



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0153528
(43) 공개일자 2024년10월23일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/47 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01) A61P 17/14 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/605 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/4703 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-0050272
(22) 출원일자 2024년04월15일
심사청구일자 2024년04월15일
- (30) 우선권주장
1020230048655 2023년04월13일 대한민국(KR)
- (71) 출원인
(주)메디엔진
서울특별시 성북구 안암로 145, 산학관 308호(안암동5가)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
- (72) 발명자
신민정
서울특별시 강남구 영동대로 230, 3동 101호(대치동, 우성 1차아파트)
정인혁
경기도 고양시 덕양구 무원로 63, 1002동 1201호 (행신동, 무원마을10단지아파트)
이세희
경기도 성남시 분당구 야탑로 102, 324호
- (74) 대리인
특허법인 에스제이파트너스

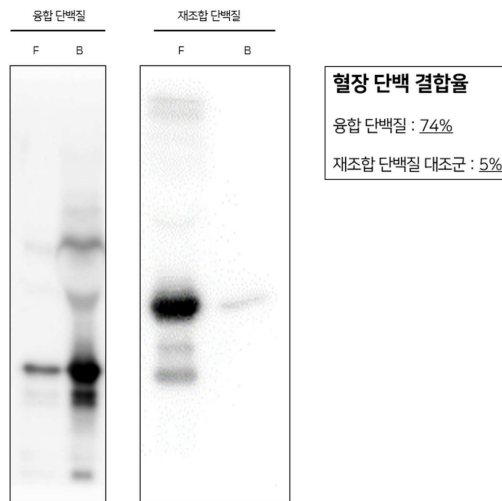
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 단일 융합 단백질 및 이를 포함하는 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 IF1 단백질 및 유래 펩타이드와 면역글로불린의 Fc 영역을 포함하는 융합 단백질 및 이를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 융합 단백질은 개선된 약리학적 효능, 체내 지속성 및 단백질의 안정성을 나타내며, 상기 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 암, 신경계 질환, 당뇨병, 비만 질환, 이상지질혈증, 대사질환, 비알콜성 지방간 질환, 비알콜성 지방간염, 탈모 방지 또는 발모 촉진, 근감소증, 비만성 근감소증을 위한 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 1/16 (2018.01)
A61P 17/14 (2018.01)
A61P 21/00 (2018.01)
A61P 25/00 (2018.01)
A61P 3/00 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/605 (2013.01)
C07K 2319/30 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 8 내지 10 및 46으로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열;

상기 아미노산 서열의 C-말단에 연결된 링커; 및

상기 링커의 말단에 연결된 Fc 서열로 이루어진 융합 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 링커는 서열번호 40 또는 서열번호 41의 서열인, 융합 단백질.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 Fc 서열은 서열번호 42 또는 서열번호 43의 서열인, 융합 단백질.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 서열번호 8 내지 10 및 46으로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열은 8번째, 9번째, 10번째, 11번째, 13번째, 14번째, 15번째, 16번째, 17번째, 22번째, 23번째, 24번째, 25번째, 26번째, 29번째, 30번째, 31번째, 32번째, 33번째, 34번째 및 31번째 아미노산으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산이 알라닌으로 치환된 것인, 융합 단백질.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 융합 단백질은 서열번호 1 내지 3, 13, 14 및 15로 이루어진 군에서 선택되는 서열로 이루어지는 것인, 융합 단백질.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 융합 단백질은 하기로 이루어지는 것인, 융합 단백질

서열번호 8 내지 10 및 46으로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열;

상기 아미노산 서열의 C-말단에 연결된 링커;

상기 링커의 말단에 연결된 서열번호 44로 이루어지는 GLP-1 (Glucagon like peptide-1) 서열;

상기 GLP-1 서열의 말단에 연결된 서열번호 45로 이루어지는 GLP-1 링커; 및

상기 GLP-1 링커의 말단에 연결된 Fc 서열로 이루어진 융합 단백질.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 융합 단백질은 서열번호 7의 서열로 이루어지는 것인, 융합 단백질.

청구항 8

제1항에 따른 융합 단백질을 유효 성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제1항에 따른 융합 단백질을 유효 성분으로 포함하는 근감소 관련 근육 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

제1항에 따른 융합 단백질을 유효 성분으로 포함하는 대사 증후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

제1항에 따른 융합 단백질을 유효 성분으로 포함하는 비알코올성 지방간의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 12

제1항에 따른 융합 단백질을 유효 성분으로 포함하는 탈모 예방 또는 발모 촉진용 약학적 조성물.

청구항 13

제1항에 따른 융합 단백질을 유효 성분으로 포함하는 뇌 신경세포 보호용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 IF1 단백질 및 유래 펩타이드와 면역글로불린의 Fc 영역을 포함하는 융합 단백질 및 이를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것으로, 상기 약학적 조성물은 암, 신경계 질환, 당뇨병, 비만 질환, 이상지질혈증, 대사 질환, 비알코올성 지방간 질환, 비알코올성 지방간염, 탈모 방지 또는 발모 촉진, 근감소증, 비만성 근감소증을 위한 치료 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

배경 기술

- [0003] 단백질 의약품은 인슐린, 성장인자, 항체와 같이 아미노산으로 구성된 의약품으로, 천연 단백질과 동일한 구조를 사용하는 1세대, 단백질 공학 기술을 응용하여 효능이 개선되거나 부수적인 물질을 결합하여 반감기가 늘어난 지속성 제제인 2세대로 구분할 수 있다.
- [0004] 단백질 의약품은 생물 유래 물질을 이용하여 의약품을 제조하기 때문에 고유 독성이 낮고 작용 기전이 명확하여 화학합성 의약품대비 치료 효과가 더 우수한 장점이 있다. 그러나 고차 구조를 가진 고분자 물질이기 때문에 저분자의 화합물에 비해 물리 화학적 안정성이 떨어지고, 이에 따라 생체 내에서 반감기가 짧은 단점은 존재한다. 또한, 생물체에서 생산하기 때문에 생물체의 종류나 배양 조건에 따라 단백질에 결합되는 수식물(modifications)의 종류와 정도가 다양하여 동질성을 확보하기가 쉽지 않은 문제가 있다.
- [0005] 특히 단백질은 아미노산의 치환, 추가 등에 의해 입체 구조가 변경되면 단백질 고유의 활성이 변경되기 때문에 고유의 활성은 유지하면서 반감기를 증가시키거나 또는 고유의 활성 자체를 증가시키는 것은 아직까지 어려운 상황이다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) 1. 바이오 의약품 시장동향, S&T Market Report, vol. 21. 2014.9

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 상기와 같은 상황에서 본 발명자들은 펩타이드의 생체 내 활성 및 반감기를 증가시키기 위해 연구하였고, 펩타이드에 Fc 서열을 결합시키자 반감기가 증가하고 펩타이드 자체의 활성 또한 증가하는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0009] 따라서 본 발명의 목적은 하기 구조의 융합 단백질 및 이를 포함하는 약학적 조성물을 제공하는 것이다:
- [0010] 서열번호 8 내지 10 및 46으로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열;

[0011] 상기 아미노산 서열의 C-말단에 연결된 링커; 및

[0012] 상기 링커의 말단에 연결된 Fc 서열.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 일 양상은 하기의 융합 단백질을 제공한다:

[0015] 서열번호 8 내지 10 및 46으로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열;

[0016] 상기 아미노산 서열의 C-말단에 연결된 링커; 및

[0017] 상기 링커의 말단에 연결된 Fc 서열.

[0019] 상기 서열번호 8로 이루어진 아미노산 서열은 야생형 ATPIF1 단백질이며, 서열번호 9, 10 및 46의 서열은 야생형 ATPIF1 단백질에서 유래된 서열이다. 서열번호 9의 서열은 야생형 ATPIF1 단백질의 1 내지 60번째 아미노산 서열로 이루어지며, 서열번호 10의 서열은 야생형 ATPIF1 단백질의 1 내지 47번째 아미노산 서열로 이루어진다. 서열번호 46의 서열은 서열번호 9의 서열에 G20S, F34M 변이가 도입된 것이다.

[0020] ATPIF1 (ATPase inhibitory factor 1)은 세포 내에서 발현되어 미토콘드리아 막에 존재하는 ATPase에 결합하여 회전운동을 방해하고 결과적으로 전자전달계에 의한 ATP 합성/분해를 방해하여 세포 내 에너지조절 및 미토콘드리아 항상성에 영향을 미치는 주요한 단백질이다.

[0021] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 링커 서열은 서열번호 40 또는 서열번호 41의 서열일 수 있으나 이에 제한되지 아니하며, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 펩타이드 링커로 사용되는 것이면 제한없이 사용될 수 있다.

[0022] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 Fc 서열은 서열번호 42 또는 서열번호 43의 서열일 수 있으나 이에 제한되지 아니하며, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 Fc 서열로 사용되는 것이면 제한없이 사용될 수 있다. 상기 Fc 서열은 면역글로불린(IgG1)의 Fc 서열일 수 있다.

[0023] 서열번호 43의 서열은 Fc 접합에 따라오는 효과기 기능 (effector function; 항체의 면역 반응 유도)을 효과적으로 억제함으로써, Fc 융합 물질이 약물로서 기능함에 있어 불필요한 면역 반응이 발생하는 것을 막기 위해 서열번호 42의 서열에 돌연변이를 도입한 서열이다.

[0024] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 서열번호 8 내지 10 및 46으로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열은 8번째, 9번째, 10번째, 11번째, 13번째, 14번째, 15번째, 16번째, 17번째, 22번째, 23번째, 24번째, 25번째, 26번째, 29번째, 30번째, 31번째, 32번째, 33번째, 34번째 및 31번째 아미노산으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산이 알라닌으로 치환된 것일 수 있다. 상기 언급한 위치들의 아미노산은 알라닌으로 치환되어도 ATP5B 단백질과의 결합능에 큰 차이가 없었다. 이 결과는 알라닌 치환에 의해 단백질의 구조가 크게 변화되지 않음을 의미하며 서열번호 8 내지 10 및 46으로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열의 생체 내 활성 또한 유지됨을 의미한다.

[0025] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 융합 단백질은 서열번호 1 내지 3, 13, 14 및 15로 이루어진 군에서 선택되는 서열로 이루어질 수 있으나 이에 제한되지 아니한다.

[0026] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 융합 단백질은 추가의 서열을 포함하여 하기 구조로 이루어질 수 있으며, 서열번호 7의 서열로 이루어질 수 있다;

[0027] 서열번호 8 내지 10 및 46으로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열;

[0028] 상기 아미노산 서열의 C-말단에 연결된 링커;

[0029] 상기 링커의 말단에 연결된 서열번호 44로 이루어지는 GLP-1 (Glucagon like peptide-1) 서열;

[0030] 상기 GLP-1 서열의 말단에 연결된 서열번호 45로 이루어지는 GLP-1 링커; 및

[0031] 상기 GLP-1 링커의 말단에 연결된 Fc 서열은 비만 유도 마우스에 투여하였을 때 세마글루티드 단독 투여군고 비교하여 더욱 유의미한 변화 (지방조직량 감소/근육 조직량 증가)를 보였다 ((도 18B, C).

- [0032] 한편, 본 발명의 발명자들은 상기 융합 단백질의 다양한 체내 활성을 확인하였다.
- [0034] 따라서, 본 발명의 다른 양상은 상기 융합 단백질을 유효 성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0035] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 서열번호 1 내지 3, 7 및 13 내지 15의 융합 단백질은 암세포를 효과적으로 사멸시키고, 활성 산소 발생을 촉진하므로 항암 활성이 우수하다 (도 3 및 도 4).
- [0036] 본 발명에서, 상기 암은 고형암일 수 있고, 구체적으로는 폐암, 난소암, 대장암, 결장암, 췌장암, 간암, 자궁경부암, 신장암, 위암, 전립선암, 유방암, 뇌종양, 자궁암 및 방광암으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0037] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"은 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 질환의 진행을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0038] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"는 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 질환의 증상이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0040] 또한, 본 발명은 상기 융합 단백질을 유효 성분으로 포함하는 대사 증후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0041] 상기 대사 증후군이란 동맥경화와 고혈압, 비만, 당뇨, 고지혈증 등 여러 가지 신진대사와 관련된 질환들이 동시다발적으로 나타나는 현상을 가리킨다. 따라서, 상기 대사 증후군에는 비만, 당뇨, 이상 지질혈증 등의 질환이 포함된다.
- [0042] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 융합 단백질은 지방 축적 억제 (실시에 3-3), 내당능 장애 개선 (실시에 4-5) 및 비만을 개선하므로 (실시에 4-3) 대사 증후군 치료 용도로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0044] 본 발명의 융합 단백질은 근감소 개선 효과도 우수하므로 (실시에 4-1) 근감소 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 활용될 수 있다.
- [0045] 상기 근감소 관련 질환이란 근감소증 (sarcopenia), 듀센 근이영양증 (Duchenne muscular dystrophy), 근위축증(muscular atrophy), 근무력증(myasthenia), 근이영양증(muscular dystrophy), 근육긴장증(myotonia), 근긴장 저하(hypotonia) 및 근력 약화(muscular weakness)로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0047] 또한, 본 발명의 다른 양상은 상기 융합 단백질을 유효 성분으로 포함하는 비알코올성 지방간의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0048] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 융합 단백질은 비알코올성 지방간을 유도한 동물 모델에서 간 손상, 혈중 콜레스테롤 및 중성지방을 감소시켜 비알코올성 지방간 개선 효과가 현저히 우수하다 (실시에 4-4).
- [0049] 본 명세서에서, 비알코올성 지방간(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD; 비알코올성 지방간 질환)은 술을 전혀 마시지 않거나 소량 마시는데도 간세포에 지방이 축적된 상태를 말한다. 한가지 병이라기보다 염증을 동반하지 않는 단순 지방간에서부터 지방간염 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH), 간경변(간경화)에 이르는 여러 형태의 간질환을 포함한다.
- [0050] 한편, 최근에는 비알코올성 지방간이란 용어 대신에 비만, 당뇨병과 같이 대사과정의 이상으로 발병하는 지방간염을 대사 기능 장애 관련 지방간염 (metabolic dysfunction-associated steatohepatitis, MASH)라고 부르고 있다.
- [0052] 본 발명의 또 다른 양상은 상기 융합 단백질을 유효 성분으로 포함하는 탈모 예방 또는 탈모 촉진용 약학 조성물을 제공한다.

- [0053] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 융합 단백질은 모낭 세포의 생존 및 증식을 촉진하므로 탈모 예방/개선, 발모 촉진 용도로 유용하게 사용될 수 있다 (실시예 3-5).
- [0055] 본 발명의 또 다른 양상은 상기 융합 단백질을 유효 성분으로 포함하는 뇌 신경세포 보호용 약학 조성물을 제공한다.
- [0056] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 융합 단백질은 로테논이라는 신경독소 물질로부터 뇌세포의 사멸을 억제하는 효과가 우수하므로 뇌 신경세포 보호 용도로 유용하게 사용될 수 있다 (실시예 3-4).
- [0058] 한편, 본 발명의 발명자들은 융합 단백질 이외에 서열번호 10으로 이루어지는 서열, 서열번호 11로 이루어지는 서열 및 서열번호 12로 이루어지는 서열의 생체 활성 또한 확인하였다.
- [0059] 따라서, 본 발명의 또 다른 양상은 서열번호 10, 11 및 12로 이루어지는 선택되는 서열을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용, 근감소 관련 근육 질환의 예방 또는 치료용, 대사 증후군의 예방 또는 치료용, 비알코올성 지방간의 예방 또는 치료용, 탈모 예방 또는 발모 촉진용 및 뇌 신경세포 보호용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0061] 본 발명의 일 예에 따른 약학적 조성물은 인간, 개, 닭, 돼지, 소, 양, 기니아피그 또는 원숭이를 포함하는 모든 동물에 적용될 수 있다.
- [0062] 본 발명의 일 예에 따른 약학적 조성물은 필요에 따라 희석제, 부형제, 활택제, 결합제, 봉해제, 완충제, 분산제, 계면 활성제, 착색제, 향료 또는 감미제 등의 첨가제를 포함할 수 있다. 본 발명의 일 예에 따른 약학적 조성물은 당업계의 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0063] 본 발명에서, 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0064] 본 발명의 일 예에 따른 약학적 조성물은 경구, 직장, 경피, 정맥 내, 근육 내, 복강 내, 골수 내, 경막 내 또는 피하 등으로 투여될 수 있다.
- [0065] 경구 투여를 위한 제형은 정제, 환제, 연질 또는 경질 캡슐제, 과립제, 산제, 액제 또는 유탁제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 비경구 투여를 위한 제형은 주사제, 점적제, 겔, 현탁제, 유제, 좌제, 패취 또는 분무제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0066] 상기 약학적 조성물은 멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액으로서 멸균 주사용 제제의 형태일 수 있다. 이 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제(예, 트윈80) 및 현탁화제를 사용하여 본 분야에 공지된 기술에 따라 제형될 수 있다. 멸균 주사용 제제는 또한 무독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매중의 멸균 주사용액 또는 현탁액(예, 1,3-부탄디올중의 용액)일 수 있다. 허용적으로 사용될 수 있는 비히클 및 용매로는 만니톨, 물, 링겔 용액 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 멸균 불휘발성 오일이 통상적으로 용매 또는 현탁화 매질로서 사용된다. 이러한 목적을 위해, 합성 모노 또는 디글리세라이드를 포함하여 자극성이 적은 어떠한 불휘발성 오일도 사용할 수 있다. 올레산 및 이의 글리세라이드 유도체와 같은 지방산이 약제학적으로 허용되는 천연오일(예, 올리브유 또는 피마자유), 특히 이들의 폴리옥시에틸화된 것과 마찬가지로 주사 제제에 유용하다.
- [0067] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 비경구 투여는 목적하는 치료가 국소 적용으로 접근이 용이한 부위 또는 기관과 관련이 있을 때 특히 유용하다. 본 발명의 조성물을 국소 투여하기 위한 담체로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 광유, 유동 파라핀, 백색 와셀린, 프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌, 폴리옥시프로필렌 화합물, 유화 왁스 및 물이 포함된다.
- [0068] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 유효 성분은 투여 받을 대상의 연령, 성별, 체중, 병리 상태 및 그 심각도, 투여 경로 또는 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 적용량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 이의 1일 투여 용량은 예를 들어 10 ng/kg/일 내지 10 mg/kg/일, 구체적으로는 0.1 µg/kg/일 내지 1

mg/kg/일, 더 구체적으로는 1 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 100 $\mu\text{g/kg/일}$, 보다 더 구체적으로는 2 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 50 $\mu\text{g/kg/일}$ 이 될 수 있으나, 용량에 따른 효과의 차이를 보이는 경우 이를 적절히 조절할 수 있다. 본 발명의 일 예에 따른 약학적 조성물은 1일 1회 내지 3회 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0070] 본 발명의 다른 양상은 상기 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용, 근감소 관련 근육 질환의 예방 또는 개선용, 대사 증후군의 예방 또는 개선용, 비알코올성 지방간의 예방 또는 치료용, 탈모 예방 또는 탈모 촉진용 및 뇌 신경세포 보호용 건강 기능성 식품 조성물을 제공한다.
- [0071] 본 발명에서 사용되는 용어, "개선"은 질환이 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0072] 상기 건강 기능성 식품 조성물에서 융합 단백질과 관련한 내용은 전술한 바와 동일하므로, 중복된 내용에 대해서는 기술을 생략한다.
- [0073] 본 발명의 일 예에 따른 식품 조성물의 제형은 특별히 한정되지 않으나, 예를 들어, 정제, 과립제, 분말제, 액제, 고형 제제 등으로 제형화될 수 있다. 각 제형은 유효 성분 이외에 해당 분야에서 통상적으로 사용되는 성분들을 제형 또는 사용 목적에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있으며, 다른 원료와 동시에 적용할 경우 상승 효과가 일어날 수 있다.
- [0074] 본 명세서에서 사용된 용어들은 특정 구체예들을 설명하기 위한 목적으로만 의도된 것이지 본 발명을 한정하고자 하는 의도가 아니다. 명사 앞에 개수가 생략된 용어는 수량을 제한하고자 하는 것이 아니라 언급된 명사 물품이 하나 이상 존재하는 것을 나타내는 것이다. 용어 "포함하는", "갖는", 및 "함유하는"은 열린 용어로 해석된다 (즉, "포함하지만 이에 한정되지는 않는"의 의미).
- [0075] 수치의 범위를 언급하는 것은 단지 그 범위 내에 속하는 각각의 별개의 수치들을 개별적으로 언급하는 것을 대신하는 쉬운 방법이기 때문이며, 그것이 아님이 명시되어 있지 않는, 각 별개의 수치는 마치 개별적으로 명세서에 언급되어 있는 것처럼 본 명세서에 통합된다. 모든 범위의 끝 값들은 그 범위 내에 포함되며 독립적으로 조합 가능하다.
- [0076] 본 명세서에 언급된 모든 방법들은 달리 명시되어 있거나 문맥에 의해 명백히 모순되지 않는 한 적절한 순서로 수행될 수 있다. 어느 한 실시예 및 모든 실시예 또는 예시적 언어 (예컨대, "~과 같은")를 사용하는 것은, 청구범위에 포함되어 있지 않는 한, 단지 본 발명을 더 잘 기술하기 위함이지 본 발명의 범위를 제한하고자 함이 아니다. 명세서의 어떤 언어도 어떤 비청구된 구성요소를 본 발명의 실시예 필수적인 것으로 해석되어서는 아니된다. 다른 정의가 없는 한, 본 명세서에 사용되는 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 갖는 사람에 의해 통상 이해되는 것과 같은 의미를 갖는다.

발명의 효과

- [0078] 본 발명에 따른 융합 단백질은 개선된 약리학적 효능, 체내 지속성 및 단백질 안정성을 나타내며, 상기 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 암, 신경계 질환, 당뇨병, 비만 질환, 이상 지질혈증, 대사질환, 비알코올성 지방간 질환, 비알코올성 지방간염, 탈모 방지 또는 탈모 촉진, 근감소증, 비만성 근감소증을 위한 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0080] 도 1은 본 발명의 융합 단백질 (서열번호 13) 또는 재조합 단백질 (서열번호 5)의 혈장 단백 결합물을 비교한 결과이다 (F: Free, 비결합 유리단백질, B: Bound, 결합 단백질).
- 도 2는 본 발명의 융합 단백질 (서열번호 1, 2, 3, 7) 또는 재조합 단백질 (서열번호 5)의 세포 활성을 C2C12 분화 혹은 미분화 근육세포에서 세포 신호경로 활성화 마커인 AKT와 S6 인산화 정도를 통해 비교한 결과이다.
- 도 3은 본 발명의 시험 물질 (서열번호 1, 2, 3, 4, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15) 또는 재조합 단백질 (서열번호 5)의 항암 활성을 MBA-MB-231 유방암 세포주에서 MTT 어세이를 통한 세포 생존능으로 비교한 결과이다 (*p

value<0.05 compared to control).

도 4는 본 발명의 물질 (서열번호 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15) 또는 제조합 단백질 (서열번호 5)의 항암 활성을 MBA-MB-231 유방암 세포주에서 ROS 어세이를 통한 활성산소 발생도로 비교한 결과이다 (*p value<0.05 compared to control).

도 5는 본 발명의 융합 단백질 (서열번호 13) 또는 합성 펩타이드 (서열번호 8)을 3T3-L1 지방 세포주에 처리한 후 UCP-1 발현도를 RT-PCR을 통해 비교한 결과이다 (*p value<0.05 compared to control).

도 6은 본 발명의 융합 단백질 (서열번호 13) 또는 합성 펩타이드 (서열번호 8)을 3T3-L1 지방 세포주에 처리한 후 (A) 지방구 크기 변화, (B) 총 지방구 면적 및 (C) 각 지방구별 가장 큰 직경을 비교한 결과이다 (*p value<0.05 compared to control).

도 7은 본 발명의 물질 (서열번호 1, 2, 3, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 15)의 지방 에너지 대사 활성도를 3T3-L1 지방 미분화세포에서 cAMP 어세이로 측정 비교한 결과이다 (*p value<0.05 compared to control).

도 8은 본 발명의 물질 (서열번호 1, 2, 3, 7, 9, 10, 11)을 SH-SY5Y 도파민성 뉴런 세포에 로테논과 같이 처리한 후 세포 생존능을 MTT 어세이로 측정 비교한 결과이다 (*p value<0.05 compared to control).

도 9는 본 발명의 물질 (서열번호 1, 2, 3, 7, 9, 10, 11)을 SH-SY5Y 도파민성 뉴런 세포에 로테논과 같이 처리한 후 활성산소 발생 억제도를 ROS 어세이로 측정 비교한 결과이다 (*p value<0.05 compared to control).

도 10는 본 발명의 물질 (서열번호 13, 15)을 모낭세포에 처리한 후 MTT 어세이로 세포 효과를 검증하여 나타낸 결과이다 (*p value<0.05 compared to control).

도 11은 본 발명의 물질 (서열번호 13, 14, 15)의 근감소 및 근육 관련 질환에 대한 생체 기능을 좌골신경절단 마우스 모델에서 (A) 근육 조직량 변화도, (B) 악력 측정값으로 정량화하여 대조군과 비교한 결과이다 (*p value<0.05 compared to control).

도 12은 본 발명의 물질 (서열번호 2)의 근감소 및 근육 관련 질환에 대한 생체 기능을 유전성 근위축 질환 마우스 모델에서 악력 측정값으로 정량화하여 대조군과 비교한 결과이다 (*p value<0.05 compared to control).

도 13은 본 발명의 물질 (서열번호 14)의 항암 활성을 유방암 이종이식 (xenograft) 마우스 모델에서 그 종양 성장 크기를 정량화하여 대조군과 비교한 결과이다 (*p value<0.05 compared to control).

도 14는 본 발명의 물질 (서열번호 1, 2)의 비만, 지질, 당대사, 근감소성 질환에 대한 생체 기능을 식이성 비만유도 마우스 모델에서 (A) 체중, (B) 혈당, (C) 간조직 내 지방구 크기, (D) 지방량, (E) 근육량을 측정하여 대조군과 비교한 결과이다 (ns, not significant, *p value<0.05 compared to control).

도 15는 본 발명의 물질 (서열번호 14)의 비만, 근감소성 비만, 근육 질환에 대한 예방성 생체 기능을 식이성 비만유도 마우스 모델에서 (A) 지방 조직 비율, (B) 근육 조직 비율, (C) 악력을 측정하여 대조군과 비교한 결과이다 (*p value<0.05 compared to control).

도 16은 본 발명의 물질 (서열번호 3)의 비만, 근감소성 비만, 근육 질환에 대한 생체 기능을 식이성 비만유도 마우스 모델에서 (A) 체중, (B) 지방 조직 비율, (C) 근육 조직 비율을 측정하여 대조군과 비교한 결과이다 (*p value<0.05 compared to control).

도 17은 본 발명의 물질 (서열번호 7)의 비만, 근감소성 비만, 근육 질환에 대한 생체 기능을 식이성 비만유도 마우스 모델에서 (A) 체중, (B) 지방 조직 비율, (C) 근육 조직 비율을 측정하여 물질 처리 전후 데이터를 비교한 결과이다 (*p value<0.05 compared to control).

도 18은 본 발명의 물질 (서열번호 14)의 비만, 근감소성 비만, 근육 질환에 대한 생체 기능을 유전성 랩틴 결함 마우스 모델에서 (A) 체중, (B) 지방 조직 비율, (C) 근육 조직 비율, (D) 악력을 측정하여 대조군과 비교한 결과이다 (*p value<0.05 compared to each group).

도 19은 본 발명의 물질 (서열번호 14, 15)의 비만, 근감소성 비만, 당대사 질환에 대한 생체 기능을 식이성 비만 유도 마우스 내당능 검사를 정량화 측정하여 대조군과 비교한 결과이다 (*p value<0.05 compared to control).

도 20은 본 발명의 물질 (서열번호 2)의 당대사 질환, 근육 질환과 그 합병증에 대한 생체 기능을 랩틴 수용체 장애 마우스 모델에서 악력을 정량화 측정하여 대조군과 비교한 결과이다 (*p value<0.05 compared to

control).

도 21은 본 발명의 물질 (서열번호 2)의 당대사 질환에 대한 생체 기능을 랩틴 수용체 장애 마우스 모델에서 혈 중 포도당 수준을 측정하여 대조군과 비교한 결과이다 (*p value<0.05 compared to control).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실시예 1: 형질 전환 대장균 세포의 제조 및 융합 단백질의 생산 및 검증

야생형 ATPIF1 단백질 (서열번호 8) 및 이의 단편 (서열번호 9, 10 및 12)의 융합 단백질을 만들기 위해 융합 단백질을 코딩하는 서열을 포함하는 벡터를 발현용 대장균 균주인 SHuffle에 형질전환시켜 생산하였다. 형질전환 균주는 LB 배지에서 37℃ 조건으로 2시간 배양하였다. 이후 배지에 이소프로필-β-D-티오갈락토피라노사이드 (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, IPTG)을 첨가하여 추가로 12시간 배양하였다. 배양이 끝나면 대장균 세포만 회수하고, 대장균 세포를 세포 파쇄 (sonication) 과정과 원심분리를 통해 수용성 분획과 불용성 분획으로 분리하였다. 각 수용성 분획으로부터 친화도 기반 레진을 통해 발현된 융합 단백질을 정제하였다: 서열번호 1, 2, 3, 7, 13, 14 및 15의 단백질: Protein A resin; 서열번호 4 및 6의 단백질: Sepharose resin).

또한, 전문기관에 의뢰하여 본 발명에서 사용할 펩타이드를 합성하였다.

아래 표 1과 표 2에 본 발명에서 사용한 융합 단백질과 펩타이드 설명, 이의 서열을 정리하였다. 대조군으로 사용할 융합 단백질과 합성 펩타이드는 His tag Human ATPIF1 (서열번호 5)과 Human ATPIF1 (서열번호 8)이다.

표 1

서열번호	생산 방식	물질 상세 설명
1	재조합 단백질	단축형 물질(1-60)-단축형 링커-Fc 융합 (mutant 개량)
2	재조합 단백질	단축형 물질(1-60)-반복형 링커-Fc 융합 (mutant 개량)
3	재조합 단백질	단축형 아미노산 개량 물질(1-60; G20S, F34M 변이 도입)-반복형 링커-Fc 융합 (mutant 개량)
4	재조합 단백질	GST tag-야생형 물질(1-81)
5	재조합 단백질	His tag-야생형 물질(1-81)
6	재조합 단백질	GST tag-단축형 물질(1-60)
7	재조합 단백질	단축형 물질(1-60)-링커-GLP1서열-GLP1-링커-Fc 융합
8	합성 펩타이드	야생형 물질(1-81)
9	합성 펩타이드	단축형 물질(1-60)
10	합성 펩타이드	단축형 물질(1-47)
11	합성 펩타이드	단축형 아미노산 개량 물질(10-49; H49K 변이 도입)
12	합성 펩타이드	단축형 물질(8-35)
13	재조합 단백질	야생형 물질(1-81)-단축형 링커-Fc 융합
14	재조합 단백질	단축형 물질(1-60)-단축형 링커-Fc 융합
15	재조합 단백질	단축형 물질(1-47)-단축형 링커-Fc 융합
16	합성 펩타이드	단축형 물질(8-35) 아미노산 Ala 치환 (8)
17	합성 펩타이드	단축형 물질(8-35) 아미노산 Ala 치환 (9)
18	합성 펩타이드	단축형 물질(8-35) 아미노산 Ala 치환 (10)
19	합성 펩타이드	단축형 물질(8-35) 아미노산 Ala 치환 (11)
20	합성 펩타이드	단축형 물질(8-35) 아미노산 Ala 치환 (13)
21	합성 펩타이드	단축형 물질(8-35) 아미노산 Ala 치환 (14)
22	합성 펩타이드	단축형 물질(8-35) 아미노산 Ala 치환 (15)
23	합성 펩타이드	단축형 물질(8-35) 아미노산 Ala 치환 (16)
24	합성 펩타이드	단축형 물질(8-35) 아미노산 Ala 치환 (17)
25	합성 펩타이드	단축형 물질(8-35) 아미노산 Ala 치환 (19)
26	합성 펩타이드	단축형 물질(8-35) 아미노산 Ala 치환 (20)
27	합성 펩타이드	단축형 물질(8-35) 아미노산 Ala 치환 (22)
28	합성 펩타이드	단축형 물질(8-35) 아미노산 Ala 치환 (23)
29	합성 펩타이드	단축형 물질(8-35) 아미노산 Ala 치환 (24)

30	합성 펩타이드	단축형 물질(8-35) 아미노산 Ala 치환 (25)
31	합성 펩타이드	단축형 물질(8-35) 아미노산 Ala 치환 (26)
32	합성 펩타이드	단축형 물질(8-35) 아미노산 Ala 치환 (27)
33	합성 펩타이드	단축형 물질(8-35) 아미노산 Ala 치환 (29)
34	합성 펩타이드	단축형 물질(8-35) 아미노산 Ala 치환 (30)
35	합성 펩타이드	단축형 물질(8-35) 아미노산 Ala 치환 (31)
36	합성 펩타이드	단축형 물질(8-35) 아미노산 Ala 치환 (32)
37	합성 펩타이드	단축형 물질(8-35) 아미노산 Ala 치환 (33)
38	합성 펩타이드	단축형 물질(8-35) 아미노산 Ala 치환 (34)
39	합성 펩타이드	단축형 물질(8-35) 아미노산 Ala 치환 (35)
40	-	단축형 링커
41	-	반복형 링커
42		Fc 서열 (mutant 개량)
43	-	Fc 서열
44	-	GLP1 서열
45	-	GLP1 링커
46	-	단축형 아미노산 개량 물질(1-60; G20S, F34M 변이 도입)

표 2

[0089]

서열 번호	서열
1	GSDQSENVDRGAGSIREAGGAFGKREQAEEERYFRAQSREQLAALKKHHEEEIVHHKKEIGGGGSEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
2	GSDQSENVDRGAGSIREAGGAFGKREQAEEERYFRAQSREQLAALKKHHEEEIVHHKKEIGGGGSGGGSGGGGSEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
3	GSDQSENVDRGAGSIREAGS A FGKREQAEEERYMRAQSREQLAALKKHHEEEIVHHKKEIGGGGSGGGSGGGGSEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
4	SPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAIESMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDLFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSGSDQSENVDRGAGSIREAGGAFGKREQAEEERYFRAQSREQLAALKKHHEEEIVHHKKEIERLQKEIERHKQKIKMLKHDD
5	MGSHHHHHSSGLVPRGSHMGSDQSENVDRGAGSIREAGGAFGKREQAEEERYFRAQSREQLAALKKHHEEEIVHHKKEIERLQKEIERHKQKIKMLKHDD
6	SPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAIESMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDLFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSGSDQSENVDRGAGSIREAGGAFGKREQAEEERYFRAQSREQLAALKKHHEEEIVHHKKEI
7	GSDQSENVDRGAGSIREAGGAFGKREQAEEERYFRAQSREQLAALKKHHEEEIVHHKKEIGGGGSGGGSGGGGSHGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGGGGGGGGGGGGSAESKYGPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
8	GSDQSENVDRGAGSIREAGGAFGKREQAEEERYFRAQSREQLAALKKHHEEEIVHHKKEIERLQKEIERHKQKIKMLKHDD
9	GSDQSENVDRGAGSIREAGGAFGKREQAEEERYFRAQSREQLAALKKHHEEEIVHHKKEI
10	GSDQSENVDRGAGSIREAGGAFGKREQAEEERYFRAQSREQLAALKK
11	RGAGSIREAGGAFGKREQAEEERYFRAQSREQLAALKKH
12	VDRGAGSIREAGGAFGKREQAEEERYFR
13	GSDQSENVDRGAGSIREAGGAFGKREQAEEERYFRAQSREQLAALKKHHEEEIVHHKKEIERLQKEIERHKQKIKMLKHDDGGGGSEPKSQDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

14	GSDQSENVDRGAGSIREAGGAFGKREQAEEERYFRAQSREQLAALKKHHEEEIVHHKKEIGGGGSEPKSQDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
15	GSDQSENVDRGAGSIREAGGAFGKREQAEEERYFRAQSREQLAALKKGGGSEPKSQDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
16	ADRGAGSIREAGGAFGKREQAEEERYFR
17	VARGAGSIREAGGAFGKREQAEEERYFR
18	VDAGAGSIREAGGAFGKREQAEEERYFR
19	VDRAGSIREAGGAFGKREQAEEERYFR
20	VDRGAASIREAGGAFGKREQAEEERYFR
21	VDRGAGSIREAGGAFGKREQAEEERYFR
22	VDRGAGSAREAGGAFGKREQAEEERYFR
23	VDRGAGSIAEAGGAFGKREQAEEERYFR
24	VDRGAGSIRAAGGAFGKREQAEEERYFR
25	VDRGAGSIREAAGAFGKREQAEEERYFR
26	VDRGAGSIREAGAAFAGKREQAEEERYFR
27	VDRGAGSIREAGGAAGKREQAEEERYFR
28	VDRGAGSIREAGGAFKREQAEEERYFR
29	VDRGAGSIREAGGAFGAREQAEEERYFR
30	VDRGAGSIREAGGAFGKAEQAEEERYFR
31	VDRGAGSIREAGGAFGKRAQAEEERYFR
32	VDRGAGSIREAGGAFGKREAAEEERYFR
33	VDRGAGSIREAGGAFGKREQAAEERYFR
34	VDRGAGSIREAGGAFGKREQAEAERYFR
35	VDRGAGSIREAGGAFGKREQAEEARYFR
36	VDRGAGSIREAGGAFGKREQAEEEAERYFR
37	VDRGAGSIREAGGAFGKREQAEEERAERFR
38	VDRGAGSIREAGGAFGKREQAEEERYAR
39	VDRGAGSIREAGGAFGKREQAEEERYFA
40	GGGGS
41	GGGSGGGSGGGGS
42	EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
43	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
44	HGEFTFTSDVSSYLEEQAAKEFI AWLVKGGG
45	GGGSGGGSGGGGSA
46	GSDQSENVDRGAGSIREAGSAFGKREQAEEERYMRAQSREQLAALKKHHEEEIVHHKKEI

[0091] 실시예 2: 융합 단백질의 생체 시스템 내 안정성 개선 평가

[0092] 실시예 1에서 생산한 융합 단백질이 안정적으로 생체 내에서 존재하는지 다음과 같이 평가하였다. 평가에는 C57BL/6 계통의 10주령 마우스를 사용하였고, 마우스를 정상 식이 및 12/12시간 밤/낮 주기를 제공하는 전문 사육 시설에서 사육한 후 실험에 사용하였다.

[0094] 2-1. 반감기 확인

[0095] 마우스에 합성 펩타이드 (서열번호 8)와 융합 단백질 (서열번호 13) 각각을 2.5 mg/kg 농도로 주입하고, 주입 0, 0.5, 2, 4, 24시간 후에 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액을 원심분리하고 얻어진 혈장 (plasma)을 분석하였다. 이 때, 효과적인 물질 정량을 수행하고자 각 물질은 사전에 Dylight 680 Near-Infrared dye (NIR)을 결합시켜 주입하였으며, 최종 채취된 혈액 샘플을 SpectraMax i3 microplate reader 기기로 형광신호를 관찰하여 시

험을 진행하였다. 그 결과, 합성 펩타이드 (서열번호 8)는 1.6시간의 반감기를 나타내는 반면 융합 단백질 (서열번호 13)은 18.9시간의 반감기를 보여 반감기가 약 11.8배 증가한 것을 확인하였다 (표 3). 이러한 결과는 융합 단백질이 생체 시스템에서 안정성이 더욱 높다는 것을 의미한다.

표 3

시험 물질	반감기
합성 펩타이드 (서열번호 8)	1.6 시간
융합 단백질 (서열번호 13)	18.9 시간

ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: 효소 결합 면역 흡착제 분석)로 융합 단백질의 반감기를 추가로 측정하였다. C57BL6/J 마우스에 각 시험 물질을 5 mg/kg 농도로 피하 주사한 후 시간별로 혈액을 분리하였다.

포획 항체가 코팅된 96-웰 플레이트에 분리한 혈액을 첨가하고, PBS (phosphate buffered saline)로 각 웰을 3회 세척하였다. 각 웰에 검출 용액을 첨가하고 450 nm에서 그 파장값을 읽어 분석하였다. 분석 결과, ATP1F1 전장 서열을 사용한 서열번호 8, 서열번호 13의 결과 (표 3)와 비교하여 융합단백질 (서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3)의 반감기가 각 39.6, 45.6, 74.7 시간으로 증대된 것을 확인하였다 (표 4).

표 4

물질	반감기
융합 단백질 (서열 1)	39.6 시간
융합 단백질 (서열 2)	45.6 시간
융합 단백질 (서열 3)	74.7 시간

이러한 반감기 증가는 혈장 단백 결합을 (Plasma protein binding test, PPB)을 측정하여 추가로 확인하였다. 혈장 단백질 (예를 들어, 알부민)과 결합하면 단백질 분해 효소로부터 상대적으로 보호받거나 크기가 증가하여 배출이 늦어지는데 결과적으로 혈액 내 순환 시간이 증가되어 반감기 또한 증가된다.

마우스의 혈장과 융합 단백질 (서열번호 13), 또는His tag-야생형 물질(1-81) (서열번호 5) 각각을 5 μ M의 농도로 37°C에서 4시간 인큐베이션시켰다. 이후 100 kD 필터로 원심분리하여 혈장 단백질과 결합한 물질 분획 혹은 결합하지 않은 물질 분획을 얻었다. 얻은 각 분획들을 웨스턴 블롯 (Western blot)으로 평가하였다. 결과, 융합 단백질 (서열번호 13)은 혈장 단백질과 74%의 결합율을 보이는 반면 His tag-야생형 물질(1-81) (서열번호 5)의 결합율은 5%에 그쳐 본 발명의 융합 단백질이 더욱 높은 생체 내 안정성을 나타내는 것을 알 수 있었다 (도 1).

실시예 3: 융합 단백질의 시험관 (in vitro) 활성도 평가

본 발명에서 제작된 융합 단백질이 본래의 단백질처럼 효과적으로 기능을 발휘하는지 확인하고자 세포 시스템에서 물질 활성도를 대조군과 비교하였다.

3-1. 근육세포

근감소 질환 관련 기능을 평가하고자, 미분화된 C2C12 마우스 골격근 세포주 (mouse myoblast cell line) 또는 근관으로 분화가 완료된 세포주에 각 시험 물질을 처리하였다. 세포주의 근관 (myotube)으로의 분화는 배양 배지에 2% 말 혈청 (Horse serum)을 첨가, 2일에 한번 새로운 배지로 교체하는 것을 총 4일간 진행하여 수행하였다.

미분화 또는 분화 세포주에 시험 물질인 융합 단백질 (서열번호 1, 2, 3, 7, 14 및 15)을 100 nM (Control: PBS 처리군) 농도로 2시간 동안 처리하였다. 이후 즉시 PBS로 세포를 1회 세척하고 RIPA 버퍼 (Radioimmunoprecipitation assay buffer)로 세포를 용해시켰다. 웨스턴 블롯으로 Akt 및 S6의 활성도 (인산화, p-Akt/p-S6)를 관찰하였다. Akt 인산화는 잘 알려진 세포신호경로 활성화의 마커로, 인슐린에 의한 당대사

촉진과 근육 생합성 촉진 등 근육 세포에 이로운 효과를 나타내는 지표이다. 마찬가지로 S6 인산화는 잘 알려진 mTOR 활성도의 마커로서, mTOR의 활성화는 근육 생합성과 다양한 세포 신호경로를 나타내는 지표이다.

분화 세포주에서 Akt 및 S6의 활성 확인 결과 융합 단백질 (서열번호 1, 2, 3, 7, 14 및 15)이 control 및 His tag-야생형 물질(1-81) (서열번호 5)보다 현저히 높은 활성도를 나타내는 것을 확인하였다 (도 2 및 표 5, 6).

표 5

물질	활성도(Control 대비 증가 %)			
	미분화		분화	
	Akt	S6	Akt	S6
서열번호 5	165%	207%	248%	262%
서열번호 2	269%	257%	360%	469%
서열번호 3	421%	302%	463%	587%
서열번호 7	377%	513%	411%	446%
서열번호 1	314%	294%	231%	486%

표 6

물질	활성도(Control 대비 증가 %)	
	Akt	S6
제조합 단백질 (서열번호 5) 대조군	254%	217%
융합 단백질 (서열번호 14) 실험군	601%	247%
융합 단백질 (서열번호 15) 실험군	548%	232%

3-2. 암세포

다음으로 MDA-MB-231 삼중 음성 유방암 세포주 (triple-negative breast cancer cell line)에 시험 물질인 융합 단백질 (서열번호 1, 2, 3, 7, 14, 15) 및 단축형 서열 (서열번호 9, 10, 11, 12)을 1 μ M (Control: PBS) 농도로 48시간 동안 처리하였다. 이후 PBS로 세포를 1회 세척하고 세포를 무혈청 버퍼(serum-free buffer)에 현탁시켰다. 여기에 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 물질을 0.5 mg/ml로 첨가하여 37℃에서 2시간 인큐베이션시켰다. 이후 PBS로 1회 세척하고, DMSO로 15분간 세포를 용해시켰다. 새로운 플레이트로 용액을 이동시키고 마이크로플레이트 리더기로 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.

측정 결과, Control, GST tag-야생형 물질(1-81) (서열번호 4) 및 His tag-야생형 물질(1-81) (서열번호 5)과 비교하여 융합 단백질 (서열번호 1, 2, 3, 7, 14, 15) 또는 단축형 서열 (서열번호 9, 10, 11, 12)을 처리했을 때 세포 생존능이 현저히 낮은 것을 알 수 있었다 (도 3). 이러한 결과는 야생형 물질(1-81) (서열번호 4, 5)을 다른 서열과 융합시키거나 일부 서열만 사용했음에도 불구하고 항암 효과가 증대되었음을 의미한다.

추가로 암 세포 사멸에 중요한 역할을 하는 활성산소 발생을 알아보기 위하여 MDA-MB-231 세포주에 각 시험 물질을 1 μ M (Control: PBS) 농도로 24시간 동안 처리하였다. 이후 세포를 DCF-DA로 염색하고 그 형광값을 485/535 nm에서 관찰, 비교하였다.

그 결과, 활성산소 역시 Control 및 His tag-야생형 물질 (서열번호 5) 대비 융합 단백질 (서열번호 1, 2, 3, 7, 13, 14, 15) 및 단축 서열 (서열 9, 10, 11) 처리군에서 더욱 많이 발생되는 것을 확인하였다 (도 4).

3-3. 지방 세포

융합 단백질의 지방대사 관련 기능성을 관찰하고자 3T3-L1 마우스 전구지방세포주 (mouse pre-adipocyte cell

line)를 세포주 자체 (미분화) 혹은 지방세포로 분화시켜 사용하였다. 지방세포로의 분화는 3T3-L1 세포를 DMEM, 10% FBS, 10 ug/ml 인슐린, 0.5 mM IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthine), 1 uM 덱사메타손 (dexamethasone)을 포함하는 배지에서 2일간 1차 분화를 유도하고, 나머지 4일간 DMEM, 10% FBS, 10 ug/ml 인슐린 포함 배지로 2차 분화를 유도하여 진행하였다. 최종 분화가 완료된 지방세포는 시험 물질을 30시간 동안 100 nM 농도로 처리 (Control: PBS)한 후 각 시험에 활용하였다.

[0125] UCP-1 (uncoupling protein 1) 은 대표적인 열발생 (thermogenesis) 관련 바이오마커로서, 지방세포의 갈색지방화 및 에너지 대사 활성화를 나타낸다. 융합 단백질 처리에 의한 UCP-1 mRNA 및 단백질 발현 변화를 관찰하기 위해 각 시험물질을 처리한 세포에서 mRNA와 단백질을 분리하여 RT-PCR과 웨스턴 블롯을 수행하였다. 수행 결과 UCP-1의 mRNA 수준이 융합 단백질 (서열번호 13) 처리에 의해 현저히 증가하는 것을 확인하였다 (도 5). 이 결과는 융합 단백질 (서열번호 13)이 지방 세포의 에너지 조절 기능을 가짐을 의미한다.

[0127] 또한, 지방 세포의 지방구를 BODIPY 493/503 염색시료로 염색 후 공초점 이미지 스캐닝을 수행하여 지방구 크기 및 직경을 분석하였다. 그 결과 융합 단백질 (서열번호 8, 13) 처리에 의해 지방구 크기, 지방구 총 면적, 세포당 최대 지방구 직경이 유의미한 수준으로 감소하는 것을 알 수 있었다 (도 6).

[0129] 다음으로, 지방분해 및 에너지대사에 기여하는 신호경로 전달물질인 cAMP (cyclic AMP)의 변화를 미분화 지방세포에서 평가하였다. 미분화 세포에 30분 동안 시험 물질을 100 nM (Control: PBS) 농도로 0.5 mM IBMX와 함께 처리하였다. 이후 hTRF (Homogeneous Time Resolved Fluorescence) 기법으로 cAMP의 수준을 평가하였다 (cAMP Gs dynamic kit from Cisbio 활용). 측정 결과, 대조군 (Control) 및 His tag-야생형 물질(1-81) (서열번호 5) 대비 융합 단백질 (서열번호 1, 2, 3, 7, 13, 14, 15) 및 단축 서열 (서열 9, 10, 11) 처리군에서 cAMP의 수준이 더욱 높은 것을 확인하였다 (도 7).

[0131] 3-4. 신경세포

[0132] 융합 단백질의 신경보호 관련 기능성을 다음과 같이 확인하였다.

[0133] SH-SY5Y 도파민성 신경세포주 (dopaminergic neuron cell line)에 독성 물질인 로테논 (rotenone) 1 μM과 각 시험 물질 100 nM을 동시에 처리하였다. 24시간 후 MTT 세포 생존능 평가 혹은 활성산소 감소 효과를 관찰하였다.

[0134] 관찰 결과, 로테논에 의해 유도된 독성 환경에서 Control (Rotenone 단일 처리군) 대비 융합 단백질 (서열번호 1, 2, 3, 7) 및 단축 서열 (서열번호 9, 10, 11) 처리군에서 세포 생존율은 유의미하게 증가하고 (도 8), 활성산소 발생은 유의미하게 억제됨을 알 수 있었다 (도 9); 도 8과 도 9에서 X축에 기재된 "Control"은 시험 물질만 처리한 것이고, "+Rotenone"은 로테논과 시험 물질을 같이 처리한 것이다.

[0136] 3-5. 발모 및 탈모 관련 기능

[0137] 본 발명의 시험 물질이 탈모 방지 혹은 발모 촉진의 효과가 있는지 다음과 같이 평가하였다. 구체적으로 모낭 세포(dermal papilla cells)를 활용, 모낭 세포의 세포 증식을 평가하여 탈모의 원인이 되는 두피 조직 내 모낭 세포의 탈락을 개선하거나 모낭 증가로 인한 발모 효능이 있는지 관찰하였다.

[0138] 모낭 세포에 각 시험 물질 100 nM (control: PBS)을 24시간 동안 처리하고, MTT 어세이로 세포 증식 정도를 평가하였다. 그 결과, Control과 비교하여 His tag-야생형 물질(1-81) (서열번호 5), 융합 단백질 (서열번호 13, 15) 처리군에서 세포 생존능이 유의미하게 증가됨을 알 수 있었다. 특히, 융합 단백질 처리군은 His tag-야생형 물질(1-81) 처리군보다 개선된 세포 증식 촉진 효과를 보여 탈모 치료 효과를 검증하였다 (도 10).

[0140] 3-6. 결합능 평가

[0141] 서열 내 치환 가능 잔기에 대해 평가하기 위하여, SPR (surface plasma resonance) 시험을 진행하였다. 구체적으로 CM5 칩에 아민-결합 (amine-conjugation)으로 ATP5B 단백질을 결합시킨 후 유속 50 μl/분 조건에서 각

시험 물질의 접촉을 관찰하고, 그 굴절도를 측정하였다. 이후 각 결합 유닛 (binding unit)을 환산하여 결합능을 비교 평가하였다. 서열번호 17-40의 서열은 서열번호 16의 단축 서열에서 각 아미노산 잔기를 비활성 아미노산인 알라닌으로 치환하여 결합능에 미치는 아미노산 잔기의 기여도를 평가하였다. 결합능 10% 이상 감소는 치환에 부정적인 영향을 미치는 것으로 간주하였다.

[0142] 평가 결과, 대조 단축 서열 (서열번호 12) 대비 각 서열 (서열번호 16-39)의 결합도를 관찰하였을 때, 서열번호 16 대비 결합능이 10% 이상 감소된 서열번호 25, 26 및 32의 서열을 제외하고 이외 잔기의 아미노산 치환 효능을 확인하였다 (표 7).

표 7

서열	결합 (%)	S.D	CV (%)
12	100.0	0.0	0.0
16	101.4	6.4	6.3
17	91.6	12.0	13.1
18	104.2	12.7	12.2
19	100.0	0.0	0.0
20	98.5	13.4	13.6
21	98.8	2.1	2.2
22	99.3	4.8	4.9
23	97.0	2.9	3.0
24	168.7	15.5	9.2
25	89.6	6.3	7.0
26	68.0	21.1	31.0
27	94.0	21.9	23.3
28	102.3	2.0	1.9
29	100.5	11.8	11.8
30	85.2	3.3	3.9
31	94.1	10.2	10.9
32	89.5	11.2	12.5
33	96.7	3.1	3.3
34	94.0	7.8	8.3
35	157.9	21.2	13.4
36	426.0	156.8	36.8
37	145.8	18.3	12.6
38	92.1	6.1	6.6
39	109.6	43.2	39.4

[0145] 이러한 결과는 일부 아미노산 서열을 알라닌으로 치환해도 펩타이드의 구조가 정상적으로 유지되고, 펩타이드의 생체 내 기능 또한 유지될 수 있음을 의미한다.

[0147] 실시예 4: 융합 단백질의 생체 (in vivo) 활성도 평가

[0148] 상기 제작된 융합 단백질의 효과적인 기능 발현이 가능한지 확인하고자 마우스 모델을 활용한 생체 시스템에서의 물질 활성도를 대조군과 당대사 처리 능력을 비교하여 평가하였다.

[0150] 실시예 4-1: 근육 질환 효능 평가 - 마우스 질환 모델

[0151] [좌골신경절단 모델]

[0152] 근감소가 일어나는 근육 질환에 대한 시험 물질의 효과를 좌골신경절단 마우스 모델을 활용하여 평가하였다.

[0153] 좌골신경절단 마우스 모델에서 근육 위축은 다음과 같이 유도하였다. C57BL/6 수컷 마우스의 대퇴부 근육을 가로로 절개하여 좌골신경을 노출시킨 다음 좌골신경 (sciatic nerve)을 절단하여 근조직 내 신경을 약화시키고,

근육 위축 (atrophy)을 유도하였다. 절개부위는 봉합을 진행하였으며, 수술이 끝난 후 1주일간의 회복 기간을 제공하였다.

[0154] 회복기간을 거친 각 마우스에 그룹별로 배정된 시험 물질 (Control-PBS; 및 융합 단백질)을 5.0 mg/kg 농도로 9주 동안 주 6회 피하로 주사하였다 (Control: n=8, No.13: n=9, No.14: n=9, No.15: n=8).

[0155] 근손실 개선 효과는 시험 물질 투여 4주차에 X선 체성분 분석기로 측정하였고 (DXA assay), 근기능 개선 효과는 악력 (grip strength)를 측정하여 비교하였다.

[0156] 그 결과, 수술 부위 근육에서 근위축이 성공적으로 진행되어 체성분 분석시 해당 부위 근육량이 대조군에서 감소하는 반면, 융합 단백질 (서열 13, 14, 15) 투여군에서는 근육량이 유의미하게 증가된 것을 확인하였다 (도 11A). 마찬가지로, 악력 테스트에서도 대조군 대비 융합 단백질 투여군에서 높은 퍼포먼스를 관찰하여, 근 기능이 개선된 것을 관찰하였다 (도 11B).

[0158] [듀센 근이영양증 (Duchenne muscular dystrophy, DMD)]

[0159] 근감소가 일어나는 근육 질환에 대한 시험 물질의 효과를 유전형 변형을 통해 진행성 근육 퇴화를 일으키는 듀센 근이영양증 마우스 모델 (C57BL/10ScSn-Dmdmdx/J)에서 평가하였다.

[0160] 상기 마우스 모델을 Control과 실험군으로 구분하였다. Control에는 PBS, 실험군에는 융합 단백질 (서열번호 2)을 5 mg/kg 농도로 주 6회씩 3주간 피하로 주사하였다. 3주 후 악력 테스트를 진행하여 융합 단백질 (서열번호 2)이 근육 퇴화로 일어나는 근기능 저하를 개선하는지 확인하였다 (Control: n=9, No.2: n=8).

[0161] 확인 결과, Control과 비교하여 융합 단백질 투여군에서 악력이 유의미하게 개선됨을 확인하여 융합 단백질의 근기능 개선 효과를 알 수 있었다 (도 12).

[0163] 실시예 4-2: 암 질환 평가 - 마우스 질환 모델

[0164] 면역-결핍 BALB/c 누드 마우스에 MDA-MB-231 세포를 주사하고, 1주일 동안 종양을 형성시켜 이종이식 (xenograft) 종양 모델을 구축하였다. 종양이 형성된 마우스를 무작위로 대조군과 실험군으로 나누고 (Control: n=8, No.14: n=7), 대조군에는 PBS, 실험군에는 융합 단백질 (서열번호 14)을 주 6회 피하 주사하여 총 6주간 7.5 mg/kg으로 주사하였다. 6주가 되는 시점에서 최종 종양 크기를 비교한 결과, 융합 단백질 투여군에서 유의미한 종양 성장 억제 효과를 확인할 수 있었다 (도 13). 이 결과는 본 발명의 융합 단백질이 생체 시스템 내에서 항암 효과를 잘 발휘함을 보여준다.

[0166] 실시예 4-3: 비만 및 근감소성 비만 질환 효능 평가 - 마우스 질환 모델

[0167] [식이성 비만유도 모델]

[0168] 비만 및 나아가 근감소성 비만에 따른 융합단백질의 질환 대상 효능을 확인하기 위하여, 식이성 비만으로 마우스에 질환 유도를 진행하였다. 동물모델로 C57BL/6N을 사용, 1주간 보통 식이를 제공하여 적응기간을 거친 이후 사용하였으며, 사육환경으로는 18~24℃, 50~60%의 습도를 유지, 적응기간 및 실험기간 모두 사료와 물에 자유롭게 접근이 가능한 자유급식을 이행하였다. 1주간의 적응기를 거친 마우스는 질환을 유도하기 위하여 고지방식이 (리서치다이어트사 D12492)를 통해 비만을 유도하였다.

[0170] [식이성 비만유도 모델 연구 I]

[0171] 비만 유도가 완료된 마우스를 Control과 실험군으로 나누고 (Control: n=8, No.1: n=6, No.2: n=6), 대조군에는 PBS, 실험군에는 융합 단백질 (서열번호 1, 2)을 10주간 5 mg/kg으로 주 6회 피하주사하여 그 효능을 관찰하였다.

[0172] 최종 체중을 비교한 결과, Control과 비교하여 융합 단백질 투여군에서 유의한 수준으로 체중이 감소됨을 확인할 수 있었고 (도 14A), 혈당 또한 감소된 것을 확인할 수 있었다 (도 14B).

- [0173] Control과 비교하여 융합 단백질 투여군에서 간 조직내 지방구의 크기도 유의하게 줄어들었고 (도 14C), 중간 지점 (3주 투여 경과 시점)에서 DXA 검사로 체성분을 분석했을 때 지방 조직량도 유의미한 감소를 보였으며 (도 14D), 근육량은 유지되었다 (도 14E). 이러한 결과들을 통해 비만 병태에서 융합단백질에 의한 항비만 효과와 동시에 당대사와 지질대사, 체성분 개선을 관찰하였다.
- [0175] [식이성 비만유도 모델 연구 II]
- [0176] 비만 유도가 진행되는 와중에, 융합 단백질이 비만을 예방하고, 비만으로 유도되는 근감소를 방지하는지 확인하였다. 마우스에 고지방 식이를 제공하는 중에, 총 6주간 융합 단백질 (서열번호 14)을 5 mg/kg으로 8회 피하주사하여 그 효능을 관찰하였다 (Control: n=11, No.14: n=9).
- [0177] 최종 체중 비교 결과, Control과 비교하여 융합 단백질 투여군에서 유의미한 수준으로 비만 발전으로 인한 체중 증가가 효과적으로 억제됨을 확인할 수 있었다 (34.61 ± 2.33 vs 32.99 ± 2.55 g; Control vs 융합 단백질 투여군).
- [0178] DXA 검사로 근육량의 절대값을 확인한 결과 Control과 비교하여 융합 단백질 투여군에서 상대적으로 증가하였고 (18.57 ± 1.26 vs 20.46 ± 2.71 g; Control vs 융합 단백질 투여군), 체성분의 유의미한 변화 (지방조직 비율 감소/근육 조직 비율 증가) (도 15A, B)도 확인할 수 있었다. 나아가 시험 물질 투여 5주차에 악력 테스트를 진행한 결과 근기능 역시 개선된 것을 확인하였다 (도 15C).
- [0180] [식이성 비만유도 모델 연구 III]
- [0181] 비만 유도가 완료된 마우스를 Control과 실험군으로 나누고 (Control: n=8, No.3: n=7), 2주간 Control에는 PBS, 실험군에는 융합 단백질 (서열번호 3)을 5 mg/kg으로 주 6회 피하주사하여 그 효능을 관찰하였다.
- [0182] 최종 체중을 비교한 결과 Control과 비교하여 융합 단백질 투여군에서 유의한 수준으로 체중이 감소됨을 확인할 수 있었으며 (도 16A), 체성분의 유의미한 변화 (지방조직 비율 감소/근육조직 비율 증가) (도 16B, C)를 관찰하여 융합 단백질의 효능을 확인하였다.
- [0184] [식이성 비만유도 모델 연구 IV]
- [0185] 비만 유도가 완료된 마우스 (No.7: n=7)에 10일간 융합 단백질 (서열번호 7)을 5 mg/kg으로 주 6회 피하주사하여 투여 전후로 그 효능을 비교 관찰하였다. 실험 결과를 paired t-test 통계분석으로 비교한 결과 유의한 수준으로 체중이 감소됨을 확인할 수 있었으며 (도 17A), 동시에 유의한 수준의 지방조직 특이적인 감소 효과 (지방조직 비율 감소/근육조직 비율 증가) (도 17B, C)를 관찰하여 그 효능을 확인하였다.
- [0187] [렙틴 결핍성 비만 질환 모델 연구]
- [0188] 유전적으로 렙틴 유전자에 돌연변이를 유도하여, 호르몬 조절 실패 및 식욕 억제가 불가한 유전적 비만 병태에서 융합단백질의 효능을 확인하는 동시에, GLP-1 물질 (Semaglutide)과의 병용 투여 가능성을 확인하고자 ob/ob 마우스 모델 (C57BL/6J-ob/ob)을 활용하였다.
- [0189] 적응기 1주가 지난 마우스를 각 그룹으로 나누고 (Control: n=7, 세마글루티드 (Semaglutide) (30 nmol/kg): n=7, 세마글루티드 (30 nmol/kg) + No.14: n=6), 정상식이를 제공하며 10주간 Control에는 PBS, 각 실험군에는 세마글루티드 또는 세마글루티드+융합 단백질 (서열번호 14)을 5 mg/kg으로 2일 1회 피하주사하여 그 효능을 관찰하였다.
- [0190] 최종 체중을 비교한 결과 Control 대비 유의한 수준으로 체중이 감소됨을 확인할 수 있었으며 (도 18A), 특히 체성분의 경우 병용투여 그룹에서 세마글루티드 단독투여 대비하여서도 더욱 유의미한 변화 (지방조직량 감소/근육 조직량 증가) (도 18B, C)를 관찰하여 그 효능을 확인하였다. 나아가 악력 테스트를 진행한 결과 근기능 역시 개선된 것을 확인하였다 (도 18D).

[0192] 실시예 4-4: 지방간 및 지질대사 질환 평가 - 마우스 질환 모델

[0193] 5주령의 C57BL/6J 암컷 마우스를 분양 받아 1주간의 적응기를 거친 후 지방간 유도를 진행하였다. 모든 마우스의 사육환경으로는 18~24℃, 50~60%의 습도를 항상 유지하였으며, 적응기간 및 지방간 유도 기간 모두 자유 급식을 이행하였다. 1주간의 적응기를 마친 후, 마우스에 GAN 식이 (Gubra Amylin NASH diet) 38주 동안 제공하여 비알콜성 지방간을 유도하였다. 상기 제품의 자세한 성분은 아래 표 8과 같다.

표 8

[0194]

40 kcal% 지방 (팜오일)
20 kcal% 프룩토스
2% 콜레스테롤

[0196] 비알콜성 지방간이 유도된 마우스를 대조군 (n=7) 및 실험군 (n=6)으로 나누었다. 대조군에는 PBS, 실험군에는 융합 단백질 (서열번호 14)을 2.5 mg/kg으로 주 6회, 5주 동안 피하투여하였다. 시험 종료 시점에 지방 조직 및 간 조직의 무게를 측정하고, 생화학 검사(OT, PT, Cholesterol, TG), 조직 염색 (마손 삼색(Masson's trichrome))을 수행하였다. 마손 삼색 염색은 아교섬유(collagen fiber)는 청색, 세포질은 적색, 세포핵은 흑갈색으로 염색하므로 지방간 질환에서 유도되는 간 섬유화의 원인인 콜라겐 축적 정도와 염증의 원인인 면역세포 침윤 (inflammatory cell infiltration)을 분석하는데 사용하였다.

[0197] 수행 결과, 대조군 대비 실험군에서 유의한 체중의 감소 및 지방 조직의 감소, 지방간 유도에 따른 간 무게 증가의 감소를 확인할 수 있었다. 또한, 대조군 대비 실험군에서는 간 조직의 손상에 반응하여 검출되는 OT (GOT, AST (aspartate aminotransferase)), PT (GPT, ALT (alanine aminotransferase))의 수치가 유의하게 감소하는 동시에 혈중 콜레스테롤이 유의하게 감소하고 중성지방(TG)이 감소하는 것을 관찰하여 지질대사 전반에 걸친 긍정적 효과를 확인할 수 있었다. 또한, 마손 삼색 염색에서 콜라겐 축적 정도가 감소한 것을 확인하여 (표 9) 지방간 및 지질 대사 질환에 대한 융합단백질의 효능을 검증하였다.

표 9

[0198]

No.	시험항목	대조군	실험군
1	BW (g ± SD)	35.64 ± 3.07	30.53 ± 4.62
2	Liver (g ± SD)	1.64 ± 0.20	1.59 ± 0.11
3	Epididymal Fat depot (g ± SD)	2.62 ± 0.67	1.50 ± 0.72
4	OT (U/L ± SD)	285.66 ± 46.95	196.70 ± 38.38
5	PT (U/L ± SD)	138.46 ± 29.03	94.07 ± 36.03
6	Cholesterol (mg/dl ± SD)	128.57 ± 21.32	102.30 ± 16.69
7	TG (mg/dl ± SD)	13.14 ± 9.58	10.27 ± 2.80
8	Collagen Area (% ± SD)	7.08 ± 3.81	5.67 ± 3.01

[0200] 실시예 5-5: 당대사 질환 평가 - 마우스 질환 모델

[0201] [식이성 비만 유도 내당능 장애 질환 모델 연구]

[0202] 내당능 장애 모델을 확보하기 위해 식이성 비만으로 마우스에 당대사 장애를 유발하는 조건을 계획하였다. 동물모델로 C57BL/6N 5주령 수컷을 분양받아 1주간 보통 식이를 제공하여 적응기간을 거친 이후 사용하였으며, 사육환경으로는 18~24℃, 50~60 %의 습도를 유지, 적응기간 및 실험기간 모두 사료와 물에 자유롭게 접근이 가능한 자유급식을 이행하였다.

[0203] 1주간의 적응기를 거친 마우스에 내당능 장애를 유도하기 위하여 고지방 식이를 공급하여 비만을 유도하였다. 고지방 식이는 하기 표 10과 같이 제조하여 제공하였다.

표 10

[0204]

Ingredients	HFD (g)
Corn Starch	15
Casein	20
Sucrose	34
Corn oil	3
Mineral mix	3.5
Vitamin mix	1
Cellulose	5
DL-methionine	0.3
Choline bitartrate	0.2
Lard	17
Cholesterol	1
BHT	0.001
Total	100

[0206]

비만이 유도된 마우스를 control (음성 대조군; n=14)과 실험군 (융합 단백질 서열번호 14, 15번; No.14: n=9, No.15: n=9)으로 나누고 8시간 동안 절식시켰다. 이후 control에는 PBS, 실험군에는 해당하는 융합 단백질을 5.0 mg/kg 농도로 투여하고, 1시간 후에 20% 포도당 용액을 복강주사하였다. 각 시간대별로 채혈하여 혈당기로 분석하였다.

[0207]

분석 결과, 융합 단백질 투여군의 시간에 따른 혈당 변화도를 정량하여 대조군과 비교하였을 때 (GLUAUC) 유의미한 차이를 보여 (도 19) 융합단백질에 의한 내당능 개선 효과를 관찰하였다.

[0209]

[렙틴 수용체 장애 당뇨 질환 모델 연구 I]

[0210]

유전적으로 렙틴 수용체 유전자에 돌연변이를 유도하여, 내당능 장애를 유도한 당뇨 병태에서 융합단백질의 효능을 확인하고자 7주령 db/db 마우스 모델 (C57BLKS/J-db/db)을 활용하였다. 적응기 1주가 지난 마우스를 control (n=7)과 실험군 (융합 단백질 서열번호 2; n=8)으로 나누었다. 마우스에 정상 식이를 제공하며 4주간 control에는 PBS, 실험군에는 해당하는 융합 단백질을 5 mg/kg으로 주 6회 피하주사하여 그 효능을 관찰하였다.

[0211]

관찰 결과, 당뇨로 인해 망가진 생체 대사로 변해버린 체성분이 융합 단백질 투여로 개선 (지방조직 비율 감소/근육조직 비율 증가)됨을 알 수 있었다 (표 11). 나아가 악력 테스트를 진행한 결과 근기능 역시 유의하게 개선된 것을 확인하였다 (도 20).

표 11

[0212]

No.	시험항목	대조군	실험군
1	지방조직 비율 (% $\pm$ SD)	52.41 $\pm$ 3.43	50.10 $\pm$ 3.26
2	근육조직 비율 (% $\pm$ SD)	47.59 $\pm$ 3.43	49.90 $\pm$ 3.26

[0214]

종합하여, 본 발명의 융합단백질은 생체 시스템 내에서의 높은 안정성과 세포 시스템에서 검증된 개선된 활성도를 바탕으로 더욱 효과적인 물질 기능 발휘가 가능할 것으로 여겨진다.

[0216]

[렙틴 수용체 장애 당뇨 질환 모델 연구 II]

[0217]

유전적으로 렙틴 수용체 유전자에 돌연변이를 유도하여, 내당능 장애를 유도한 당뇨 병태에서 융합단백질의 효능을 확인하고자 9주령 db/db 마우스 모델 (C57BLKS/J-db/db)을 활용하였다. 적응기 1주가 지난 마우스를 control (n=9)과 실험군 (융합 단백질 서열번호 2; n=7)으로 나누었다. 마우스에 정상 식이를 제공하며 11주간

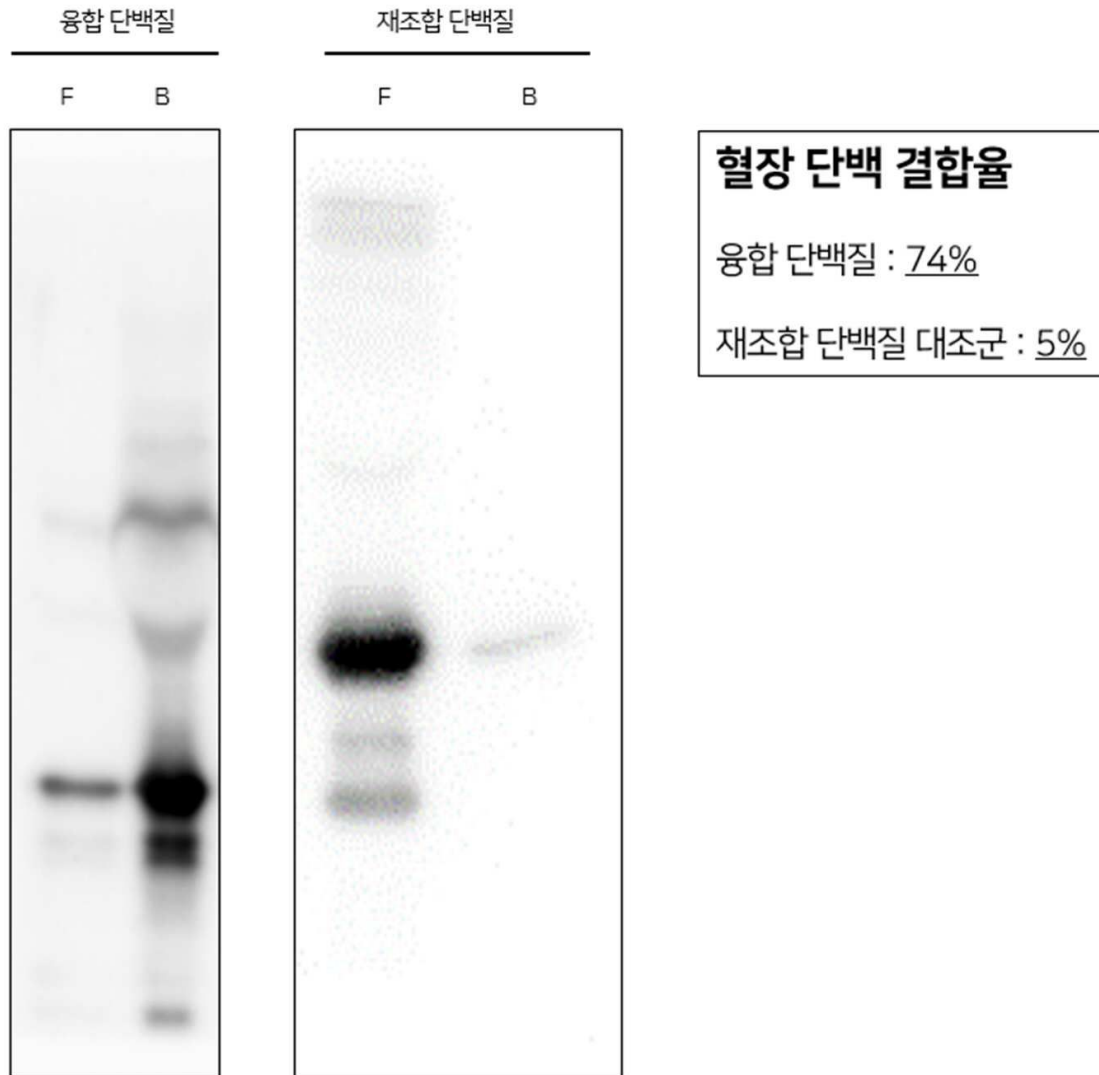
control에는 PBS, 실험군에는 해당하는 융합 단백질을 5 mg/kg으로 주 6회 피하주사하여 그 효능을 관찰하였다.

[0218]

관찰 결과, 당뇨로 인해 망가진 당 대사로 변해버린 혈중 포도당 수준 (glucose level)이 융합 단백질 투여로 유의하게 감소하는 것을 확인하여 융합 단백질의 당 대사 질환에 대한 그 효능을 확인하였다 (도 21).

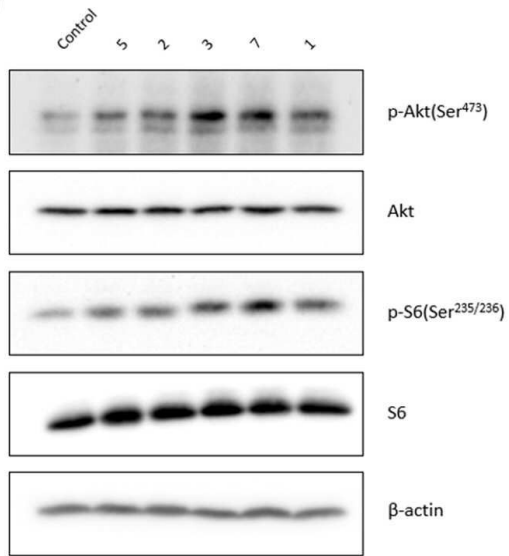
도면

도면1

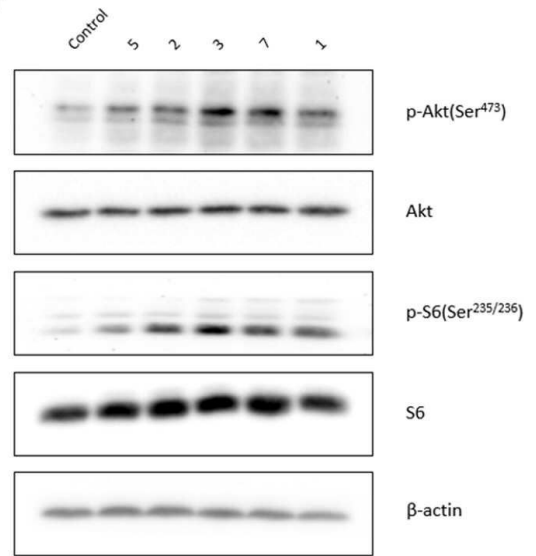


도면2

미분화

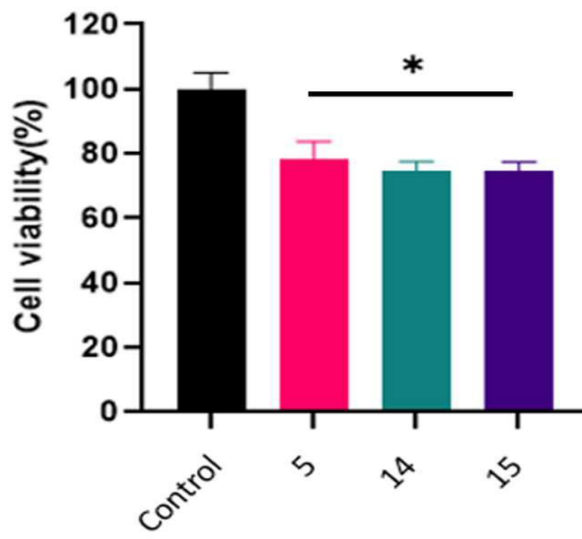


분화

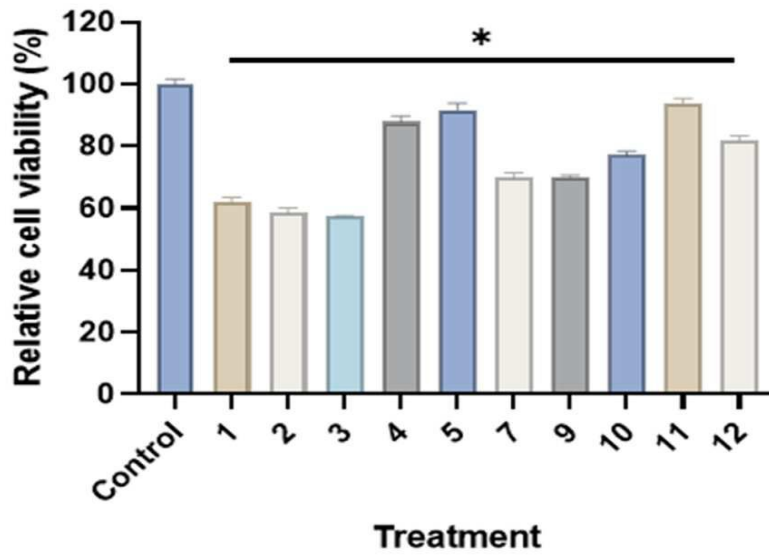


도면3

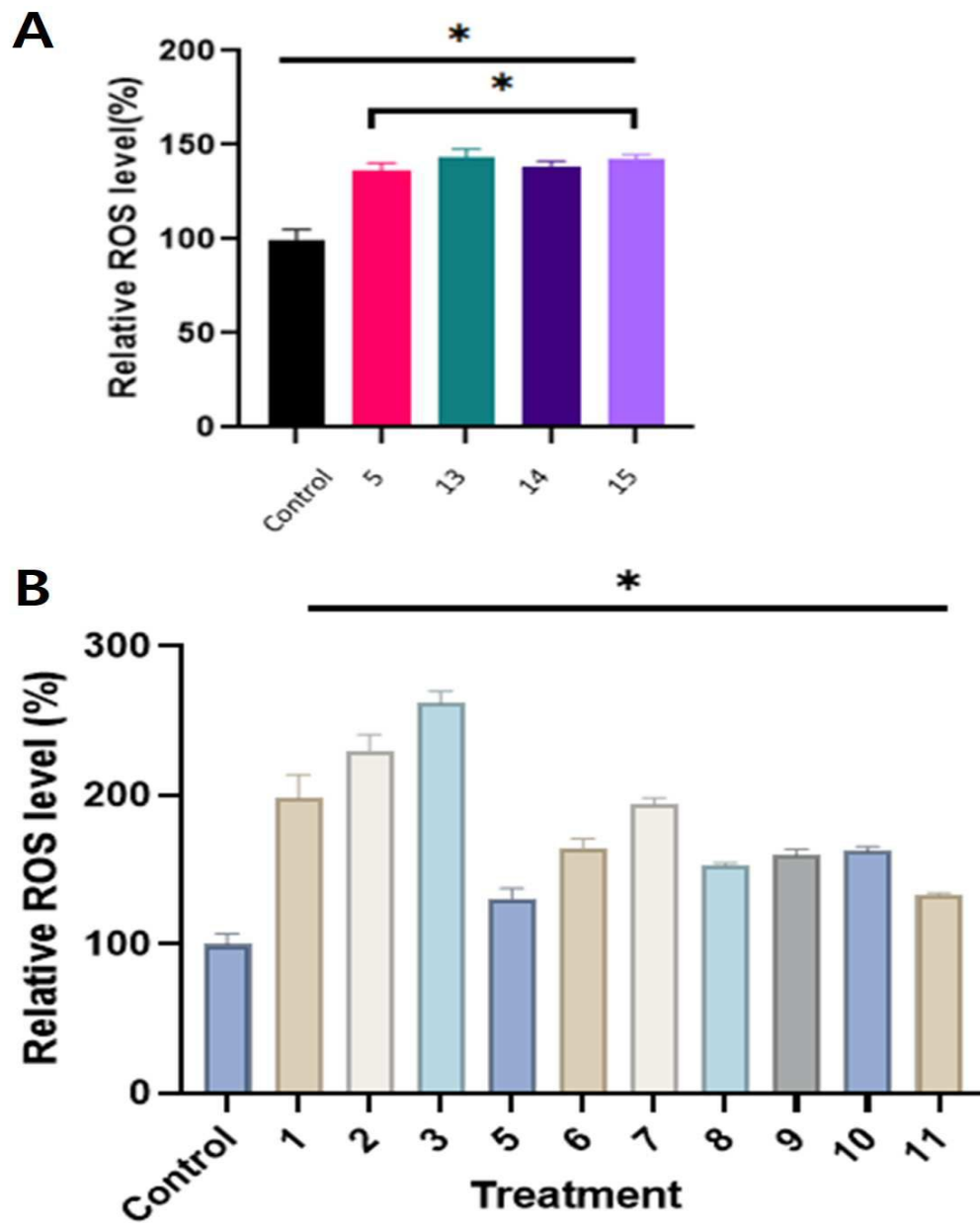
A



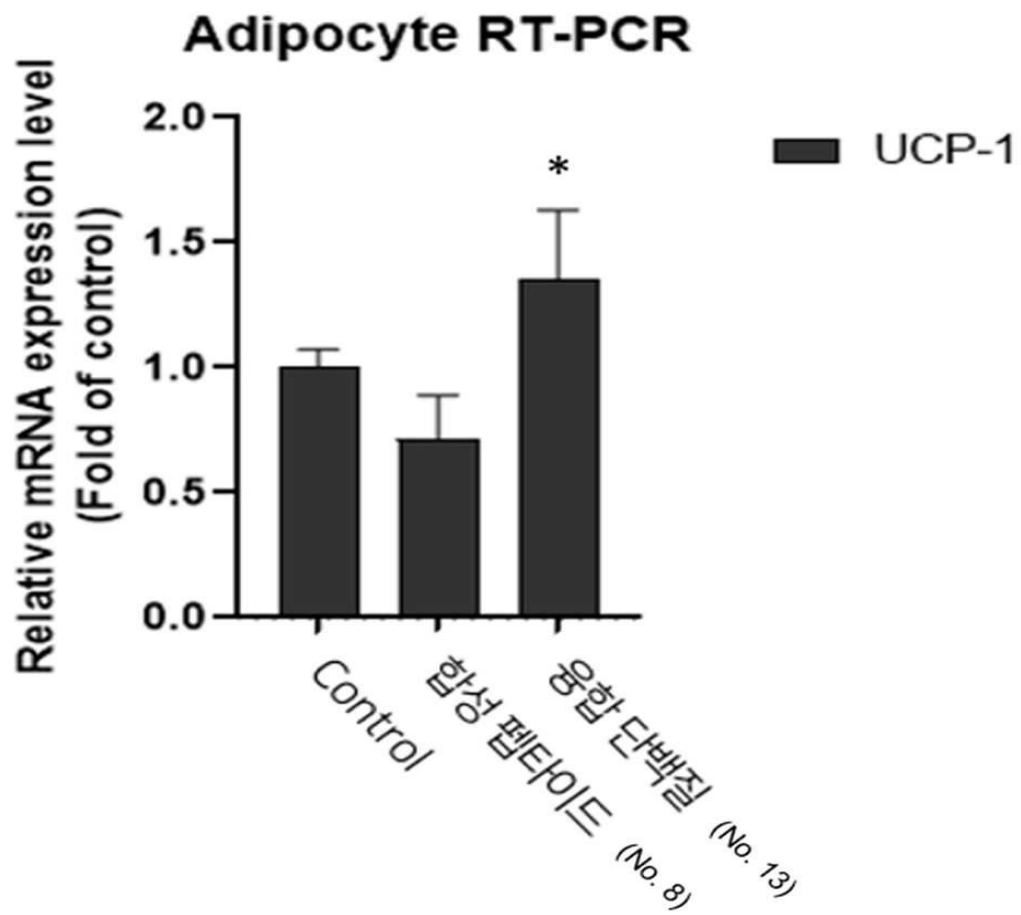
B



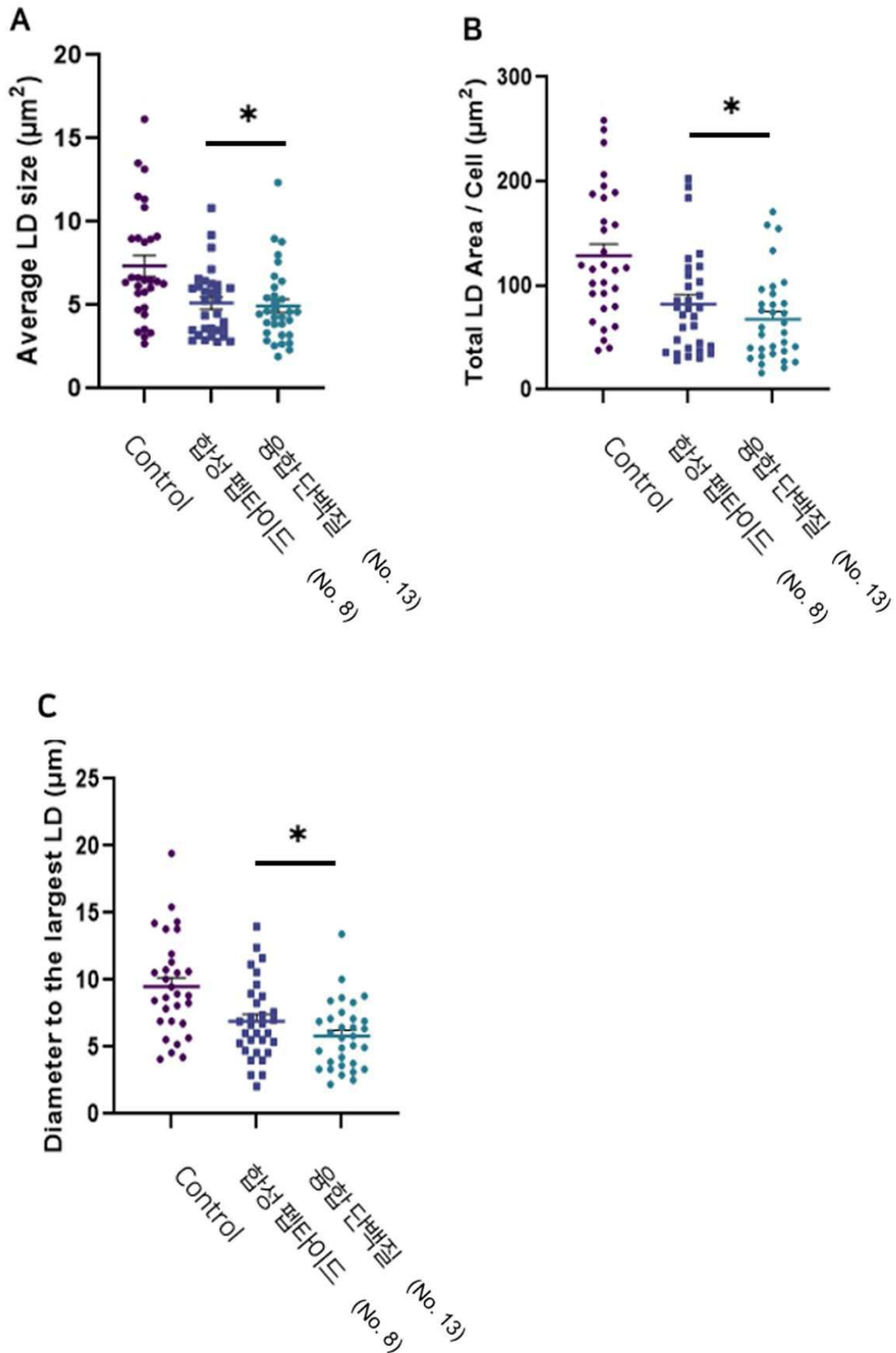
도면4



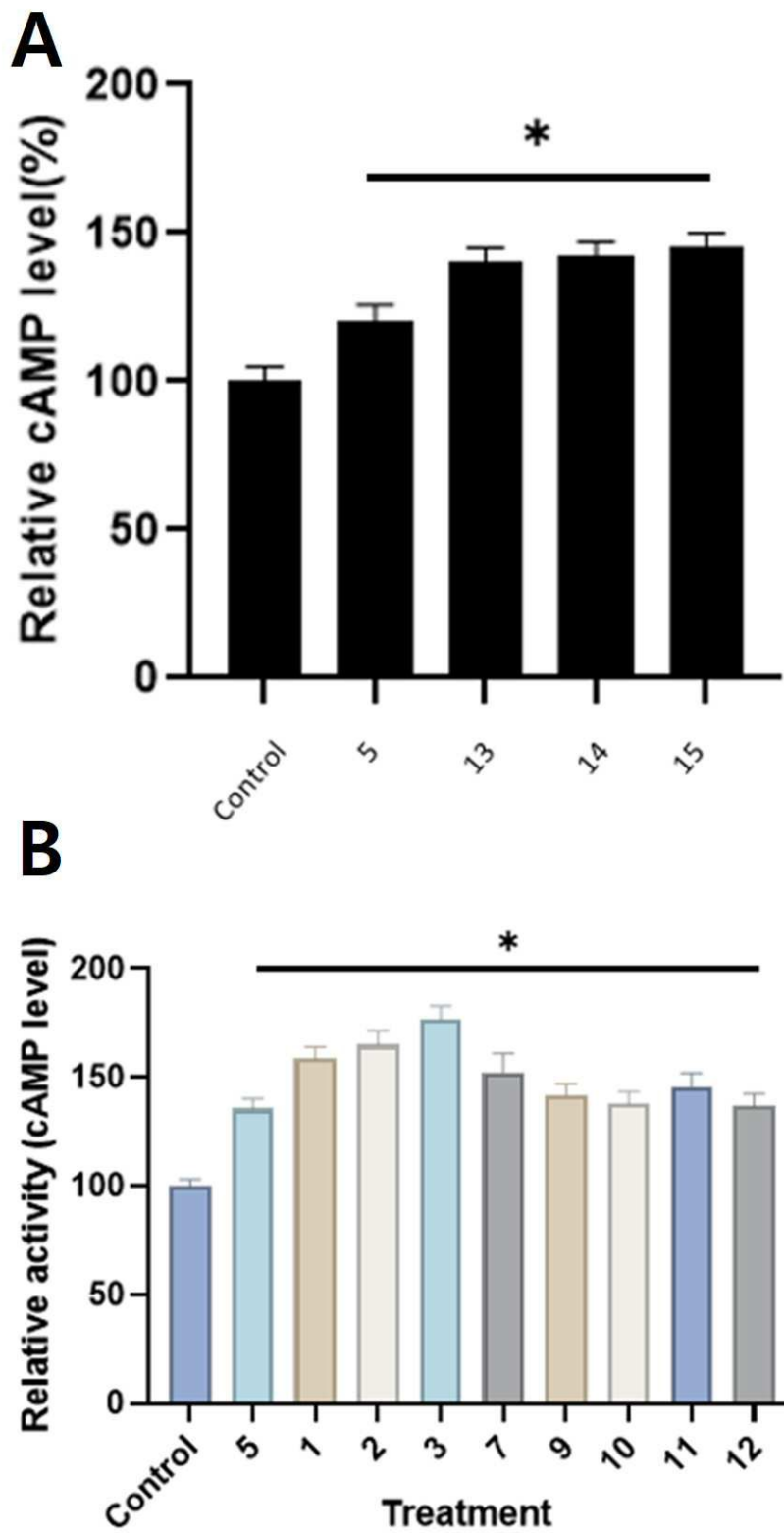
도면5



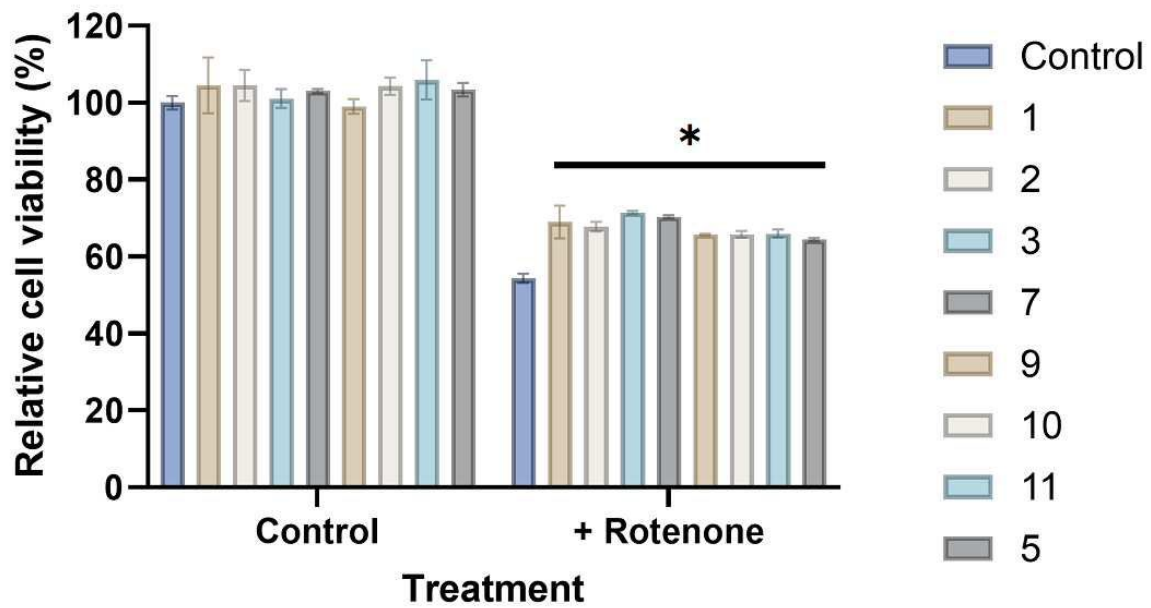
도면6



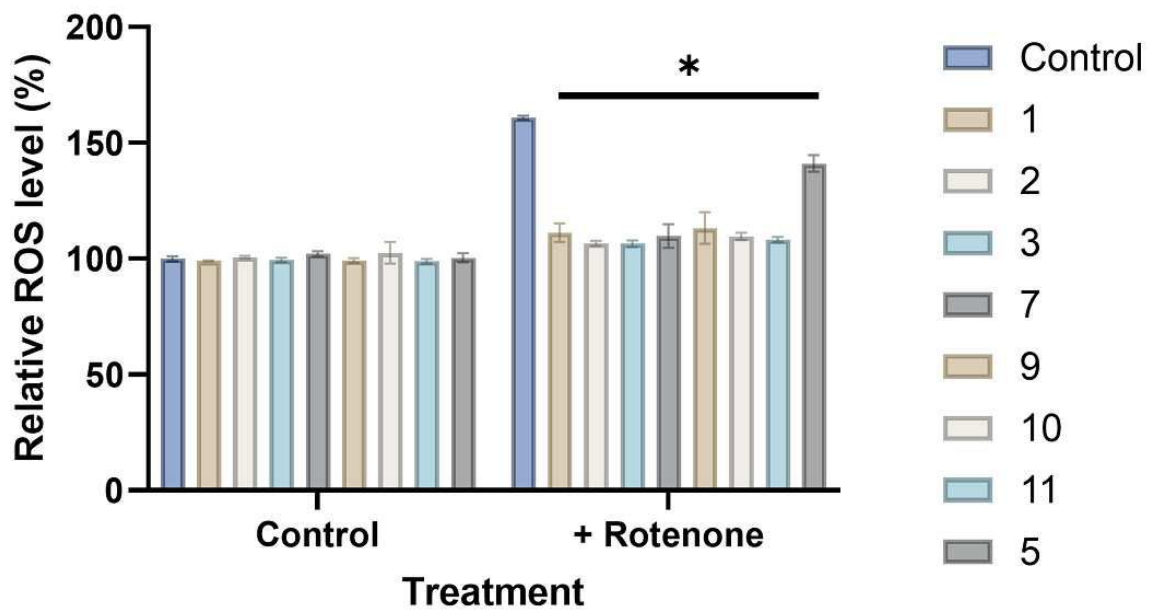
도면7



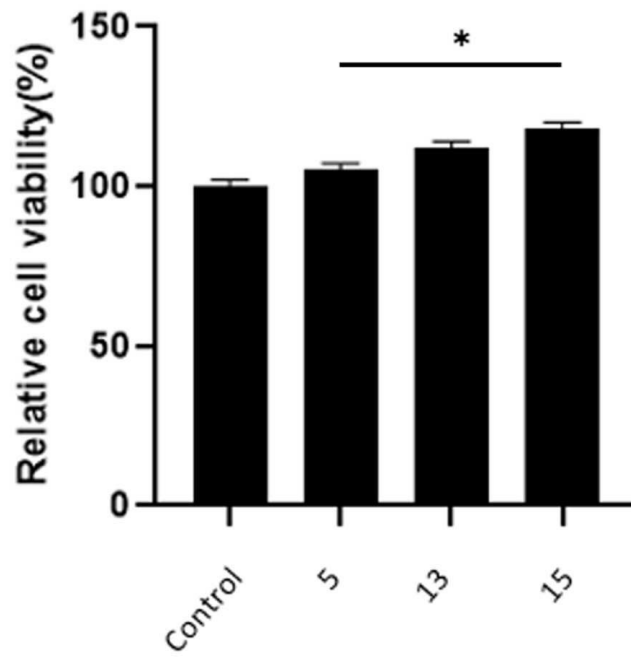
도면8



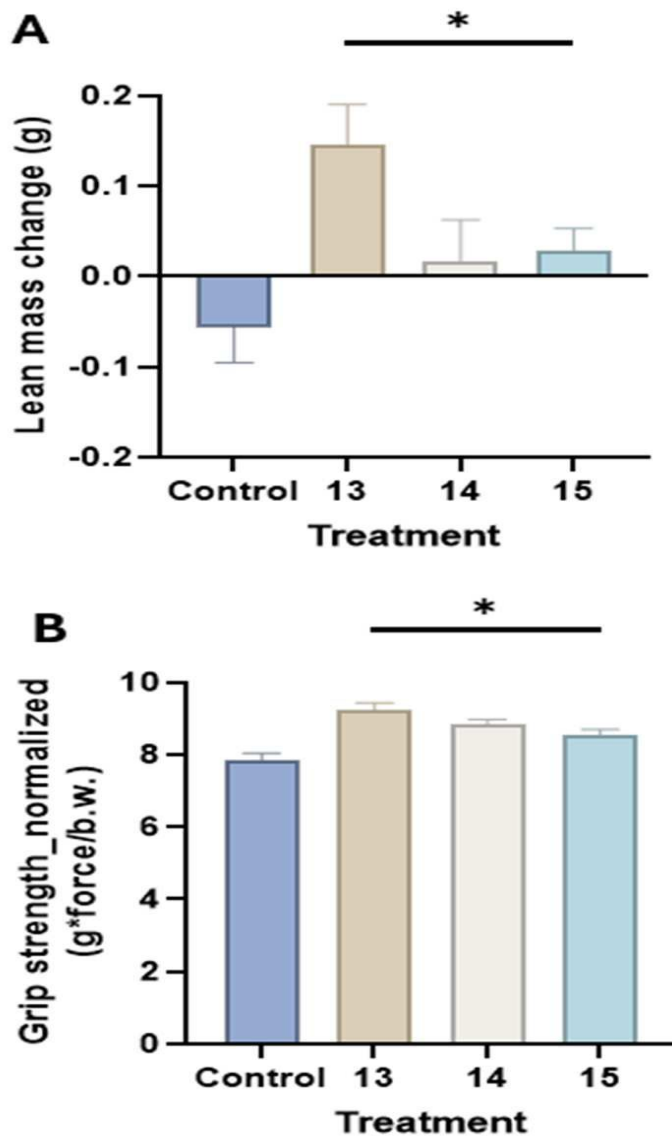
도면9



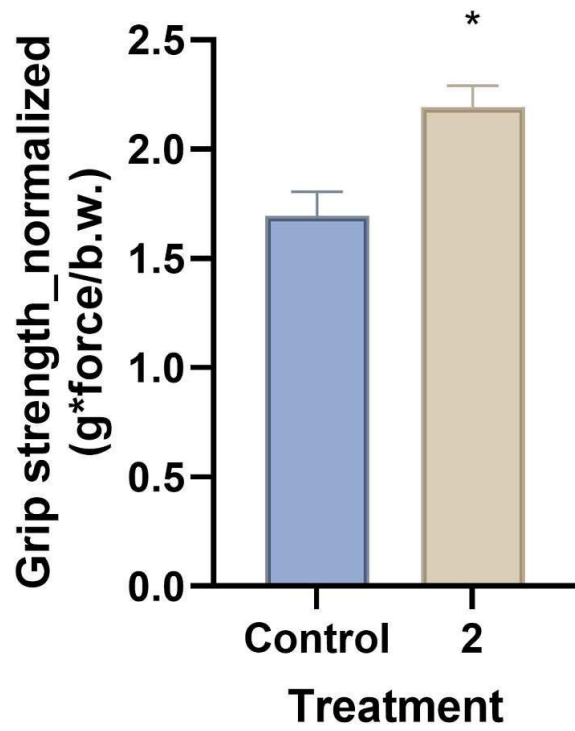
도면10



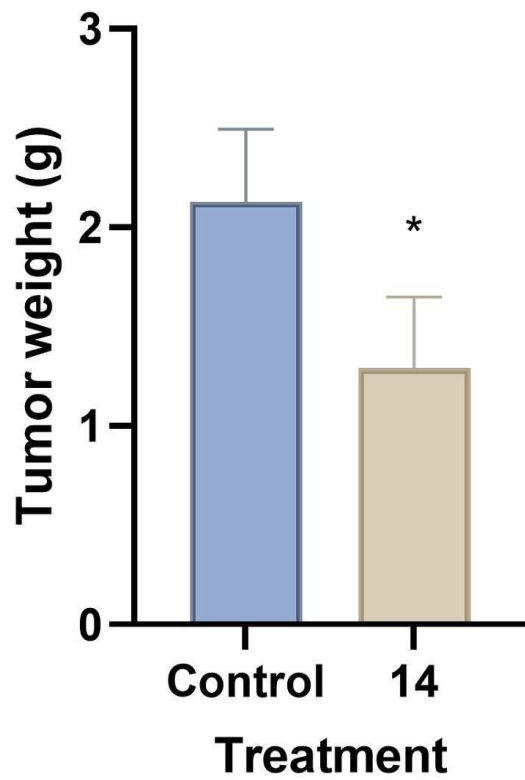
도면11



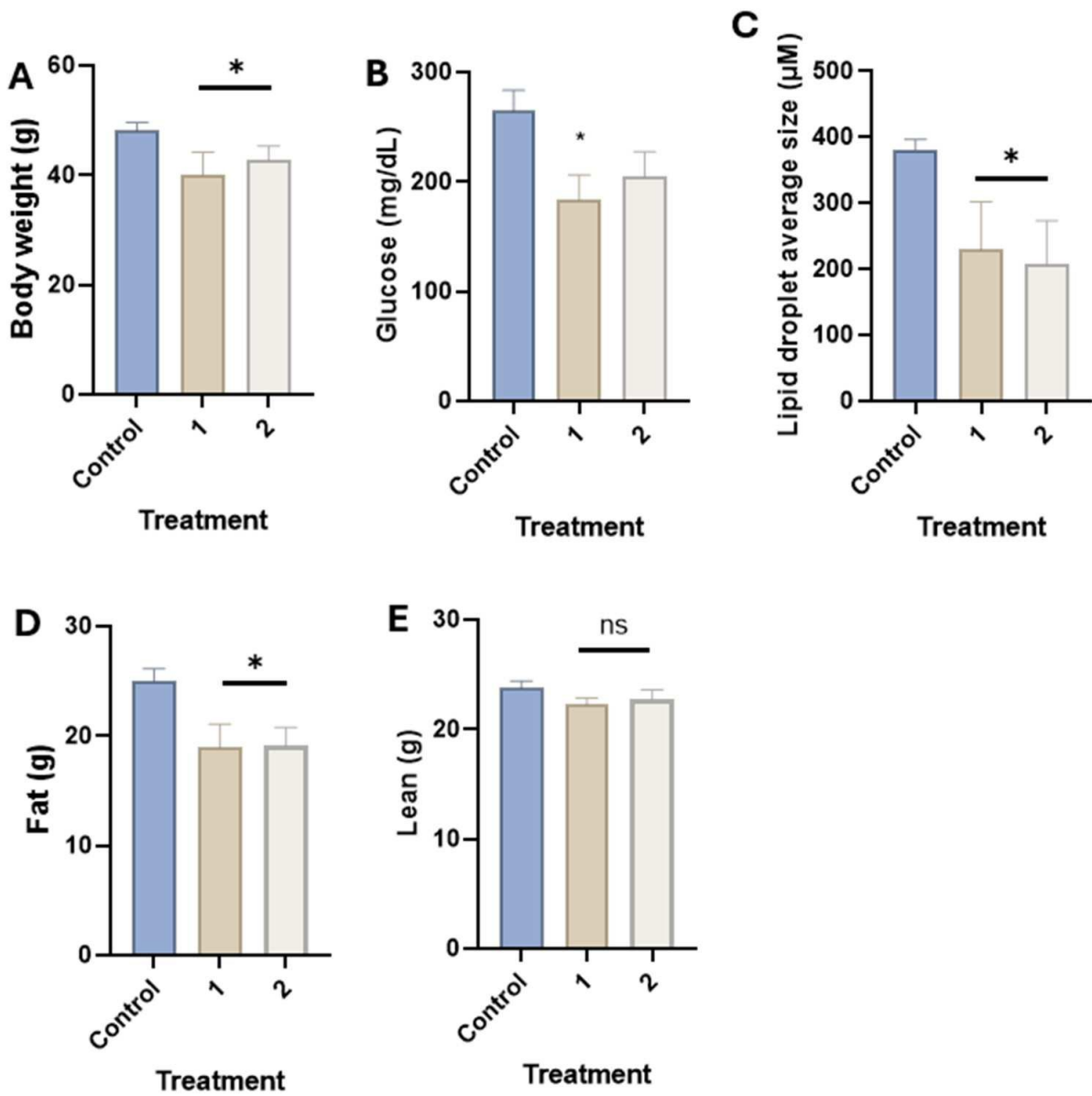
도면12



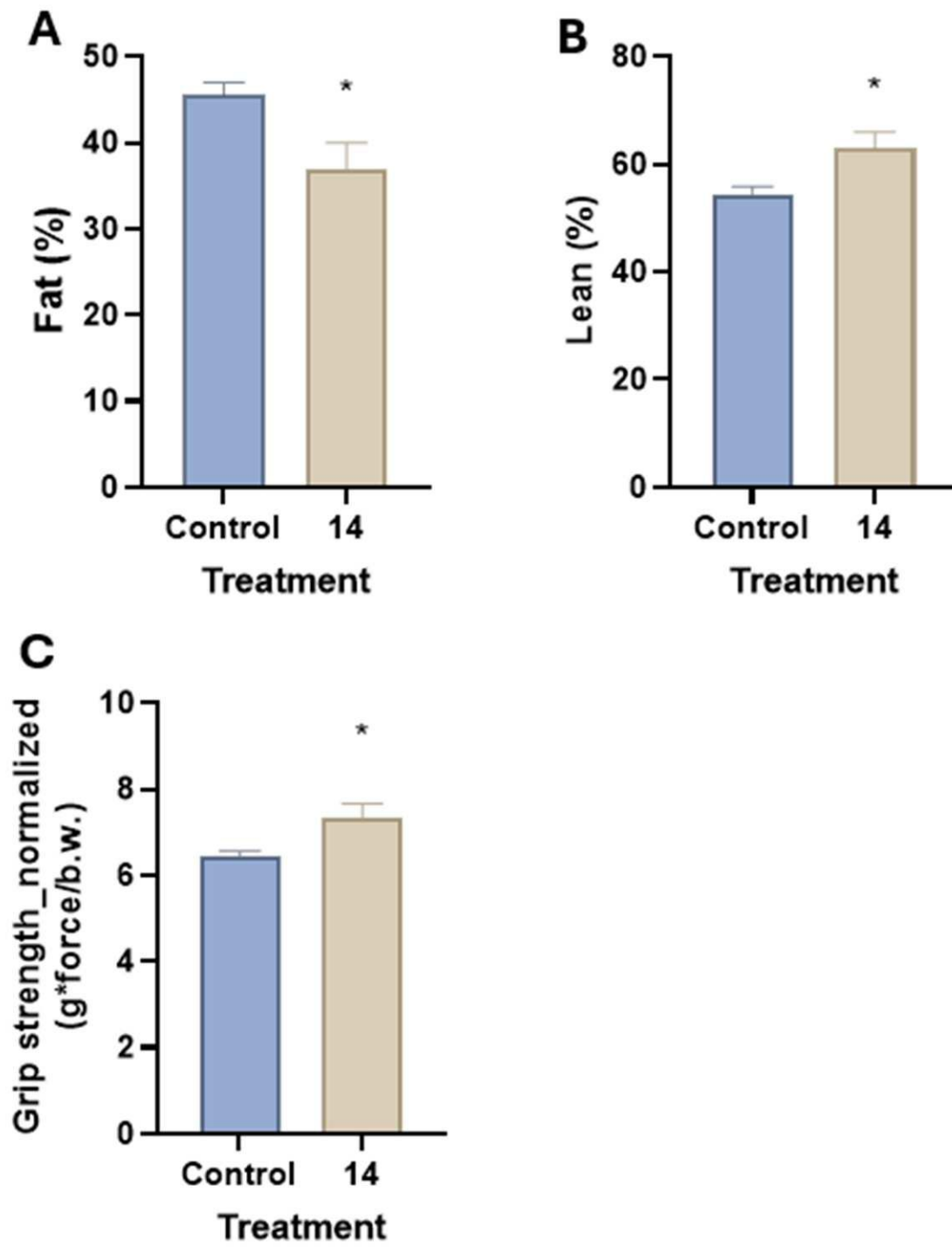
도면13



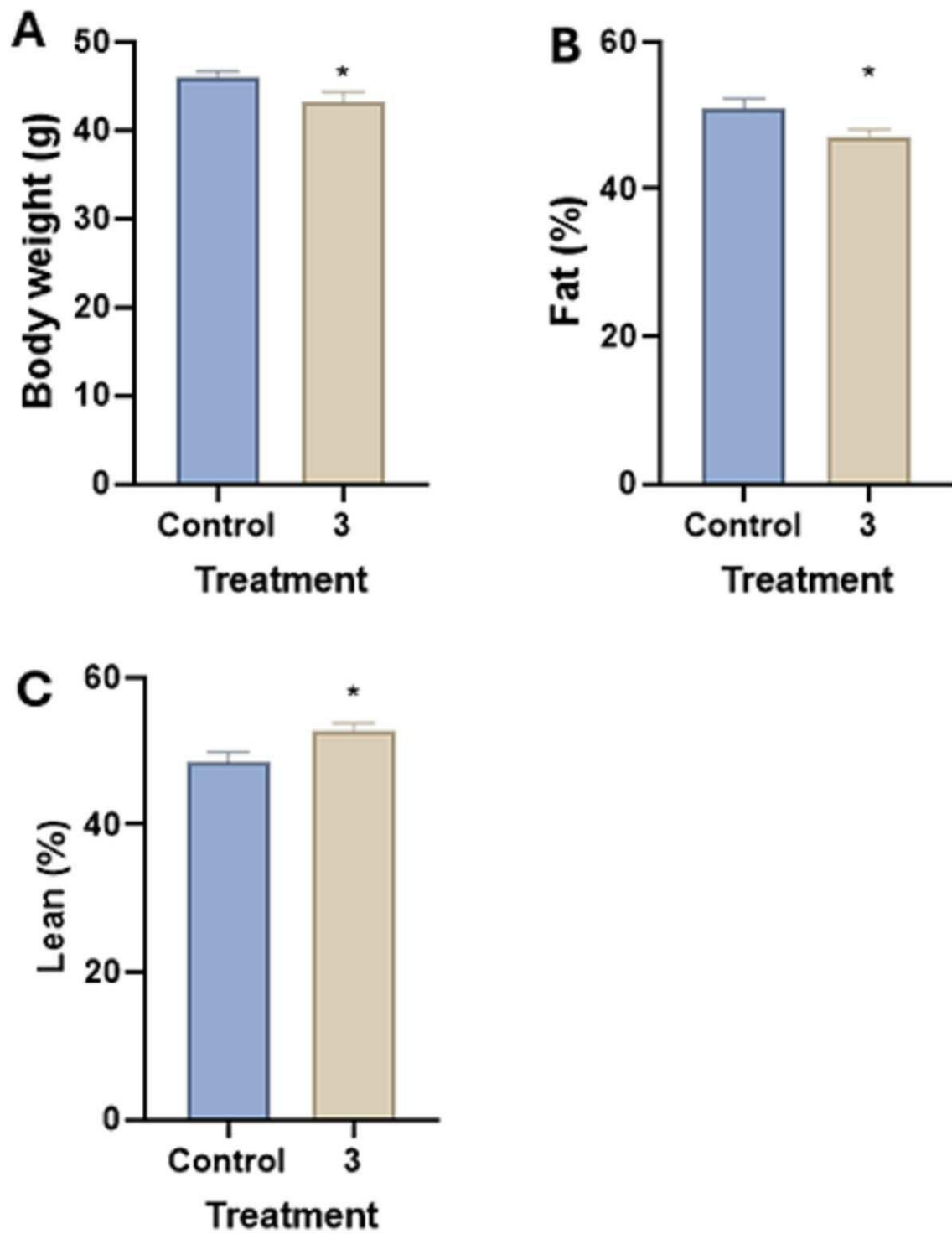
도면14



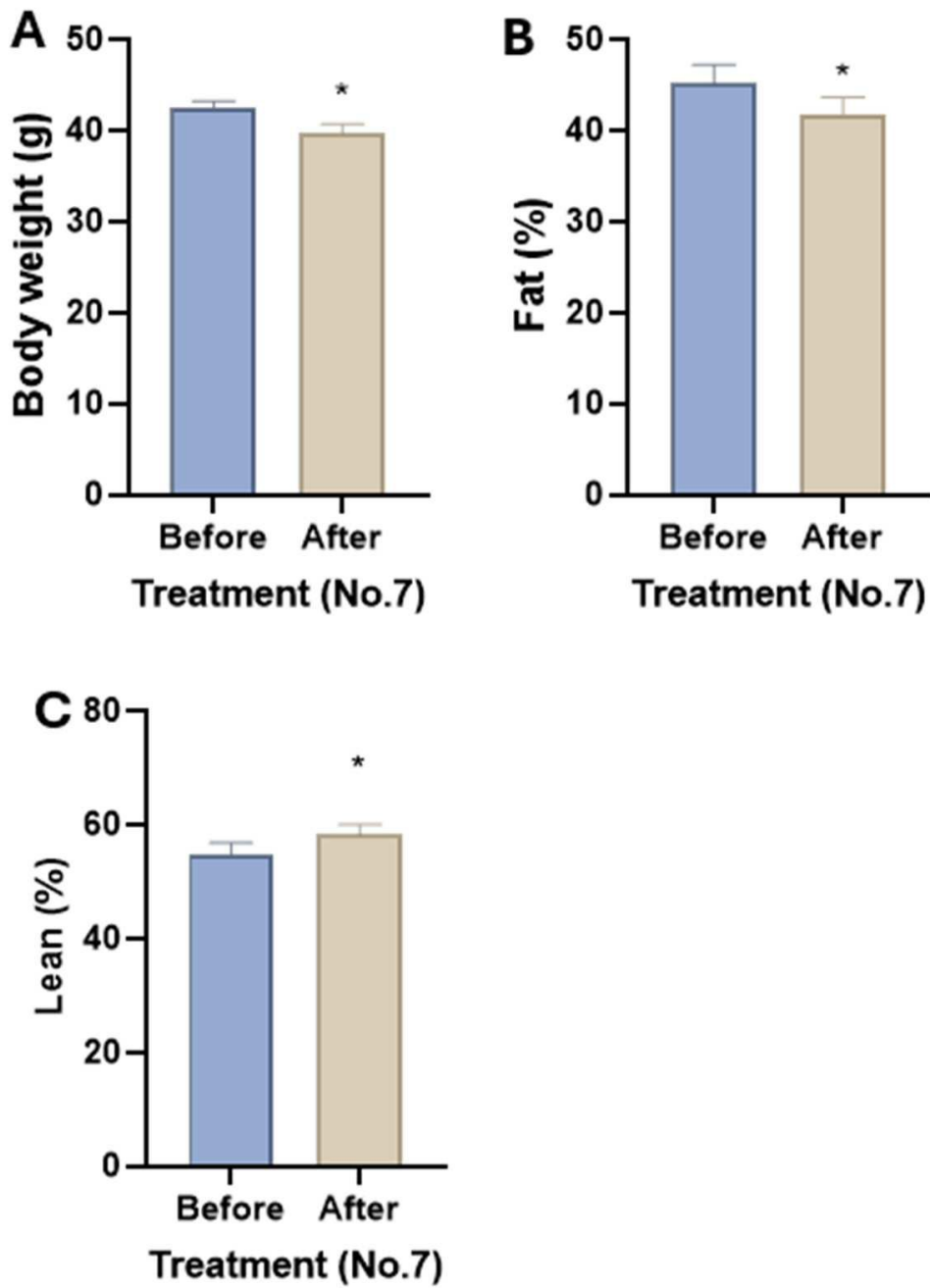
도면15



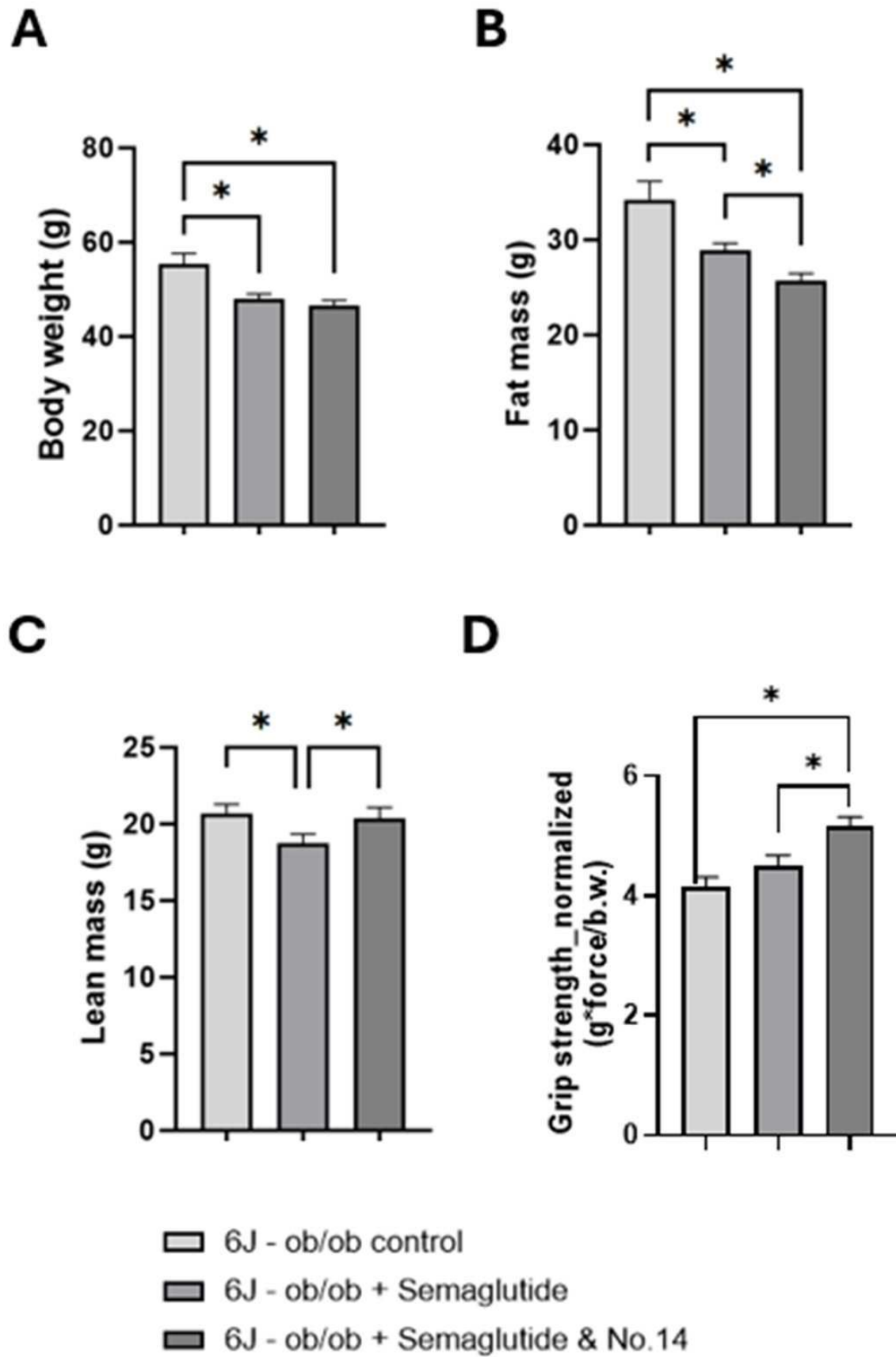
도면16



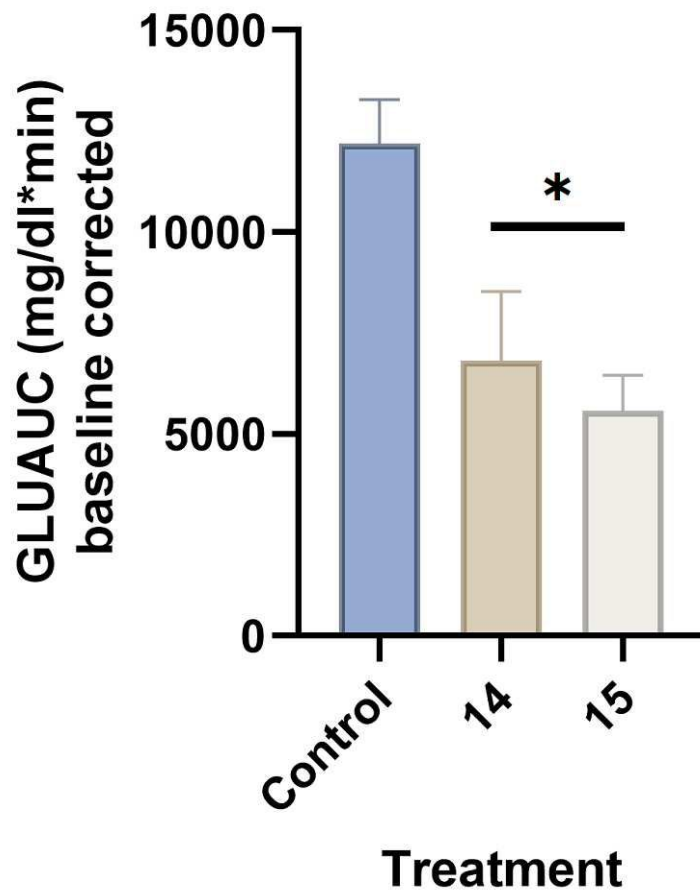
도면17



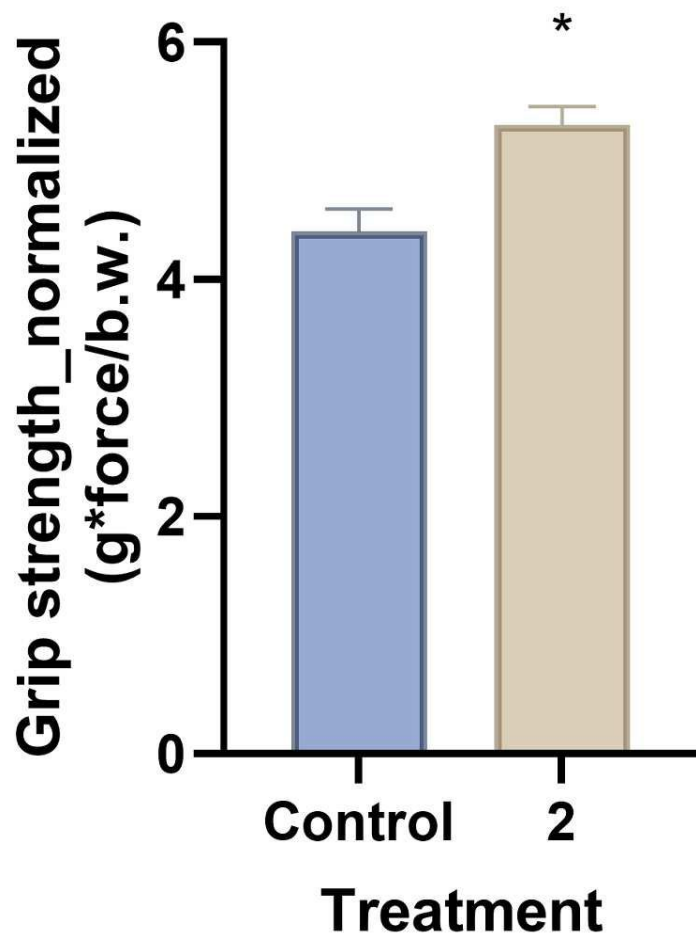
도면18



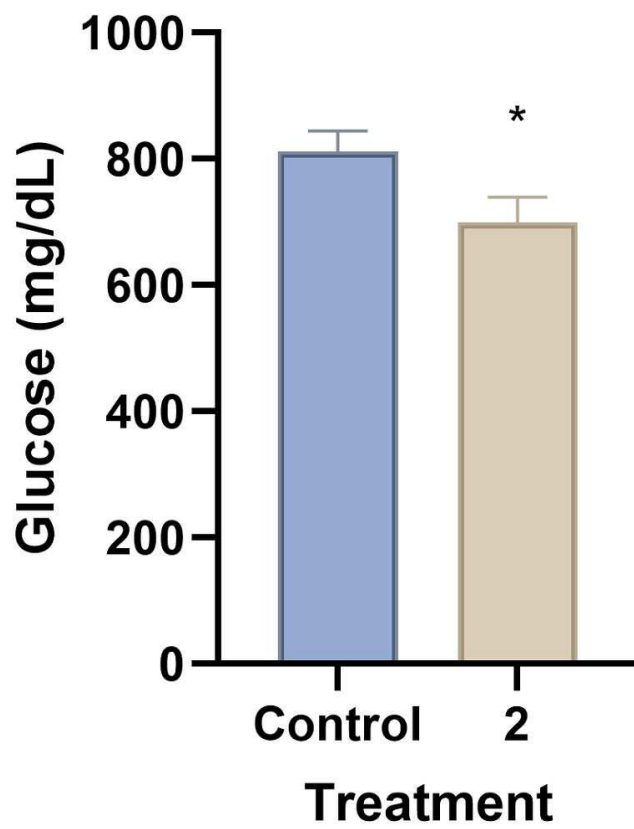
도면19



도면20



도면21



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.