

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0051415
(43) 공개일자 2023년04월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/76 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/76 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0127783

(22) 출원일자 2022년10월06일

심사청구일자 2022년10월06일

(30) 우선권주장

1020210133732 2021년10월08일 대한민국(KR)

(71) 출원인

주식회사 세네릭스

서울특별시 송파구 법원로11길 25, 제5층
제비-503호 (문정동)

(72) 발명자

오준서

서울특별시 서대문구 가재울미래로 2, 118동 805
호(남가좌동, DMC파크뷰자이)

(74) 대리인

특허법인충현

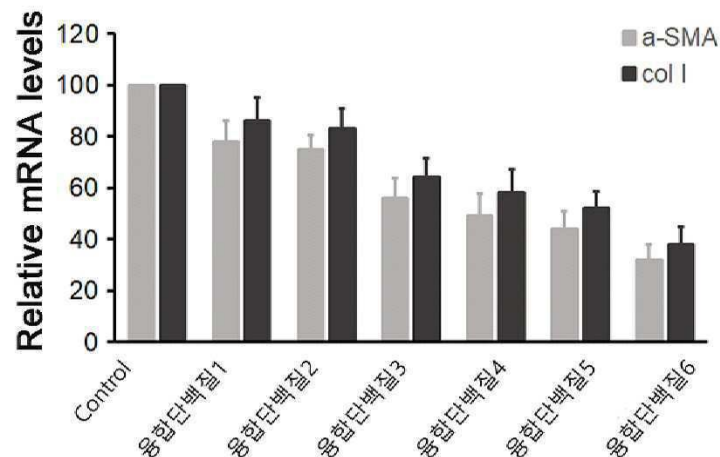
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 섬유증의 예방 또는 치료용 융합 단백질

(57) 요약

본 발명은 간, 췌장, 폐 등에 발생하는 섬유질환을 예방 또는 치료하기 위해 사용할 수 있는 알부민과 레티놀 결합 단백질의 융합 단백질에 관한 것으로서, 본 발명의 융합단백질은 조직의 섬유화에 원인이 되는 정상세포의 활성화를 억제 또는 역활성화를 유도하여 섬유질환의 예방 또는 치료가 가능하며, 같은 목적의 종래 융합단백질과 비교하여 낮은 농도에서 보다 우수한 효과를 나타내는바 단백질 치료제의 인체 투여 용량과 투여 빈도를 획기적으로 줄일 수 있는 범용적 기반기술이 될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61P 11/00 (2018.01)

C07K 14/47 (2013.01)

C12N 15/62 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

RBP4(레티놀 결합 단백질 4, Retinol-binding protein 4)의 19번 내지 194번 아미노산 또는 19번 내지 195번 아미노산을 포함하는 RBP4 단편, 알부민 단백질의 404번 내지 517번 아미노산을 포함하는 알부민 IIIA 단편, 알부민 단백질의 134번 내지 218번 아미노산 또는 131번 내지 218번 아미노산을 포함하는 알부민 IB 단편을 포함하는 융합 단백질.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 융합단백질은 RBP4 단편-알부민 IIIA 단편-알부민 IB 단편 또는 알부민 IIIA 단편-알부민 IB 단편-RBP4 단편 형태로 결합된 것을 특징으로 하는, 융합 단백질.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 융합 단백질은 RBP4 단편(19번-195번 아미노산)-알부민 IIIA 단편(404번-517번 아미노산)-알부민 IB 단편(131번-218번 아미노산), RBP4 단편(19번-195번 아미노산)-알부민 IIIA 단편(404번-517번 아미노산)-알부민 IB 단편(134번-218번 아미노산), 알부민 IIIA 단편(404번-517번 아미노산)-알부민 IB 단편(131번-218번 아미노산)-RBP4 단편(19번-194번 아미노산) 및 알부민 IIIA 단편(404번-517번 아미노산)-알부민 IB 단편(134번-218번 아미노산)-RBP4 단편(19번-194번 아미노산)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 융합 단백질.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 RBP4 단편은 하기의 식으로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 것을 특징으로 하는, 융합 단백질:

[식 1]

X19-R-D-C-X23-X24-X25-X26-F-R-V-X30-X31-X32-X33-D-K-A-X37-F-X39-X40-X41-W-Y-X44-X45-A-K-X48-D-P-X51-G-X53-F-L-X56-D-N-X59-X60-A-E-F-S-X65-D-E-X68-X69-X70-X71-X72-A-T-A-K-G-R-X79-X80-X81-L-N-N-X85-X86-V-C-X89-X90-X91-V-X93-T-F-T-D-T-X99-D-X101-X102-K-F-K-X106-X107-X108-W-G-V-A-X113-F-L-X116-K-X118-X119-D-D-H-X123-I-X125-X126-T-X128-X129-X130-X131-X132-A-X134-Q-X136-S-C-X139-L-X141-N-X143-X144-G-T-C-A-D-S-Y-X152-F-X154-F-X156-X157-X158-X159-X160-X161-L-X163-X164-X165-X166-X167-K-X169-X170-R-Q-X173-Q-X175-X176-X177-C-L-A-X181-X182-Y-X184-L-X186-X187-X188-X189-X190-Y-C-X193-G,

상기 식 1에서

X19는 E 또는 Q이고;

X23은 R, G 또는 P이고;

X24는 V, L 또는 M이고;

X25는 S 또는 N이고;

X26은 S 또는 G이고;
X30은K, E 또는 R이고;
X31은 E, Q 또는 V이고;
X32는 N 또는 D이고;
X33은 F 또는 L이고;
X37은 R 또는 H이고;
X39는 S 또는 P이고;
X40은 G 또는 E이고;
X41은 T 또는 I이고;
X44는 A, S 또는 V이고;
X45는 M, I, L 또는 T이고;
X48은 K 또는 R이고;
X51은 E, K 또는 V이고;
X53은 L 또는 V이고;
X56은 Q 또는 R이고;
X59는 I 또는 L이고;
X60은 V, I 또는 L이고;
X65는 V 또는 M이고;
X68은 T 또는 N이고;
X69는 G, C, D 또는 S이고;
X70은 Q, E 또는 H이고;
X71은 M 또는 I이고;
X72는 S, I 또는 R이고;
X79는 V 또는 G이고;
X80은 R 또는 H이고;
X81은 L 또는 V이고;
X85는 W 또는 R이고;
X86은 D, H 또는 V이고;
X89는 A 또는 T이고;
X90은 D 또는 A이고;
X91은 M 또는 I이고;
X93은 G 또는 S이고;
X99는 E 또는 K이고;
X101은 P, H, L 또는 S이고;
X102는 A, S 또는 V이고;
X106은 M 또는 L이고;

X107은 K 또는 E이고;
 X108은 Y 또는 C이고;
 X113은 S 또는 F이고;
 X116은 Q 또는 H이고;
 X118은 G 또는 E이고;
 X191은 N 또는 I이고;
 X123은 W, C 또는 R이고;
 X125는 V 또는 I이고;
 X126은 D, H 또는 N이고;
 X128은 D 또는 N이고;
 X129는 Y 또는 C이고;
 X130은 D 또는 N이고;
 X131은 T, K 또는 M이고;
 X132는 Y, F 또는 N이고;
 X134는 V, E, L 또는 M이고;
 X136은 Y 또는 S이고;
 X139는 R 또는 H이고;
 X141은 L 또는 Q이고;
 X143은 L 또는 F이고;
 X144는 D, H 또는 N이고;
 X152는 S 또는 F이고;
 X154는 V, L 또는 M이고;
 X156은 S, A 또는 F이고;
 X157은 R, G 또는 W이고;
 X158은 D, E 또는 Y이고;
 X159는 P, L 또는 S이고;
 X160은 N, H 또는 S이고;
 X161은 G, C, D 또는 S이고;
 X163은 P, L, S 또는 T이고;
 X164는 P, L, R 또는 S이고;
 X165는 E 또는 A이고;
 X166은 A, G 또는 V이고;
 X167은 Q 또는 R이고;
 X169는 I, F, L, M, T 또는 V이고;
 X170은 V, A, G, I 또는 L이고;
 X173은 R, Q 또는 W이고;

X175는 E 또는 G이고;
 X176은 E, D 또는 G이고;
 X177은 L 또는 V이고;
 X181은 R, G 또는 W이고;
 X182는 Q 또는 K이고;
 X184는 R, G 또는 K이고;
 X186은 I, L 또는 M이고;
 X187은 V 또는 I이고;
 X188은 H 또는 R이고;
 X189는 N, D 또는 S이고;
 X190은 G 또는 S이고; 및
 X193은 D 또는 N이다.

청구항 5

제 4 항에 있어서,
 상기 RBP4 단편은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 것을 특징으로 하는, 융합 단백질.

청구항 6

제 1 항에 있어서,
 상기 RBP4 단편은 하기의 식으로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 것을 특징으로 하는, 융합 단백질:

[식 2]

X19-R-D-C-X23-X24-X25-X26-F-R-V-X30-X31-X32-X33-D-K-A-X37-F-X39-X40-X41-W-Y-X44-X45-A-K-X48-D-P-X51-G-X53-F-L-X56-D-N-X59-X60-A-E-F-S-X65-D-E-X68-X69-X70-X71-X72-A-T-A-K-G-R-X79-X80-X81-L-N-N-X85-X86-V-C-X89-X90-X91-V-X93-T-F-T-D-T-X99-D-X101-X102-K-F-K-X106-X107-X108-W-G-V-A-X113-F-L-X116-K-X118-X119-D-D-H-X123-I-X125-X126-T-X128-X129-X130-X131-X132-A-X134-Q-X136-S-C-X139-L-X141-N-X143-X144-G-T-C-A-D-S-Y-X152-F-X154-F-X156-X157-X158-X159-X160-X161-L-X163-X164-X165-X166-X167-K-X169-X170-R-Q-X173-Q-X175-X176-X177-C-L-A-X181-X182-Y-X184-L-X186-X187-X188-X189-X190-Y-C-X193-G-X195,

상기 식 2에서

X19는 E 또는 Q이고;
 X23은 R, G 또는 P이고;
 X24는 V, L 또는 M이고;
 X25는 S 또는 N이고;
 X26은 S 또는 G이고;
 X30은K, E 또는 R이고;
 X31은 E, Q 또는 V이고;
 X32는 N 또는 D이고;
 X33은 F 또는 L이고;

X37은 R 또는 H이고;
X39는 S 또는 P이고;
X40은 G 또는 E이고;
X41은 T 또는 I이고;
X44는 A, S 또는 V이고;
X45는 M, I, L 또는 T이고;
X48은 K 또는 R이고;
X51은 E, K 또는 V이고;
X53은 L 또는 V이고;
X56은 Q 또는 R이고;
X59는 I 또는 L이고;
X60은 V, I 또는 L이고;
X65는 V 또는 M이고;
X68은 T 또는 N이고;
X69는 G, C, D 또는 S이고;
X70은 Q, E 또는 H이고;
X71은 M 또는 I이고;
X72는 S, I 또는 R이고;
X79는 V 또는 G이고;
X80은 R 또는 H이고;
X81은 L 또는 V이고;
X85는 W 또는 R이고;
X86은 D, H 또는 V이고;
X89는 A 또는 T이고;
X90은 D 또는 A이고;
X91은 M 또는 I이고;
X93은 G 또는 S이고;
X99는 E 또는 K이고;
X101은 P, H, L 또는 S이고;
X102는 A, S 또는 V이고;
X106은 M 또는 L이고;
X107은 K 또는 E이고;
X108은 Y 또는 C이고;
X113은 S 또는 F이고;
X116은 Q 또는 H이고;
X118은 G 또는 E이고;

X191은 N 또는 I이고;
 X123은 W, C 또는 R이고;
 X125는 V 또는 I이고;
 X126은 D, H 또는 N이고;
 X128은 D 또는 N이고;
 X129는 Y 또는 C이고;
 X130은 D 또는 N이고;
 X131은 T, K 또는 M이고;
 X132는 Y, F 또는 N이고;
 X134는 V, E, L 또는 M이고;
 X136은 Y 또는 S이고;
 X139는 R 또는 H이고;
 X141은 L 또는 Q이고;
 X143은 L 또는 F이고;
 X144는 D, H 또는 N이고;
 X152는 S 또는 F이고;
 X154는 V, L 또는 M이고;
 X156은 S, A 또는 F이고;
 X157은 R, G 또는 W이고;
 X158은 D, E 또는 Y이고;
 X159는 P, L 또는 S이고;
 X160은 N, H 또는 S이고;
 X161은 G, C, D 또는 S이고;
 X163은 P, L, S 또는 T이고;
 X164는 P, L, R 또는 S이고;
 X165는 E 또는 A이고;
 X166은 A, G 또는 V이고;
 X167은 Q 또는 R이고;
 X169는 I, F, L, M, T 또는 V이고;
 X170은 V, A, G, I 또는 L이고;
 X173은 R, Q 또는 W이고;
 X175는 E 또는 G이고;
 X176은 E, D 또는 G이고;
 X177은 L 또는 V이고;
 X181은 R, G 또는 W이고;
 X182는 Q 또는 K이고;

X184는 R, G 또는 K이고;
 X186은 I, L 또는 M이고;
 X187은 V 또는 I이고;
 X188은 H 또는 R이고;
 X189는 N, D 또는 S이고;
 X190은 G 또는 S이고;
 X193은 D 또는 N이고; 및
 X195는 R 또는 K이다.

청구항 7

제 6 항에 있어서,
 상기 RBP4 단편은 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 것을 특징으로 하는, 융합 단백질.

청구항 8

제 1 항에 있어서,
 상기 알부민 IIIA 단편은 하기의 식으로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 것을 특징으로 하는, 융합 단백질:

[식 3]

X404-V-X406-E-X408-X409-N-X411-X412-K-X414-N-C-E-L-X419-E-X421-L-X423-X424-X425-X426-X427-Q-X429-X430-X431-L-X433-X434-Y-T-K-K-V-X440-X441-X442-S-X444-X445-X446-L-V-E-X450-S-R-N-L-X455-X456-V-X458-X459-X460-C-C-K-X464-X465-X466-A-K-X469-M-P-C-X473-E-X475-X476-L-S-X479-V-L-N-X483-X484-C-V-X487-X488-E-X490-X491-X492-V-X494-X495-R-X497-T-K-C-C-X502-X503-S-L-X506-N-X508-X509-P-X511-F-S-A-L-E-X517,

상기 식 3에서

X404는 L, F 또는 P이고;
 X406은 E, D, K 또는 V이고;
 X408은 P 또는 S이고;
 X409는 Q, K 또는 L이고;
 X411은 L 또는 S이고;
 X412는 I 또는 L이고;
 X414는 Q 또는 E이고;
 X419는 F 또는 Y이고;
 X421은 Q, K 또는 R이고;
 X423은 G 또는 R이고;
 X424는 E 또는 G이고;
 X425는 Y 또는 H이고;
 X426은 K, E 또는 R이고;
 X427은 F 또는 L이고;

X429는 N, D, K 또는 S이고;
X430은 A, E, T 또는 V이고;
X431은 L 또는 V이고;
X433은 V 또는 I이고;
X434는 R, C 또는 H이고;
X440은 P 또는 H이고;
X441은 Q 또는 E이고;
X442는 V 또는 M이고;
X444는 T 또는 S이고;
X445는 P 또는 L이고;
X446은 T 또는 A이고;
X450은 V, F, I 또는 L이고;
X455는 G, A 또는 R이고;
X456은 K 또는 R이고;
X458은 G 또는 R이고;
X459는 S 또는 R이고;
X460은 K 또는 N이고;
X464는 H 또는 L이고;
X465는 P, A, L, R 또는 S이고;
X466은 E 또는 V이고;
X469는 R 또는 I이고;
X473은 A 또는 E이고;
X475는 D, A 또는 Y이고;
X476은 Y 또는 C이고;
X479는 V 또는 M이고;
X483은 Q 또는 R이고;
X484는 L 또는 F이고;
X487은 L 또는 S이고;
X488은 H, Q 또는 R이고;
X490은 K 또는 E이고;
X491은 T, K 또는 M이고;
X492는 P 또는 S이고;
X494는 S 또는 C이고;
X495는 D, E 또는 G이고;
X497은 V 또는 A이고;
X502는 T 또는 I이고;

X503은 E, D 또는 K이고;
 X506은 V, A 또는 M이고;
 X508은 R 또는 S이고;
 X509는 R 또는 Q이고;
 X511은 C 또는 Y이고; 및
 X517은 V 또는 F이다.

청구항 9

제 8 항에 있어서,
 상기 알부민 IIIA 단편은 서열번호 3 또는 4의 아미노산 서열로 구성된 것을 특징으로 하는, 융합 단백질.

청구항 10

제 1 항에 있어서,
 상기 알부민 IB 단편은 하기의 식으로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 것을 특징으로 하는, 융합 단백질:

[식 4]

P-X135-X136-X137-X138-X139-X140-R-P-X143-X144-X145-X146-X147-C-X149-X150-F-X152-X153-X154-E-X156-X157-F-L-K-K-Y-L-X164-E-I-A-R-R-X170-X171-Y-F-X174-X175-X176-X177-L-X179-X180-X181-A-X183-X184-X185-K-X187-X188-F-X190-X191-C-C-X194-X195-A-X197-K-X199-X200-X201-L-L-P-X205-X206-X207-E-X209-X210-X211-X212-X213-K-X215-X216-S-X218,

상기 식 4에서

X135는 N 또는 D이고;
 X136은 L 또는 V이고;
 X137은 P 또는 S이고;
 X138은 R, G, P 또는 Q이고;
 X139는 L 또는 F이고;
 X140은 V, L 또는 M이고;
 X143은 E 또는 K이고;
 X144는 V 또는 L이고;
 X145는 D, E 또는 V이고;
 X146은 V 또는 E이고;
 X147은 M, I 또는 T이고;
 X149는 T, A 또는 I이고;
 X150은 A, D, S 또는 T이고;
 X152는 H 또는 R이고;
 X153은 D 또는 E이고;
 X154는 N 또는 S이고;

X156은 E, A 또는 G이고;
X157은 T 또는 K이고;
X164는 Y, C 또는 H이고;
X170은 H 또는 R이고;
X171은 P 또는 L이고;
X174는 Y 또는 D이고;
X175는 A 또는 D이고;
X176은 P 또는 L이고;
X177은 E 또는 K이고;
X179는 L 또는 R이고;
X180은 F, L, S 또는 Y이고;
X181은 F 또는 Y이고;
X183은 K 또는 I이고;
X184는 R, M 또는 T이고;
X185는 Y, C 또는 N이고;
X187은 A, D 또는 S이고;
X188은 A, D 또는 V이고;
X190은 T, I 또는 S이고;
X191은 E 또는 G이고;
X194는 G 또는 L이고;
X195는 A 또는 T이고;
X197은 D, G 또는 Y이고;
X199는 A 또는 G이고;
X200은 A 또는 V이고;
X201은 C 또는 F이고;
X205는 K 또는 R이고;
X206은 L 또는 F이고;
X207은 D, E, N 또는 V이고;
X209는 L 또는 H이고;
X210은 R, Q 또는 W이고;
X211은 D, V 또는 Y이고;
X212는 E 또는 K이고;
X213은 G 또는 E이고;
X215는 A, T 또는 V이고;
X216은 S 또는 L이고; 및

X218은 A 또는 G이다.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

상기 알부민 IB 단편은 서열번호 5의 아미노산 서열로 구성된 것을 특징으로 하는, 융합 단백질.

청구항 12

제 1 항에 있어서,

상기 알부민 IB 단편은 하기의 식으로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 것을 특징으로 하는, 융합 단백질:

[식 5]

D-X132-X133-P-X135-X136-X137-X138-X139-X140-R-P-X143-X144-X145-X146-X147-C-X149-X150-F-X152-X153-X154-E-X156-X157-F-L-K-K-Y-L-X164-E-I-A-R-R-X170-X171-Y-F-X174-X175-X176-X177-L-X179-X180-X181-A-X183-X184-X185-K-X187-X188-F-X190-X191-C-C-X194-X195-A-X197-K-X199-X200-X201-L-L-P-X205-X206-X207-E-X209-X210-X211-X212-X213-K-X215-X216-S-X218,

상기 식 5에서

X132는 D 또는 E이고;

X133은 N 또는 K이고;

X135는 N 또는 D이고;

X136은 L 또는 V이고;

X137은 P 또는 S이고;

X138은 R, G, P 또는 Q이고;

X139는 L 또는 F이고;

X140은 V, L 또는 M이고;

X143은 E 또는 K이고;

X144는 V 또는 L이고;

X145는 D, E 또는 V이고;

X146은 V 또는 E이고;

X147은 M, I 또는 T이고;

X149는 T, A 또는 I이고;

X150은 A, D, S 또는 T이고;

X152는 H 또는 R이고;

X153은 D 또는 E이고;

X154는 N 또는 S이고;

X156은 E, A 또는 G이고;

X157은 T 또는 K이고;

X164는 Y, C 또는 H이고;

X170은 H 또는 R이고;
 X171은 P 또는 L이고;
 X174는 Y 또는 D이고;
 X175는 A 또는 D이고;
 X176은 P 또는 L이고;
 X177은 E 또는 K이고;
 X179는 L 또는 R이고;
 X180은 F, L, S 또는 Y이고;
 X181은 F 또는 Y이고;
 X183은 K 또는 I이고;
 X184는 R, M 또는 T이고;
 X185는 Y, C 또는 N이고;
 X187은 A, D 또는 S이고;
 X188은 A, D 또는 V이고;
 X190은 T, I 또는 S이고;
 X191은 E 또는 G이고;
 X194는 G 또는 L이고;
 X195는 A 또는 T이고;
 X197은 D, G 또는 Y이고;
 X199는 A 또는 G이고;
 X200은 A 또는 V이고;
 X201은 C 또는 F이고;
 X205는 K 또는 R이고;
 X206은 L 또는 F이고;
 X207은 D, E, N 또는 V이고;
 X209는 L 또는 H이고;
 X210은 R, Q 또는 W이고;
 X211은 D, V 또는 Y이고;
 X212는 E 또는 K이고;
 X213은 G 또는 E이고;
 X215는 A, T 또는 V이고;
 X216은 S 또는 L이고; 및
 X218은 A 또는 G이다.

청구항 13

제 12 항에 있어서,

상기 알부민 IB 단편은 서열번호 6의 아미노산 서열로 구성된 것을 특징으로 하는, 융합 단백질.

청구항 14

제 1 항에 있어서,

상기 융합 단백질은 서열번호 7 내지 12로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 융합 단백질.

청구항 15

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 16

제 15 항의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터.

청구항 17

제 16 항의 벡터를 포함하는 숙주세포.

청구항 18

하기의 단계를 포함하는 융합 단백질의 생산방법:

- (1) 제 16 항의 벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계;
- (2) 상기 형질전환체를 배양하는 단계; 및
- (3) 상기 배양액으로부터 융합 단백질을 수득하는 단계.

청구항 19

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항의 융합 단백질, 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 포함하는 섬유질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 20

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항의 융합 단백질, 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 섬유질환의 예방 또는 치료 방법.

청구항 21

섬유질환의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한, 제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항의 융합 단백질, 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터의 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 섬유증을 예방 또는 치료하기 위해 사용할 수 있는 알부민과 레티놀 결합 단백질의 신규 융합 단백질에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 조직의 섬유화(fibrosis)는 조직의 기능 상실을 초래하는 치명적인 결과를 낳는다. 예를 들어, 폐의 섬유화는 폐 조직이 굳어서 심각한 호흡 장애를 불러일으키는 호흡기 질환으로 폐 섬유증(pulmonary fibrosis)은 폐활량 감소와 산소 확산 장애로 발생하는 전신성 저산소증, 섬유조직이 수축함에 따라 폐 동맥 및 모세혈관이 발생하는 폐고혈압, 폐순환 장애로 우심실에 혈액이 고여 유발되는 심부전, 그 외에도 혈전증 및 폐렴 등의 질환을 동반할 수 있다. 폐 섬유증은 독성물질의 흡입이나 지속적인 염증이 원인이 되는 경우도 있으나, 특정 원인을 밝힐 수 없는 특발성 폐 섬유증도 있다. 아직까지 폐 섬유증으로 인해 섬유화가 진행된 폐 조직을 복구할 수 있는 방법은 없으며, 현재는 염증반응 억제를 위한 스테로이드 제제와 면역억제제로 염증반응에 의한 섬유화 반응을 지연시키는 방법이 전부이다.

[0004] 조직섬유화의 분자 기전은 아직 명확하게 밝혀지지 않았으며, 섬유질환 치료제의 개발 연구가 필요하다. 최근들어, 간, 췌장, 신장 조직의 섬유화는 조직을 구성하는 세포 중 하나인 성상세포(stellate cells)의 활성화 과정(activation 및 transdifferentiation)에 의해 발생함이 밝혀졌다. 성상세포는 활성화 과정을 거쳐 근섬유아세포(myofibroblast)로 분화되고, 콜라겐과 같은 세포외기질을 과도하게 발현하여 조직내 축적시킨다. 따라서 활성화된 성상세포는 조직 섬유화 발생에 결정적인 역할을 수행한다.

[0005] 정상의 간 성상세포(hepatic stellate cell)는 전신에서의 비타민 A 항상성의 조절에 중심적인 역할을 한다. 식품으로부터 얻어진 비타민 A(레티놀)는 혈류에서 레티놀 결합 단백질(Retinol Binding Protein, RBP)과 결합하여 순환하다가 RBP 수용체인 STRA6를 통해 성상세포로 이동되어, 세포질 내 지방 방울 내에 레티닐 에스테르의 형태로 저장된다. 한편, 알부민의 발현은 성상세포의 활성화를 저해하고, 또한 이미 활성화된 성상세포 내에서 알부민의 강제 발현은 세포를 활성화 이전의 상태로 역전환시킴이 알려져 있다.

[0006] 이전의 연구에서 본 발명자들은 조직 섬유화의 시작이 되는 성상세포의 활성화 억제 또는 역활성화를 위하여 STRA6를 통해 성상세포 내로 이동할 수 있는 RBP와 알부민을 결합하여 성상세포를 타겟팅하는 융합 단백질을 제조하고 이의 섬유화 예방 및 치료 효과를 확인하였다(KR 10-1395394).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은, 종래의 RBP와 알부민 융합 단백질의 성상세포의 활성화 억제 또는 불활성화 효과를 증진시키기 위한 것으로서, 본 발명은 RBP4(레티놀 결합 단백질 4, Retinol-binding protein 4) RBP4 단편, 알부민 IIIA 단편 및 알부민 IB 단편을 포함하는 융합 단백질을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은, RBP4 단편-알부민 IIIA 단편-알부민 IB 단편 또는 알부민 IIIA 단편-알부민 IB 단편-RBP4 단편 형태의 융합 단백질을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 벡터를 포함하는 숙주세포를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 융합 단백질의 생산방법을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 융합 단백질, 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴

클레오타이드를 포함하는 벡터를 포함하는 섬유질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 융합 단백질, 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 섬유질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은, 섬유질환의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한, 상기 융합 단백질, 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터의 용도를 제공하는 것이다.

[0019] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0021] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 RBP4(레티놀 결합 단백질 4, Retinol-binding protein 4)의 19번 내지 194번 아미노산 또는 19번 내지 195번 아미노산을 포함하는 RBP4 단편; 알부민 단백질의 404번 내지 517번 아미노산을 포함하는 알부민 IIIA 단편; 및 알부민 단백질의 134번 내지 218번 아미노산 또는 131번 내지 218번 아미노산을 포함하는 알부민 IB 단편;을 포함하는 융합 단백질을 제공한다.

[0022] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 융합단백질은 RBP4 단편-알부민 IIIA 단편-알부민 IB 단편 또는 알부민 IIIA 단편-알부민 IB 단편-RBP4 단편 형태로 결합된 것이다.

[0023] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 융합 단백질은 RBP4 단편(19번-195번 아미노산)-알부민 IIIA 단편(404번-517번 아미노산)-알부민 IB 단편(131번-218번 아미노산), RBP4 단편 (19번-195번 아미노산)-알부민 IIIA 단편 (404번-517번 아미노산)-알부민 IB 단편 (134번-218번 아미노산), 알부민 IIIA 단편 (404번-517번 아미노산)-알부민 IB 단편 (131번-218번 아미노산)-RBP4 단편 (19번-194번 아미노산) 및 알부민 IIIA 단편 (404번-517번 아미노산)-알부민 IB 단편 (134번-218번 아미노산)-RBP4 단편(19번-194번 아미노산)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것이다.

[0024] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 RBP4 단편은 하기의 식으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 그 서열로 구성된 것이다:

[식 1]

[0026] X19-R-D-C-X23-X24-X25-X26-F-R-V-X30-X31-X32-X33-D-K-A-X37-F-X39-X40-X41-W-Y-X44-X45-A-K-X48-D-P-X51-G-X53-F-L-X56-D-N-X59-X60-A-E-F-S-X65-D-E-X68-X69-X70-X71-X72-A-T-A-K-G-R-X79-X80-X81-L-N-N-X85-X86-V-C-X89-X90-X91-V-X93-T-F-T-D-T-X99-D-X101-X102-K-F-K-X106-X107-X108-W-G-V-A-X113-F-L-X116-K-X118-X119-D-D-H-X123-I-X125-X126-T-X128-X129-X130-X131-X132-A-X134-Q-X136-S-C-X139-L-X141-N-X143-X144-G-T-C-A-D-S-Y-X152-F-X154-F-X156-X157-X158-X159-X160-X161-L-X163-X164-X165-X166-X167-K-X169-X170-R-Q-X173-Q-X175-X176-X177-C-L-A-X181-X182-Y-X184-L-X186-X187-X188-X189-X190-Y-C-X193-G,

[0027] 상기 식 1에서

[0028] X19는 E 또는 Q이고;

[0029] X23은 R, G 또는 P이고;

[0030] X24는 V, L 또는 M이고;

[0031] X25는 S 또는 N이고;

[0032] X26은 S 또는 G이고;

[0033] X30은K, E 또는 R이고;

[0034] X31은 E, Q 또는 V이고;

[0035] X32는 N 또는 D이고;

[0036] X33은 F 또는 L이고;

[0037]	X37은 R 또는 H이고;
[0038]	X39는 S 또는 P이고;
[0039]	X40은 G 또는 E이고;
[0040]	X41은 T 또는 I이고;
[0041]	X44는 A, S 또는 V이고;
[0042]	X45는 M, I, L 또는 T이고;
[0043]	X48은 K 또는 R이고;
[0044]	X51은 E, K 또는 V이고;
[0045]	X53은 L 또는 V이고;
[0046]	X56은 Q 또는 R이고;
[0047]	X59는 I 또는 L이고;
[0048]	X60은 V, I 또는 L이고;
[0049]	X65는 V 또는 M이고;
[0050]	X68은 T 또는 N이고;
[0051]	X69는 G, C, D 또는 S이고;
[0052]	X70은 Q, E 또는 H이고;
[0053]	X71은 M 또는 I이고;
[0054]	X72는 S, I 또는 R이고;
[0055]	X79는 V 또는 G이고;
[0056]	X80은 R 또는 H이고;
[0057]	X81은 L 또는 V이고;
[0058]	X85는 W 또는 R이고;
[0059]	X86은 D, H 또는 V이고;
[0060]	X89는 A 또는 T이고;
[0061]	X90은 D 또는 A이고;
[0062]	X91은 M 또는 I이고;
[0063]	X93은 G 또는 S이고;
[0064]	X99는 E 또는 K이고;
[0065]	X101은 P, H, L 또는 S이고;
[0066]	X102는 A, S 또는 V이고;
[0067]	X106은 M 또는 L이고;
[0068]	X107은 K 또는 E이고;
[0069]	X108은 Y 또는 C이고;
[0070]	X113은 S 또는 F이고;
[0071]	X116은 Q 또는 H이고;
[0072]	X118은 G 또는 E이고;

- [0073] X191은 N 또는 I이고;
- [0074] X123은 W, C 또는 R이고;
- [0075] X125는 V 또는 I이고;
- [0076] X126은 D, H 또는 N이고;
- [0077] X128은 D 또는 N이고;
- [0078] X129는 Y 또는 C이고;
- [0079] X130은 D 또는 N이고;
- [0080] X131은 T, K 또는 M이고;
- [0081] X132는 Y, F 또는 N이고;
- [0082] X134는 V, E, L 또는 M이고;
- [0083] X136은 Y 또는 S이고;
- [0084] X139는 R 또는 H이고;
- [0085] X141은 L 또는 Q이고;
- [0086] X143은 L 또는 F이고;
- [0087] X144는 D, H 또는 N이고;
- [0088] X152는 S 또는 F이고;
- [0089] X154는 V, L 또는 M이고;
- [0090] X156은 S, A 또는 F이고;
- [0091] X157은 R, G 또는 W이고;
- [0092] X158은 D, E 또는 Y이고;
- [0093] X159는 P, L 또는 S이고;
- [0094] X160은 N, H 또는 S이고;
- [0095] X161은 G, C, D 또는 S이고;
- [0096] X163은 P, L, S 또는 T이고;
- [0097] X164는 P, L, R 또는 S이고;
- [0098] X165는 E 또는 A이고;
- [0099] X166은 A, G 또는 V이고;
- [0100] X167은 Q 또는 R이고;
- [0101] X169는 I, F, L, M, T 또는 V이고;
- [0102] X170은 V, A, G, I 또는 L이고;
- [0103] X173은 R, Q 또는 W이고;
- [0104] X175는 E 또는 G이고;
- [0105] X176은 E, D 또는 G이고;
- [0106] X177은 L 또는 V이고;
- [0107] X181은 R, G 또는 W이고;
- [0108] X182는 Q 또는 K이고;

- [0109] X184는 R, G 또는 K이고;
- [0110] X186은 I, L 또는 M이고;
- [0111] X187은 V 또는 I이고;
- [0112] X188은 H 또는 R이고;
- [0113] X189는 N, D 또는 S이고;
- [0114] X190은 G 또는 S이고; 및
- [0115] X193은 D 또는 N이다.
- [0116] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 RBP4 단편은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하거나 그 서열로 구성된 것이다.
- [0117] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 RBP4 단편은 하기의 식으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 그 서열로 구성된 것이다:
- [0118] **[식 2]**
- [0119] X19-R-D-C-X23-X24-X25-X26-F-R-V-X30-X31-X32-X33-D-K-A-X37-F-X39-X40-X41-W-Y-X44-X45-A-K-X48-D-P-X51-G-X53-F-L-X56-D-N-X59-X60-A-E-F-S-X65-D-E-X68-X69-X70-X71-X72-A-T-A-K-G-R-X79-X80-X81-L-N-N-X85-X86-V-C-X89-X90-X91-V-X93-T-F-T-D-T-X99-D-X101-X102-K-F-K-X106-X107-X108-W-G-V-A-X113-F-L-X116-K-X118-X119-D-D-H-X123-I-X125-X126-T-X128-X129-X130-X131-X132-A-X134-Q-X136-S-C-X139-L-X141-N-X143-X144-G-T-C-A-D-S-Y-X152-F-X154-F-X156-X157-X158-X159-X160-X161-L-X163-X164-X165-X166-X167-K-X169-X170-R-Q-X173-Q-X175-X176-X177-C-L-A-X181-X182-Y-X184-L-X186-X187-X188-X189-X190-Y-C-X193-G-X195,
- [0120] 상기 식 2에서
- [0121] X19는 E 또는 Q이고;
- [0122] X23은 R, G 또는 P이고;
- [0123] X24는 V, L 또는 M이고;
- [0124] X25는 S 또는 N이고;
- [0125] X26은 S 또는 G이고;
- [0126] X30은K, E 또는 R이고;
- [0127] X31은 E, Q 또는 V이고;
- [0128] X32는 N 또는 D이고;
- [0129] X33은 F 또는 L이고;
- [0130] X37은 R 또는 H이고;
- [0131] X39는 S 또는 P이고;
- [0132] X40은 G 또는 E이고;
- [0133] X41은 T 또는 I이고;
- [0134] X44는 A, S 또는 V이고;
- [0135] X45는 M, I, L 또는 T이고;
- [0136] X48은 K 또는 R이고;
- [0137] X51은 E, K 또는 V이고;
- [0138] X53은 L 또는 V이고;
- [0139] X56은 Q 또는 R이고;

- [0140] X59는 I 또는 L이고;
- [0141] X60은 V, I 또는 L이고;
- [0142] X65는 V 또는 M이고;
- [0143] X68은 T 또는 N이고;
- [0144] X69는 G, C, D 또는 S이고;
- [0145] X70은 Q, E 또는 H이고;
- [0146] X71은 M 또는 I이고;
- [0147] X72는 S, I 또는 R이고;
- [0148] X79는 V 또는 G이고;
- [0149] X80은 R 또는 H이고;
- [0150] X81은 L 또는 V이고;
- [0151] X85는 W 또는 R이고;
- [0152] X86은 D, H 또는 V이고;
- [0153] X89는 A 또는 T이고;
- [0154] X90은 D 또는 A이고;
- [0155] X91은 M 또는 I이고;
- [0156] X93은 G 또는 S이고;
- [0157] X99는 E 또는 K이고;
- [0158] X101은 P, H, L 또는 S이고;
- [0159] X102는 A, S 또는 V이고;
- [0160] X106은 M 또는 L이고;
- [0161] X107은 K 또는 E이고;
- [0162] X108은 Y 또는 C이고;
- [0163] X113은 S 또는 F이고;
- [0164] X116은 Q 또는 H이고;
- [0165] X118은 G 또는 E이고;
- [0166] X191은 N 또는 I이고;
- [0167] X123은 W, C 또는 R이고;
- [0168] X125는 V 또는 I이고;
- [0169] X126은 D, H 또는 N이고;
- [0170] X128은 D 또는 N이고;
- [0171] X129는 Y 또는 C이고;
- [0172] X130은 D 또는 N이고;
- [0173] X131은 T, K 또는 M이고;
- [0174] X132는 Y, F 또는 N이고;
- [0175] X134는 V, E, L 또는 M이고;

- [0176] X136은 Y 또는 S이고;
- [0177] X139는 R 또는 H이고;
- [0178] X141은 L 또는 Q이고;
- [0179] X143은 L 또는 F이고;
- [0180] X144는 D, H 또는 N이고;
- [0181] X152는 S 또는 F이고;
- [0182] X154는 V, L 또는 M이고;
- [0183] X156은 S, A 또는 F이고;
- [0184] X157은 R, G 또는 W이고;
- [0185] X158은 D, E 또는 Y이고;
- [0186] X159는 P, L 또는 S이고;
- [0187] X160은 N, H 또는 S이고;
- [0188] X161은 G, C, D 또는 S이고;
- [0189] X163은 P, L, S 또는 T이고;
- [0190] X164는 P, L, R 또는 S이고;
- [0191] X165는 E 또는 A이고;
- [0192] X166은 A, G 또는 V이고;
- [0193] X167은 Q 또는 R이고;
- [0194] X169는 I, F, L, M, T 또는 V이고;
- [0195] X170은 V, A, G, I 또는 L이고;
- [0196] X173은 R, Q 또는 W이고;
- [0197] X175는 E 또는 G이고;
- [0198] X176은 E, D 또는 G이고;
- [0199] X177은 L 또는 V이고;
- [0200] X181은 R, G 또는 W이고;
- [0201] X182는 Q 또는 K이고;
- [0202] X184는 R, G 또는 K이고;
- [0203] X186은 I, L 또는 M이고;
- [0204] X187은 V 또는 I이고;
- [0205] X188은 H 또는 R이고;
- [0206] X189는 N, D 또는 S이고;
- [0207] X190은 G 또는 S이고;
- [0208] X193은 D 또는 N이고; 및
- [0209] X195는 R 또는 K이다.
- [0210] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 RBP4 단편은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하거나 그 서열로 구성된 것이다.

- [0211] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 알부민 IIIA 단편은 하기의 식으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 그 서열로 구성된 것이다:
- [0212] [식 3]
- [0213] X404-V-X406-E-X408-X409-N-X411-X412-K-X414-N-C-E-L-X419-E-X421-L-X423-X424-X425-X426-X427-Q-X429-X430-X431-L-X433-X434-Y-T-K-K-V-X440-X441-X442-S-X444-X445-X446-L-V-E-X450-S-R-N-L-X455-X456-V-X458-X459-X460-C-C-K-X464-X465-X466-A-K-X469-M-P-C-X473-E-X475-X476-L-S-X479-V-L-N-X483-X484-C-V-X487-X488-E-X490-X491-X492-V-X494-X495-R-X497-T-K-C-C-X502-X503-S-L-X506-N-X508-X509-P-X511-F-S-A-L-E-X517,
- [0214] 상기 식 3에서
- [0215] X404는 L, F 또는 P이고;
- [0216] X406은 E, D, K 또는 V이고;
- [0217] X408은 P 또는 S이고;
- [0218] X409는 Q, K 또는 L이고;
- [0219] X411은 L 또는 S이고;
- [0220] X412는 I 또는 L이고;
- [0221] X414는 Q 또는 E이고;
- [0222] X419는 F 또는 Y이고;
- [0223] X421은 Q, K 또는 R이고;
- [0224] X423은 G 또는 R이고;
- [0225] X424는 E 또는 G이고;
- [0226] X425는 Y 또는 H이고;
- [0227] X426은 K, E 또는 R이고;
- [0228] X427은 F 또는 L이고;
- [0229] X429는 N, D, K 또는 S이고;
- [0230] X430은 A, E, T 또는 V이고;
- [0231] X431은 L 또는 V이고;
- [0232] X433은 V 또는 I이고;
- [0233] X434는 R, C 또는 H이고;
- [0234] X440은 P 또는 H이고;
- [0235] X441은 Q 또는 E이고;
- [0236] X442는 V 또는 M이고;
- [0237] X444는 T 또는 S이고;
- [0238] X445는 P 또는 L이고;
- [0239] X446은 T 또는 A이고;
- [0240] X450은 V, F, I 또는 L이고;
- [0241] X455는 G, A 또는 R이고;
- [0242] X456은 K 또는 R이고;
- [0243] X458은 G 또는 R이고;

- [0244] X459는 S 또는 R이고;
- [0245] X460은 K 또는 N이고;
- [0246] X464는 H 또는 L이고;
- [0247] X465는 P, A, L, R 또는 S이고;
- [0248] X466은 E 또는 V이고;
- [0249] X469는 R 또는 I이고;
- [0250] X473은 A 또는 E이고;
- [0251] X475는 D, A 또는 Y이고;
- [0252] X476은 Y 또는 C이고;
- [0253] X479는 V 또는 M이고;
- [0254] X483은 Q 또는 R이고;
- [0255] X484는 L 또는 F이고;
- [0256] X487은 L 또는 S이고;
- [0257] X488은 H, Q 또는 R이고;
- [0258] X490은 K 또는 E이고;
- [0259] X491은 T, K 또는 M이고;
- [0260] X492는 P 또는 S이고;
- [0261] X494는 S 또는 C이고;
- [0262] X495는 D, E 또는 G이고;
- [0263] X497은 V 또는 A이고;
- [0264] X502는 T 또는 I이고;
- [0265] X503은 E, D 또는 K이고;
- [0266] X506은 V, A 또는 M이고;
- [0267] X508은 R 또는 S이고;
- [0268] X509는 R 또는 Q이고;
- [0269] X511은 C 또는 Y이고; 및
- [0270] X517은 V 또는 F이다.
- [0271] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 알부민 IIIA 단편은 서열번호 3 또는 4의 아미노산 서열을 포함하거나 그 서열로 구성된 것이다.
- [0272] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 알부민 IB 단편은 하기의 식으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 그 서열로 구성된 것이다:
- [0273] **[식 4]**
- [0274] P-X135-X136-X137-X138-X139-X140-R-P-X143-X144-X145-X146-X147-C-X149-X150-F-X152-X153-X154-E-X156-X157-F-L-K-K-Y-L-X164-E-I-A-R-R-X170-X171-Y-F-X174-X175-X176-X177-L-X179-X180-X181-A-X183-X184-X185-K-X187-X188-F-X190-X191-C-C-X194-X195-A-X197-K-X199-X200-X201-L-L-P-X205-X206-X207-E-X209-X210-X211-X212-X213-K-X215-X216-S-X218,
- [0275] 상기 식 4에서

[0276]	X135는 N 또는 D이고;
[0277]	X136은 L 또는 V이고;
[0278]	X137은 P 또는 S이고;
[0279]	X138은 R, G, P 또는 Q이고;
[0280]	X139는 L 또는 F이고;
[0281]	X140은 V, L 또는 M이고;
[0282]	X143은 E 또는 K이고;
[0283]	X144는 V 또는 L이고;
[0284]	X145는 D, E 또는 V이고;
[0285]	X146은 V 또는 E이고;
[0286]	X147은 M, I 또는 T이고;
[0287]	X149는 T, A 또는 I이고;
[0288]	X150은 A, D, S 또는 T이고;
[0289]	X152는 H 또는 R이고;
[0290]	X153은 D 또는 E이고;
[0291]	X154는 N 또는 S이고;
[0292]	X156은 E, A 또는 G이고;
[0293]	X157은 T 또는 K이고;
[0294]	X164는 Y, C 또는 H이고;
[0295]	X170은 H 또는 R이고;
[0296]	X171은 P 또는 L이고;
[0297]	X174는 Y 또는 D이고;
[0298]	X175는 A 또는 D이고;
[0299]	X176은 P 또는 L이고;
[0300]	X177은 E 또는 K이고;
[0301]	X179는 L 또는 R이고;
[0302]	X180은 F, L, S 또는 Y이고;
[0303]	X181은 F 또는 Y이고;
[0304]	X183은 K 또는 I이고;
[0305]	X184는 R, M 또는 T이고;
[0306]	X185는 Y, C 또는 N이고;
[0307]	X187은 A, D 또는 S이고;
[0308]	X188은 A, D 또는 V이고;
[0309]	X190은 T, I 또는 S이고;
[0310]	X191은 E 또는 G이고;
[0311]	X194는 G 또는 L이고;

- [0312] X195는 A 또는 T이고;
- [0313] X197은 D, G 또는 Y이고;
- [0314] X199는 A 또는 G이고;
- [0315] X200은 A 또는 V이고;
- [0316] X201은 C 또는 F이고;
- [0317] X205는 K 또는 R이고;
- [0318] X206은 L 또는 F이고;
- [0319] X207은 D, E, N 또는 V이고;
- [0320] X209는 L 또는 H이고;
- [0321] X210은 R, Q 또는 W이고;
- [0322] X211은 D, V 또는 Y이고;
- [0323] X212는 E 또는 K이고;
- [0324] X213은 G 또는 E이고;
- [0325] X215는 A, T 또는 V이고;
- [0326] X216은 S 또는 L이고; 및
- [0327] X218은 A 또는 G이다.
- [0328] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 알부민 IB 단편은 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하거나 그 서열로 구성된 것이다.
- [0329] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 알부민 IB 단편은 하기의 식으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 그 서열로 구성된 것이다:
- [0330] **[식 5]**
- [0331] D-X132-X133-P-X135-X136-X137-X138-X139-X140-R-P-X143-X144-X145-X146-X147-C-X149-X150-F-X152-X153-X154-E-X156-X157-F-L-K-K-Y-L-X164-E-I-A-R-R-X170-X171-Y-F-X174-X175-X176-X177-L-X179-X180-X181-A-X183-X184-X185-K-X187-X188-F-X190-X191-C-C-X194-X195-A-X197-K-X199-X200-X201-L-L-P-X205-X206-X207-E-X209-X210-X211-X212-X213-K-X215-X216-S-X218,
- [0332] 상기 식 5에서
- [0333] X132는 D 또는 E이고;
- [0334] X133은 N 또는 K이고;
- [0335] X135는 N 또는 D이고;
- [0336] X136은 L 또는 V이고;
- [0337] X137은 P 또는 S이고;
- [0338] X138은 R, G, P 또는 Q이고;
- [0339] X139는 L 또는 F이고;
- [0340] X140은 V, L 또는 M이고;
- [0341] X143은 E 또는 K이고;
- [0342] X144는 V 또는 L이고;
- [0343] X145는 D, E 또는 V이고;

- [0344] X146은 V 또는 E이고;
- [0345] X147은 M, I 또는 T이고;
- [0346] X149는 T, A 또는 I이고;
- [0347] X150은 A, D, S 또는 T이고;
- [0348] X152는 H 또는 R이고;
- [0349] X153은 D 또는 E이고;
- [0350] X154는 N 또는 S이고;
- [0351] X156은 E, A 또는 G이고;
- [0352] X157은 T 또는 K이고;
- [0353] X164는 Y, C 또는 H이고;
- [0354] X170은 H 또는 R이고;
- [0355] X171은 P 또는 L이고;
- [0356] X174는 Y 또는 D이고;
- [0357] X175는 A 또는 D이고;
- [0358] X176은 P 또는 L이고;
- [0359] X177은 E 또는 K이고;
- [0360] X179는 L 또는 R이고;
- [0361] X180은 F, L, S 또는 Y이고;
- [0362] X181은 F 또는 Y이고;
- [0363] X183은 K 또는 I이고;
- [0364] X184는 R, M 또는 T이고;
- [0365] X185는 Y, C 또는 N이고;
- [0366] X187은 A, D 또는 S이고;
- [0367] X188은 A, D 또는 V이고;
- [0368] X190은 T, I 또는 S이고;
- [0369] X191은 E 또는 G이고;
- [0370] X194는 G 또는 L이고;
- [0371] X195는 A 또는 T이고;
- [0372] X197은 D, G 또는 Y이고;
- [0373] X199는 A 또는 G이고;
- [0374] X200은 A 또는 V이고;
- [0375] X201은 C 또는 F이고;
- [0376] X205는 K 또는 R이고;
- [0377] X206은 L 또는 F이고;
- [0378] X207은 D, E, N 또는 V이고;
- [0379] X209는 L 또는 H이고;

- [0380] X210은 R, Q 또는 W이고;
- [0381] X211은 D, V 또는 Y이고;
- [0382] X212는 E 또는 K이고;
- [0383] X213은 G 또는 E이고;
- [0384] X215는 A, T 또는 V이고;
- [0385] X216은 S 또는 L이고; 및
- [0386] X218은 A 또는 G이다.
- [0387] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 알부민 IB 단편은 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하거나 그 서열로 구성된 것이다.
- [0388] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 융합 단백질은 서열번호 7 내지 12로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것이다.
- [0389] 또한, 본 발명은 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0390] 또한, 본 발명은 상기 벡터를 포함하는 숙주세포를 제공한다.
- [0391] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 융합 단백질의 생산방법을 제공한다:
- [0392] (1) 상기 벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계;
- [0393] (2) 상기 형질전환체를 배양하는 단계; 및
- [0394] (3) 상기 배양액으로부터 융합 단백질을 수득하는 단계.
- [0395] 또한, 본 발명은 상기 융합 단백질, 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 포함하는 섬유질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0396] 또한, 본 발명은 상기 융합 단백질, 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 섬유질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0397] 또한, 본 발명은 섬유질환의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한, 상기 융합 단백질, 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터의 용도를 제공한다.
- [0398] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 섬유질환은 간 섬유증(liver fibrosis), 만성간염 (chronic hepatitis), 간경화 (cirrhosis), 간암(hepatic cancer), 화학요법-연관 지방간염(chemotherapy-associated steatohepatitis, CASH), 폐 섬유증(pulmonary fibrosis), 신장 섬유증(renal fibrosis), 신부전(renal failure), 췌장 섬유증(pancreatic fibrosis), 만성 췌장염(chronic pancreatitis) 및 췌장암(pancreatic cancer)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 종 이상의 질환일 수 있다.

발명의 효과

- [0400] 본 발명의 융합단백질은 조직의 섬유화에 원인이 되는 정상세포의 활성화를 억제 또는 역활성화를 유도하여 섬유질환의 예방 또는 치료가 가능하며, 같은 목적의 종래 융합단백질과 비교하여 낮은 농도에서 보다 우수한 효과를 나타내는바 단백질 치료제의 인체 투여 용량과 투여 빈도를 획기적으로 줄일 수 있는 범용적 기반기술이 될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0402] 도 1은 알부민Ⅲ과 RBP가 결합된 융합단백질이 활성화된 정상세포 내에 내포되어 작용하는 기전을 도식화한 도면이다.
- 도 2는 알부민 단백질과 RBP 모식도와 본 발명의 융합단백질 4 및 6의 모식도이다.

도 3은 본 발명의 융합단백질 1 및 2와 종래의 융합단백질 (RBP-알부민Ⅲ 및 알부민Ⅲ-RBP)의 활성화된 간 정상 세포에서 역활성화 유도 효과를 비교확인한 도면이다.

도 4는 본 발명의 융합단백질 1 및 2와 융합단백질 3 내지 6의 활성화된 간 정상세포에서 역활성화 유도 효과를 비교확인한 도면이다.

도 5는 본 발명의 융합단백질 6의 활성화된 폐 정상세포에서 역활성화 유도 효과를 확인한 도면이다.

도 6a 및 도 6b는 간 섬유화 동물모델에 융합단백질 1 및 4와 RBP-알부민² 투여에 따른 간 섬유화 정도를 시리우스 레드 조직염색을 통해 비교확인한 도면이다.

도 7은 폐 섬유화 동물모델 실험의 개략을 나타낸 것이다.

도 8은 폐 섬유화 동물모델에서 시험기간 동안 마우스의 체중변화를 나타낸 것이다. 가로축은 블레오마신 처리일을 기준일(0일)로 시간의 경과(day)를 나타내고, 세로축은 마우스의 체중(mg)을 나타낸다.

도 9는 폐 섬유화 동물모델에서 융합단백질 6 처리에 따라 폐 조직에서 콜라겐수치가감소됨을 hydroxyproline assay 수행을 통해 확인한 도면이다.

도 10은 폐 섬유화 동물모델에서 융합단백질 6 처리에 따른 폐 섬유화 정도를 H&E 염색 및 면역조직화학염색을 통해 확인한 도면이다.

도 11은 융합단백질 3 및 4의 알부민 IIIA의 441번 아미노산 E를 이의 자연적인 돌연변이인 Q로 제작하였을 때, 융합단백질 3' 및 4' 모두 441E인 경우와 동일한 간 섬유화 개선 활성을 나타냄을 확인한 결과이다.

도 12는 융합단백질 3의 알부민 IIIA의 441번 아미노산 E를 이의 자연적인 돌연변이인 Q로 제작하였을 때, 융합단백질 3' 역시 441E인 경우와 동일한 폐 섬유화 개선 활성을 나타냄을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0403] 알부민은 주로 간세포에서 합성되는 다기능성 혈장 단백질이다. 알부민은 3개의 도메인(domain)을 가지며, 각각은 두 개의 서브도메인(subdomain) A 및 B로 구성된다. 알부민은 지방산, 레티노산을 포함한 다양한 소수성 물질과 결합하여 혈액 내에서 운반시켜 주는 분자 이동의 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 결정학 분석에 따르면, 5개의 강력한 지방산 결합 부위가 알부민 내에 비대칭적으로 분포한다(서브도메인 IB에 하나, IA 과 IIA 사이에 하나, IIIA에 둘, 그리고 IIIB에 하나).
- [0404] 본 발명자들은 이전의 연구에서 알부민과 정상세포 타겟팅을 위한 레티놀 결합 단백질(Retinol Binding Protein, RBP)이 결합된 융합 단백질을 제조하였으며, 상기 융합 단백질은 활성화된 정상세포 내부로 유입되어 세포의 형태를 활성화 이전으로 역전환시키고, 이로 인하여 섬유질환의 예방 및 치료가 가능함을 확인하였다. 이에 나아가 본 발명자들은 정상세포 활성화 과정에서 레티노산(retinoic acid, RA)이 중요한 역할을 하며, 융합단백질은 이러한 RA의 세포 내 레벨을 감소시킴으로서 정상세포의 활성화를 제어함을 규명하였다. 따라서 보다 안정적으로 레티노산(retinoic acid, RA)과 결합하여 정상세포의 활성화 억제 또는 역활성화를 유도할 수 있는 융합 단백질을 개발하기 위하여, 알부민의 서열 변이와 다양한 조합의 알부민 sub-domain과 RBP의 배열을 이용하여 새로운 알부민 RBP 융합 단백질을 제조하였다.
- [0405] 종전 연구에서 알부민의 도메인 중에서도 도메인Ⅲ과 RBP의 융합단백질에서 정상세포의 활성화(activation) 억제 및/또는 역활성화(inactivation) 효과가 가장 우수하였는바, 이를 토대로 본 발명자들은 레티노산과의 결합력이 강화된 재조합 융합단백질을 제조하고자 하였다.
- [0406] 이에, 종래의 알부민 도메인 Ⅲ과 RBP 융합단백질에서 도메인 Ⅲ의 526번째와 600번째 bulky한 아미노산이 RA와의 결합에 방해가 되는 것으로 추정하고, 이를 보다 작은 크기의 아미노산으로 치환하여 RA와의 결합을 통한 활성화된 정상세포의 불활성화 효과를 확인하고자 하였다(서열번호 13 및 14 참조).
- [0407] 구체적으로, 본 발명자들은 알부민 도메인 Ⅲ에서 526 번째 아미노산 잔기(phenylalanine)와 600번째 아미노산 잔기(valine)를 각각 발린(valine), 알라닌(alanine)으로 교체하여 아래와 같이 융합 단백질 1 및 2를 설계하여 제조하였다.
- [0408] - 융합단백질 1 : RBP(19~195) + 알부민Ⅲ{404~526(F→V)~600(V→A)~601}

- [0409] - 융합단백질 2 : 알부민 [Ⅲ{404~526(F→V)~600(V→A)~601}] + RBP(19~194)
- [0410] 또한, 본 발명자들은 알부민의 sub-domain IB와 ⅢA가 레티노산과 매우 안정적으로 결합함을 확인하고, 아래와 같이 융합 단백질 3~6을 설계하여 제조하였다.
- [0411] - 융합단백질 3 : RBP(19~195) + 알부민[ⅢA{404~441E~517(V)} + IB(131~218)]
- [0412] - 융합단백질 3' : RBP(19~195) + 알부민[ⅢA{404~441Q~517(V)} + IB(131~218)]
- [0413] - 융합단백질 4 : RBP(19~195) + 알부민[ⅢA{404~441E~517(V)} + IB(134~218)]
- [0414] - 융합단백질 4' : RBP(19~195) + 알부민[ⅢA{404~441Q~517(V)} + IB(134~218)]
- [0415] - 융합단백질 5 : 알부민[ⅢA{404~517(V)} + IB(131~218)] + RBP(19~194)
- [0416] - 융합단백질 6 : 알부민[ⅢA{404~517(V)} + IB(134~218)] + RBP(19~194)
- [0417] 이어서, 본 발명자들은 제작된 융합단백질 1 또는 2를 활성화된 간 정상세포에 처리하여 정상세포의 활성화 마커인 α -SMA(α -smooth muscle actin)와 collagen type I의 발현 수준을 측정함으로써 종래 개발된 융합단백질 (KR 10-1395394, RBP-알부민Ⅲ 및 알부민Ⅲ-RBP)과 정상세포의 역활성화 효과를 비교확인하였다. 그 결과, 본 발명의 융합단백질 1 및 2는 종래 개발된 융합단백질과 비교하여 낮은 농도에서 높은 수준으로 α -SMA와 collagen I의 발현을 감소시킬 수 있음을 확인하였다(실시예 1 참조).
- [0418] 이를 통해, 본 발명자들은 알부민Ⅲ의 526 a.a 와 600 a.a가 작은 분자량의 아미노산으로 치환되는 경우 레티노산과의 결합력이 상승되어 보다 효과적으로 활성화된 정상세포의 불활성화 상태를 유도할 수 있음을 확인하였다.
- [0419] 이에, 본 발명은 526 및 600번째 아미노산이 각각 독립적으로 치환된 알부민Ⅲ과 RBP가 결합된 융합단백질을 섬유질환 치료 용도에 제공할 수 있으며, 상기 융합단백질에서 알부민 Ⅲ의 526번째 아미노산 잔기로 위치할 수 있는 아미노산은 발린, 알라닌, 글리신일 수 있고, 600번째 아미노산 잔기로 위치할 수 있는 아미노산은 알라닌, 글리신 일 수 있으며, 상기 융합단백질은 서열번호 13 또는 14의 아미노산 서열로 이루어지거나 이를 포함할 수 있다.
- [0420] 또한 본 발명은 RBP4(레티놀 결합 단백질 4, Retinol-binding protein 4)의 19번 내지 194번 아미노산 또는 19번 내지 195번 아미노산을 포함하는 RBP4 단편, 알부민 단백질의 404번 내지 517번 아미노산을 포함하는 알부민 IIIA 단편, 알부민 단백질의 134번 내지 218번 아미노산 또는 131번 내지 218번 아미노산을 포함하는 알부민 IB 단편을 포함하는 융합 단백질을 제공한다.
- [0421] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 융합단백질은 RBP4 단편-알부민 IIIA 단편-알부민 IB 단편 또는 알부민 IIIA 단편-알부민 IB 단편-RBP4 단편 형태로 결합된 것이다.
- [0422] 본 발명의 RBP4 단편은 질병과 연관성이 없는 부위로서 자연 발생적인 돌연변이를 포함할 수 있다. 상기 자연 발생적인 돌연변이는 UniProt Database(www.uniprot.org)에서 확인 할 수 있으며, 상기 돌연변이 부위를 포함하는 RBP4 단편 역시 본 발명의 내용에 포함된다:
- [0423] E19Q, R23(G,P), V24(L,M), S25N, S26G, K30(E,R), E31(Q,V), N32D, F33L, R37H, S39P, G40E, T41I, A44(S,V), M45(I,L,T), K48R, E51(K,V), L53V, Q56R, I59L, V60(I,L), V65M, T68N, G69(C,D,S), Q70(E,H), M71I, S72(I,R), V79G, R80H, L81V, W85R, D86(H,V), A89T, D90A, M91I, G93S, E99K, P101(H,L,S), A102(S,V), M106L, K107E, Y108C, S113F, Q116H, G118E, N119I, W123(C,R), V125I, D126(H,N), D128N, Y129C, D130N, T131(K,M), Y132(F,N), V134(E,L,M), Y136S, R139H, L141Q, L143F, D144(H,N), S152F, V154(L,M), S156(A,F), R157(G,W), D158(E,Y), P159(L,S), N160(H,S), G161(C,D,S), P163(L,S,T), P164(L,R,S), E165A, A166(G,V), Q167R, I169(F,L,M,T,V), V170(A,G,I,L), R173(Q,W), E175G, E176(D,G), L177V, R181(G,W), Q182K, R184(G,K), I186(L,M), V187I, H188R, N189(D,S), G190S, D193N, R195K, R198K, N199K, L200P 및 L201(V,W).
- [0424] 본 발명의 알부민 IIIA 단편은 질병과 연관성이 없는 부위로서 자연 발생적인 돌연변이를 포함할 수 있다. 상기 자연 발생적인 돌연변이는 UniProt Database(www.uniprot.org)에서 확인 할 수 있으며, 상기 돌연변이 부위를 포함하는 알부민 IIIA 단편 역시 본 발명의 내용에 포함된다:
- [0425] L404(F,P), E406(D,K,V), P408S Q409KL, L411S, I412L, Q414E, F419Y, Q421(K,R), G423R, E424G, Y425H,

K426(E,R), F427L, N429(D,K,S), A430(E,T,V), L431V, V433I, R434(C,H), P440H, **Q441E**, V442M, T444S, P445L, T446A, V450(F,I,L), G455(A,R), K456R, G458R, S459R, K460N, H464L, P465(A,L,R,S), E466V, R469I, A473E, D475(A,Y), Y476C, V479M, Q483R, L484F, L487S, H488(Q,R), K490E, T491(K,M), P492S, S494C, D495(E,G), V497A, T502I, E503(D,K), V506(A,M), R508S, R509Q, C511Y 및 V517F.

- [0426] 본 발명의 알부민 IB 단편은 질병과 연관성이 없는 부위로서 자연 발생적인 돌연변이를 포함할 수 있다. 상기 자연 발생적인 돌연변이는 UniProt Database(www.uniprot.org)에서 확인 할 수 있으며, 상기 돌연변이 부위를 포함하는 알부민 IB 단편 역시 본 발명의 내용에 포함된다:
- [0427] N135D, L136V, P137S, R138(G,P,Q), L139F, V140(L,M), E143K, V144L, D145(E,V), V146E, M147(I,T), T149(A,I), A150(D,S,T), H152R, D153E, N154S, E156(A,G), T157K, Y164(C,H), H170R, P171L, Y174D, A175D, P176L, E177K, L179R, F180(L,S,Y), F181Y, K183I, R184(M,T), Y185(C,N), A187(D,S), A188(D,V), T190(I,S), E191G, G194L, A195T, D197(G,Y), A199G, A200V, C201F, K205R, L206F, D207(E,N,V), L209H, R210(Q,W), D211(V,Y), E212K, G213E, A215(T,V), S216L, A218G.
- [0428] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 융합 단백질은 RBP4 단편(19번-195번 아미노산)-알부민 IIIA 단편(404번-517번 아미노산)-알부민 IB 단편(131번-218번 아미노산), RBP4 단편(19번-195번 아미노산)-알부민 IIIA 단편(404번-517번 아미노산)-알부민 IB 단편(134번-218번 아미노산), 알부민 IIIA 단편(404번-517번 아미노산)-알부민 IB 단편(131번-218번 아미노산)-RBP4 단편(19번-194번 아미노산) 및 알부민 IIIA 단편(404번-517번 아미노산)-알부민 IB 단편(134번-218번 아미노산)-RBP4 단편(19번-194번 아미노산)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것이다.
- [0429] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 RBP4 단편은 하기의 식으로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 것이다:
- [0430] [식 1]
- [0431] X19-R-D-C-X23-X24-X25-X26-F-R-V-X30-X31-X32-X33-D-K-A-X37-F-X39-X40-X41-W-Y-X44-X45-A-K-X48-D-P-X51-G-X53-F-L-X56-D-N-X59-X60-A-E-F-S-X65-D-E-X68-X69-X70-X71-X72-A-T-A-K-G-R-X79-X80-X81-L-N-N-X85-X86-V-C-X89-X90-X91-V-X93-T-F-T-D-T-X99-D-X101-X102-K-F-K-X106-X107-X108-W-G-V-A-X113-F-L-X116-K-X118-X119-D-D-H-X123-I-X125-X126-T-X128-X129-X130-X131-X132-A-X134-Q-X136-S-C-X139-L-X141-N-X143-X144-G-T-C-A-D-S-Y-X152-F-X154-F-X156-X157-X158-X159-X160-X161-L-X163-X164-X165-X166-X167-K-X169-X170-R-Q-X173-Q-X175-X176-X177-C-L-A-X181-X182-Y-X184-L-X186-X187-X188-X189-X190-Y-C-X193-G,
- [0432] 상기 식 1에서
- [0433] X19는 E 또는 Q이고;
- [0434] X23은 R, G 또는 P이고;
- [0435] X24는 V, L 또는 M이고;
- [0436] X25는 S 또는 N이고;
- [0437] X26은 S 또는 G이고;
- [0438] X30은K, E 또는 R이고;
- [0439] X31은 E, Q 또는 V이고;
- [0440] X32는 N 또는 D이고;
- [0441] X33은 F 또는 L이고;
- [0442] X37은 R 또는 H이고;
- [0443] X39는 S 또는 P이고;
- [0444] X40은 G 또는 E이고;
- [0445] X41은 T 또는 I이고;
- [0446] X44는 A, S 또는 V이고;

- [0447] X45는 M, I, L 또는 T이고;
- [0448] X48은 K 또는 R이고;
- [0449] X51은 E, K 또는 V이고;
- [0450] X53은 L 또는 V이고;
- [0451] X56은 Q 또는 R이고;
- [0452] X59는 I 또는 L이고;
- [0453] X60은 V, I 또는 L이고;
- [0454] X65는 V 또는 M이고;
- [0455] X68은 T 또는 N이고;
- [0456] X69는 G, C, D 또는 S이고;
- [0457] X70은 Q, E 또는 H이고;
- [0458] X71은 M 또는 I이고;
- [0459] X72는 S, I 또는 R이고;
- [0460] X79는 V 또는 G이고;
- [0461] X80은 R 또는 H이고;
- [0462] X81은 L 또는 V이고;
- [0463] X85는 W 또는 R이고;
- [0464] X86은 D, H 또는 V이고;
- [0465] X89는 A 또는 T이고;
- [0466] X90은 D 또는 A이고;
- [0467] X91은 M 또는 I이고;
- [0468] X93은 G 또는 S이고;
- [0469] X99는 E 또는 K이고;
- [0470] X101은 P, H, L 또는 S이고;
- [0471] X102는 A, S 또는 V이고;
- [0472] X106은 M 또는 L이고;
- [0473] X107은 K 또는 E이고;
- [0474] X108은 Y 또는 C이고;
- [0475] X113은 S 또는 F이고;
- [0476] X116은 Q 또는 H이고;
- [0477] X118은 G 또는 E이고;
- [0478] X191은 N 또는 I이고;
- [0479] X123은 W, C 또는 R이고;
- [0480] X125는 V 또는 I이고;
- [0481] X126은 D, H 또는 N이고;
- [0482] X128은 D 또는 N이고;

- [0483] X129는 Y 또는 C이고;
- [0484] X130은 D 또는 N이고;
- [0485] X131은 T, K 또는 M이고;
- [0486] X132는 Y, F 또는 N이고;
- [0487] X134는 V, E, L 또는 M이고;
- [0488] X136은 Y 또는 S이고;
- [0489] X139는 R 또는 H이고;
- [0490] X141은 L 또는 Q이고;
- [0491] X143은 L 또는 F이고;
- [0492] X144는 D, H 또는 N이고;
- [0493] X152는 S 또는 F이고;
- [0494] X154는 V, L 또는 M이고;
- [0495] X156은 S, A 또는 F이고;
- [0496] X157은 R, G 또는 W이고;
- [0497] X158은 D, E 또는 Y이고;
- [0498] X159는 P, L 또는 S이고;
- [0499] X160은 N, H 또는 S이고;
- [0500] X161은 G, C, D 또는 S이고;
- [0501] X163은 P, L, S 또는 T이고;
- [0502] X164는 P, L, R 또는 S이고;
- [0503] X165는 E 또는 A이고;
- [0504] X166은 A, G 또는 V이고;
- [0505] X167은 Q 또는 R이고;
- [0506] X169는 I, F, L, M, T 또는 V이고;
- [0507] X170은 V, A, G, I 또는 L이고;
- [0508] X173은 R, Q 또는 W이고;
- [0509] X175는 E 또는 G이고;
- [0510] X176은 E, D 또는 G이고;
- [0511] X177은 L 또는 V이고;
- [0512] X181은 R, G 또는 W이고;
- [0513] X182는 Q 또는 K이고;
- [0514] X184는 R, G 또는 K이고;
- [0515] X186은 I, L 또는 M이고;
- [0516] X187은 V 또는 I이고;
- [0517] X188은 H 또는 R이고;
- [0518] X189는 N, D 또는 S이고;

- [0519] X190은 G 또는 S이고; 및
- [0520] X193은 D 또는 N이다.
- [0521] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 RBP4 단편은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 것이다.
- [0522] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 RBP4 단편은 하기의 식으로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 것이다:
- [0523] [식 2]
- [0524] X19-R-D-C-X23-X24-X25-X26-F-R-V-X30-X31-X32-X33-D-K-A-X37-F-X39-X40-X41-W-Y-X44-X45-A-K-X48-D-P-X51-G-X53-F-L-X56-D-N-X59-X60-A-E-F-S-X65-D-E-X68-X69-X70-X71-X72-A-T-A-K-G-R-X79-X80-X81-L-N-N-X85-X86-V-C-X89-X90-X91-V-X93-T-F-T-D-T-X99-D-X101-X102-K-F-K-X106-X107-X108-W-G-V-A-X113-F-L-X116-K-X118-X119-D-D-H-X123-I-X125-X126-T-X128-X129-X130-X131-X132-A-X134-Q-X136-S-C-X139-L-X141-N-X143-X144-G-T-C-A-D-S-Y-X152-F-X154-F-X156-X157-X158-X159-X160-X161-L-X163-X164-X165-X166-X167-K-X169-X170-R-Q-X173-Q-X175-X176-X177-C-L-A-X181-X182-Y-X184-L-X186-X187-X188-X189-X190-Y-C-X193-G-X195,
- [0525] 상기 식 1에서
- [0526] X19는 E 또는 Q이고;
- [0527] X23은 R, G 또는 P이고;
- [0528] X24는 V, L 또는 M이고;
- [0529] X25는 S 또는 N이고;
- [0530] X26은 S 또는 G이고;
- [0531] X30은K, E 또는 R이고;
- [0532] X31은 E, Q 또는 V이고;
- [0533] X32는 N 또는 D이고;
- [0534] X33은 F 또는 L이고;
- [0535] X37은 R 또는 H이고;
- [0536] X39는 S 또는 P이고;
- [0537] X40은 G 또는 E이고;
- [0538] X41은 T 또는 I이고;
- [0539] X44는 A, S 또는 V이고;
- [0540] X45는 M, I, L 또는 T이고;
- [0541] X48은 K 또는 R이고;
- [0542] X51은 E, K 또는 V이고;
- [0543] X53은 L 또는 V이고;
- [0544] X56은 Q 또는 R이고;
- [0545] X59는 I 또는 L이고;
- [0546] X60은 V, I 또는 L이고;
- [0547] X65는 V 또는 M이고;
- [0548] X68은 T 또는 N이고;
- [0549] X69는 G, C, D 또는 S이고;

- [0550] X70은 Q, E 또는 H이고;
- [0551] X71은 M 또는 I이고;
- [0552] X72는 S, I 또는 R이고;
- [0553] X79는 V 또는 G이고;
- [0554] X80은 R 또는 H이고;
- [0555] X81은 L 또는 V이고;
- [0556] X85는 W 또는 R이고;
- [0557] X86은 D, H 또는 V이고;
- [0558] X89는 A 또는 T이고;
- [0559] X90은 D 또는 A이고;
- [0560] X91은 M 또는 I이고;
- [0561] X93은 G 또는 S이고;
- [0562] X99는 E 또는 K이고;
- [0563] X101은 P, H, L 또는 S이고;
- [0564] X102는 A, S 또는 V이고;
- [0565] X106은 M 또는 L이고;
- [0566] X107은 K 또는 E이고;
- [0567] X108은 Y 또는 C이고;
- [0568] X113은 S 또는 F이고;
- [0569] X116은 Q 또는 H이고;
- [0570] X118은 G 또는 E이고;
- [0571] X191은 N 또는 I이고;
- [0572] X123은 W, C 또는 R이고;
- [0573] X125는 V 또는 I이고;
- [0574] X126은 D, H 또는 N이고;
- [0575] X128은 D 또는 N이고;
- [0576] X129는 Y 또는 C이고;
- [0577] X130은 D 또는 N이고;
- [0578] X131은 T, K 또는 M이고;
- [0579] X132는 Y, F 또는 N이고;
- [0580] X134는 V, E, L 또는 M이고;
- [0581] X136은 Y 또는 S이고;
- [0582] X139는 R 또는 H이고;
- [0583] X141은 L 또는 Q이고;
- [0584] X143은 L 또는 F이고;
- [0585] X144는 D, H 또는 N이고;

[0586]	X152는 S 또는 F이고;
[0587]	X154는 V, L 또는 M이고;
[0588]	X156은 S, A 또는 F이고;
[0589]	X157은 R, G 또는 W이고;
[0590]	X158은 D, E 또는 Y이고;
[0591]	X159는 P, L 또는 S이고;
[0592]	X160은 N, H 또는 S이고;
[0593]	X161은 G, C, D 또는 S이고;
[0594]	X163은 P, L, S 또는 T이고;
[0595]	X164는 P, L, R 또는 S이고;
[0596]	X165는 E 또는 A이고;
[0597]	X166은 A, G 또는 V이고;
[0598]	X167은 Q 또는 R이고;
[0599]	X169는 I, F, L, M, T 또는 V이고;
[0600]	X170은 V, A, G, I 또는 L이고;
[0601]	X173은 R, Q 또는 W이고;
[0602]	X175는 E 또는 G이고;
[0603]	X176은 E, D 또는 G이고;
[0604]	X177은 L 또는 V이고;
[0605]	X181은 R, G 또는 W이고;
[0606]	X182는 Q 또는 K이고;
[0607]	X184는 R, G 또는 K이고;
[0608]	X186은 I, L 또는 M이고;
[0609]	X187은 V 또는 I이고;
[0610]	X188은 H 또는 R이고;
[0611]	X189는 N, D 또는 S이고;
[0612]	X190은 G 또는 S이고;
[0613]	X193은 D 또는 N이고; 및
[0614]	X195는 R 또는 K이다.
[0615]	본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 RBP4 단편은 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 것이다.
[0616]	본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 알부민 IIIA 단편은 하기의 식으로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 것이다:
[0617]	[식 3]
[0618]	X404-V-X406-E-X408-X409-N-X411-X412-K-X414-N-C-E-L-X419-E-X421-L-X423-X424-X425-X426-X427-Q-X429-X430-X431-L-X433-X434-Y-T-K-K-V-X440-X441-X442-S-X444-X445-X446-L-V-E-X450-S-R-N-L-X455-X456-V-X458-X459-X460-C-C-K-X464-X465-X466-A-K-X469-M-P-C-X473-E-X475-X476-L-S-X479-V-L-N-X483-X484-C-V-X487-X488-E-X490-X491-X492-V-X494-X495-R-X497-T-K-C-C-X502-X503-S-L-X506-N-X508-X509-P-X511-F-S-A-L-E-X517,

- [0619] 상기 식 3에서
- [0620] X404는 L, F 또는 P이고;
- [0621] X406은 E, D, K 또는 V이고;
- [0622] X408은 P 또는 S이고;
- [0623] X409는 Q, K 또는 L이고;
- [0624] X411은 L 또는 S이고;
- [0625] X412는 I 또는 L이고;
- [0626] X414는 Q 또는 E이고;
- [0627] X419는 F 또는 Y이고;
- [0628] X421은 Q, K 또는 R이고;
- [0629] X423은 G 또는 R이고;
- [0630] X424는 E 또는 G이고;
- [0631] X425는 Y 또는 H이고;
- [0632] X426은 K, E 또는 R이고;
- [0633] X427은 F 또는 L이고;
- [0634] X429는 N, D, K 또는 S이고;
- [0635] X430은 A, E, T 또는 V이고;
- [0636] X431은 L 또는 V이고;
- [0637] X433은 V 또는 I이고;
- [0638] X434는 R, C 또는 H이고;
- [0639] X440은 P 또는 H이고;
- [0640] X441은 Q 또는 E이고;
- [0641] X442는 V 또는 M이고;
- [0642] X444는 T 또는 S이고;
- [0643] X445는 P 또는 L이고;
- [0644] X446은 T 또는 A이고;
- [0645] X450은 V, F, I 또는 L이고;
- [0646] X455는 G, A 또는 R이고;
- [0647] X456은 K 또는 R이고;
- [0648] X458은 G 또는 R이고;
- [0649] X459는 S 또는 R이고;
- [0650] X460은 K 또는 N이고;
- [0651] X464는 H 또는 L이고;
- [0652] X465는 P, A, L, R 또는 S이고;
- [0653] X466은 E 또는 V이고;
- [0654] X469는 R 또는 I이고;

- [0655] X473은 A 또는 E이고;
- [0656] X475는 D, A 또는 Y이고;
- [0657] X476은 Y 또는 C이고;
- [0658] X479는 V 또는 M이고;
- [0659] X483은 Q 또는 R이고;
- [0660] X484는 L 또는 F이고;
- [0661] X487은 L 또는 S이고;
- [0662] X488은 H, Q 또는 R이고;
- [0663] X490은 K 또는 E이고;
- [0664] X491은 T, K 또는 M이고;
- [0665] X492는 P 또는 S이고;
- [0666] X494는 S 또는 C이고;
- [0667] X495는 D, E 또는 G이고;
- [0668] X497은 V 또는 A이고;
- [0669] X502는 T 또는 I이고;
- [0670] X503은 E, D 또는 K이고;
- [0671] X506은 V, A 또는 M이고;
- [0672] X508은 R 또는 S이고;
- [0673] X509는 R 또는 Q이고;
- [0674] X511은 C 또는 Y이고; 및
- [0675] X517은 V 또는 F이다.
- [0676] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 알부민 IIIA 단편은 서열번호 3 또는 4의 아미노산 서열로 구성된 것이다.
- [0677] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 알부민 IB 단편은 하기의 식으로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 것이다:
- [0678] **[식 4]**
- [0679] P-X135-X136-X137-X138-X139-X140-R-P-X143-X144-X145-X146-X147-C-X149-X150-F-X152-X153-X154-E-X156-X157-F-L-K-K-Y-L-X164-E-I-A-R-R-X170-X171-Y-F-X174-X175-X176-X177-L-X179-X180-X181-A-X183-X184-X185-K-X187-X188-F-X190-X191-C-C-X194-X195-A-X197-K-X199-X200-X201-L-L-P-X205-X206-X207-E-X209-X210-X211-X212-X213-K-X215-X216-S-X218,
- [0680] 상기 식 4에서
- [0681] X135는 N 또는 D이고;
- [0682] X136은 L 또는 V이고;
- [0683] X137은 P 또는 S이고;
- [0684] X138은 R, G, P 또는 Q이고;
- [0685] X139는 L 또는 F이고;
- [0686] X140은 V, L 또는 M이고;

[0687]	X143은 E 또는 K이고;
[0688]	X144는 V 또는 L이고;
[0689]	X145는 D, E 또는 V이고;
[0690]	X146은 V 또는 E이고;
[0691]	X147은 M, I 또는 T이고;
[0692]	X149는 T, A 또는 I이고;
[0693]	X150은 A, D, S 또는 T이고;
[0694]	X152는 H 또는 R이고;
[0695]	X153은 D 또는 E이고;
[0696]	X154는 N 또는 S이고;
[0697]	X156은 E, A 또는 G이고;
[0698]	X157은 T 또는 K이고;
[0699]	X164는 Y, C 또는 H이고;
[0700]	X170은 H 또는 R이고;
[0701]	X171은 P 또는 L이고;
[0702]	X174는 Y 또는 D이고;
[0703]	X175는 A 또는 D이고;
[0704]	X176은 P 또는 L이고;
[0705]	X177은 E 또는 K이고;
[0706]	X179는 L 또는 R이고;
[0707]	X180은 F, L, S 또는 Y이고;
[0708]	X181은 F 또는 Y이고;
[0709]	X183은 K 또는 I이고;
[0710]	X184는 R, M 또는 T이고;
[0711]	X185는 Y, C 또는 N이고;
[0712]	X187은 A, D 또는 S이고;
[0713]	X188은 A, D 또는 V이고;
[0714]	X190은 T, I 또는 S이고;
[0715]	X191은 E 또는 G이고;
[0716]	X194는 G 또는 L이고;
[0717]	X195는 A 또는 T이고;
[0718]	X197은 D, G 또는 Y이고;
[0719]	X199는 A 또는 G이고;
[0720]	X200은 A 또는 V이고;
[0721]	X201은 C 또는 F이고;
[0722]	X205는 K 또는 R이고;

- [0723] X206은 L 또는 F이고;
- [0724] X207은 D, E, N 또는 V이고;
- [0725] X209는 L 또는 H이고;
- [0726] X210은 R, Q 또는 W이고;
- [0727] X211은 D, V 또는 Y이고;
- [0728] X212는 E 또는 K이고;
- [0729] X213은 G 또는 E이고;
- [0730] X215는 A, T 또는 V이고;
- [0731] X216은 S 또는 L이고; 및
- [0732] X218은 A 또는 G이다.
- [0733] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 알부민 IB 단편은 서열번호 5의 아미노산 서열로 구성된 것이다.
- [0734] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 알부민 IB 단편은 하기의 식으로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 것이다:
- [0735] **[식 5]**
- [0736] D-X132-X133-P-X135-X136-X137-X138-X139-X140-R-P-X143-X144-X145-X146-X147-C-X149-X150-F-X152-X153-X154-E-X156-X157-F-L-K-K-Y-L-X164-E-I-A-R-R-X170-X171-Y-F-X174-X175-X176-X177-L-X179-X180-X181-A-X183-X184-X185-K-X187-X188-F-X190-X191-C-C-X194-X195-A-X197-K-X199-X200-X201-L-L-P-X205-X206-X207-E-X209-X210-X211-X212-X213-K-X215-X216-S-X218,
- [0737] 상기 식 5에서
- [0738] X132는 D 또는 E이고;
- [0739] X133은 N 또는 K이고;
- [0740] X135는 N 또는 D이고;
- [0741] X136은 L 또는 V이고;
- [0742] X137은 P 또는 S이고;
- [0743] X138은 R, G, P 또는 Q이고;
- [0744] X139는 L 또는 F이고;
- [0745] X140은 V, L 또는 M이고;
- [0746] X143은 E 또는 K이고;
- [0747] X144는 V 또는 L이고;
- [0748] X145는 D, E 또는 V이고;
- [0749] X146은 V 또는 E이고;
- [0750] X147은 M, I 또는 T이고;
- [0751] X149는 T, A 또는 I이고;
- [0752] X150은 A, D, S 또는 T이고;
- [0753] X152는 H 또는 R이고;
- [0754] X153은 D 또는 E이고;
- [0755] X154는 N 또는 S이고;

[0756]	X156은 E, A 또는 G이고;
[0757]	X157은 T 또는 K이고;
[0758]	X164는 Y, C 또는 H이고;
[0759]	X170은 H 또는 R이고;
[0760]	X171은 P 또는 L이고;
[0761]	X174는 Y 또는 D이고;
[0762]	X175는 A 또는 D이고;
[0763]	X176은 P 또는 L이고;
[0764]	X177은 E 또는 K이고;
[0765]	X179는 L 또는 R이고;
[0766]	X180은 F, L, S 또는 Y이고;
[0767]	X181은 F 또는 Y이고;
[0768]	X183은 K 또는 I이고;
[0769]	X184는 R, M 또는 T이고;
[0770]	X185는 Y, C 또는 N이고;
[0771]	X187은 A, D 또는 S이고;
[0772]	X188은 A, D 또는 V이고;
[0773]	X190은 T, I 또는 S이고;
[0774]	X191은 E 또는 G이고;
[0775]	X194는 G 또는 L이고;
[0776]	X195는 A 또는 T이고;
[0777]	X197은 D, G 또는 Y이고;
[0778]	X199는 A 또는 G이고;
[0779]	X200은 A 또는 V이고;
[0780]	X201은 C 또는 F이고;
[0781]	X205는 K 또는 R이고;
[0782]	X206은 L 또는 F이고;
[0783]	X207은 D, E, N 또는 V이고;
[0784]	X209는 L 또는 H이고;
[0785]	X210은 R, Q 또는 W이고;
[0786]	X211은 D, V 또는 Y이고;
[0787]	X212는 E 또는 K이고;
[0788]	X213은 G 또는 E이고;
[0789]	X215는 A, T 또는 V이고;
[0790]	X216은 S 또는 L이고; 및
[0791]	X218은 A 또는 G이다.

- [0792] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 알부민 IB 단편은 서열번호 6의 아미노산 서열로 구성된 것이다
- [0793] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 융합 단백질은 서열번호 7 내지 12로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것이다.
- [0794] 또한, 본 발명은 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0795] 본 명세서에서 "유전자" 또는 "폴리뉴클레오타이드"란 최광의의 의미로 간주되어야 하며, 단백질을 암호화하는 것으로서, 본원의 융합단백질 1 내지 6을 암호화하는 DNA 절편이라면 제한되지 아니하며, 구체적으로 서열번호 15 내지 20 중 하나의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0796] 또한, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0797] 본 발명에서 "벡터(vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 바이러스 입자 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 플라스미드(plasmid)와 벡터(vector)는 때로 상호 교환적으로 사용된다.
- [0798] 염기서열은 다른 염기서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결(operably linked)"된다. 이것은 적절한 분자(예를 들면, 전사 활성화 단백질)가 조절 서열(들)에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 조절 서열(들)일 수 있다. 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비 리더 (leader)에 대한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 배치되는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서(enhancer)는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다.
- [0799] 또한, 본 발명은 상기 벡터를 포함하거나 상기 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.
- [0800] 본 명세서에서 용어 "세포"는 진핵세포 및 원핵세포를 포함하며, 상기 벡터를 복제할 수 있거나 벡터에 의해 코딩되는 유전자를 발현할 수 있는 임의의 형질 전환 가능한 세포를 의미한다. 세포는 상기 벡터에 의해 형질감염(Transfected), 형질도입(Transduced) 또는 형질전환(Transformed) 될 수 있으며, 이는 외생의 폴리뉴클레오타이드(핵산분자)가 숙주세포 내에 전달되거나 도입되는 과정을 의미한다. 본 명세서에서 용어 "형질전환"은 상기 형질감염(Transfected) 및 형질도입(Transduced)을 포함하는 의미로 사용된다.
- [0801] 본 발명의(숙주)세포는 제한되지 않으나, 바람직하게는 곤충세포 또는 포유동물 세포, 보다 바람직하게는 곤충세포의 경우 Sf9, 포유동물 세포의 경우 HEK293 세포, HeLa 세포, ARPE-19 세포, RPE-1 세포, HepG2 세포, Hep3B 세포, Huh-7 세포, C8D1a 세포, Neuro2A 세포, CHO 세포, MES13 세포, BHK-21 세포, COS7 세포, COP5 세포, A549 세포, MCF-7 세포, HC70 세포, HCC1428 세포, BT-549 세포, PC3 세포, LNCaP 세포, Capan-1 세포, Panc-1 세포, MIA PaCa-2 세포, SW480 세포, HCT166 세포, LoVo 세포, A172 세포, MKN-45 세포, MKN-74 세포, Kato-III 세포, NCI-N87 세포, HT-144 세포, SK-MEL-2 세포, SH-SY5Y 세포, C6 세포, HT-22 세포, PC-12 세포, NIH3T3 세포 등을 이용할 수 있다.
- [0802] 본 발명의 숙주세포는 바람직하게는 단리된 숙주세포이다.
- [0803] 또한, 본 발명은 상기 융합 단백질, 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 포함하는 섬유질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0804] 또한, 본 발명은 상기 융합 단백질, 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 섬유질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0805] 또한, 본 발명은 섬유질환의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한, 상기 융합 단백질, 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터의 용도를 제공한다.

- [0806] 본 발명자들은 종래 융합단백질보다 우수한 간 정상세포의 활성화 과정 억제 효과를 나타낸 융합단백질 1 및 2와 융합단백질 3 내지 6의 α -SMA와 collagen I 발현 억제 효과를 비교확인하였다. 그 결과, 융합단백질 3 내지 6은 보다 낮은 농도에서도 정상세포의 활성화를 효과적으로 억제할 수 있음을 확인하였다(실시예 2).
- [0807] 또한, 본 발명자들은 간 정상세포에서 활성화 이전의 상태로 유도하는 활성을 갖는 본 발명의 융합단백질이 폐 정상세포에서도 동일한 활성을 나타내는지 확인하기 위하여 융합단백질 6를 대표로 선정하고 동일한 실험을 폐 정상세포에서 수행하여 융합단백질 6가 폐 정상세포에서도 역활성화 효과를 가짐을 확인하였다(실시예 3).
- [0808] 아울러, 본 발명자들은 사염화탄소에 의한 간 섬유화 동물모델을 이용하여 융합단백질 1 및 4와 종래 융합단백질(KR 10-1395394, RBP-알부민III)의 간 섬유화 개선 효과를 확인한 결과, 융합단백질 1 및 4는 RBP-알부민III보다 낮은 농도에서 보다 효과적으로 섬유화를 개선할 수 있음을 확인하였다(실시예 4).
- [0809] 마찬가지로, 본 발명자들은 간 섬유화 동물모델에서 섬유질환 효과를 나타내는 본 발명의 융합단백질이 폐 섬유화 동물모델에서도 동일한 효과를 나타내는지 확인하기 위하여 블레오마이신으로 유도한 폐 섬유화 동물모델에 융합단백질 6을 투여하여 섬유화 정도가 개선됨을 확인하였다(실시예 5).
- [0810] 상술한 바와 같이, 본 발명의 융합단백질 1 내지 6은 불활성화 정상세포가 활성화 시그널에도 불구하고 활성화되지 않도록 억제하는 효과와 활성화된 정상세포에 역활성화를 유도하여 활성화 이전의 상태, 즉 불활성화 상태로 전환시키는 활성을 나타낸다.
- [0811] 이에, 본 발명자들은 상기 개발된 융합단백질 1 내지 6으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상의 융합단백질을 포함하는 섬유질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있으며, 융합단백질 1 내지 6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 융합단백질을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 섬유질환 예방 또는 치료 방법을 제공할 수 있다.
- [0812] 본 발명의 융합단백질 1 내지 6은 종래의 RBP과 알부민의 융합단백질(KR 10-1395394) 보다 낮은 농도에서 효과적으로 활성화된 정상세포의 불활성화 상태를 유도할 수 있음을 확인하였는바, 본 발명의 약학적 조성물은 단백질 치료제의 인체 투여 용량과 투여 빈도를 획기적으로 줄일 수 있는 범용적 기반기술이 될 수 있을 것으로 기대된다.
- [0813] 본 발명에서 "섬유질환"이란 정상적인 조직이 파괴되면서 섬유성 결합조직으로 대체되는 섬유화(fibrosis)로 인하여 장기가 제 기능을 다하지 못하게 되어 나타나는 질병으로서, 간 섬유증(liver fibrosis), 만성간염(chronic hepatitis), 간경화(cirrhosis), 간암(hepatic cancer), 화학요법-연관 지방 간염(chemotherapy-associated steatohepatitis, CASH), 폐 섬유증(pulmonary fibrosis), 신장 섬유증(renal fibrosis), 신부전(renal failure), 췌장 섬유증(pancreatic fibrosis), 만성 췌장염(chronic pancreatitis) 및 췌장암(pancreatic cancer)을 포함하며, 장기의 일부가 굳는 섬유화에 의해 나타나는 질병이라면 이에 제한되지 아니하나, 바람직하게는 특히 간 섬유증과 폐 섬유증일 수 있다. 본 발명에 있어서, "개체"란 포유류라면 제한되지 아니하나, 바람직하게는 인간 또는 가축일 수 있다.
- [0814] 본 발명에서 "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 섬유질환의 발병을 지연시키거나, 조직의 섬유화를 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 섬유질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0815] 본 발명에 있어서 상기 융합 단백질의 형성에 사용되는 알부민은 임의의 종으로부터 유래한 것일 수 있으나, 면역원성의 위험을 피하기 위하여 투여되는 개체와 동일한 종(species)의 유래인 것이 바람직하다.
- [0816] 본 발명에서 약학적 조성물(pharmaceutical composition)은 융합단백질 1 내지 6 외에 조직의 섬유화를 예방 또는 치료할 수 있는 공지의 물질을 1종 이상 더 포함할 수 있으며, 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제, 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0817] 본 발명에서 "담체(carrier)"란 비이클(vehicle)이라고도 불리우며, 세포 또는 조직 내로의 단백질 또는 펩타이드의 부가를 용이하게 하는 화합물을 의미하는 것으로서, 예를 들어, 디메틸설폭사이드(DMSO)는 생물체의 세포 또는 조직 내로의 많은 유기물의 투입을 용이하게 하는 통상 사용되는 담체이다.
- [0818] 본 발명에서 "희석제(diluent)"란 대상 단백질 또는 펩타이드의 생물학적 활성 형태를 안정화시킬 뿐만 아니라, 단백질 또는 펩타이드를 용해시키게 되는 물에서 희석되는 화합물로 정의된다. 버퍼 용액에 용해되어 있는 염은 당해 분야에서 희석제로 사용된다. 통상 사용되는 버퍼 용액은 포스페이트 버퍼 식염수이며, 이는 인간 용액의 염 상태를 모방하고 있기 때문이다. 버퍼 염은 낮은 농도에서 용액의 pH를 제어할 수 있기 때문에, 버퍼 희석제

가 화합물의 생물학적 활성을 변형하는 일은 드물다. 여기에 사용된 아젤라산을 함유하는 화합물들은 인간 환자에게 그 자체로서, 또는 결합 요법에서와 같이 다른 성분들과 함께 또는 적당한 담체나 부형제와 함께 혼합된 약제학적 조성물로서, 투여될 수 있다.

[0819] 또한, 본 발명에 따른 섬유질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 외용제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 본 발명의 항균용 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 담당자에 의해 적절하게 선택될 수 있으며, 예를 들어, 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합된 형태로 약 0.001mg 내지 1000mg이 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물은 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있으며, 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0820] 한편, 본 발명의 재조합 융합 단백질의 아미노 말단은 아세틸기, 플루오레닐 메톡시 카르보닐기, 포르밀기, 팔미토일기, 미리스틸기, 스테아릴기 및 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 등의 보호기가 결합될 수 있으며, 펩타이드의 카르복시 말단은 히드록시기(-OH), 아미노기(-NH₂), 아자이드(-NHNH₂) 등으로 변형될 수 있다.

[0821] 또한 본 발명의 융합 단백질 말단 또는 아미노산의 R-잔기(R-group)에 지방산(fatty acids), 당사슬(oligosaccharides chains), 모든 나노입자(골드입자, 리포솜, 헤파린, 하이드로젤 등), 아미노산, 담체 단백질(carrier proteins) 등을 결합할 수 있다. 상술한 아미노산의 변형은 본 발명의 단백질의 역가(potency)와 안정성을 개선하는 작용을 한다.

[0822] 본 명세서에서 용어 “안정성”은 생체 내(in vivo) 안정성뿐만 아니라, 저장 안정성(상온, 냉장, 냉동 보관 시 저장 안정성 포함)도 의미한다.

[0823] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 융합 단백질의 생산방법을 제공한다:

[0824] (1) 제 16 항의 벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계;

[0825] (2) 상기 형질전환체를 배양하는 단계; 및

[0826] (3) 상기 배양액으로부터 융합 단백질을 수득하는 단계.

[0827] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 융합 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0829] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0831] [실험방법]

[0832] 1. 성상세포(stellate cells, SCs)의 분리 및 배양

[0833] 1-1. 간 성상세포(Hepatic stellate cells: HSCs)의 준비

[0834] 14주령의 수컷 BALB/c mice의 간을 먼저 PBS(phosphate-buffered saline)로 관류하고 이어서 콜라게나아제(collagenase), 프로나아제(pronase) 및 DNase를 함유하는 GBSS(Gey's balanced salt solution) 용액으로 관류시킨 후, 간을 추출하였다. 간에 부착된 담낭 및 결합 조직을 제거하고, 간 세포 현탁액을 상기 GBSS와 동일한 용액에 넣고 37℃에서 12분 동안 처리한 후, 13.4% Nycodenz 구매 상에서 1400 g에서 20분 동안 원심분리하였다. Nycodenz 용액과 수성층의 경계면 상에 있는 성상세포를 취하고, 10% 소태아혈청(FBS)이 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) (Carlsbad, CA)에서 배양하였다. 성상세포의 순도는 현미경 관찰과 anti-tyrosine aminotransferase antibody를 이용한 웨스턴 블롯팅(western blotting)을 통해 평가하였다. 세포가 디쉬에 가득 차게(confluent) 되면 계대배양을 하고, 활성화된 성상세포로 이용하였다. 간 성상세포의 활

성화는 형태학적 변화와 α -SMA와 collagen I의 발현 증가를 통해 확인하였다.

[0836] 1-2. 폐 정상세포(Lung stellate cells: LSCs)의 준비

[0837] 간 정상세포의 확보와 동일하게 14주령 수컷 BALB/c mice의 폐를 추출하고, 폐 세포 현탁액을 GBSS와 동일한 용액에 넣고 37℃에서 12분 동안 처리한 후, 13.4% Nycodenz 구매 상에서 1400 g 에서 20분 동안 원심분리한 후, Nycodenz 용액과 수성층의 경계면 상에 있는 정상세포를 취하여 배양하였다.

[0839] 2. 융합 단백질의 설계 및 제작

[0840] 2-1. 융합 단백질의 설계

[0841] 본원발명의 융합단백질 제작을 위해 사용된 RBP4의 19번 내지 194번 아미노산 또는 19번 내지 195번 아미노산을 포함하는 RBP4 단편, 알부민 단백질의 404번 내지 517번 아미노산을 포함하는 알부민 IIIA 단편, 알부민 단백질의 134번 내지 218번 아미노산 또는 131번 내지 218번 아미노산을 포함하는 알부민 IB 단편의 서열은 하기의 표 1에 나타내었다.

[0842] 레티노산과의 결합력 강화를 위하여 설계된 융합단백질 1 내지 6의 구체적인 정보는 하기 표 2에 나타내었다. RBP 유래의 영역은 밑줄로 표시하였으며, 알부민 III에서 치환된 아미노산은 굵은 글자 및 밑줄로 표시하였다. 각 융합단백질의 N-말단에는 형질전환체 세포 밖으로 분비를 유도하기 위하여 signal peptide를 추가하였으며, mkwvwalllilaawaaa 또는 mkwvtfisllflfssays 아미노산 서열로 이루어진 signal peptide를 선택하여 추가하였다.

표 1

서열번호	단백질 단편	아미노산 서열
1	RBP4(19~194)	ERDCRVSSFRVKNFDFKARFSGTWYAMAKKDPEGLFLQDNIVAEFSVDETGQMSATAKGRVRLNNWDVCADMGTFDTEDPAKFKMKYWGVSFLQKGNDDHWIVDTDYDTYAVQYSCRLNLNLTGTCADSYSFVFSRDPNGLPPEAQKIVRQRQEELCLARQYRLIVHNGYCDG
2	RBP4(19~195)	ERDCRVSSFRVKNFDFKARFSGTWYAMAKKDPEGLFLQDNIVAEFSVDETGQMSATAKGRVRLNNWDVCADMGTFDTEDPAKFKMKYWGVSFLQKGNDDHWIVDTDYDTYAVQYSCRLNLNLTGTCADSYSFVFSRDPNGLPPEAQKIVRQRQEELCLARQYRLIVHNGYCDGR
3	알부민 IIIA (404~441(E)~517(V))	LVEEPQNL IKQNCLEFQELGEYKFNALLVRYTKKVP EVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYL SVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEV
4	알부민 IIIA (404~441(Q)~517(V))	LVEEPQNL IKQNCLEFQELGEYKFNALLVRYTKKVP QVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYL SVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEV
5	알부민 IB (134~218)	PNLPRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLD ELRDEGKASSA
6	알부민 IB (131~218)	DDNPNLPRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSA

표 2

서열번호	융합단백질	아미노산 서열
13	융합단백질1: RBP(19~195) + 알부민 III {404~526(F→V)~600(V→A)~601}	ERDCRVSSFRVKNFDFKARFSGTWYAMAKKDPEGLFLQDNIVAEFSVDETGQMSATAKGRVRLNNWDVCADMGTFDTEDPAKFKMKYWGVSFLQKGNDDHWIVDTDYDTYAVQYSCRLNLNLTGTCADSYSFVFSRDPNGLPPEAQKIVRQRQEELCLARQYRLIVHNGYCDGRLVVEEPQNL IKQNCLEFQELGEYKFNALLVRYTKKVP EVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEYNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDFFAAFVEKCKADDKETCF AEEGKKLAA
14	융합단백질2: 알부민 [III {404~526(F→V)~600(V→A)~601}] + RBP(19~194)	LVEEPQNL IKQNCLEFQELGEYKFNALLVRYTKKVP EVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEYNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDFFAAFVEKCKADDKETCF AEEGKKLAAERDCRVSSFRVKNFDFKARFSGTWYAMAKKDPEGLFLQDNIVAEFSVDETGQMSATAKGRVRLNNWDVCADMGTFDTEDPAKFKMKYWGVSFLQKGNDDHWIVDTDYDTYAVQYSCRLNLNLTGTCADSYSFVFSRDPNGLPPEAQKIVRQRQEELCLARQYRLIVHNGYCDG

7	융합단백질3: RBP(17~193) + 알부민 [ⅢA{404~517(V)} + IB(131~218)]	ERDCRVSSFRVKENFDKARFSGTWYAMAKKDPEGLFLQDNIVAEFSVDETGQMSATAKGRVRLNNWDVCADMV GTFTDTEDEPAKFKMKYWGVSFLQKGNDDHWIVDTDYDTYAVQYSCRLNLNLDGTCADSYSFVFSRDPNGLPPEA QKIVRQRQEELCLARQYRLIVHNGYCDGRLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPEVSTPTLV EVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDNPN LPRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSA
8	융합단백질4: RBP(19~195) + 알부민 [ⅢA{404~517(V)} + IB(134~218)]	ERDCRVSSFRVKENFDKARFSGTWYAMAKKDPEGLFLQDNIVAEFSVDETGQMSATAKGRVRLNNWDVCADMV GTFTDTEDEPAKFKMKYWGVSFLQKGNDDHWIVDTDYDTYAVQYSCRLNLNLDGTCADSYSFVFSRDPNGLPPEA QKIVRQRQEELCLARQYRLIVHNGYCDGRLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPEVSTPTLV EVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVPNLPR LVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDEL RDE GKASSA
9	융합단백질5: 알부민 [ⅢA{404~517(V)} + IB(131~218)] + RBP(19~194)	LVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPEVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYL SVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDNPNLPRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLY E IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSA ERDCRVSSFRVKENFDKARF SGTWYAMAKKDPEGLFLQDNIVAEFSVDETGQMSATAKGRVRLNNWDVCADMVGTFTDTEDEPAKFKMKYWGVA SFLQKGNDDHWIVDTDYDTYAVQYSCRLNLNLDGTCADSYSFVFSRDPNGLPPEAQKIVRQRQEELCLARQYRLI VHNGYCDG
10	융합단백질6: 알부민 [ⅢA{404~517(V)} + IB(134~218)] + RBP(19~194)	LVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPEVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYL SVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVPNLPRPRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYE I A RRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSA ERDCRVSSFRVKENFDKARFSGT WYAMAKKDPEGLFLQDNIVAEFSVDETGQMSATAKGRVRLNNWDVCADMVGTFTDTEDEPAKFKMKYWGVSFL QKGNDDHWIVDTDYDTYAVQYSCRLNLNLDGTCADSYSFVFSRDPNGLPPEAQKIVRQRQEELCLARQYRLIVHN GYCDG
11	융합단백질3': RBP(19~195) + 알부민 [ⅢA{404~441(E→Q) ~517(V)} + IB(131~218)]	ERDCRVSSFRVKENFDKARFSGTWYAMAKKDPEGLFLQDNIVAEFSVDETGQMSATAKGRVRLNNWDVCADMV GTFTDTEDEPAKFKMKYWGVSFLQKGNDDHWIVDTDYDTYAVQYSCRLNLNLDGTCADSYSFVFSRDPNGLPPEA QKIVRQRQEELCLARQYRLIVHNGYCDGRLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPEVSTPTLV EVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDNPN LPRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSA
12	융합단백질4': RBP(19~195) + 알부민 [ⅢA{404~441(E→Q) ~517(V)} + IB(134~218)]	ERDCRVSSFRVKENFDKARFSGTWYAMAKKDPEGLFLQDNIVAEFSVDETGQMSATAKGRVRLNNWDVCADMV GTFTDTEDEPAKFKMKYWGVSFLQKGNDDHWIVDTDYDTYAVQYSCRLNLNLDGTCADSYSFVFSRDPNGLPPEA QKIVRQRQEELCLARQYRLIVHNGYCDGRLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPEVSTPTLV EVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVPNLPR LVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDEL RDE GKASSA

[0847]

2-2. 융합 단백질의 제조 융합 단백질의 제조를 위하여 signal peptide를 포함하여 융합단백질 1 내지 6을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제작하고 각 DNA 절편을 XbaI/KpnI cut pcDNA3.1(+) 벡터로 클로닝하여 재조합 발현 벡터를 제조하였다. 각 융합단백질을 암호화하는 DNA 절편의 구체적인 정보는 하기 표 2에 정리하였다. 상기 각 벡터를 리포펙타민 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 CHO cells에 도입하여 융합단백질을 발현하는 형질전환체를 제조하였다. 상기 형질전환체를 배양하여 발현 분비된 융합단백질을 친화 크로마토그래피 (affinity chromatography) 및 HPLC법에 의해 정제하여 사용하였다.

표 3

[0848]

서열번호	융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드	서열
------	------------------------	----

15	융합단백질1	ATGAAGTGGGTGTGGGCTCTGCTGCTGCTGGCTGCTTGGGCCGCTGCCGAGAGAGATTGCCGCGTGTCCAGCTT CAGAGTGAAGGAGAACTTCGACAAGGCCCGCTTTTCCGGCACCTGGTACGCTATGGCCAAGAAGGACCCCGAGG GCCTGTTCTGTCAGGACAATATCGTGGCTGAGTTTAGCGTGGATGAGACAGGCCAGATGTCTGTACCGCCAAG GGCAGAGTGCCTGTGTAACAATTGGGACGTGTGCGCTGACATGGTGGGCACCTTCACAGATACCGAGGACCC AGCCAAGTTTAAGATGAAGTATTGGGGCGTGGCTAGCTTTCTGCAGAAGGGCAACGACGATCACTGGATCGTGG ACACAGATTACGACACCTATGCCGTGCAGTACAGCTGCAGACTGCTGAACCTGGATGGCAGATGTGCTGACTCT TATTCCCTTCGTGTTTCTCGCGATCCAAATGGCCTGCCCGCTGAGGCCAGAAAGATCGTAGGCAGAGGCAGGA GGAGCTGTGCTGGCTAGGCAGTACCGGTGATCGTGCATAATGGCTATTGTGACGGCAGGCTGGTGGAGGAGC CCCAGAACCTGATCAAGCAGAATTGCGAGCTGTTTCGAGCAGCTGGGCGAGTACAAGTTTCAGAACGCCCTGCTG GTGCGGTATACCAAGAAGGTGCCAGAGGTGCCACACCCACCCTGGTGGAGGTGAGCAGGAATCTGGGCAAGGT CGGCTCTAAGTGCTGTAAGCACCCCTGAGGCTAAGCGGATGCCATGCGCCGAGGATTACCTGTCTGTGGTGCTGA ACCAGCTGTGCGTGTGCATGAGAAGACACCCGTGCCGACAGAGTGACAAAGTGCTGTACCGAGTCCCTGGTG AACAGGCGGCCCTGCTTCAGCGCCCTGGAGGTGGATGAGACCTATGTGCTTAAGGAGTTAATGCTGAGACATT CACCTTTCACGCGGACATCTGTACACTGTCTGTGAGAAGGAGCGCCAGATCAAGAAGCAGACCGCTCTGGTGGAGC TGGTGAAGCATAAGCCTAAGGCTACAAAGGAGCAGCTGAAGGCCGTGATGGACGATTTCGCTGCCTTTGTGGAG AAGTGCTGTAAGGCTGACGATAAGGAGACCTGTTTCGCGGAGGAGGGCAAGAAGCTGGCGGCT
16	융합단백질2	ATGAAGTGGGTGACATTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCTCCGCTACTCTCTGGTGGAGGAGCCCCAGAA CCTGATCAAGCAGAAATTGCGAGCTGTTCGAGCAGCTGGGCGAGTACAAGTTTCAGAACGCCCTGCTGGTGAGGT ATACCAAGAAGGTGCCAGAGGTGTCCACCCCCACACTGGTGGAGGTGAGCAGGAATCTGGGCAAGGTCCGCTCT AAGTGCTGTAAGCACCCCTGAGGCCAAGCGGATGCCATGCGCTGAGGATTACCTGTCCGTGGTGCTGAACACGCT GTGCGTGTGCTGATGAGAAGACACCTGTGAGCGACAGGGTGACAAAGTGCTGTACCGAGTCTCTGGTGAACAGGC GGCCCTGCTTCTCCGCTCTGGAGGTGGATGAGACCTATGTGCCTAAGGAGTTAATGCCGAGACCTTCACATTT CACGCTGACATCTGTACACTGTCCGAGAAGGAGAGACAGATCAAGAAGCAGACCGCCCTGGTGGAGCTGGTGAA GCATAAGCCAAAGGCCACAAAGGAGCAGCTGAAGGCTGTGATGGACGATTTCGCGCTTTTGTGGAGAAGTGCT GTAAGGCCGACGATAAAGGAGACCTGCTTCGCTGAGGAGGGCAAGAAGCTGGCGGCCGAGAGAGATTGTGCGGTG TCTTCTTTAGAGTGAAAGGAGAACTTCGACAAGGCTCGCTTTAGCGGCACATGGTAGCTATGGCCAAGAAGGA CCCCGAGGGCCTGTTCTGTCAGGACAATATCGTGGCCGAGTTTTCGCTGGATGAGACAGGCCAGATGAGCGCCA CCGCTAAGGGAAGAGTGCGCCTGCTGAACAATTGGGACGTGTGCGCCGACATGGTGGGCACCTTCACAGATACC GAGGACCCCGCTAAGTTTAAGATGAAGTATTGGGGCGTGGCCTCTTTTCTGCAGAAGGGCAACGACGATCCACTG GATCGTGGACACAGATTACGACACCTATGCTGTGACGACTCTTTCAGAGCTGCTGAACCTGGATGGCACCTGTG CCGACAGCTATTCTTTCGTGTTTTCGCGATCCTAATGGCCTGCCCGCTGAGGCTCAGAAGATCGTAGGCAG AGGCAGGAGAGCTGTGCTGGCCAGGCAGTACCGCTGATCGTGCATAATGGCTATTGTGACGGC
17	융합단백질3	ATGAAGTGGGTGTGGGCTCTGCTGCTGCTGGCTGCTTGGGCCGCTGCCGAGAGAGATTGCCGCGTGTCCAGCTT CAGAGTGAAGGAGAACTTCGACAAGGCCCGCTTTTCCGGCACCTGGTACGCTATGGCCAAGAAGGACCCCGAGG GCCTGTTCTGTCAGGACAATATCGTGGCTGAGTTTAGCGTGGATGAGACAGGCCAGATGTCTGTACCGCCAAG GGCAGAGTGCCTGTGTAACAATTGGGACGTGTGCGCTGACATGGTGGGCACCTTCACAGATACCGAGGACCC AGCCAAGTTTAAGATGAAGTATTGGGGCGTGGCTAGCTTTCTGCAGAAGGGCAACGACGATCACTGGATCGTGG ACACAGATTACGACACCTATGCCGTGCAGTACAGCTGCAGACTGCTGAACCTGGATGGCAGATGTGCTGACTCT TATTCCCTTCGTGTTTCTCGCGATCCAAATGGCCTGCCCGCTGAGGCCAGAAAGATCGTAGGCAGAGGCAGGA GGAGCTGTGCTGGCTAGGCAGTACCGGTGATCGTGCATAATGGCTATTGTGACGGCAGGCTGGTGGAGGAGC CCCAGAACCTGATCAAGCAGAATTGCGAGCTGTTTCGAGCAGCTGGGCGAGTACAAGTTTCAGAACGCCCTGCTG GTGCGGTATACCAAGAAGGTGCCAGAGGTGCCACACCCACCCTGGTGGAGGTGAGCAGGAATCTGGGCAAGGT CGGCTCTAAGTGCTGTAAGCACCCCTGAGGCTAAGCGGATGCCATGCGCCGAGGATTACCTGTCTGTGGTGCTGA ACCAGCTGTGCGTGTGCATGAGAAGACACCCGTGCCGACAGAGTGACAAAGTGCTGTACCGAGATCCCTGGTG AACAGGCGGCCCTGCTTCAGCGCCCTGGAGGTGGACGATAACCCAAATCTGCCAGACTGGTGCGCCAGAGGT GGATGTGATGTGCACAGCTTTCACGACAATGAGGAGACCTTTCTGAAGAAGTACCTGTATGAGATGCCAGAC GCCATCCCTACTTTTATGCTCCTGAGCTGTGTTCTTTGCCAAGCGGTACAAGGCTGCCTTCACAGAGTGTCTGT CAGGCTGCTGACAAGGCTGCTTCCCTGCTGCCAAAGCTGGATGAGCTGAGGGACGAGGGCAAGGCTTCTCCGC C
18	융합단백질4	ATGAAGTGGGTGTGGGCTCTGCTGCTGCTGGCTGCTTGGGCCGCTGCCGAGAGAGATTGCCGCGTGTCCAGCTT CAGAGTGAAGGAGAACTTCGACAAGGCCCGCTTTTCCGGCACCTGGTACGCTATGGCCAAGAAGGACCCCGAGG GCCTGTTCTGTCAGGACAATATCGTGGCTGAGTTTAGCGTGGATGAGACAGGCCAGATGTCTGTACTACCGCCAAG GGCAGAGTGCCTGTGTAACAATTGGGACGTGTGCGCTGACATGGTGGGCACCTTCACAGATACCGAGGACCC AGCCAAGTTTAAGATGAAGTATTGGGGCGTGGCTAGCTTTCTGCAGAAGGGCAACGACGATCACTGGATCGTGG ACACAGATTACGACACCTATGCCGTGCAGTACAGCTGCAGACTGCTGAACCTGGATGGCAGATGTGCTGACTCT TATTCCCTTCGTGTTTCTCGCGATCCAAATGGCCTGCCCGCTGAGGCCAGAAAGATCGTAGGCAGAGGCAGGA GGAGCTGTGCTGGCTAGGCAGTACCGGTGATCGTGCATAATGGCTATTGTGACGGCAGGCTGGTGGAGGAGC CCCAGAACCTGATCAAGCAGAATTGCGAGCTGTTTCGAGCAGCTGGGCGAGTACAAGTTTCAGAACGCCCTGCTG GTGCGGTATACCAAGAAGGTGCCAGAGGTGCCACACCCACCCTGGTGGAGGTGAGCAGGAATCTGGGCAAGGT CGGCTCTAAGTGCTGTAAGCACCCCTGAGGCTAAGCGGATGCCATGCGCCGAGGATTACCTGTCTGTGGTGCTGA ACCAGCTGTGCGTGTGCATGAGAAGACACCCGTGCCGACAGAGTGACAAAGTGCTGTACCGAGTCCCTGGTG AACAGGCGGCCCTGCTTCAGCGCCCTGGAGGTGGACGATAACCCAAATCTGCCAGACTGGTGCGCCAGAGGT GGATGTGATGTGCACAGCTTTCACGACAATGAGGAGACCTTTCTGAAGAAGTACCTGTATGAGATGCCAGAC GCCATCCCTACTTTTATGCTCCTGAGCTGTGTTCTTTGCCAAGCGGTACAAGGCTGCCTTCACAGAGTGTCTGT CAGGCTGCTGACAAGGCTGCTTCCCTGCTGCCAAAGCTGGATGAGCTGAGGGACGAGGGCAAGGCTTCTCCGC C

19	융합단백질5	ATGAAGTGGGTGACATTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCGCTACTCTCTGGTGGAGGAGCCCCAGAA CCTGATCAAGCAGAATTGCGAGCTGTTTCGAGCAGCTGGGCGAGTACAAGTTTCAGAACGCCCTGCTGGTGAGGT ATACCAAGAAGGTGCCAGAGGTGTCCACCCCCACACTGGTGGAGGTGAGCAGGAATCTGGCAAGGTCCGCTCT AAGTGCTGTAAGCACCCCTGAGGCCAAGCGGATGCCATGCGCTGAGGATTACCTGTCCGTGGTGCTGAACAGCT GTGCGTGCTGCATGAGAAGACACCTGTGAGCGACAGGGTGACAAAGTGCTGTACCGAGTCTCTGGTGAACAGGC GGCCCTGCTTCTCCGCTCTGGAGGTGGACGATAACCCAAATCTGCCAGACTGGTGCGCCAGAGGTGGATGTG ATGTGCACAGCTTTCCACGACAATGAGGAGACCTTTCTGAAGAAGTACCTGTATGAGATCGCCAGACGCCATCC CTACTTTTATGCTCCTGAGCTGCTGTTCTTTGCCAAGCGGTACAAGGCTGCCTTCACAGAGTGCTGTACGGCTG CTGACAAGGCTGCTTGCCTGCTGCCAAAGCTGGATGAGCTGAGGACAGGGCAAGGCTTCTTCCGCCGAGAGA GATTGCCGCTGTCCAGCTTCAGAGTGAAGGAGAACTTCGACAAGGCCCGCTTTTCCGGCACCTGGTACGCTAT GGCCAAGAAGGACCCGAGGGCTGTTCCTGCAGGACAATATCGTGGCTGAGTTTAGCGTGGATGAGACAGGCC AGATGTCTGCTACCGCAAGGGCAGAGTGCGCTGCTGAACAATTGGGACGTGTGCGCTGACATGGTGGGCACC TTCACAGATACCGAGGACCCAGCCAAGTTTAAAGTGAAGTATTGGGGCGTGGCTAGCTTTCTGCAGAAGGGCAA CGACGATCACTGGATCGTGGACACAGATTACGACACCTATGCCGTGACAGTACAGCTGCAGCTGCTGAACCTGG ATGGCACATGTGCTGACTCTTATTCCTTCGTGTTTCTCGCGATCCAAATGGCCTGCCCCCTGAGGCCCAGAAG ATCGTGAGGCAGAGGCAGGAGAGCTGTGCTGGCTAGGCAGTACCGGCTGATCGTGCATAATGGCTATTGTGA CGGC
20	융합단백질6	ATGAAGTGGGTGACATTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCGCTACTCTCTGGTGGAGGAGCCCCAGAA CCTGATCAAGCAGAATTGCGAGCTGTTTCGAGCAGCTGGGCGAGTACAAGTTTCAGAACGCCCTGCTGGTGAGGT ATACCAAGAAGGTGCCAGAGGTGTCCACCCCCACACTGGTGGAGGTGAGCAGGAATCTGGCAAGGTCCGCTCT AAGTGCTGTAAGCACCCCTGAGGCCAAGCGGATGCCATGCGCTGAGGATTACCTGTCCGTGGTGCTGAACAGCT GTGCGTGCTGCATGAGAAGACACCTGTGAGCGACAGGGTGACAAAGTGCTGTACCGAGTCTCTGGTGAACAGGC GGCCCTGCTTCTCCGCTCTGGAGGTGCCAAATCTGCCAGACTGGTGCGCCAGAGGTGGATGTGATGTGCACA GCTTTCCACGACAATGAGGAGACCTTTCTGAAGAAGTACCTGTATGAGATCGCCAGACGCCATCCCTACTTTTA TGCTCCTGAGCTGTGTTCTTTGCCAAGCGGTACAAGGCTGCCTTCACAGAGTGCTGTACGGCTGCTGACAAGG CTGCTTGCCTGCTGCCAAAGCTGGATGAGCTGAGGGACGAGGGCAAGGCTTCTTCCGCCGAGAGAGATTGCCGC GTGTCCAGCTTCAGAGTGAAGGAGAACTTCGACAAGGCCCGCTTTTCCGGCACCTGGTACGCTATGGCCAAGAA GGACCCGAGGGCCTGTTCTGCAGGACAATATCGTGGCTGAGTTTAGCGTGGATGAGACAGGCCAGATGTCTG CTACCGCCAAGGGCAGAGTGCGCTGCTGAACAATTGGGACGTGTGCGCTGACATGGTGGGCACCTTCACAGAT ACCGAGGACCCAGCCAAGTTTAAAGTGAAGTATTGGGGCGTGGCTAGCTTTCTGCAGAAGGGCAACGACGATCA CTGGATCGTGACACAGATTACGACACCTATGCCGTGACGTACAGCTGCAGACTGCTGAACCTGGATGGCACAT GTGCTGACTCTTATTCCTTCGTGTTTCTCGCGATCCAAATGGCCTGCCCCCTGAGGCCCAGAAGATCGTGAGG CAGAGGCAGGAGAGCTGTGCTGGCTAGGCAGTACCGGCTGATCGTGCATAATGGCTATTGTGACGGC

3. 정량적 실시간 중합효소연쇄반응(Quantitative Real-Time PCR)

TRIzol (Ambion, Austin, TX, USA)를 이용하여 총 RNA를 준비하고 cDNA를 제작하였다. qRT-PCR은 ABI QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System에서 수행하였다. 반응의 변화를 통제하기 위하여 PCR 산물은 GAPDH(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)의 mRNA 수준으로 정규화하였다.

4. 동물 모델 제조

4-1. 간 섬유화 동물 모델

미네랄 오일 중에 1:1로 용해시킨 CCl_4 를 BALB/c 마우스 복강 내 1 mL/kg 농도로 주 3회, 6주 동안 주사하여 간 손상을 유도한 간 섬유화 마우스 모델을 제조하였다. 대조군(control)은 동일한 양의 미네랄 오일 단독을 투여 하였다. 최종 CCl_4 주사 48시간 후 마우스를 희생시켰다.

희생된 마우스의 섬유화를 평가하기 위하여 간을 적출하고, 각 실험군의 간조직을 10% 완충 포르말린으로 고정 후 파라핀으로 포매하여 조직절편을 제작하였다. 각 조직 절편은 조직학적 분석을 위하여 시리우스 레드(Sirius red) 염색을 수행 후 광학현미경으로 관찰하였다.

4-2. 폐 섬유화 동물모델

항암제로 흔히 이용되는 블레오마이신(bleomycin: BLM)은 폐 섬유화의 부작용을 일으키는 것으로 잘 알려져 있으며, 폐 섬유화 동물모델 제작에 널리 사용되고 있다. 구체적으로, 6주령의 BALB/c 수컷 마우스에 블레오마이신을 기관지로 흡입시켜 폐 섬유화를 유도하였다.

실험 기간동안 매일 마우스의 체중을 측정하였으며, 마우스 희생 후에는 섬유화를 평가하기 위하여 폐를 적출하고, hydroxyproline assay를 수행하여 조직의 콜라겐 양을 측정하였다. 또한, 각 실험군의 폐 조직을 10% 완충

포르말린으로 고정 후 파라핀으로 포매하여 조직절편을 제작하였고, 각 조직 절편은 조직학적 분석을 위하여 H&E 염색을 수행 후 광학현미경으로 관찰하였다. 모든 실험 데이터는 폐 섬유화를 유도하지 않은 정상 마우스(control)와 비교하여 나타내었다.

5. 통계학적 분석

결과들은 평균±표준 편차 (SD)로 표현하였다. 통계학적 분석은 t-tests를 이용하여 수행하였다. 비교는 $P<0.05$ 에서 유의도를 검정하였으며, P 수치는 양측검정을 수행하였다.

[실험결과]

실시에 1. 간 정상세포에서 융합단백질 1 및 2와 종래의 알부민-RBP 융합 단백질의 효과 비교

종전 연구에서 정상세포의 활성화 억제 또는 역활성화에 우수한 효과를 나타낸 RBP-알부민Ⅲ 및 알부민Ⅲ-RBP과 실시예 2에서 설계한 융합단백질 1 및 2의 효과를 비교하였다. 구체적으로 활성화된 생쥐의 간 정상세포에 각 융합단백질 0.25 μ M를 20시간 동안 처리하고 real-time PCR 을 이용하여 α -SMA과 collagen I의 발현 수준을 측정하였다. 종래의 융합 단백질(RBP-알부민Ⅲ 및 알부민Ⅲ-RBP)은 KR 10-1395394의 R-Ⅲ과 Ⅲ-R 융합 단백질이다.

그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 종래의 융합단백질과 비교하여 융합단백질 1 및 2는 α -SMA과 collagen I의 mRNA 발현을 더 많이 감소시킴을 확인할 수 있었다.

실시에 2. 간 정상세포에서 융합단백질 1 내지 6의 효과 비교

활성화된 간 정상세포의 역활성화 효과에 있어서 종래의 융합단백질보다 우수한 효과를 확인한 융합단백질 1 및 2와 융합단백질 3 내지 6의 효과를 비교하여 확인하고자 하였다. 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하되 활성화된 간 정상세포에 처리하는 융합단백질의 양은 0.125 μ M로 하였다.

그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 융합단백질 3 내지 6은 보다 적은 양의 단백질량으로도 현저하게 높은 수준으로 α -SMA과 collagen I의 발현을 감소시킬 수 있음을 확인하였다.

실시에 3. 폐 정상세포에서 융합단백질 6의 효과 확인

상기 실시예 2에서 확인한 바와 같이, 융합단백질 3 내지 6은 융합단백질 1 및 2와 비교하여 적은 양의 단백질량으로 활성화된 간 정상세포의 역활성화를 유도하여 불활성 상태로 변환시킬 수 있음을 확인하였다. 이어서, 간 정상세포에서 효과가 확인된 융합단백질 중에서 임의로 융합단백질 6를 선택하여 폐 정상세포에서도 동일한 효과를 나타내는지 확인하였다.

실험은 실시예 2와 동일하게 수행하였으며, 도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 폐 조직에서 추출한 정상세포를 활성화시킨 후 융합단백질 6를 처리하는 경우 세포의 형태가 활성화 초기로 역전됨을 확인할 수 있었다. 또한, 활성화된 폐 정상세포에서 융합단백질 6 처리에 따라 α -SMA 발현이 감소됨을 확인할 수 있었다.

실시에 4. 간 섬유화 동물 모델에서 융합단백질 1 및 4와 종래의 알부민-RBP 융합 단백질의 효과 비교

사염화탄소(CCl_4) 주사로 유도된 간 섬유화 모델을 이용하여 융합 단백질의 치료 효과를 비교 평가하였다. 구체적으로, 미네랄 오일 중에 1:1로 용해시킨 사염화탄소를 1ml/kg 농도로 주 3회, 6주 동안 BALB/c 마우스 복강 내 주사하고, 상기 융합 단백질 (25, 12.5, 6.25, 또는 3 μ g) 또는 식염수를 CCl_4 처리 마지막 2주 동안 주당 3회 정맥 투여하였다(n=5마리).

광학현미경으로 조직을 관찰한 결과, 미네랄 오일만 투여한 대조군 마우스(control)는 정상적인 간 구조를 보여 주나, CCl_4 처리된 마우스에서는 심각한 간 조직 구조의 파괴 및 섬유화를 관찰할 수 있었다. 또한, 알부민과

RBP의 융합 단백질의 투여로 섬유화가 개선됨을 확인할 수 있었다(도 5).

[0880] Image J Software (NIH)에 의한 Sirius red 염색의 정량 분석 결과, 섬유화 개선 효과는 시료에 따라 차이를 보였다(도 6a 및 도 6b). 종래의 융합 단백질 RBP-알부민²의 경우 25ug 투여군에서만 유의한 개선효과가 보인 반면, 융합 단백질 4는 6.25ug 투여에서도 우수한 효과를 보였다. 상기 결과로부터 융합 단백질 1 및 4는 종래의 융합 단백질과 비교하여 낮은 농도에서 우수한 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0882] 실시예 5. 폐 섬유화 동물모델에서 융합단백질 6의 효과 확인

[0883] 블레오마이신 기관지 투여로 유도된 폐 섬유화 모델을 이용하여 융합 단백질의 치료 효과를 평가하였다. 구체적으로, 블레오마이신 처리일을 기준일(0일)로 2, 3, 5, 6, 8, 및 10일 후에 각각 융합단백질 6를 정맥투여하였고, 최종 투여 24시간 후 마우스를 희생하였다(도 7). 음성대조군에는 동일한 양의 생리식염수(saline)를 정맥투여하였다(n=14).

[0884] 블레오마이신의 투여로 폐 손상을 유도 후 즉시 마우스의 체중이 감소하는 경향을 나타내었으며, 융합단백질 6의 투여 후 감소된 체중이 점차 회복됨을 확인할 수 있었다(도 8).

[0885] 또한, hydroxyproline assay 수행 결과로부터 융합단백질의 투여가 폐 조직에서 콜라겐 수준을 현저하게 감소시킨 것을 알 수 있었으며(도 9), H&E 염색과 면역조직화학분석 수행 결과로부터 융합단백질 6의 투여로 폐 조직의 섬유화 정도가 정상군 수준으로 회복됨을 확인할 수 있었다(도 10).

[0887] 실시예 6. 알부민과 레티놀 결합 단백질의 융합단백질에서 알부민 아미노산의 자연적인 점 돌연변이 서열 차이(441E, 441Q)가 활성에 미치는 영향 조사

[0888] 실시예 6-1: 간 섬유화 모델

[0889] 사염화탄소(CCl₄) 복강 주사로 유도된 간 섬유화 모델을 이용하여 융합단백질 3'(441Q), 4'(441Q), 4(441E), 그리고 6(441E)의 치료 효과를 비교하였다. 이전 실험을 통하여, 융합단백질(441E) #4~6의 간 섬유 질환 치료 효과에서 큰 차이가 없음을 확인한 바 있다.

[0890] 구체적으로, 미네랄 오일 중에 1:1로 용해시킨 사염화탄소를 1ml/kg 농도로 주 3회, 4주 동안 BALB/c 마우스 복강 내 주사하고, 융합단백질 #3'(441Q), 4'(441Q), 4(441E), 그리고 6(441E)을 주 3회 정맥 투여(12.5 ug)하였다. 음성대조군에는 동일한 양의 생리식염수(saline)를 정맥 투여하였다.

[0891] Image J에 의한 Sirius red 염색의 정량 분석 결과, 융합단백질 투여에 의한 간 조직에서 콜라겐 수준이 현저히 감소됨을 확인하였으나, 융합단백질 #3'(441Q), 4'(441Q), 4(441E), 6(441E)에 따른 간 섬유화 개선 효과에는 큰 차이가 없었다(도 11).

[0893] 실시예 6-2: 폐 섬유화 모델

[0894] 블레오마이신(bleomycin) 기관지 투여로 유도된 폐 섬유화 모델을 이용하여 융합단백질 #3'(441Q), 4(441E), 그리고 6(441E)의 치료 효과를 비교하였다.

[0895] 구체적으로, 블레오마이신 처리일을 기준일(0일)로 1, 4, 6, 8, 및 11일 후에 융합 단백질 #3'(441Q), 4(441E), 그리고 6(441E)을 정맥 투여(12.5 ug)하였고, 최종 투여 24시간 후 마우스를 희생하였다. 음성대조군에는 동일한 양의 생리식염수(saline)를 정맥 투여하였다.

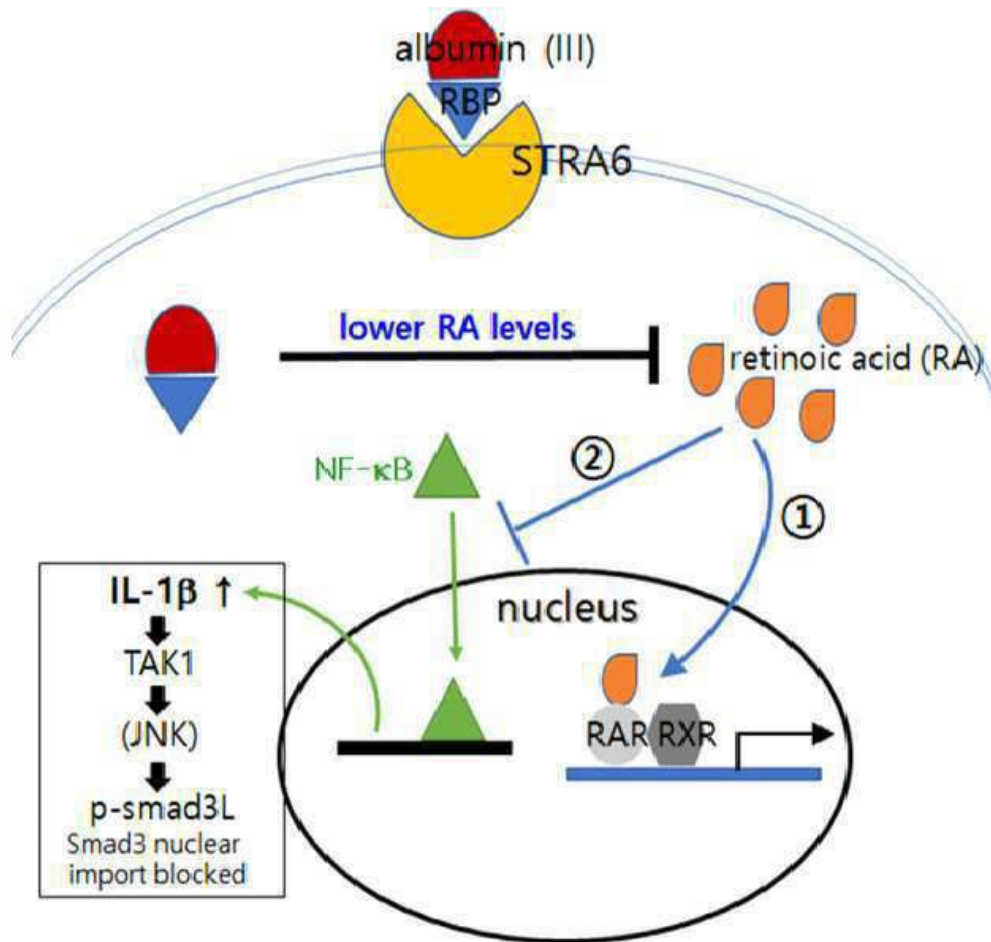
[0896] hydroxyproline assay 수행 결과, 융합단백질의 투여가 폐 조직에서 콜라겐 수준을 현저하게(~35%) 감소시킨 것을 알 수 있었으나, 융합단백질 #3'(441Q), 4(441E), 6(441E)에 따른 폐 섬유화 개선 효과에는 큰 차이가 관찰되지 않았다(도 12).

[0898] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할

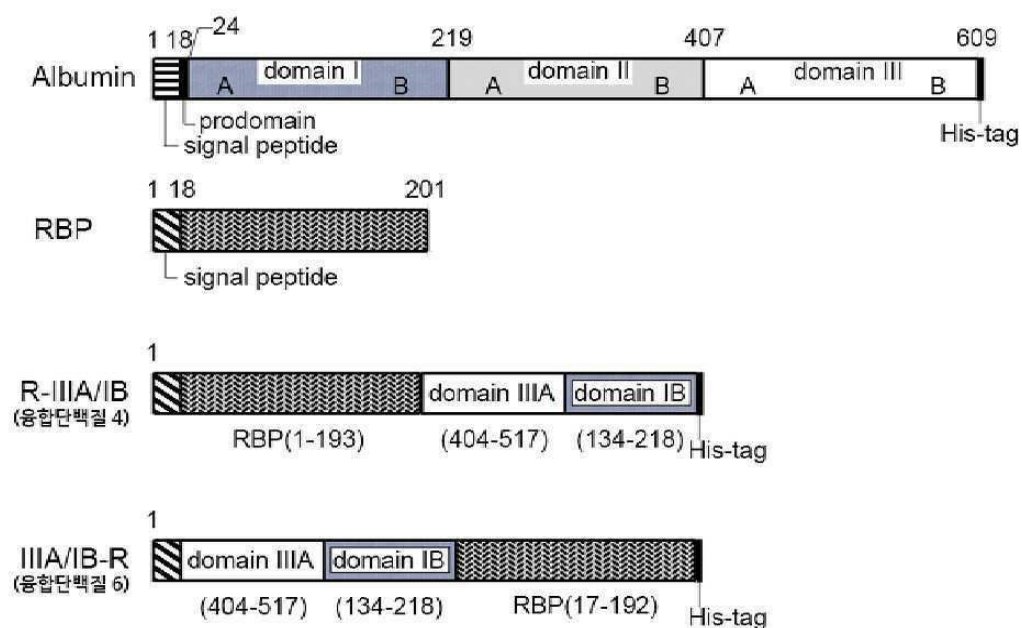
것이다.

도면

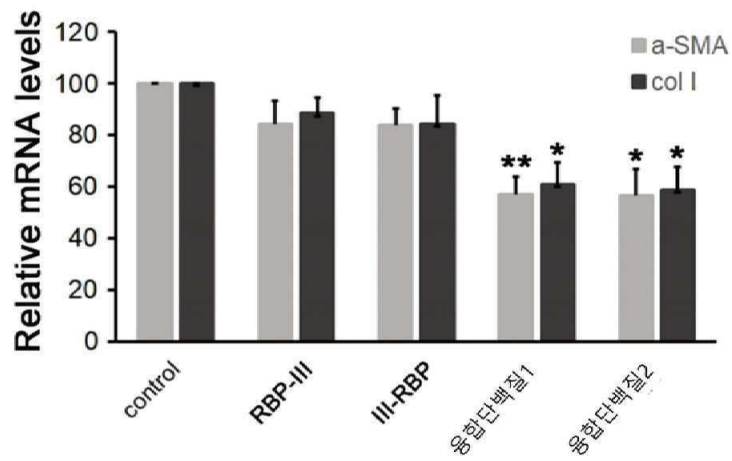
도면1



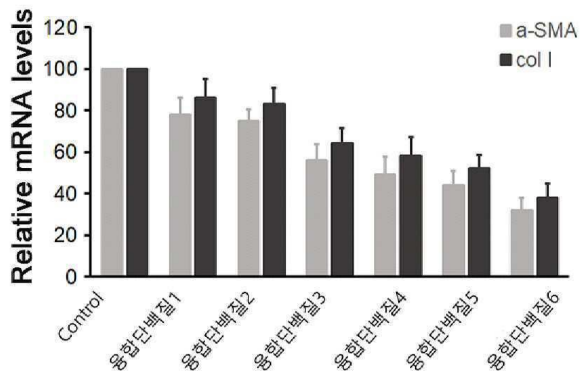
도면2



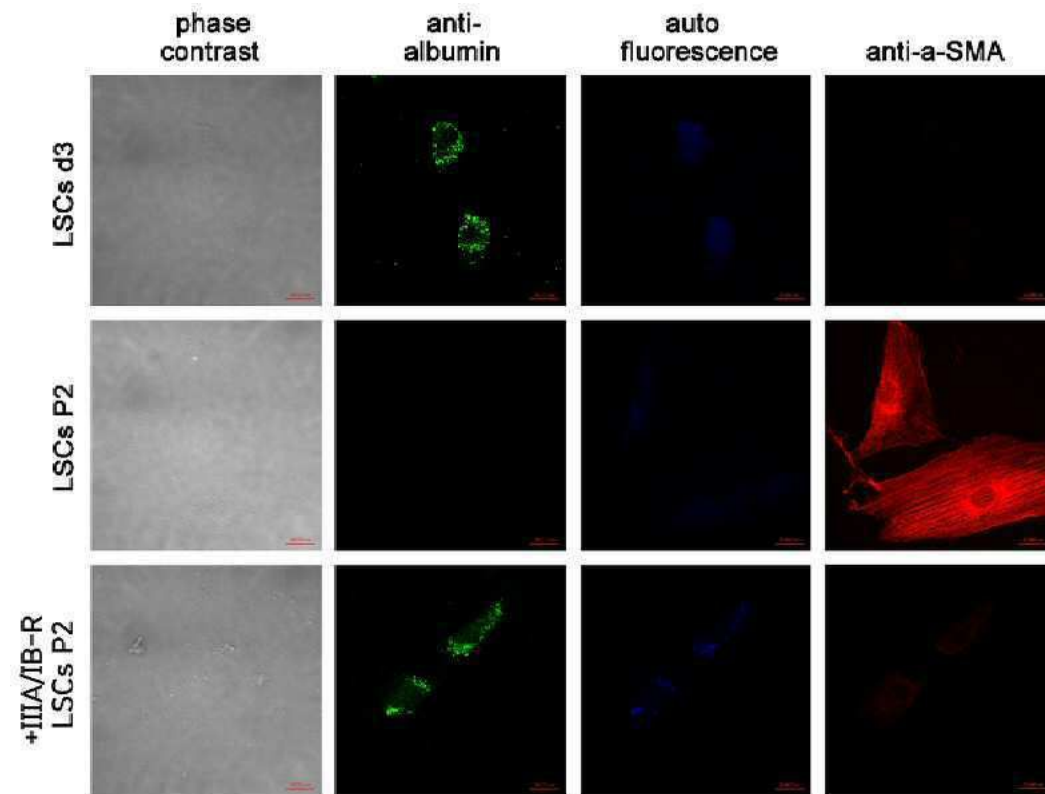
도면3



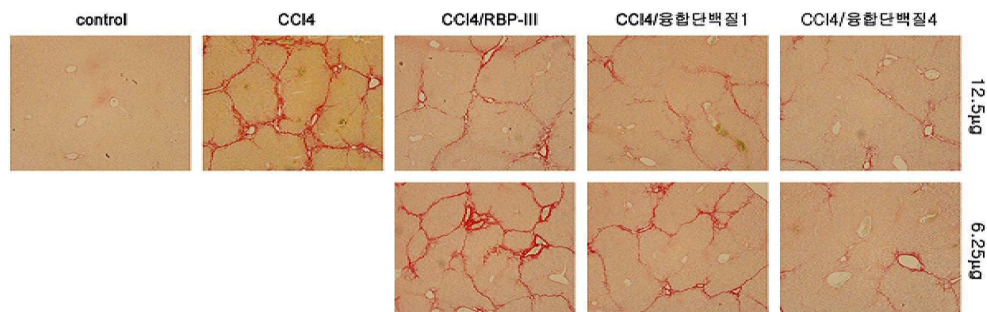
도면4



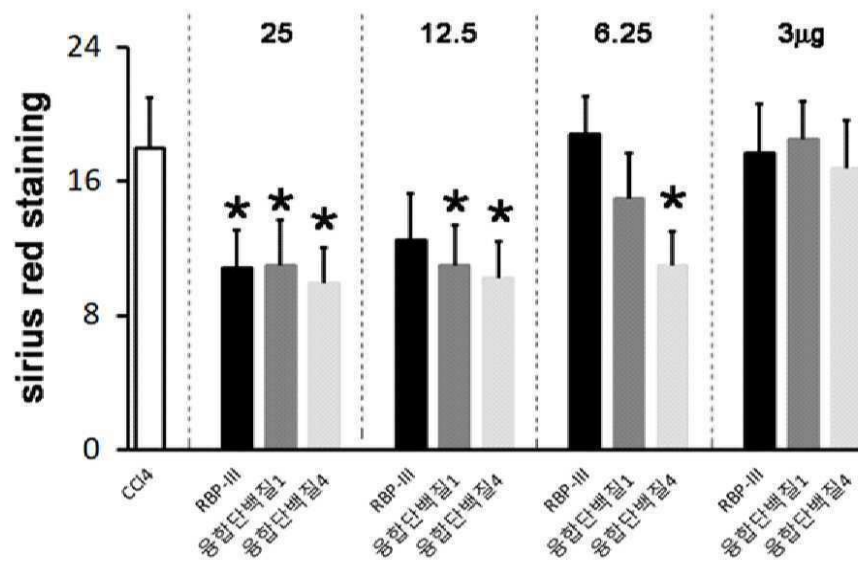
도면5



도면6a

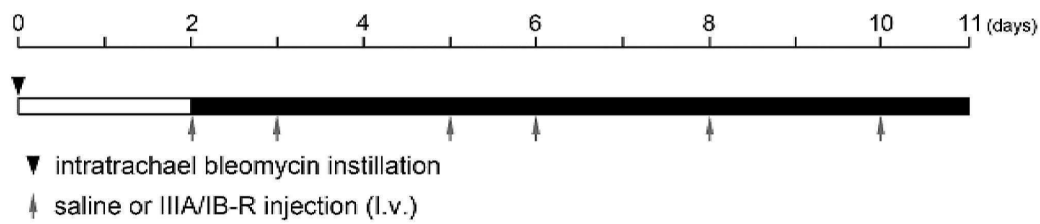


도면6b

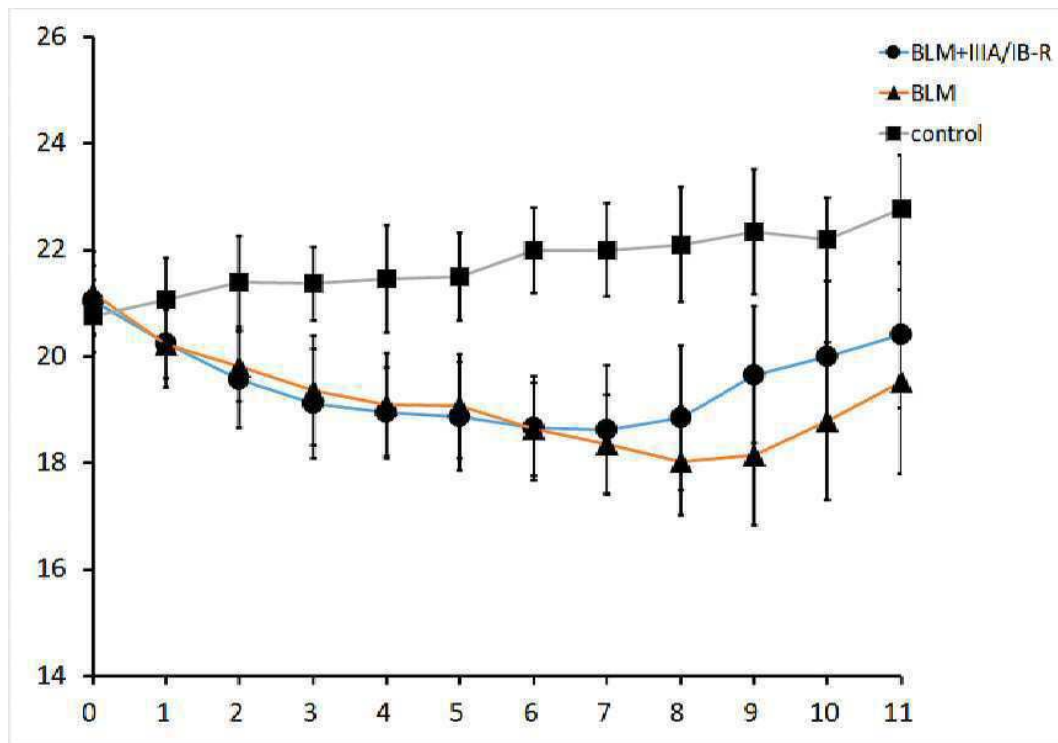


도면7

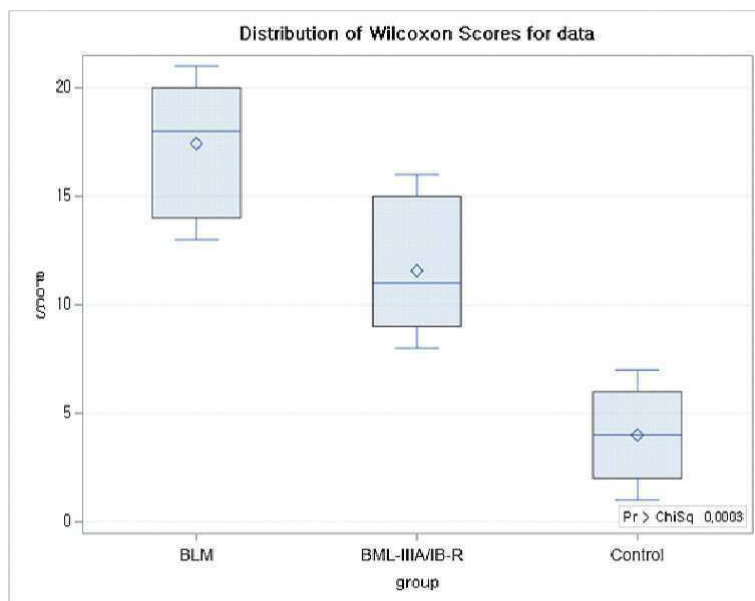
Bleomycin-induced pulmonary fibrosis



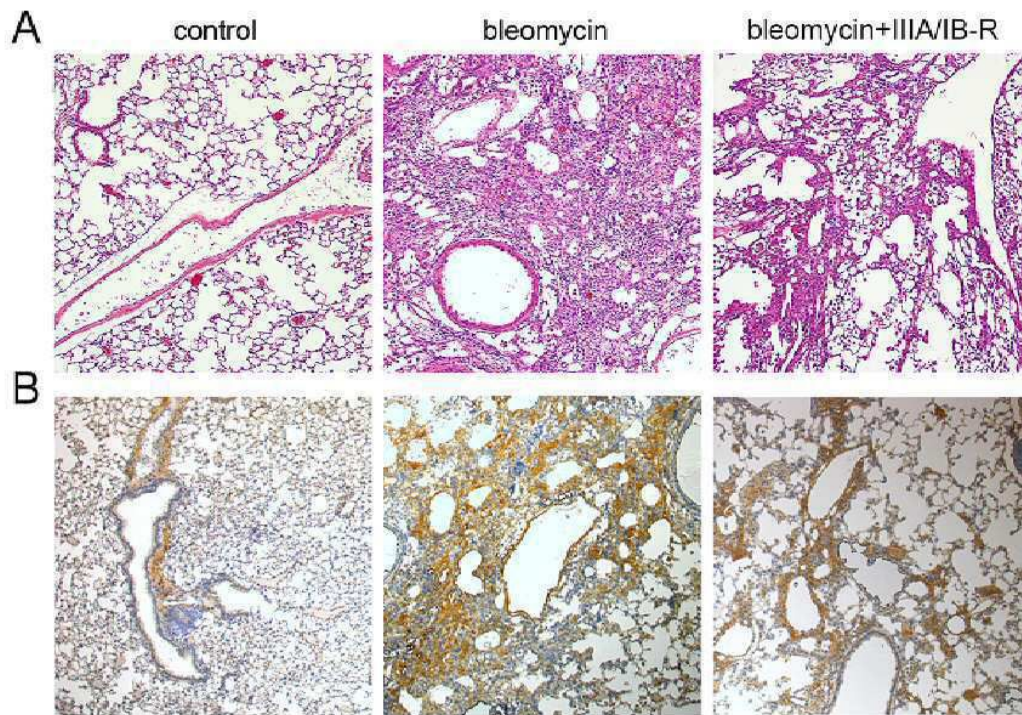
도면8



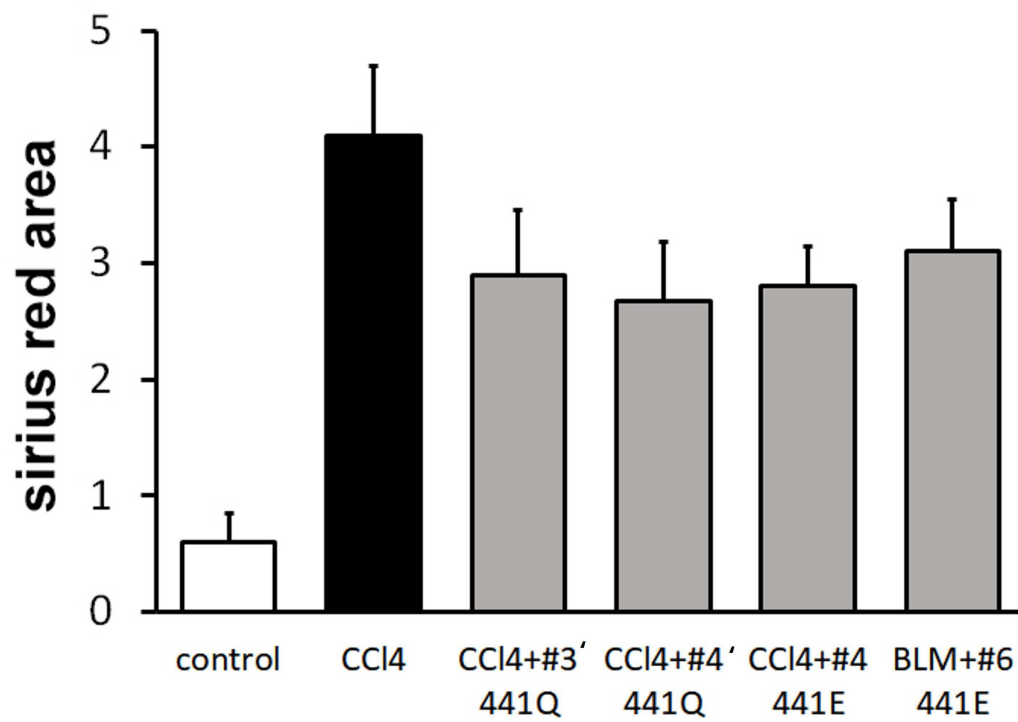
도면9



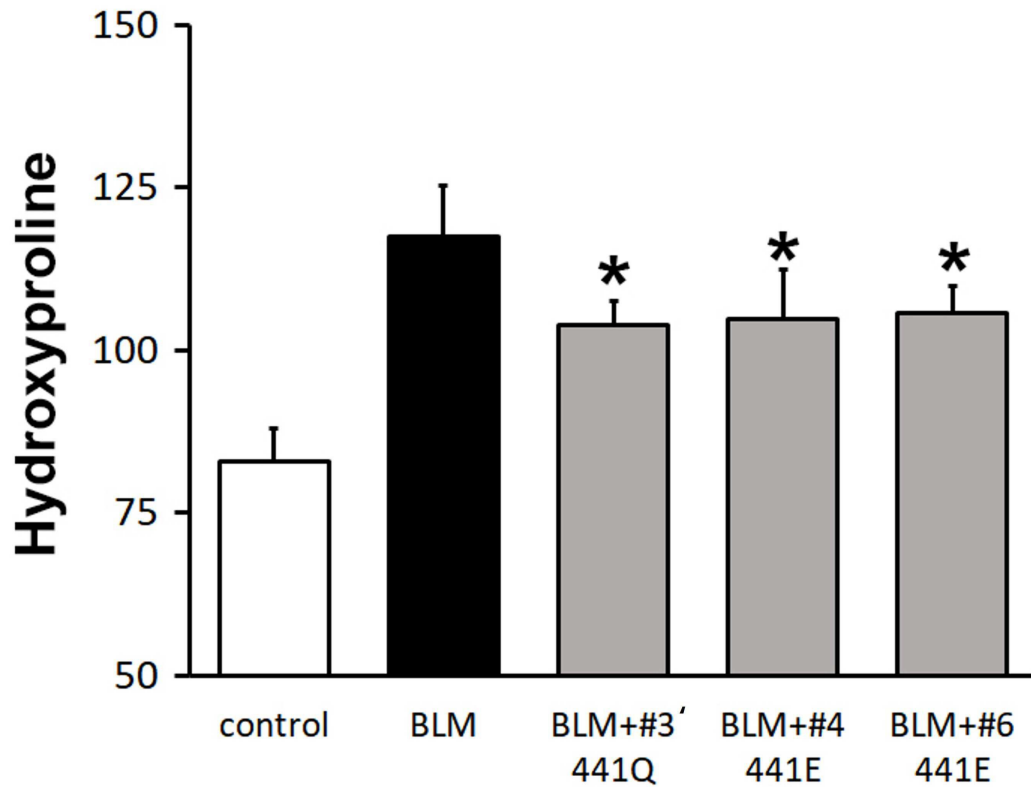
도면10



도면11



도면12



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.