(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년05월04일
(11) 등록번호 10-1727506
(24) 등록일자 2017년04월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/18 (2006.01) *A23L 1/305* (2006.01)
C07K 14/495 (2006.01) *C12N 15/86* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/18 (2013.01)
A23L 33/18 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0089470
(22) 출원일자 2016년07월14일
심사청구일자 2016년07월14일
(56) 선행기술조사문헌
WO2015198199 A1*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
충남대학교 산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
정효균
대전광역시 중구 수침로 122 (태평동, 푸른뫼아파트) 101동 602호
김군순
대전광역시 서구 관저로 83 (관저동, 신선마을아파트) 211-1404
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 조경주

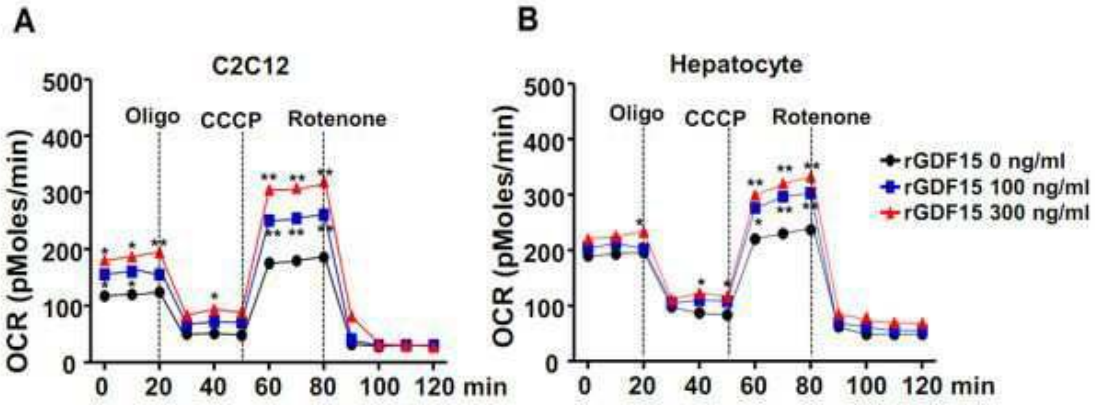
(54) 발명의 명칭 **GDF15 단백질 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 유효성분으로 함유하는 지방간의 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 GDF15 단백질 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 유효성분으로 함유하는 지방간의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, GDF15(Growth differentiation factor 15) 단백질 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 비만 동물 모델인 ob/ob 마우스 모델에 투여되었을 때, 몸무게 증가 억제 효과를 보였고, 간

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



조직과 지방조직에서 지방세포생성(lipogenesis)이 감소되었으며. 지방분해에 관여하는 유전자와 미토콘드리아 기능의 향상과 관련된 유전자의 발현 및 베타 산화(beta-oxidation)관련 유전자 발현이 증가될 뿐만 아니라 시험관 내(*in vitro*)에서 재조합 GDF15 단백질을 농도 별로 근육세포와 간세포에 처리하였을 때 미토콘드리아 산소 소모량과 지방의 분해(lipolysis)를 증가시켜 미토콘드리아의 기능을 향상시킴을 최종 확인함으로써, GDF15 단백질 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 미토콘드리아 기능을 향상시켜 지방간의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로써 유용하게 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류
C07K 14/495 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)

(72) 발명자
장준영
대전광역시 중구 대흥로24번길 21-10 403호 (대사동,스위트빌)
송민호
대전광역시 중구 계백로1716번길 87 (문화동, 센트럴파크) 306-1202

(56) 선행기술조사문헌
WO2015200078 A1*
Nutrients 7(6): 4995-5019(2015.06.19.)*
NCBI GenBank Accession No. EAW84694(2015.03.23.)*
WO2013113008 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2015R1A2A1A13000951
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원사업 ; 도약후속연구(전략연구)
연구과제명 미토콘드리아 OXPHOS 단백질의 번역조절기전을 기반으로 하는 당뇨병 제어
기 여 율 40/100
주관기관 충남대학교
연구기간 2015.05.01 ~ 2018.04.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2015R1D1A1A01060529
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 이공분기초연구지원사업(기본연구)
연구과제명 골격근 유래 미토콘드리아 기능이상이 골대사에 미치는 영향에 연구
기 여 율 30/100
주관기관 충남대학교
연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2013R1A1A2058889
부처명 교육부(한국연구재단)
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 일반연구자지원사업(기본연구)
연구과제명 당뇨병 전환/진행에서 미토콘드리아 기능조절분석
기 여 율 30/100
주관기관 충남대학교 산학협력단
연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 GDF15 (Growth differentiation factor 15) 단백질의 C-말단 도메인을 유효성분으로 함유하는, 지방간의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 지방간은 비알코올성 지방간인 것을 특징으로 하는, 지방간의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 지방간은 미토콘드리아 기능이상 및 부전으로 인한 질환인 것을 특징으로 하는, 지방간의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 GDF15 (Growth differentiation factor 15) 단백질의 C-말단 도메인을 유효성분으로 함유하는, 지방간 개선용 건강기능식품.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 지방간은 비알코올성 지방간인 것을 특징으로 하는, 지방간 개선용 건강기능식품.

청구항 12

제 10항에 있어서, 상기 지방간은 미토콘드리아 기능이상 및 부전으로 인한 질환인 것을 특징으로 하는, 지방간 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 지방간(fat liver)의 예방 또는 치료를 위한 GDF15(Growth differentiation factor 15) 단백질 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 유효성분으로 함유하는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 간(liver)은 신체에서 오른쪽, 위쪽 복강 내에 위치하고 있는 커다란 장기로서 성인 에서는 그 무게가 약 1.5 Kg이다. 정상적인 간은 육안 적으로 붉은 색조를 띄 고 있으며 표면은 매끈하다. 이러한 간의 모양과 크기는 간에 질병이 발생 하게 되면 변하게 된다. 대표적인 예로, 술을 많이 마셔서 간에 기름기가 쌓이게 되면 간의 크기가 커지며 기름기에 의해 노란 색조를 띄게 된다. 반대로, 간경변증이 심해지면 간의 크기가 줄어들고 표면은 울퉁불퉁하게 변한다.

[0003] 간은 여러 가지의 기능을 갖고 있는 매우 중요한 장기로 그 기능을 정리하면 다음과 같다. 첫째, 간은 우리 몸에 있는 여러 가지 영양소들을 적절하게 처리하는 기능, 즉 대사기능을 한다. 장으로부터 흡수된 음식물들은 우리 몸의 여러 조직에서 사용할 수 있도록 간에서 적절히 변화되게 되며, 여러 조직에서 영양소를 이용하고 남은 노폐물들은 다시 간으로 운반되어 처리되는 것이다. 둘째, 간에서는 우리 몸에 필요한 몇 가지 영양소들을 보관하는 기능을 한다. 셋째로는 장에서 영양소 흡수를 위해 꼭 필요한 물질인 담즙 산을 만들고 이를 담도를 통해 장으로 배출하는 기능을 한다. 이러한 담즙 산이 만들어지지 않으면 여러 영양소의 흡수가 되지 않아서 영양 결핍이 생기게 된다. 넷째, 우리 몸이 적절한 기능을 하는데 절대적으로 필요한 물질들(알부민, 혈액응고단백질, 콜레스테롤 등)을 만드는 기능을 한다. 마지막으로, 술(알코올), 약물, 및 우리 몸에서 생긴 여러 가지 독소를 해독하는 작용이다(Eugene Brainward, et al. Harrison' s principles of internal medicine. 15th edition. 2001).

[0004] 지방간(fat liver)은 간세포 내에 비정상적으로 지방이 축적된 상태를 말하며, 의학적으로 중성지질 함량이 전체 간 무게의 5% 이상을 초과하는 병적 상태를 의미한다. 일반적으로 지방간은 지속적이고 과다한 음주에 의해 유발되는 알콜성 지방간(Alcoholic fat liver disease, ALD)과 알콜 섭취력은 거의 없지만 알콜성 지방간과 유사한 간 조직소견을 나타내는 비알콜성 지방간의 두 가지로 구분할 수 있다.

[0005] 알콜성 지방간은 우리나라에 흔하며, 알콜 섭취로 인해 간에서 지방합성이 촉진되고 정상적인 에너지 대사가 이루어지지 않음으로써 발병하며, 알콜 섭취 정도에 따라 간염이나 간경변으로 발전될 수 있다. 또한, 비알콜성 지방간(Non-alcoholic fat liver disease, NAFLD)은 음주와 관계없이 비만, 당뇨병, 고지혈증, 약물 등의 원인에 의해 발병될 수 있으며, 진행경과에 따라 염증 반응을 동반하지 않는 단순 지방간 (steatosis)와 간세포의 염증반응(hepatocellular inflammation)을 나타내는 비알콜성 지방간염 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH), 진행 섬유화증(advanced fibrosis) 및 간경변(cirrhosis)까지 포함하는 넓은 범위의 질환을 의미한다.

[0006] 현재 알콜성 또는 비알콜성 지방간 환자에게 사용되고 있는 치료제는 크게 두 가지로 분류되며 첫째로 위험인자의 교정을 통해 지방간을 치료 및 개선하는 약제인 비만치료제(orlistat), 인슐린저항치료제 (metformin, pioglitazone, rosiglitazone), 고지혈증치료제 (clofibrate, gemfibrozil, bezafibrate, atorvastatin, simvastatin)등과, 두 번째로 지방간의 위험인자 교정과는 독립적으로, 이미 손상된 간세포 및 간기능 회복을 위한 약물로서 간세포 보호제 (ursodeoxycholic acid 및 taurine), 항산화제 (vitamine E) 및 nutritional supporter(lectin, betaine, N-acetylcystein)등이 있다.

[0007] 그러나 상기의 기존 치료제들은 효능 면에서 볼 때 본질적인 치료제가 아닌 증상 개선제로 이용되는 약물이므로

표적 효과로 볼 수 없다. 또한, 지방간 치료용의 효능으로 식품 의약품 안전처로부터 허가 받은 의약품은 현재 국내에서 단 한 품목이고, 이 의약품의 시장규모도 2008년 이후 계속 감소 추세에 있는데, 이는 해당 약물의 효과가 충분치 않다는 근본적인 문제에 기인하는 것으로 여겨진다. 따라서 현재까지 약물학적으로 지방간을 치료할 수 있는 제제는 거의 없는 실정이므로, 부작용이 없고 장기 복용시에도 안전성이 우수한 적절한 치료제 개발의 필요성이 절실하다.

[0008] 한편, 미토콘드리아 기능이상 및 부전(不全)은 단일한 증상이나 질병이 아닌 인체 내 다양한 기관이나 조직에서 다양한 질병의 증상으로 나타날 수 있어, 미토콘드리아 기능 이상과 연관된 병소 및 질병에 대한 특이적인 치료법의 가능성이 제기되고 있으나 현재까지 정확한 타겟이나 합당한 치료기술은 없어 앞으로의 연구 개발이 시급한 상태이다. 특히 세포 내에서 증가된 활성산소종(ROS)으로 인한 산화스트레스의 증가가 최근 지방간과 대사성 질환은 물론 퇴행성 신경 질환에서의 분자생물학적 근본 기전임을 보여주는 강력한 증거들이 계속해서 알려지고 있으나, 현재까지 임상 및 전임상 단계에서 사용되는 대사성 질환 치료제 혹은 항산화제를 활용한 치료방법 등은 아직까지 논란의 여지가 있다.

[0009] 한편, GDF15(Growth differentiation factor 15)는 Transforming growth factor β (TGF- β) superfamily에 속하는 단백질로써, 다른 이름으로는 macrophage inhibitory cytokine 1, placental TGF-β prostate-derived factor (PDF), nonsteroidal anti-inflammatory drug-activator gene 등으로 불리기도 한다. GDF15 단백질은 뇌, 대장, 골수 등의 조직에서는 낮게 발현되지만, 태반에서 많이 발현되는 것으로 알려져 있고, 위암, 유방암, 대장암, 전립선암 등에서도 발현량이 높은 것으로 알려져 있는 단백질이다.

[0010] 이렇듯 GDF15 단백질의 발현 양상은 매우 다양하지만, 정확한 작용기전이 알려진 바는 많이 없다. 최근의 연구에 따르면, 평소(resting)의 상태에서는 발현되지 않거나 혹은 매우 약하게 발현되지만, 여러 가지 세포의 자극 혹은 스트레스 노출 상황인 저산소증(hypoxia), 염증, 자외선노출 및 여러 가지 암화 과정 중에서 강하게 발현됨이 잘 알려져 있다. 뿐만 아니라 생체대사 에너지 항상성(energy homeostasis)의 조절에도 관여함이 알려져 있다.

[0011] 따라서, 본 발명자들은 미토콘드리아 기능 향상을 통해 지방간을 치료하기 위한 치료제로써, GDF15 단백질의 가능성을 확인하고자 시험관 내(*in vitro*)실험을 수행하여 GDF15 단백질이 지방간을 억제하고 대사성 질환을 개선하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 GDF15 단백질 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 유효성분으로 함유하는, 지방간의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 GDF15(Growth differentiation factor 15) 단백질을 유효성분으로 함유하는 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 GDF15 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 또는 상기 벡터를 포함하는 세포를 유효성분으로 함유하는 지방간의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0015] 아울러, 본 발명은 GDF15 단백질을 유효성분으로 함유하는 지방간 개선용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에서 GDF15(Growth differentiation factor 15) 단백질 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 비만 동물 모델인 ob/ob 마우스 모델에 투여되었을 때, 몸무게 증가 억제 효과를 보였고, 간조직과 지방조직에서 지방세포생성(lipogenesis)이 감소되었으며. 지방분해에 관여하는 유전자와 미토콘드리아 기능의 개선과 관련된 유전자의 발현 및 베타 산화(beta-oxidation)관련 유전자 발현이 증가되는 것을 확인하였다. 또한 시험관 내(*in vitro*)에서 재조합 GDF15 단백질을 농도 별로 근육세포와 간세포에 처리하였을 때 미토콘드리아 산소 소모량과 지방의 분해(lipolysis)를 증가시켜 미토콘드리아의 기능을 향상시키므로, GDF15 단백질 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 미토콘드리아 기능을 향상시킴으로써 지방간의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로써 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 실험관 내(*in vitro*)에서 근육세포인 C2C12와 간세포인 hepatocyte에 재조합 GDF15 단백질을 농도별로 처리하고 미토콘드리아 호흡율 (OCR, O_2 consumption rate)을 Seahorse XF analyzer를 이용하여 분석한 것으로 basal respiration, proton leak, maximal respiratory capacity를 나타낸 도이다:

A: 근육세포(C2C12); 및

B: 간세포(hepatocyte).

도 2는 실험관 내에서 3T3L1 지방세포에서 재조합 GDF15 단백질 처리에 의한 lipolysis를 분석한 것으로 배양액(media)내로 분비되는 glycerol 양을 나타낸 도이다:

SB-431542: TGF -β 억제제;

PD98059: Ere1/2 억제제; 및

SB203580: p38 억제제.

도 3은 비만 동물모델인 ob/ob 마우스 모델에 재조합 GDF15 단백질(500ug/kg/day)을 처리한 후 먹이 섭취량의 변화와 몸무게의 변화를 나타낸 도이다:

A: GDF15 단백질을 3주간 처리하고 먹이 섭취량의 변화를 나타낸 도: 및

B: GDF15 단백질을 3주간 처리하며 5일 간격으로 몸무게 변화를 나타낸 도(**p<0.001).

도 4는 ob/ob 마우스에 재조합 GDF15 단백질을 3주간 처리하고 indirect calorimetry 장비를 이용하여 12시간 간격으로 산소소모량, 이산화탄소 발생량 및 에너지 소비 (energy expenditure)를 측정하여 나타낸 도이다:

A: 산소소모량;

B: 이산화탄소 발생량; 및

C: 에너지 소비.

도 5는 도 4의 간조직과 지방조직에서 RNA를 분리하여 베타산화(beta-oxidation), 지방세포생성(lipogenesis), 지방 분해(lipolysis) 및 미토콘드리아 관련 단백질들에 대한 qRT-PCR을 실시한 결과를 나타낸 도이다:

A: 간조직; 및

B: 지방조직(epididymal white adipose tissue, eWAT).

도 6는 ob/ob 마우스에 재조합 GDF15 단백질과 vehicle을 처리하고 간조직과 지방조직을 분리하여 H/E (Hematoxylin and Eosin) 염색을 실시하여 나타낸 도이다. 특히 간조직에서 lipid 축적을 확인하기 위해 oil-red-o 염색을 실시하였다.

도 7은 ob/ob마우스에 재조합 GDF15 단백질과 vehicle을 처리하고 간조직에서의 염증반응을 확인하기 위해 염증반응 마커를 사용하여 나타낸 도이다:

A: NF-kB p65, p38 및 JNK1/2의 인산화 여부; 및

B: TNF-α의 유전자 발현과 분비량.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0019] 본 발명은 GDF15(Growth differentiation factor 15) 단백질을 유효성분으로 함유하는 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0020] 상기 GDF15 단백질은 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 것이 바람직하고, 서열번호 1을 포함하는 것이 더욱 바람직하다.

표 1

[0021]

서열번호	서열
GDF15(서열 번호 2)	MPGQELRTVN GSQMLLVLLV LSWLPHGGAL SLAEASRASF PGPSELHSED SRFRELRKRY EDLLTRLRAN QSWEDSNTDL VPAPAVRILT PEVRLGSGGH LHLRISRAAL PEGLPEASRL HRALFRLSPT ASRSWDVTRP LRRQLSLARP QAPALHLRLS PPPSQSDQLL AESSSARPQL ELHLRPQAAR GRRRARARNG DHCPLGPGRC CRLHTVRASL EDLGWADWVL SPREVQVTMC IGACPSQFRA ANMHAQIKTS LHRLKPDTVP APCCVPASYN PMVLIQKTDT GVSLQTYDDL LAKDCHCI
rGDF15(서열 번호 1)	RRARARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSL HRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

[0022] 또한, 본 발명에 있어 상기 지방간은 비알코올성 지방간(Non-alcoholic fat liver disease, NAFLD)인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 아울러 상기 지방간은 미토콘드리아 기능이상 및 부전으로 인한 질환인 것이 바람직하다.

[0023] 비알콜성 지방간은 음주와 관계없이 비만, 당뇨병, 고지혈증, 약물 등의 원인에 의해 발병될 수 있고, 진행경과에 따라 염증 반응을 동반하지 않는 단순 지방간 (steatosis)과 간세포에서 염증반응(hepatocellular inflammation)을 나타내는 비알콜성 지방간염 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH), 진행 섬유화증(advanced fibrosis) 및 간경변(cirrhosis)까지 포함한다. 또한, 최근의 연구를 통해 지방간을 포함한 대사성질환의 주요 발생기작 중 하나로, 여러가지 스트레스 기작들에 의한 미토콘드리아의 기능이상이 주요 원인임이 밝혀졌다.

[0024] 본 발명의 실험예에서, 지방간에 대한 본 발명의 GDF15 단백질의 효과를 알아보기 위해 시험관 내(*in vitro*)에서 GDF15 단백질을 처리하여 실험해 본 결과, 미토콘드리아 기능 향상에 의한 산소호흡률이 증가되는 것을 확인하였고(도 1 참조), 미토콘드리아 기능 향상에 의해 지방의 분해(lypolysis)도 유도됨을 확인하였다(도 2 참조). 또한, 비만동물 모델 마우스(ob/ob)에 GDF15 단백질을 투여하였을 때, 몸무게가 감소하는 것을 확인하였고(도 3 참조), 마우스의 산소 소모량과 에너지 소모량도 유의하게 증가함을 확인하였다(도 4 참조). 또한, GDF15 단백질을 투여하였을 때, 마우스의 지방 조직에서 산화(oxidation)와 지방분해(lipolysis) 및 에너지 소모와 관련된 thermogenic 유전자가 높게 발현됨을 확인하여 미토콘드리아의 기능이 향상됨을 확인하였고(도 5 참조), 동시에 지방세포의 생성(lipogenesis)과 관련이 있는 유전자들도 억제되어 있음을 확인하였으며(도 5 참조), GDF15 단백질에 의해, 실제 간조직에서 지방방울(lipid droplet)의 크기가 유의하게 감소됨을 확인하였다(도 6 참조). 또한, GDF15 단백질에 의한 염증반응 마커들의 인산화 여부를 실험해 본 결과, 지방조직에서 NF-kB p65, p38 및 JNK1/2의 인산화가 현저히 감소됨을 확인하였고, 염증관련 사이토카인인 TNF-α의 발현량 및 분비량도 감소되어 있는 것을 확인하였다(도 7 참조).

[0025] 따라서, 본 발명의 GDF15 단백질 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 지방간의 예방 또는 치료를 위해 유용하게 사용될 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명은 GDF15 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 또는 상기 벡터를 포함하는 세포를 유효성분으로 함유하는, 지방간의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0027] 상기 벡터는 인체 또는 동물세포에서 발현되는 선형 DNA, 플라스미드 벡터, 바이러스성 발현벡터를 포함하는 벡터 또는 재조합 레트로바이러스(retrovirus) 벡터, 재조합 아데노 바이러스(adenovirus) 벡터, 재조합 아데노 부속 바이러스(adeno-associated virus, AAV) 벡터, 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스(herpes simplex virus) 벡터 또는 재조합 렌티바이러스(lentivirus) 벡터를 포함하는 재조합 바이러스 벡터인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0028] 또한, 상기 세포는 조혈 줄기세포(hematopoietic stem cells), 수지상 세포(dendritic cells), 자가이식 종양세포(autologous tumor cells) 및 정착 종양세포(established tumor cells)로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0029] 아울러, 상기의 지방간은 비알코올성 지방간인 것이 바람직하며, 상기 지방간은 미토콘드리아 기능이상 및 부전으로 인한 질환인 것이 바람직하다.

[0030] 상기의 약학적 조성물을 제제화할 경우, 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.

[0031] 경구 투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0032] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다.

[0033] 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 81, 카카오지, 타우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0034] 본 발명에 따른 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0035] 구체적으로, 본 발명에 따른 화합물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.1 mg 내지 100 mg, 바람직하게는 0.5 mg 내지 10 mg을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 질환의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0036] 본 발명의 GDF15 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터의 경우에는 0.05 내지 500 mg을 함유하는 것이 바람직하고, 0.1 내지 300 mg을 함유하는 것이 더욱 바람직하며, GDF15 유래 펩타이드를 암호화는 폴

리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 바이러스의 경우, 10^3 내지 10^{12} IU(10 내지 10^{10} PFU)를 함유하는 것이 바람직하고, 10^5내지 10^{10} IU를 함유하는 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0037] 또한, 본 발명의 GDF15 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포의 경우, 10^3내지 10^8 개를 함유하는 것이 바람직하고, 10^4 내지 10^7 개를 함유하는 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0038] 또한, 본 발명의 GDF15 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 또는 세포를 유효성분으로 함유하는 조성물의 유효 용량은 체중 1 kg당 벡터의 경우에는 0.05 내지 12.5 mg/kg, 재조합 바이러스의 경우에는 10^7 내지 10^{11} 바이러스 입자(10^5 내지 10^9 IU)/kg, 세포의 경우에는 10^3 내지 10^6 세포/kg이고, 바람직하게는 벡터의 경우에는 0.1 내지 10 mg/kg, 재조합 바이러스의 경우에는 10^8 내지 10^{10} 입자(10^6 내지 10^8 IU)/kg, 세포의 경우에는 10^2 내지 10^5 세포/kg이며, 하루 2 내지 3회 투여될 수 있다. 상기와 같은 조성은 반드시 이에 한정되는 것은 아니고, 환자의 상태 및 신경 질환의 발병 정도에 따라 변할 수 있다.

[0039] 아울러, 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용될 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명은 GDF15(Growth differentiation factor 15) 단백질을 유효성분으로 함유하는 지방간 개선용 건강기능식품을 제공하며, 상기 GDF15 단백질은 상기의 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 것이 바람직하고, 서열번호 1을 포함하는 것이 더욱 바람직하다.

[0041] 본 명세서의 "건강기능식품"이란 일상 식사에서 결핍되기 쉬운 영양소나 인체에 유용한 기능을 가진 원료나 성분 (기능성 원료)을 사용하여 제조한 것으로, 인체의 정상적인 기능을 유지하거나 생리기능 활성화를 통하여 건강을 유지하고 개선하는 식품으로 식품의약품안전처장이 정한 것을 의미하나, 이에 한정되지 않으며 통상적인 의미의 건강식품을 배제하는 의미로 사용된 것이 아니다.

[0042] 본 발명의 조성물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강기능식품 중의 상기 화합물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취 시에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0043] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 조성물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 단당류, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 이당류, 예를 들어 말토스, 수크로스 등; 및 다당류, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제{타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)} 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 g 당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

[0044] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일 쥬스 및 과일쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0045] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0046] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0047] 단, 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예 및 실험예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0048] **<실시예 1> 재조합 GDF15 단백질(rGDF15)의 제조**

[0049] 재조합 GDF15 단백질을 만들기 위해 인간 GDF15의 아미노산 서열 중 상기의 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 pGEX plasmid(promega)에 클로닝하여 IPTG로 *E.coli*에 GST-GDF15 단백질을 도입하고 이를 GST 컬럼으로 정제한 후 트롬빈(Thrombin)을 처리하여 순수한 재조합 GDF15 단백질을 제조하여 실험에 사용하였다.

[0050] 또한, 필요에 따라 재조합 GDF15 단백질을 구입(R/D system, (#8146-GD/CF)하여 실험에 사용하였다.

[0051] **<실험예 1> 재조합 GDF15 단백질에 의한 미토콘드리아의 산소 소모량 증가 확인**

[0052] 본 발명자들은 재조합 GDF15 단백질에 의한 미토콘드리아 기능의 향상 여부를 확인하기 위해 시험관 내(*in vitro*) 실험을 통해 재조합 GDF15 단백질에 의한 미토콘드리아의 세포 호흡율의 영향 여부를 실험하였다.

[0053] 구체적으로, 근육세포주인 C2C12와 간조직세포인 primary hepatocyte에 상기 <실시예1>에서 제조한, 재조합 GDF15 단백질(rGDF15)을 농도별(0, 100, 300 ng/ml)로 처리하고 올리고마이신(oligomycin; oligo), Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone(CCCP) 및 로테논(rotenone)등의 세포호흡 저해제들을 일정구간 별로 처리하면서 seahorse XF analyzer를 이용하여 미토콘드리아에서의 산소 소모량(oxygen consumption rate, OCR)을 측정하였다.

[0054] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 근육세포주와 간조직세포 모두에서 재조합 GDF15 단백질 농도의존적으로 미토콘드리아 기능 향상에 따른 산소 소모량(세포 호흡률)이 증가됨을 확인하였다(도 1).

[0055] **<실험예 2> 재조합 GDF15 단백질에 의한 미토콘드리아의 지방세포의 분해(lipolysis) 증가 확인**

[0056] 미토콘드리아에서의 산소 호흡율 증가 외에도 미토콘드리아의 베타 산화(beta-oxidation)는 에너지를 생산하는 미토콘드리아의 대표적인 기능이며 지방세포의 분해(lipolysis)와 관련이 있다. 미토콘드리아에서는 지방을 원료로 이용한 후, 그 대사 산물인 글리세롤(glycerol)을 생성하므로, 이 글리세롤의 농도를 측정함으로써 간접적으로 미토콘드리아 의 기능을 확인할 수 있다. 이에 본 발명자들은 재조합 GDF15 단백질(rGDF15)에 의한 지방세포의 분해(lipolysis)의 정도를 확인하기 위해 하기와 같이 실험하였다.

[0057] 구체적으로, 시험관 내(*in vitro*)에서 3T3L1 미분화 지방세포주를 분화시켜 지방세포로 만든 후 상기 <실시예 1>에서 제조한 재조합 GDF15 단백질을 100ng/ml 처리하고 배양액 내로 분비되는 글리세롤의 양을 측정하였다. 또한, 지방분해 대사에 관여하는 각종 단백질 억제제인 SB-431542, PD98059 및 SB203580를 각각 5μM, 25μM, 10μM씩 GDF15 단백질과 함께 처리하여 지방세포의 분해능을 확인하였다.

[0058] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 재조합 GDF15 단백질을 처리할 경우 지방세포 내의 지질(lipid)이 글리세롤로 분해되면서 배양액 내로 분비되어 축적되는 것을 확인하였다(도 2). 또한, 지방 분해 대사에 관여하는 각종 단백질 억제제(SB-431542, TGF -β 억제제/ PD98059, Ere1/2 억제제/ SB203580, p38 억제제)들을 동시에 처리하여 이들에 의해 글리세롤의 생성이 다시 억제됨을 확인함으로써, 재조합 GDF15 단백질이 지방세포의 분해를 유도함을 확인하였고, 이는 미토콘드리아 기능의 향상과도 연관성이 있음을 알 수 있다.

[0059] **<실험예 3> 비만동물 모델에서 재조합 GDF15 단백질에 의한 식이 및 몸무게 변화 확인**

[0060] 비만동물 모델인 ob/ob 마우스 모델은 leptin 유전자의 결손으로 비만형의 표현형을 나타내는 동물 모델이다. 또한 ob/ob 마우스는 미토콘드리아 기능이 비정상적으로 억제되거나 이상이 있는 것으로 잘 알려져 있다.

[0061] 본 발명자들은 GDF15 단백질에 의한 미토콘드리아 기능의 향상 및 이에 따른 비만 증상의 억제 효과를 확인해 보기 위해, ob/ob 마우스에 상기 <실시예 1>에서 제조한 재조합 GDF15 단백질(rGDF15, 500ug/kg/day)를 IP 방법으로 3주간 투여하면서 먹이 섭취량의 변화와 몸무게의 변화를 관찰하였다. 6주령인 수컷 ob/ob 마우스(그룹당 n=5)에 vehicle과 재조합 GDF15 단백질을 투여하고, 2주 후 재조합 GDF15 단백질에 의한 먹이섭취량의 변화

및 몸무게를 확인해 보았다.

[0062] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 재조합 GDF15 단백질에 의해서는 마우스 먹이섭취량의 변화가 나타나지 않는 것을 확인할 수 있었다(도 3의 A). 하지만 재조합 GDF15 단백질을 처리하였을 때, 마우스 몸무게의 변화에 있어서 vehicle 처리군에 비해 현저한 감소를 확인하였다(도 3의 B). 재조합 GDF15 단백질을 투여하면서 약 10일까지는 몸무게 증가가 감소되는 경향만을 확인할 수 있었으나, 재조합 GDF15 단백질을 처리한 2주 후부터는 몸무게의 증가율이 통계적으로 유의하게 감소되는 것을 확인함으로써, 마우스에서 먹이 섭취량의 변화 없이 GDF15 투여에 의해 몸무게가 상당히 감소하는 것을 확인하였다.

[0063] **<실험예 4> 비만동물모델에서 재조합 GDF15 단백질에 의한 산소 소모량 및 에너지 소모량 증가 확인**

[0064] 본 발명자들은, 상기 <실험예 3>에서의 마우스 대사의 표현형을 직접 확인해보기 위해 ob/ob 마우스 모델에 vehicle과 본 발명의 재조합 GDF15 단백질(rGDF15)을 각각 투여한 뒤, indirect calorimetry 장비를 이용하여 산소 소모량(VO_2)과 이산화탄소 발생량(VCO_2) 및 에너지 소모량(Energy expenditure, EE)을 직접 측정하였다.

[0065] 실험에는 Physical cage system (Oxylet, Panlab, Cornella, Spain)을 사용하였고, 음식과 물은 자율공급한 상태에서 24시간 내지 72시간 동안 실험을 진행하였다. 마우스의 먹이인 표준 사료 및 고지방 사료는 물과 음식에의 접근에 아무런 제한이 없는 각각의 대사분석 구획(individual metabolic chambers)들에 위치해 두었고, 산소 소모량(VO_2)과 이산화탄소 발생량(VCO_2), 에너지 소모량(Energy expenditure, EE) 및 이동행위 등은 Physical cage system을 사용한 간접적인 열량측정방법에 따라 분석되었다. 얻어진 데이터는 METABOLISM software version 2.2를 사용하여 분석하였고, 불빛이 있을 때와 없을 때의 평균값이 계산되었으며, *P* value값은 t-test를 사용하여 계산하였다.

[0066] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 재조합 GDF15 단백질을 처리한 마우스 그룹에서 유의하게 산소 소모량이 증가하였으며(도 4의 A), 이산화탄소 발생량도 유의하게 증가되어 있는 것을 확인하였다(도 4의 B). 뿐만 아니라 에너지 소모량 (EE) 역시 증가되어 있는 것을 확인하였다(도 4의 C). 또한 밤과 낮을 따로 구별하여 분석한 경우에도 동일한 결과가 나오는 것을 확인하였다.

[0067] **<실험예 5> 비만동물모델에서 재조합 GDF15 단백질에 의한 간조직과 지방조직에서의 대사관련 유전자 발현 변화 확인**

[0068] 본 발명자들은 상기 <실험예 4>에서 나타나는 대사의 표현형들과 관련하여 좀 더 구체적인 파악을 위해 간조직 및 지방조직의 대사관련 유전자들의 발현을 관찰하였다.

[0069] 구체적으로, Vehicle과 상기 <실시예 1>에서 제조한 재조합 GDF15 단백질을 3주간 투여한 마우스의 간조직과 지방조직(epididymal white adipose tissue, eWAT)에서 베타 산화(beta-oxidation)관련 유전자(Ppara, AcadL 및 AcadM), 지방세포생성(lipogenesis)관련 유전자(Fasn, Pparγ), 지방분해(lipolysis) 관련 유전자(Hsl, Atgl) 및 미토콘드리아 대사관련 유전자(Pgc1α, Cpt1α, Cox 1 및 Ndufa9)들의 발현을 RT-PCR 실험으로 확인하였다.

[0070] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이 간조직의 경우, 베타 산화(beta-oxidation)관련 유전자인 Ppara, AcadL 및 AcadM의 발현이 유의하게 증가되었고, 지방분해(lipolysis) 관련 유전자인 Hsl과 Atgl 유전자의 발현도 증가되었으며, 미토콘드리아 대사관련 유전자인 Pgc1α, Cpt1α, Cox 1 및 Ndufa9의 발현 역시 증가되는 것을 확인하였다. 반면, 지방세포생성(lipogenesis)관련 유전자인 Fasn과 Pparγ의 발현 증가는 관찰되지 않았다(도 5의 A).

[0071] 지방조직의 경우에도, 재조합 GDF15 단백질에 의해서 베타 산화(beta-oxidation)관련 유전자인 Ppara, AcadL 및 AcadM의 발현이 증가되고, 지방분해(lipolysis) 관련 유전자인 Hsl과 Atgl 유전자의 발현 역시 증가되며, 미토콘드리아 대사관련 유전자인 Pgc1α, Cpt1α, Cox 1 및 Ndufa9의 발현도 증가되는 것을 확인하였다(도 5의 B).

[0072] 상기와 같이 간조직과 지방조직에서의 특정 유전자 발현을 확인해 본 결과, 재조합 GDF15 단백질에 의해 산화(oxidation)와 지방분해(lipolysis) 및 에너지 소모와 관련된 thermogenic 유전자들의 높은 발현을 확인하였고, 이는 대사의 표현형들이 개선되는 것과 동일한 결과를 나타낸다.

[0073] **<실험예 6> 비만동물모델에서 재조합 GDF15 단백질에 의한 지방간 및 지방 방울(lipid droplet)의 감소 확인**

[0074] 본 발명자들은 상기 <실험예 3>에서 3주간 재조합 GDF15 단백질을 투여한 각각의 마우스 그룹에서 간조직과 지방조직을 적출하여 H/E염색을 통해 조직학적 검사를 실시하였다.

[0075] 16시간 절식을 한 마우스를 CO_2 처리 후, 4% 파라포름 알데히드로 상온에서 1시간동안 고정한 뒤, 파라핀 블록을 제작하였으며 표준 H/E 염색법을 이용하여 간조직과 지방조직의 조직학적 검사를 시행하였다.

[0076] 또한, 더욱 정확한 지질(lipid)의 양을 확인하기 위해 동결절편 간조직을 이용한 Oil-red-O 염색을 실시하였다. 0.5% (w/v)의 오일 레드 O(oil red O) 용액을 준비하고, 이를 3:2의 비율로 멸균된 증류수와 희석하여 1시간을 상온에 둔 뒤 지방세포의 염색용 시약으로 사용하기 직전, 0.2-㎛의 필터로 걸렀다. 그리고 동결절편 간조직을 1 x PBS를 이용하여 2번 세척한 후, 3.7% (w/v) 포르말린(in PBS)을 이용하여 세포를 4℃, 1시간 동안 고정하였다. 고정 후, 300㎕의 오일 레드 O 워킹 솔루션을 1시간 동안 처리하고, 증류수를 이용하여 2번 세척한 뒤 이를 현미경을 이용하여 확인하였다.

[0077] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, vehicle를 처리한 마우스 그룹에서는 지방간 질환의 표현형이 관찰되었으나, 재조합 GDF15 단백질을 처리한 마우스 그룹의 경우 간조직에서 지방방울(lipid droplet)이 유의하게 감소되어 있는 것을 확인하였다(도 6).

[0078] 이는 GDF15 단백질에 의해 지방간 증상이 억제되거나 개선됨을 직접적으로 보여주는 결과이다. 또한, 지방조직(eWAT)에서 재조합 GDF15 단백질을 처리한 후, H/E 염색으로 조직학적 변화를 관찰한 결과, 간조직에서의 결과와 유사하게 지방방울(lipid droplet)의 크기가 vehicle을 처리한 그룹에 비해 50% 이상 유의하게 감소되어 있는 것을 확인하였다(도 6).

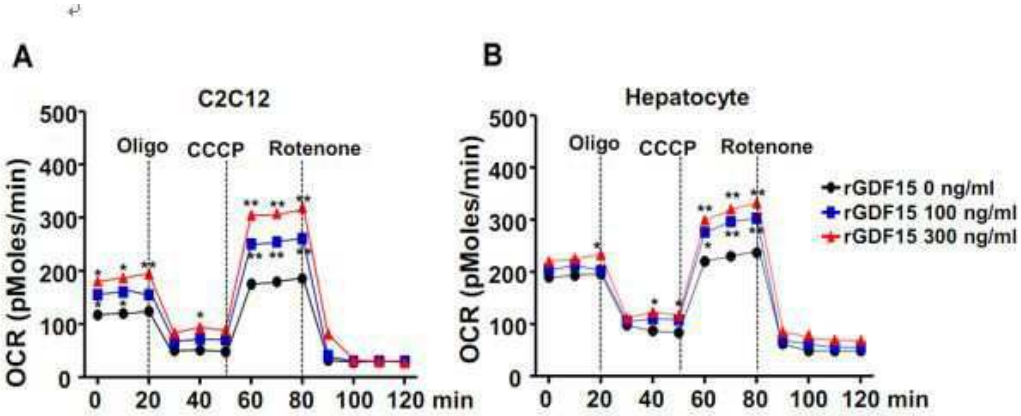
[0079] **<실험예 7> 비만동물모델에서 재조합 GDF15 단백질에 의한 지방조직 염증반응의 감소 확인**

[0080] 본 발명자들은 상기 <실험예 3>의 마우스 간조직을 이용하여 염증관련 유전자의 인산화 여부를 알아보고자 vehicle과 재조합 GDF15 단백질을 처리한 후, 간조직을 용해(lysis)하여 염증마커로 잘 알려져 있는 NF-kB p65, p38 및 JNK1/2의 인산화를 웨스턴 블롯(western blot)실험으로 확인해 보았다.

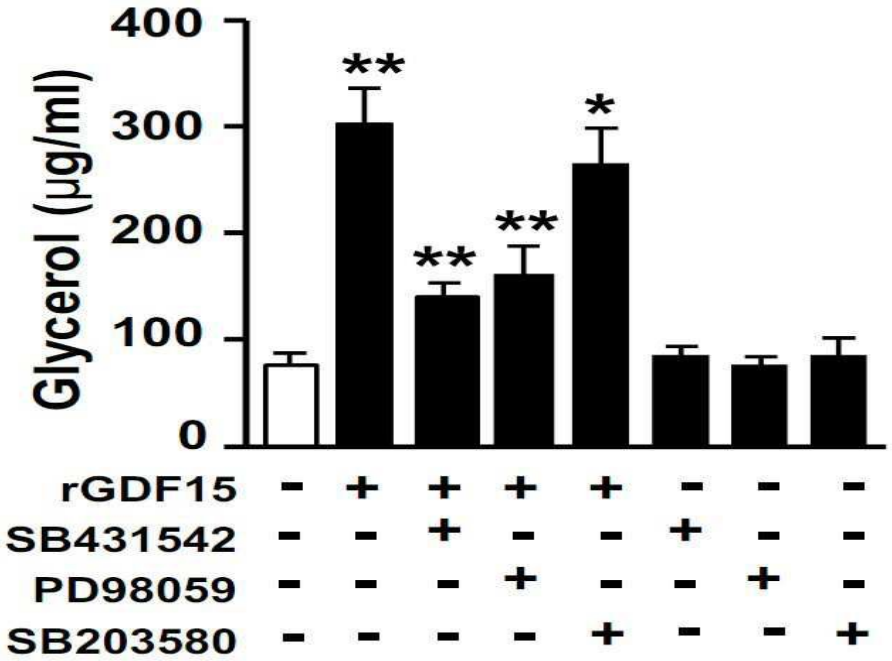
[0081] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, 재조합 GDF15 단백질을 처리한 군에서 상기 염증마커 NF-kB p65, p38 및 JNK1/2의 인산화가 현저히 감소되는 것을 확인하였다(도 7의 A). 뿐만 아니라, 염증관련 사이토카인으로 잘 알려져 있는 TNF-α의 발현량과 분비량을 간조직에서 확인해 본 결과, GDF15 단백질에 의해 TNF-α유전자의 발현량과 분비량이 현저히 감소됨을 확인하였다(도 7의 B)

도면

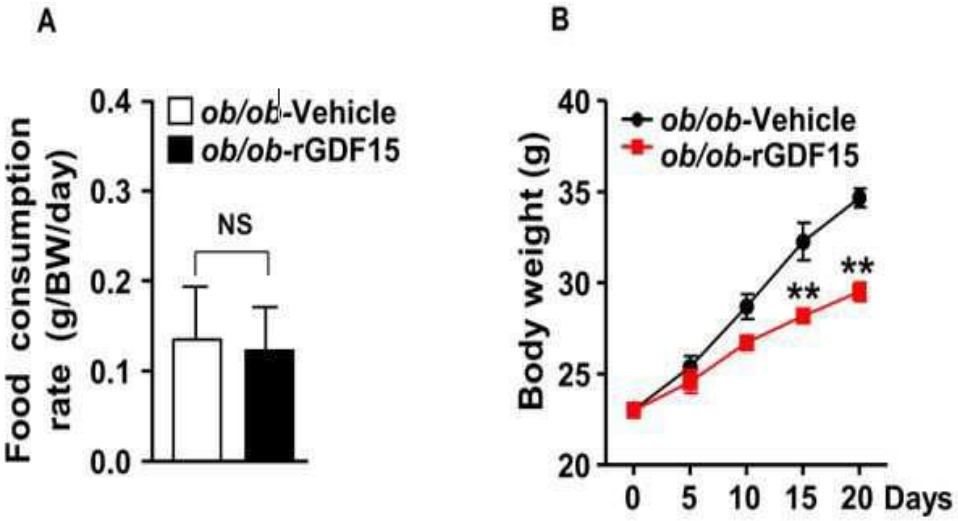
도면1



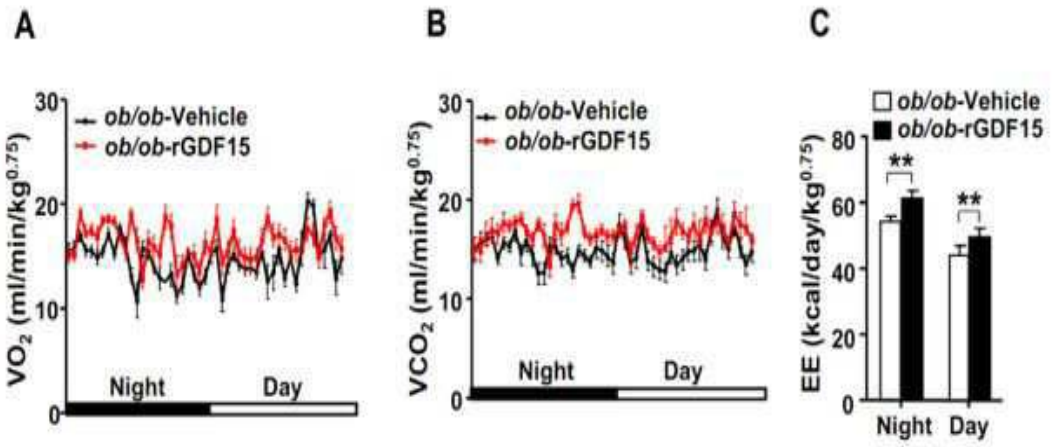
도면2


Glycerol (μg/ml)
400
300
200
100
0
**
**
**
*
rGDF15 - + + + + - - -
SB431542 - - + - - + - -
PD98059 - - - + - - + -
SB203580 - - - - + - - +

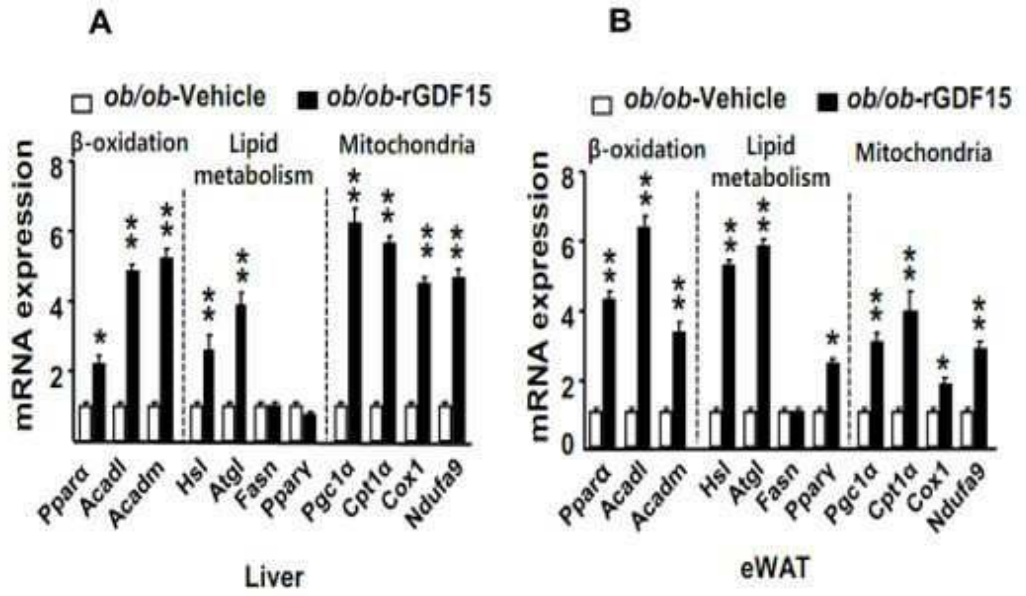
도면3


A
Food consumption rate (g/BW/day)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
ob/ob-Vehicle
ob/ob-rGDF15
NS
B
Body weight (g)
40
35
30
25
20
ob/ob-Vehicle
ob/ob-rGDF15
**
**
0 5 10 15 20 Days

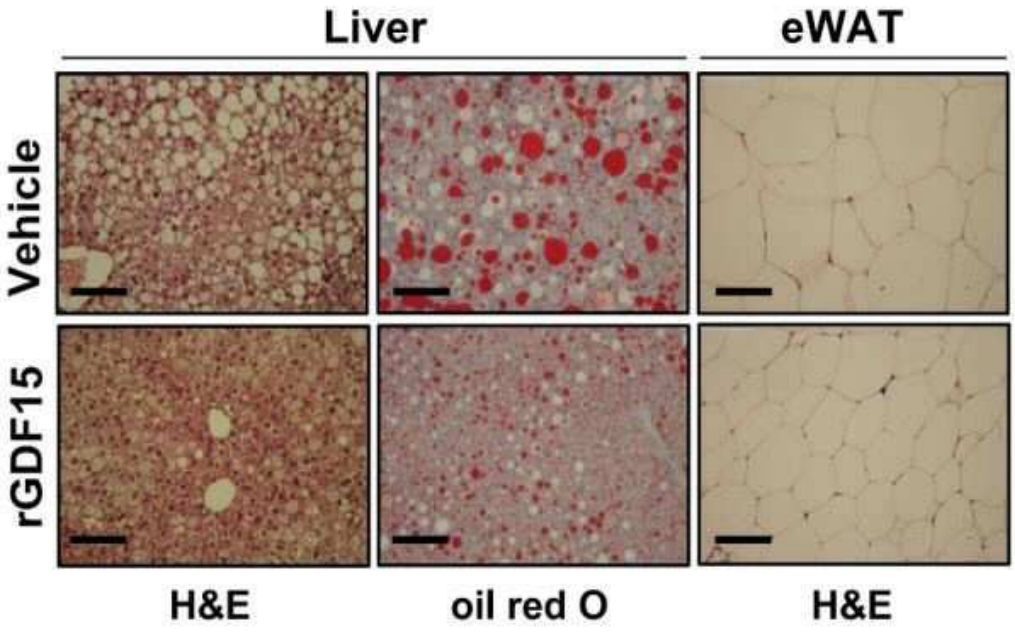
도면4


A
B
C
ob/ob-Vehicle
ob/ob-rGDF15
VO2 (ml/min/kg0.75)
VCO2 (ml/min/kg0.75)
EE (kcal/day/kg0.75)
Night
Day
**

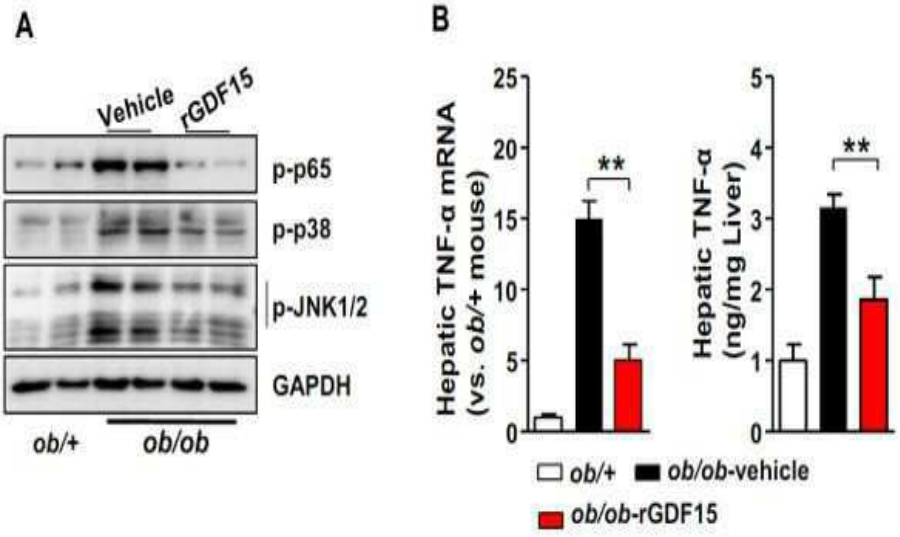
도면5


A
B
ob/ob-Vehicle
ob/ob-rGDF15
β-oxidation
Lipid metabolism
Mitochondria
mRNA expression
Pparα
Acadl
Acadm
Hsl
Atgl
Fasn
Pparγ
Pgc1α
Cpt1α
Cox1
Ndufa9
Liver
eWAT

도면6



도면7



서 열 목 록

<110> 충남대학교 산학협력단

<120> Pharmaceutical composition for the prevention or treatment of fat liver comprising GDF15 protein or polynucleotide encoding GDF15 as an effective ingredient

<130> 2016P-04-042

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> rGDF15

<400> 1

Arg Arg Ala Arg Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly
1 5 10 15

Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly
20 25 30

Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys
35 40 45

Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln
50 55 60

Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro
65 70 75 80

Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr
85 90 95

Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp
100 105 110

Cys His Cys Ile
115

<210> 2

<211> 308

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GDF15

<400> 2

Met Pro Gly Gln Glu Leu Arg Thr Val Asn Gly Ser Gln Met Leu Leu
1 5 10 15

Val Leu Leu Val Leu Ser Trp Leu Pro His Gly Gly Ala Leu Ser Leu
20 25 30

Ala Glu Ala Ser Arg Ala Ser Phe Pro Gly Pro Ser Glu Leu His Ser

```
          35                  40                  45
Glu Asp Ser Arg Phe Arg Glu Leu Arg Lys Arg Tyr Glu Asp Leu Leu
     50                  55                  60
Thr Arg Leu Arg Ala Asn Gln Ser Trp Glu Asp Ser Asn Thr Asp Leu
 65                  70                  75                  80
Val Pro Ala Pro Ala Val Arg Ile Leu Thr Pro Glu Val Arg Leu Gly
                 85                  90                  95

Ser Gly Gly His Leu His Leu Arg Ile Ser Arg Ala Ala Leu Pro Glu
            100                 105                 110
Gly Leu Pro Glu Ala Ser Arg Leu His Arg Ala Leu Phe Arg Leu Ser
        115                 120                 125
Pro Thr Ala Ser Arg Ser Trp Asp Val Thr Arg Pro Leu Arg Arg Gln
    130                 135                 140
Leu Ser Leu Ala Arg Pro Gln Ala Pro Ala Leu His Leu Arg Leu Ser
145                 150                 155                 160
Pro Pro Pro Ser Gln Ser Asp Gln Leu Leu Ala Glu Ser Ser Ser Ala

                165                 170                 175
Arg Pro Gln Leu Glu Leu His Leu Arg Pro Gln Ala Ala Arg Gly Arg
            180                 185                 190
Arg Arg Ala Arg Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly
        195                 200                 205
Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly
    210                 215                 220
Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys
225                 230                 235                 240

Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln
                245                 250                 255
Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro
            260                 265                 270
Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr
        275                 280                 285
Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp
```

290 295 300

Cys His Cys Ile

305

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 1

【변경전】

지방간 예방 또는 치료용

【변경후】

지방간의 예방 또는 치료용