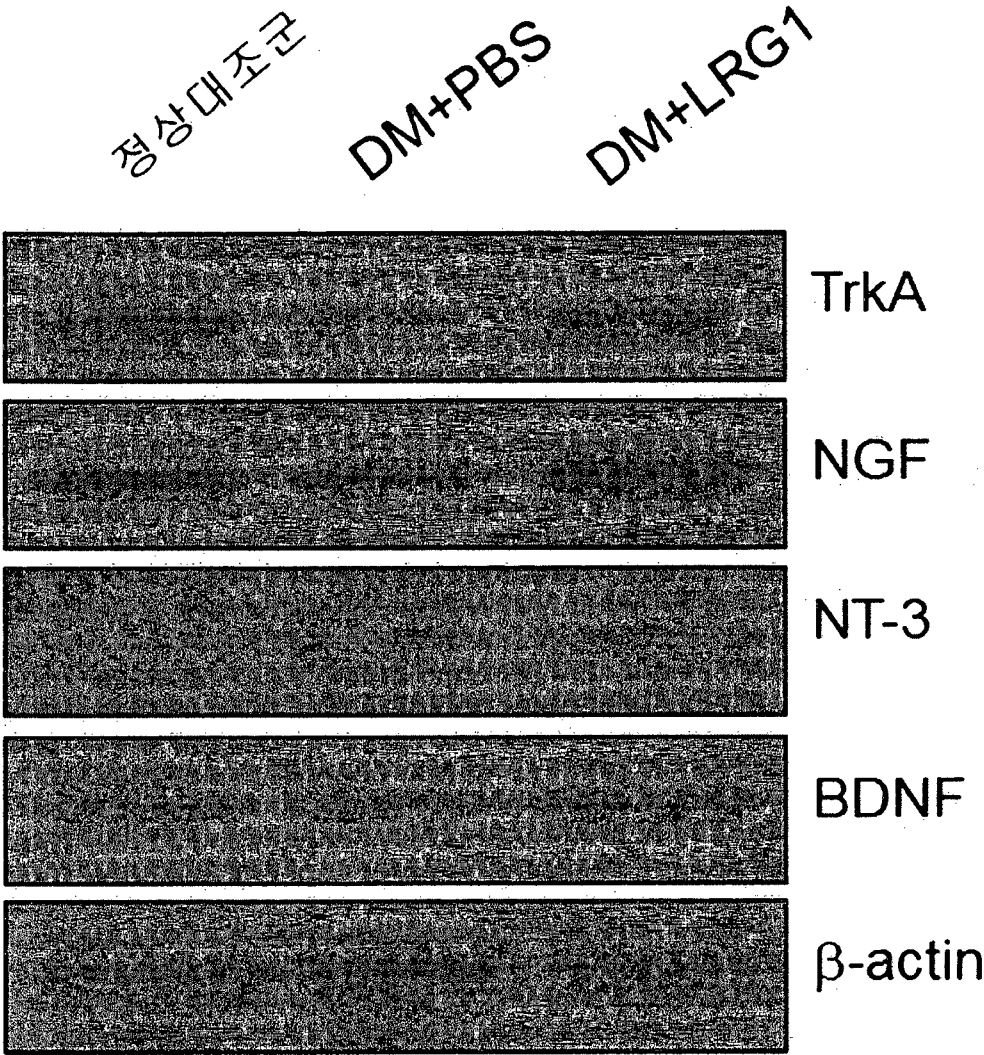
[도 8]



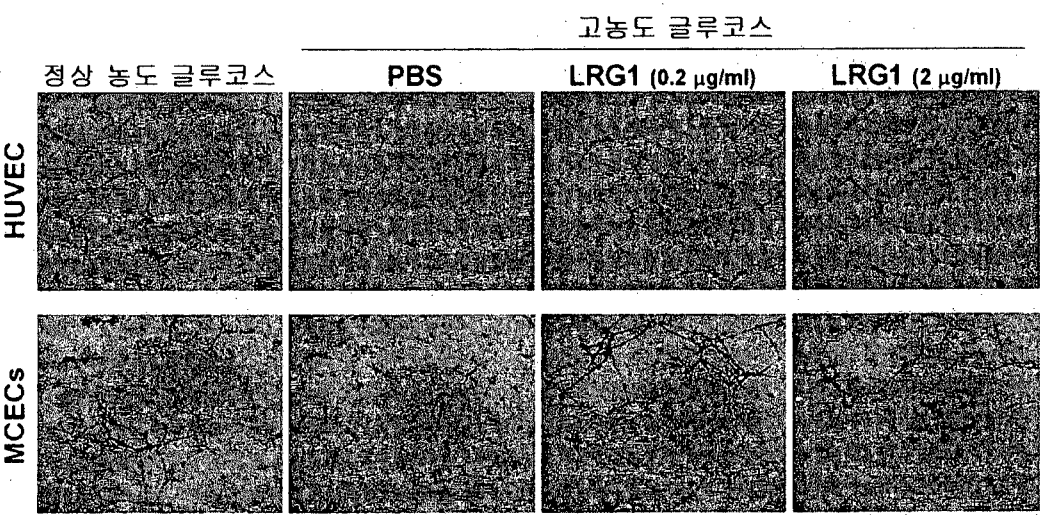
[도 9]



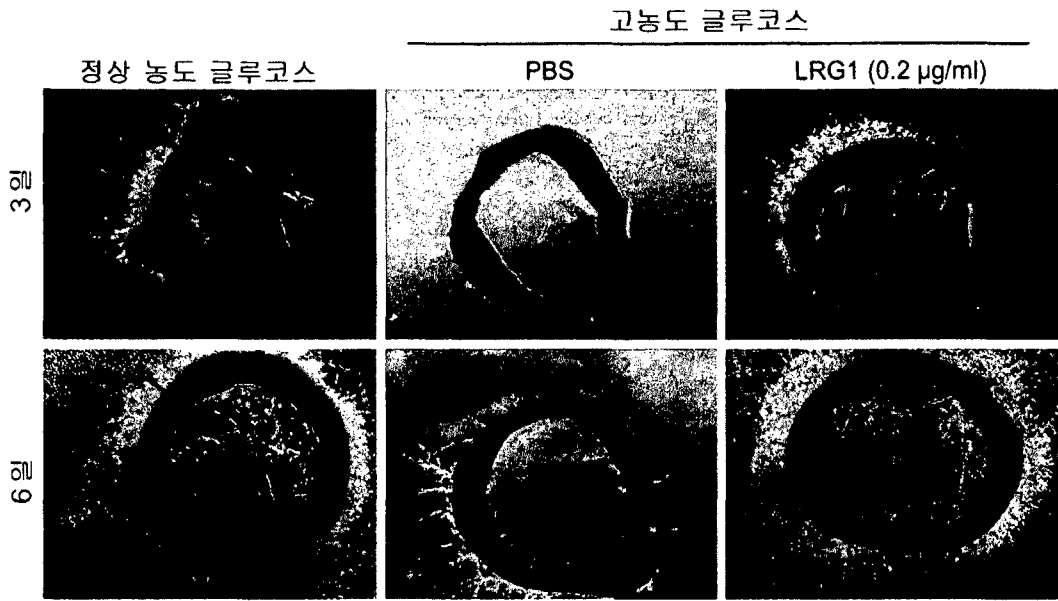
[도 10]



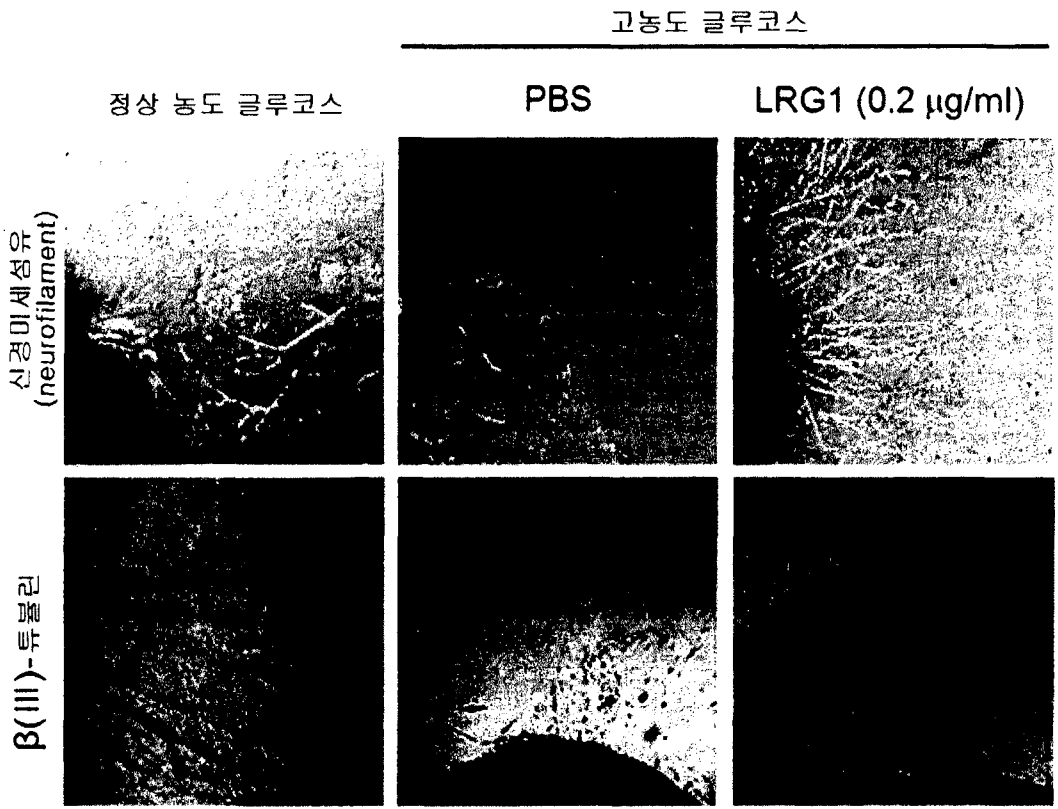
[도 11]



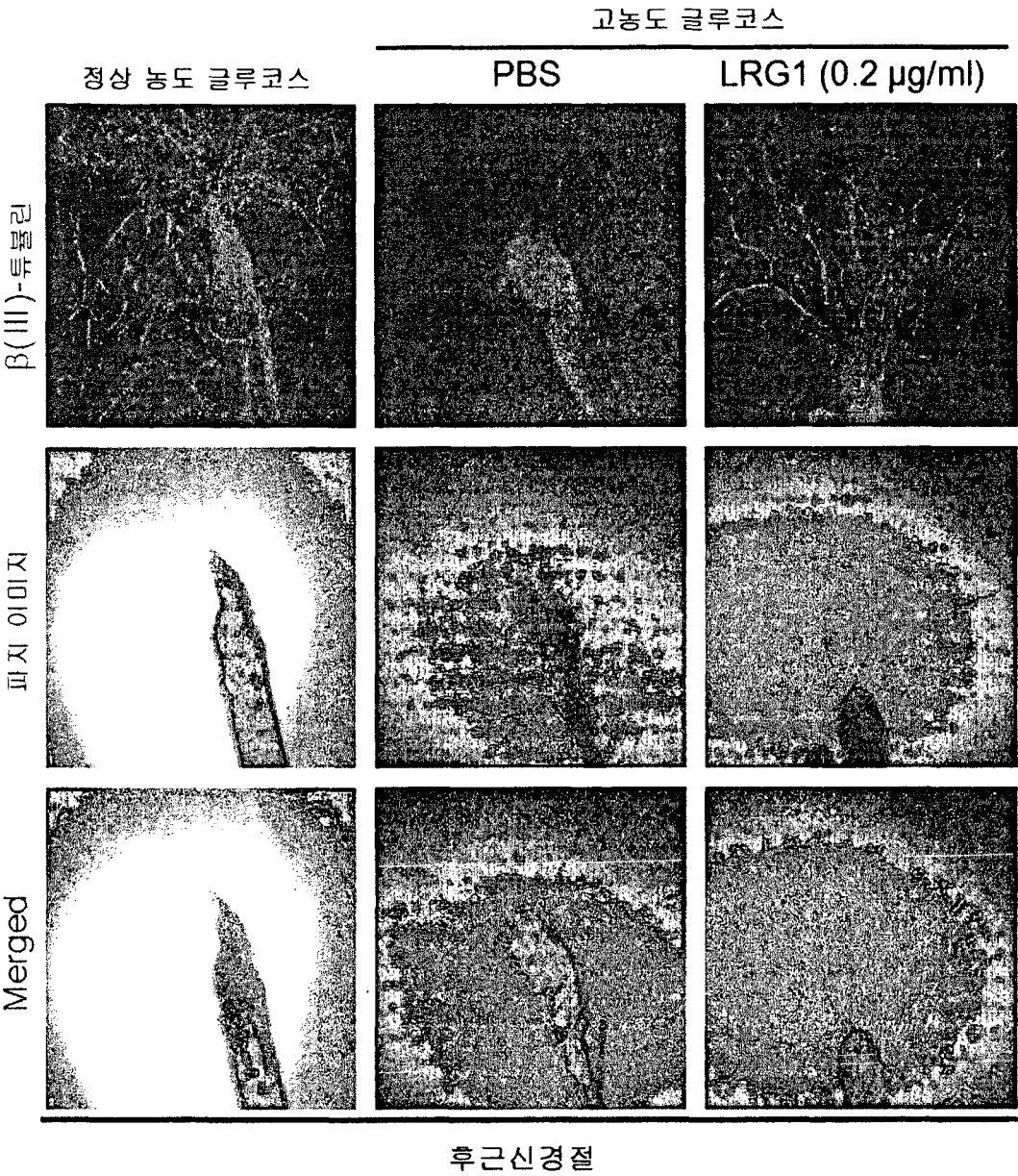
[도 12]



[도 13]



[도 14]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/007949

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/47(2006.01)i, A61K 38/17(2006.01)i, A61K 47/50(2017.01)i, A23L 33/18(2016.01)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; A61K 39/395; A61K 48/00; A61K 38/17; A61K 47/50; A23L 33/18

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, fusion protein, erectile dysfunction, ischemia, peripheral nerves disorder

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2016-0184458 A1 (SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES, INC.) 30 June 2016 See paragraphs [0010], [0065], [0068], [0070], [0076], [0085], [0129]; claims 1, 3; and table 1.	1-13
Y		17-20
A		14-16
Y	PEK, Sharon L. T. et al., "Elevation of A Novel Angiogenic Factor, Leucine-rich- α 2-glycoprotein (LRG1), Is Associated with Arterial Stiffness, Endothelial Dysfunction, and Peripheral Arterial Disease in Patients with Type 2 Diabetes", The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 30 January 2015 (online), vol. 100, no. 4, pages 1586-1593 See pages 1586, 1590-1592.	17-20
A	US 8790647 B2 (GREENWOOD, John et al.) 29 July 2014 See abstract; column 4, 9-10; and SEQ ID NO: 2.	1-20
A	WANG, Xiaomeng et al., "LRG1 Promotes Angiogenesis by Modulating Endothelial TGF- β Signalling", Nature, 18 July 2013, vol. 499, pages 306-311 See pages 306-308.	1-20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search

30 OCTOBER 2017 (30.10.2017)

Date of mailing of the international search report

31 OCTOBER 2017 (31.10.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Sconsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/007949

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HUNG, Peir-Haur et al., "Plasma Proteomic Analysis of the Critical Limb Ischemia Markers in Diabetic Patients with Hemodialysis", Molecular BioSystems, 2011, vol. 7, pages 1990-1998 See page 1992; and table 2.	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/007949

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2016-0184458 A1	30/06/2016	EP 2970940 A1 WO 2014-152940 A1	20/01/2016 25/09/2014
US 8790647 B2	29/07/2014	AU 2010-290986 A1 AU 2010-290986 B2 CA 2771965 A1 CN 102596998 A CN 102596998 B EP 2473526 A1 EP 2473526 B1 JP 2013-503621 A JP 2016-104757 A US 2012-0231002 A1 US 2014-0377277 A1 US 9708397 B2 WO 2011-027129 A1 WO 2011-027129 A9	05/04/2012 11/02/2016 10/03/2011 18/07/2012 16/03/2016 11/07/2012 09/08/2017 04/02/2013 09/06/2016 13/09/2012 25/12/2014 18/07/2017 10/03/2011 14/06/2012

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 14/47(2006.01)i, A61K 38/17(2006.01)i, A61K 47/50(2017.01)i, A23L 33/18(2016.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 14/47; A61K 39/395; A61K 48/00; A61K 38/17; A61K 47/50; A23L 33/18

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, 융합 단백질, 발기부전, 허혈, 말초 신경질환

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2016-0184458 A1 (SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES, INC.) 2016.06.30 단락 [0010], [0065], [0068], [0070], [0076], [0085], [0129]; 청구항 1, 3; 및 표 1 참조.	1-13
Y		17-20
A		14-16
Y	PEK, SHARON L. T. 등, 'Elevation of a novel angiogenic factor, leucine-rich -α2-glycoprotein (LRG1), is associated with arterial stiffness, endothelial dysfunction, and peripheral arterial disease in patients with type 2 diabetes', The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2015.01.30(online), 100권, 4호, 페이지 1586-1593 페이지 1586, 1590-1592 참조.	17-20
A	US 8790647 B2 (GREENWOOD, JOHN 등) 2014.07.29 요약; 컬럼 4, 9-10; 및 SEQ ID NO: 2 참조.	1-20
A	WANG, XIAOMENG 등, 'LRG1 promotes angiogenesis by modulating endothelial TGF-β signalling', Nature, 2013.07.18, 499권, 페이지 306-311 페이지 306-308 참조.	1-20

☒ 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

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

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

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 10월 30일 (30.10.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 10월 31일 (31.10.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

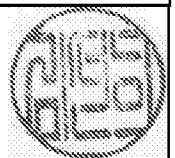
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김선희

전화번호 +82-42-481-5405



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	HUNG, PEIR-HAUR 등, 'Plasma proteomic analysis of the critical limb ischemia markers in diabetic patients with hemodialysis' , Molecular BioSystems, 2011, 7권, 페이지 1990-1998 페이지 1992; 및 표 2 참조.	1-20

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2016-0184458 A1	2016/06/30	EP 2970940 A1 WO 2014-152940 A1	2016/01/20 2014/09/25
US 8790647 B2	2014/07/29	AU 2010-290986 A1 AU 2010-290986 B2 CA 2771965 A1 CN 102596998 A CN 102596998 B EP 2473526 A1 EP 2473526 B1 JP 2013-503621 A JP 2016-104757 A US 2012-0231002 A1 US 2014-0377277 A1 US 9708397 B2 WO 2011-027129 A1 WO 2011-027129 A9	2012/04/05 2016/02/11 2011/03/10 2012/07/18 2016/03/16 2012/07/11 2017/08/09 2013/02/04 2016/06/09 2012/09/13 2014/12/25 2017/07/18 2011/03/10 2012/06/14