명세서

발명의 명칭: 신규한 단백질 결합체, 및 이의 비알콜성 지방간염, 비만 및 당뇨 질환의 예방 또는 치료 용도

기술분야

[1] 본 발명은 폴리유비퀴틴, 폴리유비퀴틴에 결합된 캐리어 (carrier), 및 상기 폴리유비퀴틴 또는 캐리어에 결합된 2개 이상의 생체 분자를 포함하는 단백질 결합체에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 2개 이상의 생체 분자를 포함하는 단백질 결합체를 포함하는, 비알콜성 지방간염, 지방간, 간섬유화, 간경변, 간암, 비만, 및 당뇨 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 비알콜성 지방간질환 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 알코올을 전혀 섭취하지 않거나 거의 섭취하지 않음에도 알코올 간염과 유사한 조직소견을 보이는 질환의 일종으로, 비알콜성 지방간 (non-alcoholic fatty liver, NAFL)으로부터 비알콜성 지방간염 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH), 간경변 (cirrhosis), 간암 (hepatocellular carcinomas)까지를 아우르는 대사성 증후군의 일종이다. 비알콜성 지방간질환은 비만 및 당뇨인구가 증가함에 따라 함께 증가하고 있는 추세이며, 우리나라에서도 연간 발병률이 약 16%에 이르고 있다.

[4] 비알콜성 지방간염 (NASH)은 간에서의 비정상적 지방 축적 또는 침적 (간지방증), 간 염증 및 간 손상 또는 간 조직 손상 (섬유증)을 주요 특징으로 한다. 전세계적으로 비알콜성 지방간염의 유병률은 2~4% (미국 성인의 3~12%)에 달한다. 단순 지방증이 느린 조직학적 진행을 보임에 반해 비알코올성 지방간염은 보다 빠른 조직학적 진행을 나타내고 간경변으로 진행할 수 있다는 것이 잘 알려져 있다. 지방간으로 판명 받은 사람들 중 약 5-10%가 지방간염으로 판명된다 (Metabolism Clinical and Experimental 65 (2016) 1038-1048).

[5] 현재 비알코올성 지방간염을 치료하기 위해 시판되고 있는 치료제는 없으며, 치료제의 부재로 인해 복부비만, 고지혈증, 당뇨 등 다른 대사증후군 치료제들, 예를 들어, 인슐린 저항성 개선 약제, 항산화제 (예를 들어, 비타민 C, E), 이상지질혈증치료제, 간장보호제 등이 사용되고 있으나, 이들은 비알코올성 지방간염의 직접적인 치료제라고 보기 어렵다.

[6] 비알콜성 지방간염은 복합적 질환의 성격을 가지고 있어, 미국과 유럽 등 허가 당국에서는 치료제 허가 요건을 까다롭게 설정해두고 있어 최근 다수 치료제가 임상개발 단계에서 실패하고 있는 실정이며, 그에 따라 다양한 지표를 동시에 개선하기 위한 다중 작용제 기반의 치료제가 대두되고 있다. 현재 임상 진행중인 다중 작용제 기반의 비알콜성 지방간염 치료제로는 GLP-1/글루카곤 (GCG) 이중 작용제인 아스트라제네카 (AstraZeneca) 사의 MEDI0382, GIP/GLP-1 이중

작용제인 일라이릴리 (Eli Lilly) 사의 LY3298176, 글루카곤/GIP/GLP-1 삼중 작용제인 한미약품의 HM15211 등이 존재한다.

[7] 비만은 체지방이 과도한 상태를 의미하며, 과도한 체지방으로 인해 심장 질환을 포함한 여러 질병의 원인이 되는 건강 위험 상태로 정의할 수 있다. 세계보건기구(WHO)는 세계적으로 약 1억 600만명 이상의 과체중을 가진 성인들이 있으며 최소 400만명 이상이 비만이며 미국인의 3명 중 2명 이상이 과체중이거나 비만을 가지고 있다고 보고했다 (Low et al, 2009; Cooke and Bloom, 2006). 비만인 사람은 정상 체중인 사람에 비해 제2형 당뇨병, 고지혈증, 관절염 및 무호흡증을 비롯한 여러 질환에 걸릴 위험이 증가하고, 특히 여러 종류의 암과 심장 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다.

[8] 당뇨병은 인슐린의 분비량이 부족하거나 인슐린 저항성으로 인해 높은 혈당 수치가 오랜 기간 지속되는 대사 질환에 해당한다. 체내 혈당이 높아진 상태가 장기간 지속됨에 따라, 당화 산물이 망막, 신장, 신경 또는 전신의 크고 작은 혈관들을 침범하면서 만성 합병증을 유발하게 된다. 당뇨병은 그 자체보다 당뇨 합병증이 더 위험하기 때문에, 오늘날 당뇨병 치료에 있어서 가장 큰 목표는 당뇨 합병증의 유발이나 진행을 억제하는 데에 있다. 대표적인 당뇨 합병증으로는 당뇨병성 망막증, 당뇨병성 백내장, 당뇨병성 신장병증, 당뇨병성 신경병증, 당뇨병성 심장병, 당뇨병성 골다공증, 당뇨병성 아테롬성 동맥경화 등이 있다.

[9] 다중 작용제 기반의 치료제 개발에 있어서, 구조적 한계에 따른 활성 감소문제로 인하여 현재 사중 작용제 이상의 비알콜성 지방간염, 지방간, 간섬유화, 간경변, 간암, 비만 또는 당뇨 질환의 치료제는 연구된 바 없다. 이에 본 발명자들은 사중 작용제/길항제 기반의 비알콜성 지방간염, 지방간, 간섬유화, 간경변, 간암, 비만, 및 당뇨 질환의 치료제를 개발하기 위해 부단히 노력한 결과, 폴리유비퀴틴 구조를 이용하여 본 발명을 완성하였다.

[10]

[11] [선행기술문헌]

[12] [특허문헌]

[13] (특허문헌 0001) 한국 공개특허 제10-2016-0032699호

[14] (특허문헌 0002) 한국 등록특허 제10-2034607호

[15]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[16] 본 발명은 폴리유비퀴틴, 폴리유비퀴틴에 결합된 캐리어 (carrier), 및 상기 폴리유비퀴틴 또는 캐리어에 결합된 2개 이상의 생체 분자를 포함하는 단백질 결합체를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[17] 또한, 본 발명은 상기 2개 이상의 생체 분자를 포함하는 단백질 결합체를

포함하는, 비알콜성 지방간염 (NASH), 지방간, 간섬유화, 간경변, 간암, 비만 또는 당뇨 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 구체적으로, 본 발명은 GCG/GLP-1/FGF21/GIP 또는 GCG/GLP-1/FGF21/IL-1RA 수용체 사중 작용제/길항제를 포함하는 비알콜성 지방간염, 지방간, 간섬유화, 간경변, 간암, 비만, 또는 당뇨 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[18]

기술적 해결방법

[19] 본 발명은 폴리유비퀴틴, 상기 폴리유비퀴틴에 직접 결합되거나 링커에 의해 결합되는 캐리어 (carrier), 및 상기 폴리유비퀴틴 또는 캐리어에 직접 결합되거나 링커에 의해 결합되는 생체분자를 포함하고, 상기 폴리유비퀴틴은 (i) 유비퀴틴의 라이신이 아르기닌 또는 알라닌으로 치환될 수 있으나 치환되지 않은 하나 이상의 라이신을 포함하는 수용체 유비퀴틴, 및 (ii) 유비퀴틴의 모든 라이신이 아르기닌 또는 알라닌으로 치환된 공여체 유비퀴틴으로 이루어지며, 상기 생체분자는 GCG, GLP-1, FGF21, GIP 및 IL-1RA; 이의 아날로그; GCG 및 GLP-1 이중 수용체 작용제; 및 GLP-1 및 GIP 이중 수용체 작용제로 구성된 군에서 2 이상 선택된 것을 특징으로 하는 단백질 결합체를 제공한다.

[20] 일 실시태양에서, 상기 GCG 및 이의 아날로그는 서열번호 1 내지 3의 아미노산 서열로 이루어지는 단백질로 구성된 군에서 선택된 것일 수 있고, 바람직하게는 상기 GCG 아날로그는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 단백질일 수 있다.

[21] 일 실시태양에서, 상기 GLP-1 및 이의 아날로그는 서열번호 4 내지 14의 아미노산 서열로 이루어지는 단백질로 구성된 군에서 선택된 것일 수 있고, 바람직하게는 상기 GLP-1 아날로그는 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어지는 단백질일 수 있다.

[22] 일 실시태양에서, 상기 GCG 및 GLP-1 이중 수용체 작용제는 서열번호 15 및 16의 아미노산 서열로 이루어지는 단백질로 구성된 군에서 선택된 것일 수 있다.

[23] 일 실시태양에서, 상기 FGF21 및 이의 아날로그는 서열번호 17 내지 21의 아미노산 서열로 이루어지는 단백질로 구성된 군에서 선택된 것일 수 있다. 바람직하게는 상기 FGF21 아날로그는 서열번호 20의 아미노산 서열로 이루어지는 단백질일 수 있다.

[24] 일 실시태양에서, 상기 GIP 및 이의 아날로그는 서열번호 22 내지 26의 아미노산 서열로 이루어지는 단백질로 구성된 군에서 선택된 것일 수 있다. 바람직하게는 상기 GIP 및 이의 아날로그는 서열번호 24의 아미노산 서열로 이루어지는 단백질일 수 있다.

[25] 일 실시태양에서, 상기 IL-1RA 및 이의 아날로그는 서열번호 27 및 28의 아미노산 서열로 이루어지는 단백질로 구성된 군에서 선택된 것일 수 있다.

바람직하게는 상기 IL-1RA는 서열번호 27의 아미노산 서열로 이루어지는 단백질일 수 있다.

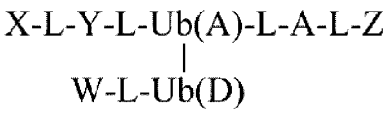
[26] 일 실시태양에서, 상기 폴리유비퀴틴은 유비퀴틴의 N-말단에서 6, 11, 27, 29, 33, 및 48번 라이신이 아르기닌으로 치환된 수용체 유비퀴틴 및 유비퀴틴의 모든 라이신이 아르기닌으로 치환된 공여체 유비퀴틴으로 이루어진 것일 수 있다. 바람직하게는 상기 폴리유비퀴틴은 서열번호 30의 아미노산 서열로 이루어지는 수용체 유비퀴틴 및 서열번호 31의 아미노산 서열로 이루어지는 공여체 유비퀴틴으로 이루어진 것일 수 있다.

[27] 일 실시태양에서, 상기 링커는 GGGGS, EAAAK 또는 VPPPPP가 1개 내지 30개 반복하여 조합된 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩타이드일 수 있다. 바람직하게는 상기 링커는 서열번호 29의 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩타이드일 수 있다.

[28] 일 실시태양에서, 상기 캐리어는 알부민, 항체단편, scFc (single chain Fc), scFc 다이머 (single chain Fc-dimer), 트랜스페린 (transferrin), XTEN (genetic fusion of non-exact repeat peptide sequence), CTP (carboxy-terminal peptide), PAS (proline-alanine-serine polymer), ELK (elastin-like peptide), HAP (homo-amino acid polymer), GLK (gelatin-like protein), PEG (poly ethylene glycol), 및 지방산 (fatty acid)으로 구성된 군에서 선택된 것일 수 있다. 바람직하게는 상기 캐리어는 알부민일 수 있다.

[29] 본 발명은 하기 식으로 표현되는 단백질 결합체를 제공한다.

[30]



[31] 상기 식에서, W, X, Y 및 Z는 각각 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 GCG 아날로그, 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어지는 GLP-1 아날로그, 서열번호 20의 아미노산 서열로 이루어지는 FGF21 아날로그, 서열번호 24의 아미노산 서열로 이루어지는 GIP 아날로그, 및 서열번호 27의 아미노산 서열로 이루어지는 IL-1RA로 구성된 군에서 선택되는 생체분자이고, Ub(A)는 서열번호 30의 아미노산 서열로 이루어지는 수용체 유비퀴틴이고, Ub(D)는 서열번호 31의 아미노산 서열로 이루어지는 공여체 유비퀴틴이고, L은 각각 독립적으로 부재 또는 링커 (Linker)이고, A는 캐리어 (Carrier)이고, Ub(A) 및 Ub(D)는 공유결합으로 연결된 것일 수 있다.

[32] 일 실시태양에서 상기 X는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 GCG 아날로그이고, Y는 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어지는 GLP-1 아날로그이고, Z는 서열번호 20의 아미노산 서열로 이루어지는 FGF21 아날로그이고, W는 서열번호 24의 아미노산 서열로 이루어지는 GIP 아날로그 또는 서열번호 27의 서열로 이루어지는 IL-1RA일 수 있다.

[33] 일 실시태양에서 상기 링커는 서열번호 29의 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩타이드일 수 있으며, 상기 캐리어는 알부민일 수 있다.

[34] 본 발명은 상기 단백질 결합체를 포함하는, 비알콜성 지방간염 (NASH), 지방간, 간섬유화, 간경변, 간암, 비만 또는 당뇨 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[35] 본 발명은 상기 조성물을 인간을 제외한 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 비알콜성 지방간염 (NASH), 지방간, 간섬유화, 간경변, 간암, 비만 또는 당뇨 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[36] 또한 본 발명은

[37] (i) 하기 식으로 표현되는 수용체 단백질을 제조하는 단계;

[38] X-L-Y-L-Ub(A)-L-A-L-Z

[39] (ii) 하기 식으로 표현되는 공여체 단백질을 제조하는 단계; 및

[40] W-L-Ub(D)

[41] (iii) 상기 수용체 단백질의 Ub(A) 및 상기 공여체 단백질의 Ub(D)를 결합시키는 단계를 포함하고,

[42] W, X, Y 및 Z는 각각 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 GCG 아날로그, 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어지는 GLP-1 아날로그, 서열번호 20의 아미노산 서열로 이루어지는 FGF21 아날로그, 서열번호 24의 아미노산 서열로 이루어지는 GIP 아날로그, 및 서열번호 27의 아미노산 서열로 이루어지는 IL-1RA로 구성된 군에서 선택되는 생체분자이고, Ub(A)는 서열번호 30의 아미노산 서열로 이루어지는 수용체 유비퀴틴이고, Ub(D)는 서열번호 31의 아미노산 서열로 이루어지는 공여체 유비퀴틴이고, L은 각각 독립적으로 부재 또는 링커 (Linker)이고, A는 캐리어 (Carrier)인 것을 특징을 하는, 단백질 결합체의 제조 방법을 제공한다.

[43]

발명의 효과

[44] 본 발명의 신규한 단백질 결합체는 2개 이상의 생체 분자를 포함하여, 간에서의 지방증, 염증 발생 및 섬유화를 억제함으로써 비알콜성 지방간염 (NASH), 지방간, 간섬유화, 간경변 또는 간암의 예방 또는 치료에 우수한 효과를 갖고, 비만 또는 당뇨 질환의 예방 또는 치료에도 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 단백질 결합체는 체내에서 오랫동안 유지되어 효과를 장시간동안 발휘할 수 있고, 인체에 무해한 폴리유비퀴틴 및 캐리어를 사용하여 우수한 안전성을 갖는다.

[45]

도면의 간단한 설명

[46] 도 1은 수용체 단백질의 정제 결과를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

[47] 도 2는 공여체 단백질의 정제 과정을 나타낸 모식도이다.

[48] 도 3 및 4는 공여체 단백질의 Ni 컬럼을 통한 정제 결과를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

[49] 도 5 및 6은 공여체 단백질의 His-SUMO 제거를 통한 정제 결과를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

[50] 도 7 및 8은 공여체 단백질의 Polishing 정제 결과를 나타낸 것이다.

[51] 도 9는 수용체 단백질 및 공여체 단백질의 컨쥬게이션을 통해 단백질 결합체를 제작하는 과정을 나타낸 모식도이다.

[52] 도 10 및 11은 수용체 단백질 및 공여체 단백질의 컨쥬게이션 결과를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

[53] 도 12는 단백질 결합체의 Ni 정제 결과를 크로마토그래피로 확인한 것이다.

[54] 도 13 및 14는 단백질 결합체의 정제 결과를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

[55] 도 15는 최종 단백질 결합체의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 것이다.

[56] 도 16 내지 18은 cAMP accumulation assay 결과를 나타낸 그래프이다.

[57] 도 19는 FGFR/KLB functional assay 결과를 나타낸 그래프이다.

[58] 도 20은 NF-κB reporter assay 결과를 나타낸 그래프이다.

[59] 도 21 및 22는 *in-vivo* 효능 시험에서 마우스 혈액의 알라닌아미노전이효소 (ALT) 및 아스파테이트아미노전이효소 (AST) 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

[60] 도 23 내지 26은 *in-vivo* 효능 시험에서 마우스 간조직의 지방증 (steatosis) 및 염증 (lobular inflammation) 관찰 결과 및 NAS 평가기준에 따른 점수 (score)를 나타낸 것이다.

[61] 도 27 및 28은 *in-vivo* 효능 시험에서 마우스 간조직의 TGT-β 및 트리글리세리드 (triglyceride) 농도 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

[62] 도 29 및 30은 *in-vivo* 효능 시험에서 마우스 혈액의 알라닌아미노전이효소 (ALT) 및 아스파테이트아미노전이효소 (AST) 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

[63] 도 31 내지 34는 *in-vivo* 효능 시험에서 마우스 간조직의 지방증 (steatosis) 및 염증 (lobular inflammation) 관찰 결과 및 NAS 평가기준에 따른 점수 (score)를 나타낸 것이다.

[64] 도 35 및 36은 *in-vivo* 효능 시험에서 마우스 간조직의 TGT-β 및 트리글리세리드 (triglyceride) 농도 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

[65] 도 37 내지 41은 *in-vivo* 효능 시험에서 식이 유도 비만 마우스의 혈청 중 중성지방 (TG), 유리지방산 (NEFA), 총콜레스테롤 (T-Chol), 저밀도 지단백 콜레스테롤 (LDL-Cholesterol) 및 고밀도 지단백 콜레스테롤 (HDL-Cholesterol)의 변화를 나타낸 그래프이다.

[66] 도 42 및 43은 *in-vivo* 효능 시험에서 제2형 당뇨 마우스의 비절식 혈당의 변화를 나타낸 그래프이다.

[67] 도 44 및 45는 *in-vivo* 효능 시험에서 제2형 당뇨 마우스의 체중의 변화를 나타낸 그래프이다.

[68] 도 46 및 47은 *in-vivo* 효능 시험에서 제2형 당뇨 마우스의 사료섭취량의 변화를

나타낸 그래프이다.

[69] 도 48 및 49는 *in-vivo* 효능 시험에서 제2형 당뇨 마우스의 음수섭취량의 변화를 나타낸 그래프이다.

[70] 도 50 내지 52는 MHC Class I에서의 *in silico* 면역원성 시험 결과를 나타낸 것이다.

[71] 도 53 내지 55는 MHC Class II에서의 *in silico* 면역원성 시험 결과를 나타낸 것이다.

[72]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[73] 이하, 첨부한 도면을 참조하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본원의 실시태양 및 실시예를 상세히 설명한다. 그러나 본원은 여러 가지 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시태양 및 실시예에 한정되지 않는다.

[74] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[75] 본원에 사용된 용어 "예방"은 조성물의 투여에 의해 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"는 조성물의 투여에 의해 질환의 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[76] 본원에 사용된 용어 "개체"는 포유동물, 바람직하게는 인간이지만, 반려 동물 (예를 들어, 개, 고양이 등), 가축 (예를 들어, 소, 양, 돼지, 말 등) 및 실험 동물 (예를 들어, 래트, 마우스, 기니 피그 등)을 포함하는 동물일 수 있다.

[77] 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 비경구투여 또는 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 또한 상기 조성물의 치료적으로 유효한 양은 투여방법, 목적부위, 환자의 상태에 따라 달라질 수 있으며, 인체에 사용시 투여량은 안전성 및 효율성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다.

[78] 본원에 사용된 용어 "GCG"는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 단백질인 야생형 글루카곤 (Native GCG)을 의미할 수 있다.

[79] 본원에 사용된 용어 "GCG 아날로그"는 야생형 글루카곤 단백질의 일부 아미노산이 치환된 것을 의미한다. 바람직하게는, 서열번호 2 또는 3의 아미노산 서열로 이루어지는 단백질을 의미할 수 있다. 더욱 바람직하게는, 야생형 글루카곤 단백질의 N-말단으로부터 16번 내지 20번 아미노산이 SRRAQ에서 ERRAK로 치환되고, 23번 내지 24번 아미노산이 VQ에서 IE로 치환되고, 27번 내지 29번 아미노산이 MNT에서 LSA로 치환된, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 단백질을 의미할 수 있다.

[80] 본원에 사용된 용어 "GLP-1"는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어지는 단백질인 야생형 GLP-1 (Native GLP-1)을 의미할 수 있다.

[81] 본원에 사용된 용어 "GLP-1 아날로그"는 야생형 GLP-1 단백질의 일부 아미노산이 치환된 것을 의미한다. 바람직하게는, 서열번호 5 내지 14의 아미노산 서열로 이루어지는 단백질로 구성된 군에서 선택된 것을 의미할 수 있다. 더욱 바람직하게는, 야생형 GLP-1 단백질의 N-말단으로부터 2번 아미노산이 A에서 G로 치환되고, 16번 아미노산이 G에서 E로 치환되고, 30번 아미노산이 R에서 GG로 치환된, 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어지는 단백질을 의미할 수 있다.

[82] 본원에 사용된 용어 "FGF21"는 서열번호 17의 아미노산 서열로 이루어지는 단백질인 야생형 FGF21 (Native FGF21)을 의미할 수 있다.

[83] 본원에 사용된 용어 "FGF21 아날로그"는 야생형 FGF21 단백질의 일부 아미노산이 치환된 것을 의미한다. 바람직하게는, 서열번호 18 내지 21의 아미노산 서열로 이루어지는 단백질로 구성된 군에서 선택된 것을 의미할 수 있다. 더욱 바람직하게는, 야생형 FGF21 단백질의 N-말단으로부터 19번 아미노산이 R에서 V로 치환되고, 98번 내지 100번 아미노산이 LLL에서 DLK로 치환되고, 167번 내지 170번 아미노산이 SMVG에서 RLVE로 치환되고, 174번 아미노산이 G에서 L로 치환되고, 179번 내지 181번 아미노산이 YAS에서 FE로 치환된, 서열번호 20의 아미노산 서열로 이루어지는 단백질을 의미할 수 있다.

[84] 본원에 사용된 용어 "GIP"는 서열번호 22의 아미노산 서열로 이루어지는 단백질인 야생형 GIP (Native GIP)을 의미할 수 있다.

[85] 본원에 사용된 용어 "GIP 아날로그"는 야생형 GIP 단백질의 일부 아미노산이 치환된 것을 의미한다. 바람직하게는, 서열번호 23 내지 26의 아미노산 서열로 이루어지는 단백질로 구성된 군에서 선택된 것을 의미할 수 있다. 더욱 바람직하게는, 야생형 GIP 단백질의 N-말단으로부터 2번 아미노산이 A에서 S로 치환된, 서열번호 24의 아미노산 서열로 이루어지는 단백질을 의미할 수 있다.

[86] 본원에 사용된 용어 "IL-1RA"는 서열번호 27의 아미노산 서열로 이루어지는 단백질인 야생형 IL-1RA (Native IL-1RA)을 의미할 수 있다.

[87] 본원에 사용된 용어 "IL-1RA 아날로그"는 야생형 IL-1RA 단백질의 일부 아미노산이 치환된 것을 의미한다. 바람직하게는, 서열번호 28의 아미노산 서열로 이루어지는 단백질을 의미할 수 있다.

[88] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 하나, 하기의 실시예는 단지 설명의 목적을 위한 것이며 본원 발명의 범위를 한정하고자 하는 것은 아니다.

[89]

[90] **수용체 단백질**

[91] 이하 실시예에서 제작한 수용체 단백질은 하기 식으로 표현되는 폴리펩타이드이다.

[92] X-L-Y-L-Ub(A)-L-A-L-Z

[93] 상기 식에서,

[94] 상기 X는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 GCG 아날로그이고, Y는 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어지는 GLP-1 아날로그이고, Z는 서열번호 20의 아미노산 서열로 이루어지는 FGF21 아날로그이고,

[95] Ub(A)는 서열번호 30의 아미노산 서열로 이루어지는 수용체 유비퀴틴이고,

[96] L은 서열번호 29의 아미노산 서열로 이루어지는 링커 (Linker)이고,

[97] A는 서열번호 32의 아미노산 서열로 이루어지는 알부민이다.

[98]

[99] 상기 수용체 단백질을 구성하는 각각의 단백질 및 시그널 펩타이드의 아미노산 서열의 서열번호를 표 1에 나타내었다.

[100] [표1]

단백질	아미노산 서열
GCG 아날로그	서열번호 2
GLP-1 아날로그	서열번호 12
FGF21 아날로그	서열번호 20
Linker	서열번호 29
Ub(A)	서열번호 30
Albumin	서열번호 32
HSA	서열번호 33
IgGκ	서열번호 34

[101] **공여체 단백질**

[102] 이하 실시예에서 제작한 공여체 단백질은 하기 식으로 표현되는 폴리펩타이드이다.

[103] W-L-Ub(D)

[104] 상기 식에서,

[105] W는 서열번호 24의 아미노산 서열로 이루어지는 GIP 아날로그 또는 서열번호 27의 아미노산 서열로 이루어지는 IL-1RA이고,

[106] L은 서열번호 29의 서열로 이루어지는 링커 (Linker)이고,

[107] Ub(D)는 서열번호 31의 서열로 이루어지는 공여체 유비퀴틴이다.

[108]

[109] 상기 공여체 단백질을 구성하는 각각의 단백질 아미노산 서열의 서열번호를 표 2에 나타내었다.

[110]

[표2]

단백질	아미노산 서열
GIP	서열번호 24
IL-1RA	서열번호 27
Linker	서열번호 29
Ub(D)	서열번호 31

[111]

[112] 본원에 사용된 용어 "Donor-191" 및 "D-191"은 GIP 아날로그를 포함하는 공여체 단백질을 의미한다.

[113] 본원에 사용된 용어 "Donor-192" 및 "D-192"는 IL-1RA를 포함하는 공여체 단백질을 의미한다.

[114] 본원에 사용된 용어 "RD-191" 및 "C-191"은 수용체 단백질과 GIP 아날로그를 포함하는 공여체 단백질이 결합한 단백질 결합체를 의미한다.

[115] 본원에 사용된 용어 "RD-192" 및 "C-192"는 수용체 단백질과 IL-1RA를 포함하는 공여체 단백질이 결합한 단백질 결합체를 의미한다.

[116]

[117] **[실시예 1]**

[118] **수용체 단백질 발현을 위한 플라스미드 DNA 제조**

[119]

[120] 수용체 단백질을 암호화하는 유전자인 수용체 유전자 서열을 합성한 후, CMV 프로모터, 앰피실린 (ampicillin) 내성 유전자 등을 가지는 간단한 구조의 발현 벡터인 pcDNA3.1(+)에 클로닝하였다.

[121] 수용체 유전자가 삽입된 플라스미드 (plasmid)에 단백질을 세포 밖으로 분비하게 하는 시그널 펩타이드 (signal peptide)를 클로닝하기위해 패스트 클로닝 (fast cloning)을 진행하였다. 수용체 유전자가 삽입된 플라스미드 DNA를 주형으로 하여 수용체 단백질의 5'에 시그널 펩타이드가 삽입될 수 있도록 벡터 PCR을 진행하였으며, 서열번호 33의 서열로 이루어지는 인간 혈청 알부민 (Human Serum Albumin, HSA) 및 서열번호 34의 서열로 이루어지는 IgGκ 시그널 펩타이드를 주형으로 하여 수용체 단백질의 5'에 각각의 시그널 펩타이드가 삽입될 수 있도록 인설트 PCR을 진행하였다. PCR 반응은 Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher, Cat. No.: F530)를 이용하였으며, 1차 변성 98 ℃ 3 분, 2차 변성 98 ℃ 10 초, 프라이머 접합 60 ℃ 30 초, 신장 반응 72 ℃ 3 분 과정 중 2차 변성에서 신장 반응까지 18 회 반복하여 진행시킨 후, 최종 신장 반응을 72 ℃ 5 분으로 진행하였다.

[122] PCR 반응이 끝나면 아가로스 젤 (agarose gel) 전기 영동을 통해 목적 유전자 증폭 여부를 확인한 후, 벡터 PCR 산물과 인설트 PCR 산물을 1 대 1로 10 μL씩

PCR 튜브에 넣은 후, DpnI 0.5 μL를 넣어주었다. 해당 튜브를 37 ℃에서 1 시간 동안 처리하여 주형 DNA를 제거하고 라이게이션하였다. 라이게이션된 PCR 산물은 DH5α 컴피턴트 세포 (competent cell)에 넣어 42 ℃에서 1분간 열충격 (heat shock) 처리하여 형질 전환하고, 앰피실린 (ampicillin)이 포함된 LB 고체 배지에 도말한 후 37 ℃에서 16 시간 이상 정치 배양하여 콜로니 (colony)를 확보하였다. 단일 콜로니를 찍어 앰피실린 (ampicillin)이 포함된 LB 배지 5 mL에 접종한 후 37 ℃, 220 rpm에서 16 시간 배양하였다. 배양액은 3500 rpm에 20 분간 원심 분리하여 대장균 Wet Cell을 확보한 후 DNA 추출키트 (COSMO Genetech, Cat. No.: CMP0112)의 S1, S2, S3 용액을 첨가하여 세포벽을 깨고, 단백질과 DNA가 분리된 DNA 혼탁액을 확보하였다. DNA 추출키트 (COSMO Genetech, Cat. No.: CMP0112)의 정제 칼럼을 이용해 확보한 DNA 혼탁액으로부터 플라스미드 DNA를 정제하였다. 플라스미드 DNA는 COSMO Genetech에 유전자 서열 분석을 의뢰하여 수용체 단백질의 5'에 서열번호 33의 서열로 이루어지는 HSA 또는 서열번호 34의 서열로 이루어지는 IgGκ 시그널 펩타이드가 삽입된 2개의 벡터를 확보하였다.

[123] 유전자 서열이 확인된 벡터는 DH5α 컴피턴트 세포 (competent cell)에 넣어 42 ℃에서 1분간 열충격(heat shock) 처리하여 형질 전환하고 앰피실린 (ampicillin)이 포함된 LB 고체 배지에 도말한 후 37 ℃에서 16 시간 이상 정치 배양하여 콜로니 (colony)를 확보하였다. 단일 콜로니를 찍어 LB 배지 5 mL에 접종한 후 37 ℃, 220 rpm에서 16 시간 배양하였다. 이 배양액 일부를 다시 앰피실린 (ampicillin)이 포함된 LB 배지 200 mL에 접종한 후 37 ℃, 220 rpm에서 16 시간 배양하였다. 배양액은 3500 rpm에 30 분간 원심 분리하여 대장균 Wet Cell을 확보한 후, DNA 추출키트 (QIAGEN, Cat. No. : 12263)의 P1, P2, P3 용액을 첨가하여 세포벽을 깨고, 단백질과 DNA가 분리된 DNA 혼탁액을 확보하였다. DNA 추출키트 (QIAGEN, Cat. No.: 12263)의 정제 칼럼을 이용해 확보한 DNA 혼탁액으로부터 플라스미드 DNA 펠렛을 확보하였다. 펠렛은 세포 배양용 물 (Sigma Aldrich, W3500)로 녹여준 후 0.22 μm 필터로 여과시켰다. 추출한 플라스미드 DNA는 나노 드롭 기기 (IMPLEN사, Nanodrop NP-80)를 이용하여 DNA 농도와 순도를 측정한 후 단백질 발현에 사용하였다.

[124]

[125] **[실시예 2]**

[126] **ExpiCHO-S 세포에서의 수용체 단백질 발현**

[127]

[128] 형질주입 과정 24 시간 전에 ExpiCHO-S (Gibco, Cat. No. : A29127, Lot : 1974423) 세포를 4x10 ^{6} cells/mL로 접종하여 준비하고, 37 ℃, 80 % 습도 이상, 8 % CO_2 인큐베이터 안의 오비탈 진탕기 (orbital shaker)에 장착하여 95 rpm (50 mm shaking diameter) 조건으로 배양하였다. 24 시간이 지난 뒤 세포의 클럼프 (clump)를 제거하기 위해 40 μm 나일론 필터(BD Falcon, Cat. No.: 352340)를 통해

여과시킨 뒤 세포 생존도 (cell viability) 및 세포수를 측정하였다. 여과시킨 세포가 최종 6x10 ^{6} cells/mL이 되도록 ExpiCHO-S 발현 배지 (ExpiCHO Expression Media, Gibco, Cat. No. : A29100-01)를 이용하여 희석하고, 최종 200 mL의 세포를 1 L 플라스크에 넣었다.

[129] OptiPRO SFM (Gibco, Cat. No.: 12309-019) 배지 8 mL에 DNA 120 μg과 OptiPRO SFM (Gibco, Cat. No.: 12309-019) 배지 7.4 mL에 ExpiFectamine CHO Reagent (Gibco, Cat. No. : 100033022) 640 μL를 각각 희석한 후 혼합하였다. 혼합액은 상온에서 3 분 반응시킨 뒤, 6x10 ^{6} cells/mL이 되도록 접종한 플라스크에 천천히 분주하여 형질 주입시켰다. 37 ℃, 80 % 습도 이상, 8 % CO_2 인큐베이터 안의 오비탈 진탕기 (orbital shaker)에 장착하여 95 rpm (50 mm shaking diameter) 조건으로 18시간 배양하였다. 18시간 후에 ExpiFectamine CHO Enhancer (Gibco, Cat. No. : 100033019) 1200 μL와 ExpiCHO Feed (Gibco, Cat. No. : A29101-01)를 48 mL 첨가하고, 37 ℃, 80 % 습도 이상, 8 % CO_2 인큐베이터 안의 오비탈 진탕기 (orbital shaker)에 장착하여 95 rpm 조건으로 7-8 일 배양하였다. 배양이 끝난 후, 3500 rpm 조건에서 30 분 이상 원심 분리하여 세포 펠렛을 제외한 수용체 단백질 발현 배양액만 확보하였다. 확보한 배양액은 두가지 필터 (Satorius stedim, Cat. No.: DH-ST-29MDL20MC5FFV) (Satorius stedim, Cat. No.: DH-ST-5441307G4OOB)에 여과시켜 불순물을 제거하였다.

[130] 준비가 완료된 배양액 80 μL를 취하여 5 X 환원성 샘플 로딩 염료 (reducing sample loading dye)를 20 μL을 넣고 혼합하여 95 ℃에서 5분간 방치하였다. 겔상에서 발현량을 비교하고자 62.5, 125, 250 mg/mL 로 희석한 소 혈청 알부민 (Bovine Serum Albumin) 80 μL 와 5 X 환원성 샘플 로딩 염료 (reducing sample loading dye)를 20 μL 넣어 혼합하여 95 ℃에서 5분간 방치하였다. 준비된 시료와 사이즈 확인용 마커 단백질을 10 % Tris-Glycine 겔에 로딩하였다. 겔은 쿠마시 브릴리언트 블루 R (Coomassie brilliant blue R)로 가볍게 진탕하면서 염색하였으며, 소 혈청 알부민 단백질 밴드를 기준으로 수용체 단백질의 농도를 상대 정량하였다.

[131]

[132] **[실시예 3]**

[133] **수용체 단백질의 정제**

[134]

[135] 실시예 2를 통하여 발현된 수용체 단백질 배양액을 Equilibrium buffer (20 mM sodium phosphate, pH 7.0)로 평형이 이루어진 Blue sepharose HP resin (GE, Cat. No.: 17-0413-01) 컬럼에 로딩 (loading)하였다. Pre-elution(20 mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.15M KCl)을 통하여 불순물 (impurity)을 제거하고, Elution buffer (20 mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.6 M KCl)를 사용하여 수용체 단백질을 회수하였다. 회수된 수용체 단백질은 20 mM 인산 나트륨 (sodium phosphate), pH 7.0 buffer로 dialysis를 수행하여 염(salt)을 제거하고, 최종 (final) 시료가 5

mg/mL이 되도록 ultrafiltration을 수행하였다. SDS-PAGE를 통한 수용체 단백질 정제 결과를 도 1에 나타내었다.

[136]

[137] **[실시예 4]**

[138] **E. coli 세포에서의 공여체 단백질 발현**

[139]

[140] 공여체 단백질을 암호화하는 공여체 유전자 서열을 His-SUMO 태그가 있는 pET21a vector에 형질전환한 후, 공여체 유전자가 삽입된 플라스미드를 BL21(DE3) 컴피턴트 세포 (competent cell)에 넣어 42 ℃에서 1 분간 열충격(heat shock) 처리하여 형질 전환하고 앰피실린 (ampicillin)이 포함된 LB 고체 배지에 도말한 후 37 ℃에서 16 시간 이상 정치 배양하여 콜로니 (colony)를 확보하였다. 단일 콜로니를 찍어 50 mL에 LB 배지에 접종한 후 37 ℃, 220 rpm에서 16 시간 동안 seed culture를 수행하였다.

[141] 생체분자로 GIP를 포함하는 공여체 단백질 (Donor-191, D-191)의 경우, seed culture 배양액을 앰피실린 (ampicillin)이 포함된 1L의 LB 배지에 1:100의 비율로 접종하여 main culture를 수행하였다. 37 ℃, 220 rpm에서 2시간 배양 후, OD600nm에서 0.6에 도달하였을 때, 0.25 M의 IPTG를 첨가하여 16 ℃, 220 rpm에서 20시간 배양하였다. 배양완료 후 3500 rpm에 30 분간 원심 분리하여 대장균 Wet Cell을 확보하였다.

[142] 생체분자로 IL-1RA를 포함하는 공여체 단백질 (Donor-192, D-192)의 경우, seed culture 배양액을 앰피실린 (ampicillin)이 포함된 1L의 LB 배지에 1:100의 비율로 접종하여 main culture를 수행하였다. 37 ℃, 220 rpm에서 24시간 autoinduction을 수행하였다. 배양완료 후, 3500 rpm에 30 분간 원심 분리하여 대장균 Wet Cell을 확보하였다.

[143]

[144] **[실시예 5]**

[145] **E. coli 세포에서의 공여체 단백질 정제**

[146]

[147] 배양된 공여체 단백질을 다음과 같은 방법으로 정제하였으며, 정제 과정을 도 2에 나타내었다.

[148]

[149] <u>용해/초음파 처리</u>

[150] 배양으로 확보한 Wet Cell은 lysis buffer (20 mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.5 M NaCl 0.02 M imidazole, 0.1 mM PMSF)를 사용하여 resuspension을 수행하였다. Lysis 시료를 얼음에 담아서 sonication을 Pules on/off= 5 sec/3 sec, 45 % amplitude 조건으로 15 분간 수행하였다. Lysate는 14,000rpm에 30 분간 원심분리하여 상등액 (supernatant)만 회수하여 확보하였다.

[151]

[152] 포획 정제

[153] Ni-sepharose resin (QIAGEN, Cat. No.: 30250) 에 lysate를 로딩 (loading)하였다. 샘플 로딩이 끝난 후, binding buffer (20 mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.5 M NaCl, 0.02 M imidazole)를 사용하여 non-specific 단백질을 충분히 씻어서 제거하였다. 그 후 elution buffer (20 mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.5M NaCl, 0.25 M imidazole)를 사용하여 Hig-SUMO 태그가 부착된 공여체 단백질을 회수하였다. 회수된 His-SUMO 태그가 부착된 공여체 단백질은 20 mM sodium phosphate, pH 7.0 buffer로 dialysis를 수행하여 염 (salt) 및 이미다졸 (imidazole)을 제거하였다. Ni 컬럼을 통한 공여체 단백질 정제를 SDS-PAGE로 확인한 결과를 도 3 및 4에 나타내었다.

[154]

[155] SENP1 효소 분해

[156] His-SUMO 태그가 부착된 공여체 단백질 및 SENP1을 100 mg : 1 mg의 비율로 SENP1 enzyme digestion을 수행하였다. Ni-purification으로 회수된 단백질의 농도 정량을 수행하고, His-SUMO 태그가 부착된 공여체 단백질 양 (mg)의 1/100 w/w에 해당하는 SNEP1 (in-house)을 혼합해 주였다. 반응 혼합물은 상온 (15 ~ 25 ℃)에서 1 시간 동안 방치하였다.

[157]

[158] His-SUMO 제거

[159] Equilibrium buffer (20 mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.5 M NaCl, 0.02 M imidazole)로 평형이 이루어진 Ni-sepharose resin (QIAGEN, Cat. No.: 30250) 에 반응 혼합물을 로딩하였다. 샘플 로딩 (Sample loading)을 진행하고, His-SUMO 태그가 잘려진 공여체 단백질은 flow through로 빠지도록 하였다. 샘플 로딩을 완료한 후, equilibrium buffer (20 mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.5 M NaCl, 0.02 M imidazole)를 사용하여 나머지 공여체 단백질를 회수하고, 회수된 공여체 단백질을 20 mM sodium phosphate, pH 7.0 buffer로 dialysis를 수행하여 염 및 이미다졸을 제거하였다. 최종 공여체 산물은 10 mg/mL이 되도록 ultrafiltration을 수행하였다. His-SUMO removal 정제를 SDS-PAGE로 확인한 결과를 도 5 및 6에 나타내었다.

[160]

[161] 정제

[162] Equilibrium buffer (20 mM sodium phosphate, pH 7.0 buffer)로 평형이 이루어진 Capto Q ImpRes (GE, Cat. No.: 17-5470-15) 컬럼에 이전단계에서 회수한 공여체를 로딩하였다. 공여체 단백질은 flow through로 빠지도록 하였다. 회수된 단백질들은 고농도로 농축을 수행하였다. 공여체 단백질의 Polishing 정제 결과를 도 7 및 8에 나타내었다.

[163]

[164] **[실시예 6]**

[165] 컨쥬게이션

[166]

[167] 도 9에 나타낸 바와 같이, 실시예 3에서 생산된 수용체 단백질과 실시예 5에서 생산된 공여체 단백질을 사용하여 컨쥬게이션을 수행하였다. 하기 표 3에 나타낸 조건의 혼합물을 만들어, 30 ℃에서 4 시간 동안 컨쥬게이션 반응을 수행하였다.

[168] [표3]

	수용체	공여체	ATP	mUBA1	UBC13 /MMS2	Buffer	Reducing agent	Vol.
조건	10 μM	15 μM	4 mM	1 μM	10 μM	50mM Tris pH7.6,2.5mM MgCl2	0.05 mM TCEP	100 mL

[169] 반응물을 8 % SDS-PAGE에 10 μg의 수용체를 로딩하여 컨쥬게이션 정도를 확인하였다. 그 결과를 도 10 및 11에 나타내었다.

[170]

[171] **[실시예 7]**

[172] **Ni-sepharose로 효소 제거**

[173]

[174] 결합체 시료만을 회수하기 위하여, 반응물을 equilibrium buffer (20 mM sodium phosphate, pH 8.0, 0.15 M NaCl)로 평형이 이루어진 Ni-sepharose resin (QIAGEN, Cat. No.: 30250)에 샘플 로딩을 완료한 후, equilibrium buffer (20 mM sodium phosphate, pH 8.0, 0.5 M NaCl)를 사용하여 불순물을 제거하였다. 이후, elution buffer (25 mM Tris, pH 8.0, 0.15 M NaCl, 0.01 M imidazole)를 사용하여 결합체를 회수하였다. 회수된 단백질 결합체 (C-191 및 C-192)는 20 mM sodium phosphate, pH 7.0 buffer로 dialysis를 수행하여 염 및 이미다졸을 제거하였다. Ni 정제 결과를 크로마토그래피를 통해 확인하여 도 12에 나타내었다.

[175]

[176] **[실시예 8]**

[177] **정제**

[178]

[179] Equilibrium buffer (25 mM sodium phosphate, pH 7.0 buffer)로 평형이 이루어진 Capto Q ImpRes (GE, Cat. No.: 17-5470-15) 컬럼에 이전단계에서 회수한 결합체를 로딩하였다. Elution buffer (25 mM sodium phosphate, pH 7.0, 158 mM NaCl buffer)를 사용하여 결합체를 회수하였다. 회수된 단백질 결합체는 20 mM sodium phosphate, pH 7.0 buffer로 dialysis를 수행하여 염 및 이미다졸을 제거하였다. 최종 결합체 산물은 5 mg/mL이 되도록 ultrafiltration을 수행하였다. 그 결과를 도 13 및 14에 나타내었다.

[180]

[181] **[실시예 9]**

[182] **포뮬레이션**

[183]

[184] AEX에서 회수된 단백질 결합체는 formulation buffer (4.6 mM Histidine, 5.7 mM Tris, pH 7.5, 10 mM Arginine, 0.1 g/mL trehalose)로 dialysis를 수행하여 염 및 이미다졸을 제거하였다. 최종 결합체 산물은 5 mg/mL이 되도록 ultrafiltration을 수행하였다. 그 결과를 도 15에 나타내었다.

[185]

[186] **[시험예 1]**

[187] **cAMP 누적 분석 (accumulation assay)**

[188]

[189] 실시예 1 내지 9를 통해 제작한 GCG/GLP-1/FGF21/GIP 또는 GCG/GLP-1/FGF21/IL-1RA 수용체 사중(tetra) 작용제/길항제인 단백질 결합체 C-191 및 C-192 중 GLP-1, GCG, GIP 작용제의 세포 수준 (시험관 내)에서의 활성 정도를 시험하기 위해, Cisbio cAMP Gs Dynamic kit #62AM4PEC를 사용하여 GLP-1 수용체, GIP 수용체, GCG 수용체가 각각 일시적 (transient) 혹은 안정적 (stable)으로 과발현된 세포주에서 cAMP 누적 분석을 다음과 같이 수행하였다.

[190]

[191] **<u>세포 준비 (Transient)</u>**

[192] T-75 플라스크에 HEK293 세포가 70 ~ 80 %가 되도록 37℃ 5 % CO_2 인큐베이터 (incubator)에서 2 ~ 3일간 배양하였다. 배지를 제거하고, TryPLE Express 2 mL을 처리한 후, 37℃ 5 % CO_2 인큐베이터에서 3~5 분간 배양하여, 세포를 떨어뜨렸다. 배양 배지 (MEM, 10 % FBS, 1 % Anti-anti) 6 mL을 더하여 희석하고, 15 mL 튜브 (tube)로 옮긴 후, 1000 rpm에서 3 분간 원심 분리하였다. 상등액을 버리고, 배지 5 mL에 풀어주었다. 세포 수를 계수하고, 3 X 10^5 cells/mL의 농도가 되도록 하였다. 6-well pate에 2 mL씩 분주하고, 37℃ 5 % CO_2 인큐베이터에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 배지를 제거하고, 항생제가 없는 배지를 1.7 mL씩 분주하였다. FuGENE6와 각 수용체 플라스미드를 Opti-MEM에 적정량 넣고, 상온에서 각각 5 분간 배양하였다. 각각을 혼합하여 상온에서 15 분간 배양하였다. 혼합액을 해당 웰 (well)에 분주하고, 37℃ 5 % CO_2 인큐베이터에서 24 시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고, pre-warmed PBS 2 mL로 세포를 세척하였다. 웰 당 Accutase 0.5 mL을 분주하고, 37℃ 5 % CO_2 인큐베이터에서 5 분간 배양하여 세포가 떨어지도록 하였다. 이때, 현미경으로 세포가 완전히 떨어졌는지 확인하고, 플레이트 (plate)를 쳐서 세포를 떨어뜨리지 않도록 하였다. 웰 당 37℃ pre-warmed assay buffer (0.5 % BSA, 2 mM IBMX in PBS) 2.5 mL를 더하고, 15 mL 튜브로 옮겨 1,000 rpm에서 3 분간 원심분리 한 후, 2 mL assay buffer에 다시 풀어주었다. 세포 수를 계수하고, assay buffer에 400,000

cells/mL의 농도가 되도록 하였다.

[193]

[194] **세포 준비 (Stable)**

[195] T-25 플라스크에 GLP-1 수용체 (Genscript, Cat. No. M00451), GIP 수용체 (Genscript, Cat. No. M00486), GCG 수용체 (Genscript, Cat. No. M00345)의 과발현 세포가 70~80%가 되도록 배양하였다. 배지를 제거하고, 37℃ pre-warmed PBS 2 mL로 세포를 세척하였다. Accutase 1 mL를 분주하고, 37℃ 5 % CO_2 인큐베이터에서 5 분간 배양하여 세포가 떨어지도록 하였다. 이때, 현미경으로 세포가 완전히 떨어졌는지 확인하고, 플레이트를 쳐서 세포를 떨어뜨리지 않도록 하였다. 웰 당 37℃ pre-warmed assay buffer 3 mL를 더하고, 15 mL 튜브로 옮겨 1,000 rpm에서 3 분간 원심분리 한 후, 2 mL assay buffer에 다시 풀어주었다. 세포 수를 계수하고, assay buffer에 400,000 cells/mL의 농도가 되도록 하였다.

[196]

[197] **과정 (Procedure)**

[198] 준비된 세포를 5 μL씩 96-well low volume white plate에 분주하였다. 4-fold serial dilution으로 준비한 reference 및 sample (2X)을 5 μL씩 duplicate로 분주하고, 5 % CO_2 인큐베이터에서 30 분간 배양하였다. 이때, 대조군 (Control) 및 비어있는 웰 (blank well)은 assay buffer를 5 μL씩 넣어주었다. 1 X cAMP-d2 solution을 5 μL씩 분주하였다. 이때, 비어있는 웰에는 Lysis & Detection buffer 5 μL를 넣었다. 1X Anti-cAMP-Cryptate solution을 5 μL씩 분주하고 빛이 차단된 상태에서 상온에서 1 시간 배양한 후, plate reader로 형광을 측정하였다.

[199]

[200] **측정 및 분석**

[201] Synergy Neo2 기기로 플레이트 내 시료의 형광을 측정하였다 (Excitation wavelength : 330 nm, Emission wavelength : 665 nm and 620 nm).

[202] 아래와 같이 HTRF ratio를 계산하였다.

[203]

$$HTRF\ Ratio = \frac{Signal\ 665\ nm}{Signal\ 620\ nm} \times 10^4$$

[204] 또한, 아래와 같이 Delta ratio (△R)를 계산하였다.

[205] $\triangle R = Ratio_{sample} - Ratio_{blank} = Signal - background\ fluorescence$

[206] GraphPad Prism 8을 사용하여 HTRF ratio plot 값으로 EC50값을 구했다 (curve-fitting of the log(agonist) vs. normalized response - variable slope equation).

[207]

[208] GLP-1R (GLP-1 수용체), GIPR (GIP 수용체) 및 GCGR (GCG 수용체)에 대한 HTRF ratio plot을 도 16 내지 18에 나타내었으며, EC50값을 계산하여 하기 표 4에 나타내었다.

[209]

[표4]

EC50 (pM)	GLP-1R				GIPR				GCGR			
	1	2	Mean	SD	1	2	Mean	SD	1	2	Mean	SD
Liraglutide	40.7	36.7	38.7	2.83	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulaglutide	1.23	0.9	1.07	0.23	-	-	-	-	-	-	-	-
GIP(1-39)	-	-	-	-	15.4	14.1	14.8	0.92	-	-	-	-
GCG	-	-	-	-	-	-	-	-	39.3	30.4	34.9	6.29
C-191	25.4	36.5	31.0	7.85	110	85	97.5	17.7	4487	3832	4160	463
C-192	13.2	15.9	14.6	1.91	-	-	-	-	286	251	269	24.7

[210] 표 4에 나타낸 바와 같이, C-191이 각각의 GLP-1 수용체, GIP 수용체, GCG 수용체에 대해 활성을 갖는 것을 확인하였다. 또한, C-192도 각각의 GLP-1 수용체 및 GCG 수용체에 대해 활성을 갖는 것을 확인하였다.

[211] 특히, GLP-1 수용체에 대한 활성의 면에서, C-191 및 C-192가 대조군으로 사용한 리라글루티드보다 더욱 우수한 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 또한, GLP-1 수용체에 대한 활성의 면에서, C-192가 C-191 보다 약 2배 정도 우수하고, GCG 수용체에 대한 활성의 면에서, 약 15배 정도 우수한 것을 확인하였다.

[212]

[213] **[시험예 2]**

[214] **FGFR1/KLB 기능 분석 (functional assay)**

[215]

[216] 실시예 1 내지 9를 통해 제작한 GCG/GLP-1/FGF21/GIP 또는 GCG/GLP-1/FGF21/IL-1RA 수용체 사중 (tetra) 작용제/길항제인 단백질 결합체 C-191 및 C-192 중 FGF21 작용제의 세포 수준 (시험관 내)에서의 활성 정도를 시험하기 위해, FGFR1/KLB가 과발현된 세포주 (Discover X, Cat. No. 93-118C3)에서 PathHunter Detection Kit (Discover X, Cat. No. 93-0001)를 사용하여 FGFR1/KLB 기능 분석을 다음과 같이 수행하였다.

[217]

[218] **세포 시딩 (Cell seeding)**

[219] T-75 플라스크에 세포가 70~80 % 차도록 배양하였다. 배지를 제거하고, pre-warmed PBS 5 mL로 세척하였다. PBS를 제거하고, AssayComplete cell

detachment reagent 2 mL을 넣어준 후, 37℃ 5 % CO_2 인큐베이터에서 3 분간 배양하여 부착된 세포를 떨어뜨렸다. AssayComplete cell plating 0 reagent 6 mL과 섞어서 15 mL 튜브에 옮기고, 1,000 rpm에서 3분간 원심 분리한 후, 5 mL cell plating reagent에 다시 풀어주었다. 세포 숫자를 세고 500,000 cells/mL의 농도로 만들었다. Reservoir에 옮기고, multi-channel pipette을 사용하여 white 96-well half-area 세포 배양 플레이트에 웰 당 40 μL씩 분주하였다 (20,000 cells/well). 비어있는 웰에는 cell plating reagent 40 μL만 분주하였다. 세포가 부착되도록 37℃ 5 % CO_2 인큐베이터에서 24 시간 동안 배양하였다.

[220]

[221] **<u>과정 (Procedure)</u>**

[222] 4-fold serial dilution으로 준비한 rhFGF21 (5X) 및 test sample (5X)을 10 μL씩 duplicate로 분주하고, 상온에서 4 시간 동안 배양하였다. 대조군 및 비어있는 웰은 AssayComplete cell plating 0 reagent를 10 μL씩 넣어주었다. 배양 후, 배지를 제거하고, AssayComplete cell plating 0 reagent를 50 μL씩 넣어주었다. Detection reagent를 30 μL씩 분주하고, 빛이 차단된 상태에서 상온에서 1 시간 반응시킨 후, plate reader로 발광을 측정하였다.

[223]

[224] **<u>측정 및 분석</u>**

[225] Synergy Neo2 기기로 플레이트내 시료의 발광 (luminescence)을 측정하였다.

[226] Delta RLU (Relative luminescence unit) (△RLU)를 아래와 같이 계산하였다.

[227] $\triangle RLU = RLU_{sample} - RLU_{blank} = Signal - background\ luminescence$

[228] 또한, 아래와 같이 대조군 대비 fold induction을 계산하엿다.

[229]

$$Fold\ induction = \frac{\Delta RLU_{sample}}{\Delta RLU_{control}}$$

[230] 농도 별 Fold induction 값을 바탕으로 아래와 같이 GraphPad Prism 8을 사용하여 EC50값을 구하였다 (curve-fitting of the log(agonist) vs. normalized response - variable slope equation).

[231] plot을 도 19에 나타내었으며, EC50값을 계산하여 하기 표 5에 나타내었다.

[232] [표5]

EC50 (nM)	rhFGF21	C-191	C-192
1	0.75	92.2	42.2
2	0.88	45.1	40.5
Mean	0.82	68.7	41.4
SD	0.09	33.3	1.20

[233] 상기 표 5에 나타낸 바와 같이, C-191 및 C-192은 모두 FGFR1/KLB 수용체에

대해 활성을 갖는 것을 확인하였다. 또한, FGFR1/KLB 수용체의 활성의 면에서, C-192이 C-191 보다 약 40% 정도 더 우수한 것을 확인하였다.

[234]

[235] **[시험예 3]**

[236] **NF-κB reporter gene 발광효소 분석 (reporter gene assay)**

[237]

[238] 실시예 1 내지 9를 통해 제작한 GCG/GLP-1/FGF21/IL-1RA 수용체 사중 (tetra) 작용제/길항제인 단백질 결합체 C-192 중 IL-1RA의 IL-1β에 의한 NF- κB 활성 저해능을 세포 수준 (시험관 내)에서 시험하기 위해, NF-κB reporter (Luc) 세포주 (BPS Bioscience, Cat. No. 60650)에서 다음과 같이 발광효소 분석을 수행하였다.

[239]

[240] **세포 시딩 (Cell seeding)**

[241] T-75 플라스크에 세포가 70~80% 차도록 배양하였다. 배지를 제거하고, pre-warmed PBS 5 mL로 한 번 세척하였다. PBS를 제거하고, TryPLE Express 1 mL을 넣어 5분간 37℃ 5% CO_2 인큐베이터에서 배양하여 세포를 떨어뜨렸다. 4 mL Assay medium (10 % FBS, 1% 항생제 in DMEM)에 섞고, 15 mL 튜브로 옮겨 1,000 rpm에서 3분간 원심 분리한 후, 5 mL assay medium에 다시 풀어주었다. 세포 숫자를 세고 500,000 cells/mL의 농도로 만들었다. Reservoir에 옮기고, multi-channel pipette을 사용하여 white 96-well half-area 세포 배양 플레이트에 웰당 40 μL씩 분주하였다 (20,000 cells/well). 비어있는 웰에는 Assay medium 40 μL만 분주하였다. 세포가 부착되도록 37℃ 5 % CO_2 인큐베이터에서 24 시간 동안 배양하였다.

[242]

[243] **과정 (Procedure)**

[244] 4-fold serial dilution으로 준비된 reference (10X) 및 sample (10X)을 5 μL씩 duplicate로 분주하였다. 이어서 50 pM IL-1β (10X)를 5 μL씩 분주하고, 5 % CO_2 인큐베이터에서 4시간 동안 배양하였다. ONE-Glo reagent (Promega, Cat. No. E6120) 50 μL를 각각 분주하고, 상온에서 5분간 배양 후, Synergy Neo2 기기로 발광을 측정하였다. 이때, ONE-Glo reagent 처리 전, 인큐베이터에서 플레이트를 15분 먼저 꺼내 놓아 상온에 맞추도록 하였다.

[245] Delta RLU (Relative luminescence unit) (△RLU)를 아래와 같이 계산하였다.

[246] $\triangle RLU = RLU_{sample} - RLU_{blank}$ = Signal - background luminescence

[247] 각 농도별 △RLU로 아래와 같이 GraphPad Prism 8을 사용하여 IC50값을 구하였다 (curve-fitting of the log(antagonist) vs. normalized response - variable slope equation).

[248] plot을 도 20에 나타내었으며, IC50값을 계산하여 하기 표 6에 나타내었다.

[249]

[표6]

IC50 (pM)	rhIL-1RA	C-192
1	39.9	561
2	51.5	594
3	46.6	708
4	51.9	568
Mean	47.5	607
SD	4.85	68.4

[250] 상기 표 6에 나타낸 바와 같이, C-192가 IL-1β에 의한 NF-κB의 활성을 저해하는 것을 확인하였다.

[251]

[252] **[시험예 4]**

[253] ***in-vivo* 효능 시험 : 비알콜성 지방간염에 대한 효능 평가**

[254]

[255] 실시예 1 내지 9를 통해 제작한 GCG/GLP-1/FGF21/IL-1RA 수용체 사중 (tetra) 작용제/길항제인 단백질 결합체 C-192의 비알콜성 지방간염에 대한 *in vivo* 효능 검증은 MCD (Methionine and Choline Deficient L-Amino Acid Diet)를 식이하여 지방간을 유발한 C57BL/6J 마우스에서 진행하였다. MCD 마우스 모델은 비알콜성 지방간염에 대한 효능시험에 가장 전형적으로 사용되는 방법으로, 조직학적으로 2~4주째 유발된 간 조직의 조직학적 외형이 인간의 비알콜성 지방간염과 비슷한 유형을 보인다고 알려져 있으며, 다수의 제약사 및 학계에서 다양한 물질로 시험을 진행한 선행사례가 많이 존재한다.

[256] 수컷 C57BL/6J 마우스에 MCD를 8주간 식이하여 지방간을 유발한 후, 마우스를 하기 표 7에 나타낸 6개의 군으로 분리하여 4주간 약물 투여를 진행하였다. 비교물질로는 현재 시판되고 있는 리라글루티드 (Liraglutide, Saxenda) 및 두라글루티드 (Dulaglutide, Trulycity)의 2가지 종류를 사용하였다. 투여 조성물은 각 투여주기에 맞추어 일회용주사기를 이용하여 반복 피하 투여하였다. 8주간의 식이 기간 동안 주 1회 체중을 측정하였으며, 8주 후의 체중으로 유의하게 군 분리를 진행하였다. 정상대조군은 MCS (Methionine and Choline Sufficient L-Amino Acid Diet)를 식이하였다.

[257]

[표7]

No	그룹	식이	투여 조성물	투여 용량	투여 주기	투여 횟수
1	정상 대조군	MCS	-	-	-	-
2	음성 대조군	MCD	부형제	-	-	-
3	실험군 A	MCD	C-192	5 nmol/kg	1회/2일	14회
4	실험군 B	MCD	C-192	40 nmol/kg	1회/2일	14회
5	비교군 A	MCD	Liraglutide	50 nmol/kg	2회/1일	56회
6	비교군 B	MCD	Dulaglutide	2 nmol/kg	1회/2일	14회

[258] 4주간의 투여기간 동안 일반증상 및 행동관찰을 진행하였으며, 투여개시 후 주 1회 및 조직적출일에 체중을 측정하였다. 채혈과 간조직의 적출은 관찰종료일에 진행하였으며, 혈액은 혈액생화학적 검사를 진행하고 적출된 간조직은 조직병리학적 검사를 진행하였다.

[259]

[260] 혈액생화학적 검사를 통해 간질환의 가장 기본적인 지표로 사용되는 알라닌아미노전이효소 (Alanine Aminotransferase, ALT)를 측정하여, 하기 표 8 및 도 21에 나타내었다.

[261] [표8]

No	그룹	ALT
1	정상 대조군	18.3
2	음성 대조군	230.6
3	실험군 A	178.3
4	실험군 B	126.3
5	비교군 A (리라글루티드 투여군)	223.0
6	비교군 B (두라글루티드 투여군)	220.5

[262] 상기 표 8에 나타낸 바와 같이, 리라글루티드 및 두라글루티드를 투여한 군 (비교군 A 및 B)에서는 ALT 값이 거의 감소하지 않았으나, C-192을 투여한 군에서는 ALT 값이 현저하게 감소하는 것을 알 수 있었다.

[263] ALT는 간 손상의 정도를 나타내기 때문에, 본 발명의 단백질 결합체를 투여한 경우, 간손상의 정도가 감소하는 것을 알 수 있다.

[264]

[265] 또한, ALT/AST 값을 하기 표 9 및 도 22에 나타내었다.

[266] [표9]

No	그룹	ALT/AST 값
1	정상 대조군	1.77
2	음성 대조군	0.98
3	실험군 A	1.35
4	실험군 B	1.53
5	비교군 A (리라글루티드 투여군)	0.99
6	비교군 B (두라글루티드 투여군)	0.79

[267] 상기 표 9에 나타낸 바와 같이, 리라글루티드 및 두라글루티드를 투여한 군 (비교군 A 및 B)에서는 ALT/AST 값이 1.0 미만으로 확인되었으나, C-192을 투여한 군에서는 ALT/AST 값이 1.0을 초과한 것을 알 수 있었다.

[268] 간질환에서 ALT/AST 값이 1 미만인 경우가 많기 때문에, 본 발명의 단백질 결합체를 투여한 경우, 간손상의 정도가 감소하는 것을 알 수 있다.

[269]

[270] 또한, 조직병리학적 검사는 H&E 및 Masson's trichrome 염색을 통해 관찰하였고, 그 결과를 도 23에 나타내었다. 비알콜성 지방간염의 경우, 지방증 및 소엽에 염증이 생겨 조직 염색시 염증세포를 확인할 수 있다. 도 23에 나타낸 바와 같이, 40 nmol/kg의 단백질 결합체를 투여한 군 (실험군 B)은 음성대조군과 비교하였을 때, 지방 및 염증세포가 정상대조군 정도로 개선된 것을 알 수 있다.

[271]

[272] 또한, 하기 표 10에 나타낸 평가기준에 근거하여, 지방증 점수 (Steatosis score), 소엽 염증 점수 (Lobular inflammation score), 및 NAS (NAFLD activity score)를 평가하였다.

[273]

[표10]

ITEM	Definition	Score
Steatosis	Low to medium power evaluation of parenchymal involvement by steatosis	
	<5%	0
	5~33%	1
	>33~66%	2
	>66%	3
Lobular inflammation	Overall assessment of all inflammatory foci	
	No foci	0
	<2 foci per 200ϒfield	1
	2~4 foci per 200ϒfield	2
	>4 foci per 200ϒfield	3
Ballooning	None	0
	Few balloon cells	1
	Many cells/prominet ballooning	2

[274] 상기 평가결과를 하기 표 11 내지 표 13 및 도 24 내지 도 26에 나타내었다.

[275] [표11]

No	그룹	지방증 점수 (Steatosis)
1	정상 대조군	0
2	음성 대조군	2.1
3	실험군 A	1.7
4	실험군 B	0.9
5	비교군 A (리라글루티드 투여군)	1.6
6	비교군 B (두라글루티드 투여군)	1.9

[276]

[표12]

No	그룹	소엽 염증 점수 (Lobular inflammation)
1	정상 대조군	0.3
2	음성 대조군	1.3
3	실험군 A	1.2
4	실험군 B	0.2
5	비교군 A (리라글루티드 투여군)	0.5
6	비교군 B (두라글루티드 투여군)	1.5

[277] [표13]

No	그룹	NAS (NAFLD Activity Score)
1	정상 대조군	0.3
2	음성 대조군	3.4
3	실험군 A	2.9
4	실험군 B	1.2
5	비교군 A (리라글루티드 투여군)	2.2
6	비교군 B (두라글루티드 투여군)	3.4

[278] 상기 표 11 내지 13에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 단백질 결합체를 투여한 군은 모두 우수한 결과를 나타내었고, 특히 40 nmol/kg의 단백질 결합체를 투여한 군 (실험군 B)는 리라글루티드 및 두라글루티드 투여군보다 월등하게 우수한 평가 결과를 나타내었다.

[279]

[280] 간조직으로부터 간 섬유화 마커인 TGF-β에 대해 ELISA로 분석을 진행하였고, 그 결과를 하기 표 14 및 도 27에 나타내었다.

[281] [표14]

No	그룹	Hepatic TGF-β
1	정상 대조군	74.40
2	음성 대조군	164.10
3	실험군 A	135.50
4	실험군 B	98.70
5	비교군 A (리라글루티드 투여군)	136.40
6	비교군 B (두라글루티드 투여군)	159.60

[282] 상기 표 14에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 단백질 결합체를 투여한 군은 TGF-β 값이 감소하였고, 특히 40 nmol/kg의 단백질 결합체를 투여한 군 (실험군 B)는 정상대조군과 거의 유사한 값을 나타내었다.

[283]

[284] 또한, 간조직 내 트리글리세리드 (Triglyceride) 축적은 Triglyceride Assay Kit를 이용하여 분석하였고, 그 결과를 하기 표 15 및 도 28에 나타내었다.
리라글루티드 및 두라글루티드 투여군은 간조직 내 트리글리세리드의 양이 거의 감소하지 않았으나, 본 발명의 단백질 결합체 투여군은 정상대조군과 거의 유사한 값을 나타내었다.

[285] [표15]

No	그룹	Hepatic Triglyceride
1	정상 대조군	17.76
2	음성 대조군	40.31
3	실험군 A	25.69
4	실험군 B	24.43
5	비교군 A (리라글루티드 투여군)	40.69
6	비교군 B (두라글루티드 투여군)	40.78

[286] 결국, 본 발명의 단백질 결합체 C-192 투여군은 리라글루티드 및 두라글루티드 투여군과 비교하여 모든 실험에서 월등하게 우수한 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다.

[287]

[288] **[시험예 5]**

[289] ***in-vivo* 효능 시험 : 비알콜성 지방간염에 대한 효능 평가**

[290]

[291] 실시예 1 내지 9를 통해 제작한 GCG/GLP-1/FGF21/GIP 수용체 사중 (tetra) 작용제/길항제인 단백질 결합체 C-191의 비알콜성 지방간염에 대한 *in vivo* 효능 검증은 MCD (Methionine and Choline Sufficient L-Amino Acid Diet)를 식이하여 지방간을 유발한 C57BL/6J 마우스에서 진행하였다.

[292] 하기 표 16에 나타낸 바와 같이 4개의 군으로 분리하여 상기 시험예 4와 동일한 방법으로 진행하였으며, 비교물질로는 현재 시판되고 있는 두라글루티드 (Dulaglutide, Trulycity)를 사용하였다.

[293]

[표16]

No	그룹	식이	투여 조성물	투여 용량	투여 주기	투여 횟수
1	정상 대조군	MCS	-	-	-	-
2	음성 대조군	MCD	부형제	-	-	-
3	실험군 A	MCD	C-191	10 nmol/kg	1회/2일	14회
4	비교군 B	MCD	Dulaglutide	2 nmol/kg	1회/2일	14회

[294] 4주간의 투여기간 동안 일반증상 및 행동관찰을 진행하였으며, 투여개시 후 주 1회 및 조직적출일에 체중을 측정하였다. 채혈과 간조직의 적출은 관찰종료일에 진행하였으며, 혈액은 혈액생화학적 검사를 진행하고 적출된 간조직은 조직병리학적 검사를 진행하였다.

[295]

[296] 혈액생화학적 검사를 통해 간질환의 가장 기본적인 지표로 사용되는 알라닌아미노전이효소 (Alanine Aminotransferase, ALT)를 측정하여, 하기 표 17 및 도 29에 나타내었다.

[297] [표17]

No	그룹	ALT
1	정상 대조군	19.1
2	음성 대조군	312.4
3	실험군 A	151.9
4	비교군 A (두라글루티드 투여군)	246.8

[298] 상기 표 17에 나타낸 바와 같이, 두라글루티드를 투여한 군에서는 ALT 값이 거의 감소하지 않았으나, C-191을 투여한 군에서는 ALT 값이 현저하게 감소하는 것을 확인하였다.

[299] ALT는 간 손상의 정도를 나타내기 때문에, 본 발명의 단백질 결합체를 투여한 경우, 간손상의 정도가 감소하는 것을 알 수 있다.

[300]

[301] 또한, AST/ALT 값을 하기 표 18 및 도 30에 나타내었다.

[302]

[표18]

No	그룹	AST/ALT 값
1	정상 대조군	1.84
2	음성 조군	0.82
3	실험군 A	0.98
4	비교군 A (두라글루티드 투여군)	0.76

[303] 상기 표 18에 나타낸 바와 같이, 두라글루티드를 투여한 군에서 ALT/AST 값이 0.76으로 확인되었으나, C-191을 투여한 군에서는 ALT/AST 값이 0.98로 두라글루티드 투여군보다 높은 것을 확인하였다.

[304] 간질환에서 ALT/AST 값이 1 미만인 경우가 많기 때문에, 본 발명의 단백질 결합체를 투여한 경우, 간손상의 정도가 감소하는 것을 알 수 있다.

[305]

[306] 또한, 조직병리학적 검사는 H&E 및 Masson's trichrome 염색을 통해 관찰하였고, 그 결과를 도 31에 나타내었다. 비알콜성 지방간염의 경우, 지방증 및 소엽에 염증이 생겨 조직 염색시 염증세포를 확인할 수 있다. 도 31에 나타낸 바와 같이, 10 nmol/kg의 단백질 결합체를 투여한 군은 음성대조군과 비교하였을 때, 지방 및 염증세포가 정상대조군 정도로 개선된 것을 알 수 있다.

[307]

[308] 또한, 상기 표 10에 나타낸 평가기준에 근거하여, 지방증 점수 (Steatosis score), 소엽 염증 점수 (Lobular inflammation score), 및 NAS (NAFLD activity score)를 평가하였다.

[309] 상기 평가결과를 하기 표 19 내지 표 21 및 도 32 내지 도 34에 나타내었다.

[310] [표19]

No	그룹	지방증 점수 (Steatosis)
1	정상 대조군	0
2	음성 대조군	2.4
3	실험군 A	1.4
4	비교군 A (두라글루티드 투여군)	1.8

[311]

[표20]

No	그룹	소엽 염증 점수 (Lobular inflammation)
1	정상 대조군	0.2
2	음성 대조군	1.6
3	실험군 A	1.0
4	비교군 A (두라글루티드 투여군)	1.6

[312] [표21]

No	그룹	NAS (NAFLD Activity Score)
1	정상 대조군	0.2
2	음성 대조군	4.0
3	실험군 A	2.4
6	비교군 A (두라글루티드 투여군)	3.4

[313] 상기 표 19 내지 21에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 단백질 결합체를 투여한 군은 모두 우수한 결과를 나타내었고, 두라글루티드 투여군보다 월등하게 우수한 평가 결과를 나타내었다.

[314]

[315] 간조직으로부터 간 섬유화 마커인 TGF-β에 대해 ELISA로 분석을 진행하였고, 그 결과를 하기 표 22 및 도 35에 나타내었다.

[316] [표22]

No	그룹	Hepatic TGF-β
1	정상 대조군	77.3
2	음성 대조군	177.9
3	실험군 A	117.4
4	비교군 A (두라글루티드 투여군)	165.3

[317] 상기 표 22에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 단백질 결합체를 투여한 군은 TGF-β 값이 감소하였고, 두라글루티드 투여군보다 현저하게 감소한 것을 확인하였다.

[318]

[319] 또한, 간조직 내 트리글리세리드 (triglyceride) 축적은 Triglyceride Assay Kit를 이용하여 분석하였고, 그 결과를 하기 표 23 및 도 36에 나타내었다.
두라글루티드 투여군은 간조직 내 트리글리세리드의 양이 거의 감소하지 않았으나, 본 발명의 단백질 결합체 투여군은 정상대조군과 거의 유사한 값을 나타내었다.

[320] [표23]

No	그룹	Hepatic Triglyceride
1	정상 대조군	17.13
2	음성 대조군	40.09
3	실험군 A	24.02
6	비교군 A (두라글루티드 투여군)	36.08

[321] 결국, 본 발명의 단백질 결합체 C-191 투여군은 두라글루티드 투여군과 비교하여 모든 실험에서 월등하게 우수한 효과를 나타내는 것을 알 수 있다.

[322]

[323] **[시험예 6]**

[324] ***in-vivo* 효능 시험 : 비만에 대한 효능 평가**

[325]

[326] 실시예 1 내지 9를 통해 제작한 GCG/GLP-1/FGF21/IL-1RA 수용체 사중 (tetra) 작용제/길항제인 단백질 결합체 C-192의 혈중 지질 감소 효과를 확인하기 위하여, 식이 유도 비만 마우스를 이용하여 평가를 실시하였다. 식이 방법으로 비만을 유발하기 위하여, 5주령 C57BL/6J 마우스를 ㈜중앙실험동물로부터 구입하였고, 약 7일간의 순화기간 종료 후 western diet를 16주 급여하여 비만 마우스를 유발시켰다. 하기 표 24에 나타낸 바와 같이, 평균체중 및 체중변화를 참고하여 이상이 없는 동물을 선발하였고, 각 군의 평균체중이 균등하도록 군당 6마리씩 군 분리를 진행하였다. 투여 경로는 임상적용 예정경로와 동일하게 피하 투여를 실시하였으며, 투여 빈도는 1회/2일, 8주간 총 28회 반복 투여하였다.

[327] [표24]

No	그룹	평균체중(g)	식이	투여 조성물	투여 용량	투여 주기	투여 횟수
1	정상 대조군	27.1 ± 1.3	실험동물용 고형사료	부형제	-	1회/2일	28회
2	음성 대조군	44.7 ± 2.3	RD western diet	부형제	-	1회/2일	28회
3	실험군 A	43.9 ± 1.1	RD western diet	C-192	10 nmol/kg	1회/2일	28회
4	실험군 B	42.1 ± 4.1	RD western diet	C-192	30 nmol/kg	1회/2일	28회
5	실험군 C	41.7 ± 4.4	RD western diet	C-192	60 nmol/kg	1회/2일	28회

[328] 투여 조성물로 정상 대조군 및 음성 대조군의 경우 부형제를 투여하였으며, 실험군의 경우 10, 30 및 60 nmol/kg 용량으로 C-192를 투여하였다. 8주간의 투여 기간 동안 1일 1회 외관, 행동 및 배설물 등의 일반 증상을 관찰하였다. 투여 종료일에 복대정맥에서 혈액을 채취하고 SST tube에 혈액을 담아 3,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 혈청을 분리한 후, 혈액생화학적 분석기 (7180, HTTACHI, Japan)를 이용하여 하기 표 25에 나타낸 바이오마커들을 측정하였다.

[329] [표25]

지질 관련 바이오마커	단위	측정방법
중성지방 (triglycerides, TG)	mg/dL	GPO-HMMPS Glycerol blanking
유리지방산 (Non esterified fatty acid, NEFA)	μEq/L	ACS·ACOD
총콜레스테롤 (total cholesterol, T-Chol)	mg/dL	Cholesterol oxidase-HMMPS
저밀도 지단백 콜레스테롤 (LDL-Cholesterol)	mg/dL	Selective protection enzymatic
고밀도 지단백 콜레스테롤 (HDL-Cholesterol)	mg/dL	Direct

[330] C-192의 지질 개선에 대한 효과를 평가하기 위하여 혈청 중 중성지방 (TG), 유리지방산 (NEFA), 총콜레스테롤 (T-Chol), 저밀도 지단백 콜레스테롤 (LDL) 및 고밀도 지단백 콜레스테롤 (HDL)을 측정하였고, 그 결과를 하기 표 26 및 도 37 내지 41에 나타내었다.

[331] [표26]

No	그룹	TG (mg/dL)	NEFA (μEq/L)	T-Chol (mg/dL)	LDL (mg/dL)	HDL (mg/dL)
1	정상 대조군	14.7	1.2	105.3	2.9	62.8
2	음성 대조군	26.0	1.5	241.8	21.7	99.2
3	실험군 A	24.2	1.3	227.0	19.9	102.8
4	실험군 B	18.0	1.1	162.0	13.6	74.7
5	실험군 C	16.0	1.2	167.2	12.7	79.8

[332] 상기 표 26 및 도 37 내지 41에 나타낸 바와 같이, C-192를 투여한 군에서 혈액 내 지질 관련 바이오마커들의 수치가 감소하는 것을 확인하였다. 특히, 60

nmol/kg의 C-192를 투여한 군 (실험군 C)의 경우, 음성 대조군 대비 중성지방 (TG) 38.5%, 유리지방산 (NEFA) 20%, 총콜레스테롤 (T-Chol) 30.9%, 저밀도 지단백 콜레스테롤 (LDL-Chol) 41.5% 및 고밀도 지단백 콜레스테롤 (HDL-Chol) 19.6%가 감소한 것을 확인하였다. 또한, 고밀도 지단백 콜레스테롤을 제외한 모든 바이오마커들에서 음성 대조군과 비교했을 때 통계학적으로 유의한 차이를 보였다. 따라서, 본 발명의 단백질 결합체는 식이 유도 비만 마우스의 혈액 내 지질을 감소시키는 것을 알 수 있다.

[333]

[334] **[시험예 7]**

[335] ***in-vivo* 효능 시험 : 당뇨에 대한 효능 평가**

[336]

[337] 실시예 1 내지 9를 통해 제작한 GCG/GLP-1/FGF21/IL-1RA 수용체 사중 (tetra) 작용제/길항제인 단백질 결합체 C-192의 항 당뇨 효능을 확인하기 위하여, 제2형 당뇨 모델 마우스인 db/db 마우스를 이용하여 평가를 실시하였다. db/db 마우스는 4번 염색체의 렙틴 (leptin) 수용체 유전자인 Lepr에 돌연변이가 생겨 지방세포에서 분비하는 호르몬인 렙틴의 신호전달이 일어나지 않아 비만과 제2형 당뇨병이 발생하는 동물 모델이다. 정상 동물로는 C57BL/6J 마우스를 사용하였고, 실험 동물로는 Japan SLC로부터 7주령 수컷을 구입하여 7일간 검역 및 순화시킨 8주령의 마우스를 사용하였다.

[338] 하기 표 27에 나타낸 바와 같이, 실험군의 구성은 정상 대조군, 음성 대조군, 시험물질 투여군 및 양성 대조군으로 분류하였다. 검역 및 순화 종료 후 체중 및 혈당이 균등하도록 군당 5마리씩 군 분리를 진행하였다. 투여 경로는 임상적용 예정경로 동일하게 피하 투여를 실시하였으며, 투여는 8일간 진행하였다. 투여 빈도는 정상 대조군, 음성 대조군 및 실험군은 1회/1일, 양성 대조군은 1회/2일 투여를 실시하였다.

[339] [표27]

No	계통 및 종	그룹	투여 조성물	투여 용량	투여 주기	투여 횟수
1	C57BL/6J mouse	정상 대조군	부형제	-	1회/1일	8 회
2	db/db mouse	음성 대조군	부형제	-	1회/1일	8 회
3		실험군 A	C-192	10 nmol/kg	1회/1일	8 회
4		실험군 B	C-192	60 nmol/kg	1회/1일	8 회
5		양성 대조군	Semaglutide	10 nmol/kg	1회/2일	4 회

[340] 투여 조성물로 정상 대조군 및 음성 대조군의 경우 부형제로 투여하였으며,

실험군의 경우 10 및 60 nmol/kg 용량으로 C-192를 투여하였다. 8일간의 투여 기간 동안 1회/1일 일반 증상을 관찰하였고, db/db 마우스에서 항 당뇨 효과를 확인하기 위하여 혈당, 체중, 사료 및 음수를 측정하였다. 혈당은 비절식 혈당을 측정하였으며, 투여 전 1회/2일 꼬리정맥에서 채혈하여 혈당기 (G-Doctor)를 이용하여 측정하였다. 체중, 사료 및 음수의 변화를 확인하기 위하여 투여 1일, 투여 4일, 투여 8일차에 측정을 진행하였고, 그 결과를 하기 표 28 및 도 42 내지 49에 나타내었다.

[341] [표28]

No	그룹	Glucose (mg/dL)	Weight (g)	Food (g)	Water (mL)
1	정상 대조군	161.0	23.6	15.4	33.1
2	음성 대조군	561.9	33.2	26.6	97.2
3	실험군 A	409.6	33.7	20.4	61.5
4	실험군 B	216.8	30.6	16.7	48.6
5	양성 대조군	444.5	32.3	21.9	41.3

[342] 상기 표 28 및 도 42 내지 49에서 나타낸 바와 같이, C-192를 투여한 군에서 혈당, 사료 및 음수 섭취량이 감소하는 것을 확인하였다. 특히, 60 nmol/kg의 C-192를 투여한 군 (실험군 B)의 경우, 음성대조군 대비 9일차 혈당 61.4 %, 8일차 체중 7.8 %, 사료 섭취량 37.1 % 및 음수섭취량 50.0 %가 유의하게 감소하는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 단백질 결합체는 항 당뇨 효과를 나타내는 것을 알 수 있다.

[343]

[344] **[시험예 8]**

[345] ***In silico* 면역원성 분석**

[346]

[347] 실시예 1 내지 9를 통해 제작한 GCG/GLP-1/FGF21/GIP 또는 GCG/GLP-1/FGF21/IL-1RA 수용체 사중 (tetra) 작용제/길항제인 단백질 결합체 C-191 및 C-192를 이루는 각각의 수용체와 공여체에 대한 *in silico* 면역원성 분석을 수행하였다. 면역원성은 인체 내에 약물이 투여되었을 때, 면역반응을 유발하는 성질을 의미하는 것으로, 약효뿐만 아니라 안전성에도 영향을 주는 인자이다. 면역원성 유발 서열 데이터베이스와 컴퓨터 분석 프로그램을 이용한 *in silico* 분석과 사람 유래의 PBMC를 이용한 *in vitro* 면역원성 평가를 진행하였다.

[348] 그 결과, 도 50 내지 55에 나타낸 바와 같이, 전세계적으로 가장 빈도수가 높은 하기 표 29의 27종의 HLA type들에 관하여 면역원성 유발 정도를 예측하였다.

[349]

[표29]

순번	HLA type		순번	HLA type
1	HLA-DRB1*01:01		15	HLA-DRB5*01:01
2	HLA-DRB1*03:01		16	HLA-DQA1*05:01/DQB1*02:01
3	HLA-DRB1*04:01		17	HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01
4	HLA-DRB1*04:05		18	HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02
5	HLA-DRB1*07:01		19	HLA-DQA1*04:01/DQB1*04:02
6	HLA-DRB1*08:02		20	HLA-DQA1*01:01/DQB1*05:01
7	HLA-DRB1*09:01		21	HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02
8	HLA-DRB1*11:01		22	HLA-DPA1*02:01/DPB1*01:01
9	HLA-DRB1*12:01		23	HLA-DPA1*01:03/DPB1*02:01
10	HLA-DRB1*13:02		24	HLA-DPA1*01/DPB1*04:01
11	HLA-DRB1*15:01		25	HLA-DPA1*03:01/DPB1*04:02
12	HLA-DRB3*01:01		26	HLA-DPA1*02:01/DPB1*05:01
13	HLA-DRB3*02:02		27	HLA-DPA1*02:01/DPB1*14:01
14	HLA-DRB4*01:01			

[350] 각각의 수용체 및 공여체의 단백질 서열은 27종의 HLA type 별로 MHC I과 MHC II의 항원결합 부위에 결합할 가능성이 낮은 것으로 예측되었다. 이는 각각의 수용체 및 공여체가 낮은 면역원성을 갖는 것으로 안전성이 높을 것으로 예측하였다.

[351]

[352] **[시험예 9]**

[353] **API 스크리닝 (Screening)**

[354]

[355] **GLP-1 수용체 작용제 스크리닝**

[356] Native GLP-1 및 GLP-1 아날로그의 세포 수준 (시험관 내)에서의 활성 정도를 시험하기 위해, 시험예 1과 동일한 방법으로 cAMP 누적 분석을 수행하였다.

[357] GLP-1 수용체 단일 작용제의 EC50값을 계산하여 하기 표 30에 나타내었다.

[358]

[표30]

구분	세포주	EC50 (pM)	Comments	서열번호
Liraglutide	Transient	43.0 ± 10.6	n=11	-
	Stable	50.3 ± 21.9	n=8	
Dulaglutide	Stable	1.45 ± 0.45	n=6	-
GLP-1(7-36)_native	Transient	4.00	n=1	서열번호 4
GLP#1	Transient	159	n=1	서열번호 5
GLP#3	Transient	2.25 ± 0.19	n=2	서열번호 6
GLP#4	Transient	3.19 ± 0.74	n=2	서열번호 7
GLP#5	Transient	7.52	n=1	서열번호 8
GLP#6	Transient	1.50 ± 0.06	n=2	서열번호 9
GLP#7	Transient	23.0	n=1	서열번호 10
GLP#8	Transient	1.95 ± 0.03	n=2	서열번호 11
GLP#9	Transient	0.71 ± 0.37	n=3	서열번호 12
	Stable	2.08 ± 1.60	n=4	
GLP#10	Transient	8.26 ± 4.02	n=2	서열번호 13
GLP#11	Transient	6.05	n=1	서열번호 14
GLP#12	Transient	559	n=1	-
GLP#13	Transient	31.9 ± 7.28	n=2	-
GLP#14	Transient	>5000	n=1	-
GLP#15	Transient	>5000	n=1	-

[359] GLP-1/GCG 수용체 이중 작용제의 EC50값을 계산하여 하기 표 31에 나타내었다.

[360]

[표31]

구분	세포주	EC50 (pM)	Comments	서열번호
GCG#2	Transient	52.0 ± 27.4	n=2	서열번호 2
	Stable	10.1 ± 1.23	n=2	
GCG#3	Transient	43.9 ± 28.3	n=2	서열번호 3
	Stable	25.6 ± 26.9	n=3	
GLP/GCG#1	Transient	588	n=1	-
GLP/GCG#2	Transient	201	n=1	-
GLP/GCG#3	Transient	13	n=1	서열번호 15
GLP/GCG#4	Transient	15.0 ± 7.00	n=2	-
GLP/GCG#5	Transient	165	n=1	-
GLP/GCG#6	Transient	129	n=1	-
GLP/GCG#7	Transient	3860	n=1	-
GLP/GCG#8	Transient	12.5	n=1	-
GLP/GCG#9	Transient	1589	n=1	-
GLP/GCG#10	Transient	9742	n=1	-
GLP/GCG#11	Transient	>5000	n=1	-
GLP/GCG#12	Transient	80.1	n=1	-
GLP/GCG#13	Transient	604	n=1	-
GLP/GCG#14	Transient	221	n=1	-
GLP/GCG#15	Transient	16	n=1	서열번호 16

[361] GLP-1/GIP 수용체 이중 작용제의 EC50값을 계산하여 하기 표 32에 나타내었다.

[362] [표32]

구분	세포주	EC50 (pM)	Comments	서열번호
GLP/GIP#2	Transient	57.8	n=1	-
GLP/GIP#3	Transient	>5000	n=1	-
GLP/GIP#4	Transient	>5000	n=1	-

[363] **GIP 수용체 작용제 스크리닝**

[364] Native GIP 및 GIP 아날로그의 세포 수준 (시험관 내)에서의 활성 정도를 시험하기 위해, 시험예 1과 동일한 방법으로 cAMP 누적 분석을 수행하였다.

[365] GIP 수용체 단일 작용제 및 GLP-1/GIP 수용체 이중 작용제의 EC50값을 계산하여 하기 표 33에 나타내었다.

[366] [표33]

구분	세포주	EC50 (pM)	Comments	서열번호
GIP native-Ub	Transient	8.93 ± 5.77	n=4	서열번호 22
	Stable	35.0	n=1	
GIP#1	Transient	17.5 ± 10.6	n=3	서열번호 23
GIP#2	Transient	6.63 ± 3.87	n=3	서열번호 24
	Stable	12.0 ± 5.73	n=2	
GIP#3	Transient	171	n=1	-
GIP#4	Transient	>5000	n=1	-
GIP#5	Transient	81.9	n=1	서열번호 25
GIP#6	Transient	398	n=1	-
GIP#7	Transient	76.9	n=1	서열번호 26
GIP#8	Transient	560	n=1	-
GLP/GIP#2	Transient	128	n=1	-
GLP/GIP#3	Transient	566	n=1	-
GLP/GIP#4	Transient	1283	n=1	-

[367] **GCG 수용체 작용제 스크리닝**

[368] Native GCG 및 GCG 아날로그의 세포 수준 (시험관 내)에서의 활성 정도를 시험하기 위해, 시험예 1과 동일한 방법으로 cAMP 누적 분석을 수행하였다.

[369] GCG 수용체 단일 작용제의 EC50값을 계산하여 하기 표 34에 나타내었다.

[370]

[표34]

구분	세포주	EC50 (pM)	Comments	서열번호
GCG native-Ub	Transient	41.7 ± 29.9	n=3	서열번호 1
	Stable	35.3 ± 32.7	n=2	
GCG#1	Transient	>5000	n=1	-
GCG#2	Transient	41.7 ± 5.51	n=3	서열번호 2
	Stable	68.5 ± 41.8	n=2	
GCG#3	Transient	47.8 ± 21.9	n=3	서열번호 3
	Stable	21.1 ± 12.3	n=3	
GCG#4	Transient	>5000	n=1	-
GCG#5	Transient	661 ± 193	n=3	-
GCG#6	Transient	8400	n=1	-
GCG#7	Transient	956	n=1	-
GCG#8	Transient	761 ± 73.5	n=2	-
GCG#9	Transient	1073	n=1	-
GCG#10	Transient	>5000	n=1	-
GCG#11	Transient	>5000	n=1	-

[371] GLP-1/GCG 수용체 이중 작용제의 EC50값을 계산하여 하기 표 35에 나타내었다.

[372]

[표35]

구분	세포주	EC50 (pM)	Comments	서열번호
GLP/GCG#1	Transient	>5000	n=1	-
GLP/GCG#2	Transient	>5000	n=1	-
GLP/GCG#3	Transient	>5000	n=1	서열번호 15
GLP/GCG#4	Transient	>5000	n=1	-
GLP/GCG#5	Transient	>5000	n=1	-
GLP/GCG#6	Transient	>6250	n=1	-
GLP/GCG#7	Transient	>5000	n=1	-
GLP/GCG#8	Transient	>5000	n=1	-
GLP/GCG#9	Transient	>5000	n=1	-
GLP/GCG#10	Transient	>5000	n=1	-
GLP/GCG#11	Transient	>5000	n=1	-
GLP/GCG#12	Transient	321	n=1	-
GLP/GCG#13	Transient	>5000	n=1	-
GLP/GCG#14	Transient	>5000	n=1	-
GLP/GCG#15	Transient	424	n=1	서열번호 16

[373] **FGF21 수용체 작용제 스크리닝**

[374] Native FGF21 및 FGF21 아날로그의 세포 수준 (시험관 내)에서의 활성 정도를 시험하기 위해, 시험예 2와 동일한 방법으로 FGFR1/KLB 기능 분석을 수행하였다.

[375] FGF21 수용체 단일 작용제의 EC50값을 계산하여 하기 표 36에 나타내었다.

[376]

[표36]

구분	EC50 (nM)	Comments	서열번호
rhFGF21 (native)	1.17 ± 0.56	n=4	서열번호 17
FGF#1	21.0 ± 0.49	n=2	서열번호 18
FGF#5	22.3 ± 0.71	n=2	서열번호 19
FGF#7	17.7 ± 2.55	n=2	서열번호 20
FGF#9	19.1 ± 0.49	n=2	서열번호 21
FGF#11	> 5000	n=1	-
FGF#12	> 5000	n=1	-
FGF#13	> 5000	n=1	-
FGF#14	> 5000	n=1	-
FGF#15	> 5000	n=1	-

[377] **IL-1RA 수용체 길항제 스크리닝**

[378] Native IL-1RA 및 IL-1RA 아날로그의 IL-1β에 의한 NF-κB 활성 저해능을 세포 수준 (시험관 내)에서 시험하기 위해, 시험예 3과 동일한 방법으로 NF-κB reporter gene 발광효소 분석을 수행하였다.

[379] IL-1RA 수용체 단일 길항제의 IC50값을 계산하여 하기 표 37에 나타내었다.

[380] [표37]

구분	IC50 (pM)	Comments	서열번호
rhIL-1RA (native)	68.6 ± 7.71	n=2	서열번호 27
IL-1RA-Ub(Donor)	236 ± 43.8	n=2	서열번호 28

[381] 상기의 다양한 작용제 및 길항제를 스크리닝한 결과, 우수한 효과를 갖는 생체분자를 선별하여, 본 발명의 단백질 결합체를 제조하였다. 그 결과 본 발명의 단백질 결합체는 비알콜성 지방간염 (NASH), 지방간, 간섬유화, 간경변, 간암, 비만 또는 당뇨 질환의 예방 및 치료에 우수한 효과를 가지며, 우수한 안정성을 갖는 것도 확인되었다.