



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년02월12일
(11) 등록번호 10-1947341
(24) 등록일자 2019년02월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/59 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/59 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0057117
(22) 출원일자 2017년05월05일
심사청구일자 2017년05월05일
(65) 공개번호 10-2018-0122900
(43) 공개일자 2018년11월14일
(56) 선행기술조사문헌
HORMONES, Vol.1, No.4, pp.224-232(2002)
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 3 항

(73) 특허권자
주식회사 유비프로틴
경기도 성남시 분당구 판교역로 240, 에이동518호(삼평동,삼환하이팩스)
(72) 발명자
백광현
서울특별시 강남구 삼성로 151, 11동 1201호 (대치동, 선경아파트)
김경곤
서울특별시 송파구 올림픽로 435, 113동 3401호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이중승

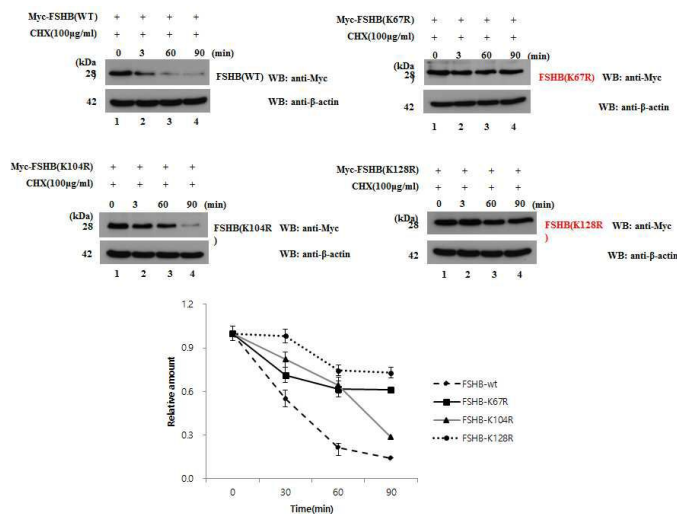
심사관 : 문명순

(54) 발명의 명칭 FSHβ 반감기를 증가시키는 방법

(57) 요약

본 발명은 여포자극호르몬β의 아미노산 서열에 존재하는 하나 이상의 라이신 잔기를 치환 하는 것을 포함하여 여포자극호르몬β의 반감기를 증가시키는 방법 또는 반감기가 증가 된 여포자극호르몬β에 관한 것으로서, 본 발명의 라이신 잔기가 치환된 여포자극호르몬β은 인체 내에서 오랜 시간 동안 잔류하며 치료효과가 우수하다.

대표도 - 도6



(72) 발명자

김명선

강원도 원주시 무설로 155, 101동 103호

김현미

경기도 수원시 영통구 태장로82번길 32, 109동
2004호

오수경

경기도 용인시 수지구 손곡로 56, 203동 102호

배성렬

경기도 성남시 분당구 정자로 112, 507동 1901호
(정든마을신화5단지아파트)

(56) 선행기술조사문헌

Molecular and Cellular Endocrinology, Vol.161,
Iss.1-2, pp.9-17 (2000.03.30.)

KR1020080087854 A

WO2001058493 A1

KR1020040039320 A

Human reproduction update vo.4, no.3,
pp.260-283 (1998)

KR1020110111266 A

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호: 1의 아미노산 서열을 갖는 여포자극호르몬β (FSHβ, Follicle-stimulating hormoneβ)의 N-말단으로부터 67번째, 104번째 및 128번째 위치의 라이신 잔기 중 어느 하나가 아르기닌으로 치환된 것인, 증가된 반감기를 갖는 여포자극호르몬β.

청구항 2

삭제

청구항 3

(a) 프로모터; 및 (b) 제 1항의 여포자극호르몬β를 엔코딩 하는 염기서열을 포함하는 발현벡터로서, 상기 프로모터와 염기서열이 작동적으로 연결된 것인, 발현벡터.

청구항 4

제 3항의 발현벡터를 포함하는 숙주세포.

청구항 5

삭제

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 단백질 또는 (폴리)펩타이드의 하나 이상의 아미노산 잔기를 치환함에 의해 단백질 또는 (폴리)펩타이드의 반감기를 증가시키는 방법에 관한 것이다. 또한, 이러한 방법에 의해 제작된 반감기가 증가된 단백질 또는 (폴리)펩타이드에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 세포 내 단백질 분해는 리소좀 (lysosome)과 프로테아좀 (proteasome)에 의한 두 가지 경로를 통해 이루어진다. 단백질의 10 ~ 20%를 분해하는 리소좀 경로는 기질 특이성 및 정교한 시간적 조절성이 없다. 즉 내포운동 (endocytosis)에 의해 세포 내로 함입되어 들어간 세포 표면단백질이 리소좀에서 분해되는 것처럼 대부분 세포 외 또는 막단백질을 분해하는 과정이다. 그러나, 진핵세포에서 단백질들이 선택적으로 분해되기 위해서는 유비퀴틴 (ubiquitin) 결합효소에 의해 목표단백질에 유비퀴틴이 결합한 후 폴리유비퀴틴 사슬이 형성되고, 이것이 프로테아좀에 의해 인지되고 분해되는 과정, 즉 유비퀴틴-프로테아좀 경로 (ubiquitin-proteasome pathway: UPP)를 거쳐야 한다. 진핵세포 단백질 중 80 ~ 90% 이상은 이 과정을 거쳐서 분해되며, 유비퀴틴-프로테아좀 경로는 진핵세포 내에 존재하는 대부분의 단백질 분해를 조절함으로써, 단백질의 전환과 항상성을 담당한다.

[0003] 유비퀴틴은 매우 잘 보존된 76개의 아미노산으로 구성된 단백질로서 거의 모든 진핵세포에 존재하며, 그 중 6, 11, 27, 29, 33, 48, 63번째 아미노산 잔기는 라이신 (Lysine, Lys, K)이며, 48과 63번이 폴리유비퀴틴 사슬을 형성하는 데 주요한 역할을 한다. 유비퀴틴이 단백질에 표지되는 과정 (ubiquitination)에는 일련의 효소계 (E1, E2, E3)가 관여하며, 표지된 단백질은 ATP-의존성 단백질 분해효소 복합체인 26S 프로테아좀에 의해 분해된다. 유비퀴틴-프로테아좀 경로는 별개의 두 개의 연속된 과정을 포함하는데, 이 중 첫 번째는 기질에 여러 개의 유비퀴틴 분자를 공유결합으로 표지하는 과정이며, 두 번째는 유비퀴틴에 의해 표지된 단백질이 26S 프로테아좀 복합체에 의해 분해되는 과정이다. 유비퀴틴과 기질의 결합은 기질분자의 라이신 잔기와 유비퀴틴의 C-

말단의 글리신 사이의 이소펩티드 결합 (isopeptide bond)을 통해 일어나며, 유비퀴틴-활성화 효소 E1, 유비퀴틴-결합 효소 E2, 유비퀴틴 리가아제 E3에 의해 유비퀴틴과 효소 간에 티올에스테르가 형성됨으로써 이루어진다. 그 중 E1 (ubiquitin-activating enzyme)은 ATP-의존적인 반응으로 유비퀴틴을 활성화시킨다. E2 (ubiquitin-conjugating enzyme)은 유비퀴틴-컨쥬게이션화 도메인 내의 시스테인 (cysteine) 잔기에 E1으로부터 활성화된 유비퀴틴을 받아서 이를 E3 리가아제 (ligase)에 전달하거나 또는 기질 단백질에 직접 전달한다. E3 효소 역시 기질 단백질의 라이신 잔기와 유비퀴틴의 글리신 잔기 간의 안정된 이소펩티드 결합을 촉매한다. 기질 단백질에 결합된 유비퀴틴의 C-말단 라이신 잔기에 또 다른 유비퀴틴이 연결될 수 있는데, 이러한 과정을 반복하여 기질 단백질에 여러 개의 유비퀴틴 분자가 가지를 친 모양으로 연결되어 폴리유비퀴틴 사슬을 형성하면 그 단백질은 26S 프로테아좀에 의해 인식되어 선택적으로 분해된다.

[0004] 한편, 생체 내에서 치료적 효과를 갖는 다양한 종류의 단백질 및 (폴리)펩타이드가 알려져 있다. 이와 같이 생체 내에서 치료적 효과를 갖는 단백질 또는 (폴리)펩타이드는, 예를 들어, 성장호르몬분비호르몬 (growth hormone releasing hormone, GHRH), 성장호르몬 분비펩타이드 (growth hormone releasing peptide), 인터페론 (interferons, interferon- α or interferon- β), 인터페론수용체 (interferon receptors), 콜로니자극인자 (colony stimulating factors, CSFs), 글루카곤-유사 펩타이드 (glucagon-like peptides), 인터류킨 (interleukins), 인터류킨수용체 (interleukin receptors), 엔자임 (enzymes), 인터류킨결합단백질 (interleukin binding proteins), 사이토카인 결합단백질 (cytokine binding proteins), G-단백질-결합수용체 (G-protein-coupled receptor), 인간성장호르몬 (human growth hormone, hGH), 대식세포 활성화인자 (macrophage activating factor), 대식세포 펩타이드 (macrophage peptide), B 세포인자 (B cell factor), T 세포인자 (T cell factor), 단백질 A (protein A), 알러지저해제 (allergy inhibitor), 세포괴사 글리코단백질 (cell necrosis glycoproteins), G-단백질-결합수용체 (G-protein-coupled receptor), 면역독소 (immunotoxin), 림프독소 (lymphotoxin), 종양괴사인자 (tumor necrosis factor), 종양억제자 (tumor suppressors), 전이성장인자 (metastasis growth factor), 알파-1 안티트립신 (alpha-1 antitrypsin), 알부민 (albumin), 알파-락트알부민 (alpha-lactalbumin), 아포지질단백질-E (apolipoprotein-E), 에리트로포이에틴 (erythropoietin), 고도로 글리코실화된 에리트로포이에틴 (highly glycosylated erythropoietin), 안지오포이에틴 (angiopoietins), 헤모글로빈 (hemoglobin), 트롬빈 (thrombin), 트롬빈수용체 활성화 펩타이드 (thrombin receptor activating peptide), 트롬보모듈린 (thrombomodulin), 제 VII인자 (factor VII), 제 VIIa인자 (factor VIIa), 제 VIII인자 (factor VIII), 제 IX인자 (factor IX), 제 XIII인자 (factor XIII), 플라스미노겐 활성화인자 (plasminogen activating factor), 유로키나아제 (urokinase), 스트렙토키나아제 (streptokinase), 히루딘 (hirudin), 단백질 C (protein C), C-반응성단백질 (C-reactive protein), 레닌저해제 (renin inhibitor), 콜라게네이즈 저해제 (collagenase inhibitor), 슈퍼옥사이드 디스무타아제 (superoxide dismutase), 렙틴 (leptin), 혈소판 유래 성장인자 (platelet-derived growth factor), 상피세포성장인자 (epithelial growth factor), 내피세포성장인자 (epidermal growth factor), 안지오스타틴 (angiostatin), 안지오텐신 (angiotensin), 골성장인자 (bone growth factor), 골자극단백질 (bone stimulating protein), 칼시토닌 (calcitonin), 인슐린 (insulin), 아트리오펩틴 (atriopeptin), 연골유도인자 (cartilage inducing factor), 피브린결합펩타이드 (fibrin-binding peptide), 엘카토닌 (elcatonin), 결합조직 활성화인자 (connective tissue activating factor), 조직인자계 응고억제제 (tissue factor pathway inhibitor), 여포자극호르몬 (follicle stimulating hormone), 황체형성호르몬 (luteinizing hormone), 황체형성호르몬분비호르몬 (luteinizing hormone releasing hormone), 신경성장인자 (nerve growth factors), 부갑상선호르몬 (parathyroid hormone), 릴락신 (relaxin), 세크레틴 (secretin), 소마토메딘 (somatomedin), 인슐린 유사 성장인자 (insulin-like growth factor), 부신피질호르몬 (adrenocortical hormone), 글루카곤 (glucagon), 콜레시토키닌 (cholecystokinin), 췌장폴리펩타이드 (pancreatic polypeptide), 가스트린분비펩타이드 (gastrin releasing peptide), 부신피질자극호르몬 방출인자 (corticotropin releasing factor), 갑상선자극호르몬 (thyroid stimulating hormone), 오토택신 (autotaxin), 락토페린 (lactoferrin), 미오스타틴 (myostatin), 수용체 (receptors), 수용체길항제 (receptor antagonists), 세포표면항원 (cell surface antigens), 바이러스 유래 백신항원 (virus derived vaccine antigens), 모노클로날 항체 (monoclonal antibodies), 폴리클로날 항체 (polyclonal antibodies), 및 항체단편을 포함한다.

[0005] 여포자극호르몬 (FSH; Follicle-stimulating hormone)은 35.5 kDa의 당단백질 폴리펩타이드 (glycoprotein polypeptide) 형태로 두 개의 폴리펩타이드인 알파 (alpha)와 베타 (beta)가 이형이량체 (heterodimer)를 이루고 있는 생식샘 자극 호르몬 (gonadotrophin) 중 하나로, 여성의 난포 성장과 남성의 정자 발생을 촉진시키고 유지하는 역할을 하며, 뇌하수체 전엽의 생식샘 세포에서 합성되어 분비되며, 신체의 생식 과정, 발생, 성장,

사춘기 성숙을 조절한다 (Annu Rev Biochem., 50:465-495, 1981; Proc Natl Acad Sci USA., 109(31):12491-12496, 2012). 일반적으로 여포자극 호르몬은 불임 치료인 체외 수정 (IVF) 시, 과배란 유도를 위해 사용된다. 또한 고형암의 경우, FSH의 수용체가 종양 혈관 내피에서 높게 발견되어 신생혈관재생에 관여한다고 보고되어 있어 FSH와 수용체의 antagonist를 개발할 경우 항암 치료로도 사용될 수 있다 (N Engl J Med., 363(17):1621-1630, 2010).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명은 단백질의 반감기를 증가시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0007] 또한 본 발명은 아미노산 서열에 존재하는 하나 이상의 라이신 잔기가 치환된 단백질로서, 증가된 반감기를 갖는 단백질을 제공하는 하는 것을 목적으로 한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 증가된 반감기를 갖는 단백질을 포함하는 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 단백질의 아미노산 서열에 존재하는 하나 이상의 라이신 잔기를 치환하는 것을 포함하는, 단백질의 반감기를 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0010] 본 발명에서, 단백질의 라이신 잔기는 보존적 아미노산으로 치환될 수 있다. 본 발명에서, "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한, 예를 들어, 전하 또는 소수성을 갖는 화학적 특성을 갖는 측쇄를 가지는 다른 아미노산 잔기에 의해 치환되는 것을 의미한다. 일반적으로 보존적 아미노산 치환에 의해 단백질의 기능적 특성은 실질적으로 변화하지 않는다. 유사한 화학적 특성을 갖는 측쇄를 갖는 아미노산 그룹의 예는 1) 지방족 측쇄: 글리신, 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신; 2) 지방족-하이드록실 측쇄: 세린 및 트레오닌; 3) 아미드-함유 측쇄: 아스파라긴 및 글루타민; 4) 방향족 측쇄: 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판; 5) 염기성 측쇄: 라이신, 아르기닌 및 히스티딘; 6) 산성 측쇄: 아스파르트 테이트 및 글루탐에이트 7) 황-함유 측쇄: 시스테인 및 메티오닌을 포함한다.
- [0011] 본 발명에서 단백질의 라이신 잔기는 염기성 측쇄를 포함하는 아르기닌 또는 히스티딘으로 치환될 수 있으며, 바람직하게는 아르기닌 잔기로 치환된다.

발명의 효과

- [0012] 본 발명에 따르면 단백질의 아미노산 서열에 존재하는 하나 이상의 라이신 잔기가 아르기닌으로 치환된 단백질은 반감기가 증가되어 체내에서 오랜 시간 잔류할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0013] 도 1은 FSH-β 발현벡터의 구조를 나타낸다.
- 도 2는 FSH-β 유전자 크기와 PCR 결과를 나타낸다.
- 도 3은 HEK-293T 세포에서 FSH-β의 플라스미드를 통한 단백질 발현을 나타낸 것이다.
- 도 4는 유비퀴틴화 분석을 통한 FSH-β의 분해경로를 제시한다.
- 도 5는 야생형과 비교하여 라이신 잔기가 아르기닌으로 치환된 FSH-β 치환체의 유비퀴틴화 정도를 나타낸다.
- 도 6은 단백질합성 저해제 시클로헥시미드 (cycloheximide, CHX)으로 처리한 후 FSH-β의 반감기 변화를 나타낸다.
- 도 7은 JAK-STAT, PI3K-AKT 및 MAPK/ERK 시그널 유도와 같은 효과에 대한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 본 발명의 일 구체예에서, 단백질은 FSH-β이다. 서열번호 1으로 표시되는 FSH-β 아미노산 서열에서 N-말단으로부터 67, 104 및 128번째 라이신 잔기 중 하나 이상이 아르기닌 잔기로 치환된다. 따라서, 반감기가 증가된

FSH 및 이를 포함하는 과배란 유도를 위한 불임 치료제 및/또는 고행암 치료용 약학 조성물을 제공한다.

- [0015] 본 발명에서, 단백질의 아미노산 서열에 존재하는 라이신 잔기를 아르기닌 (arginine, R) 잔기로 치환시키기 위하여 부위특이적 돌연변이유도 (site-directed mutagenesis)를 이용하였다. 이 방법은 특정 돌연변이를 유도할 DNA서열을 이용하여 프라이머를 제작한 후, 특정조건에서 PCR을 진행함으로써 특정 아미노산 잔기를 치환시킨 플라스미드 DNA를 제작한다.
- [0016] 본 발명에서, 표적단백질을 면역침강분석법에 의해 세포주 내로 형질감염시키고 침강시켜 유비퀴틴화 정도를 확인하였으며, MG132 (프로테아좀 저해제) 시약을 처리한 결과, 유비퀴틴화 정도가 증가한 것을 통해 표적단백질이 유비퀴틴-프로테아좀에 의한 분해 경로를 거친다는 것을 확인하였다.
- [0017] 본 발명에서 약학조성물은 경구 (oral), 경피 (transcutaneous), 피하 (subcutaneous), 정맥내 (intravenous) 또는 근육내 투여를 포함하는 다양한 경로로 체내 전달될 수 있으며, 주사형 제제로 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 상기 방법에 따라 투여된 후에 신속한 방출, 지연된 방출 또는 천천히 방출 되도록 당업자에게 잘 알려진 방법에 따라 제형화 될 수 있다. 상기 제형은 정제 (tablet), 알약 (pill), 분말 (powder), 사세 (sachet), 엘렉시르제 (elixir), 현탁 (suspension), 에멀션 (emulsion), 용액 (solution), 시럽 (syrup), 에어로졸 (aerosol), 소프트 또는 단단한 젤라틴 캡슐 (soft and hard gelatin capsule), 멸균주 사용액 (sterile injectable solution), 멸균 팩지된 분말 등을 포함한다. 적합한 담체, 부형제 및 희석제로는, 락토오스 (lactose), 덱스트로오스 (dextrose), 수크로오스 (sucrose), 만니톨 (mannitol), 자일리톨 (xylitol), 에리스리톨 (erythritol), 말티톨 (maltitol), 탄수화물 (starches), 검 아카시아 (gum acacia), 알지네이트 (alginates), 젤라틴 (gelatin), 인산칼슘 (calcium phosphate), 규산칼슘 (calcium silicate), 셀룰로오스 (cellulose), 메틸셀룰로오스 (methyl cellulose), 마이크로크리스탈린셀룰로오스 (microcrystalline cellulose), 폴리비닐 피롤리돈 (polyvinyl pyrrolidone), 물, 메틸히드록시벤조에이트 (methylhydroxybenzoates), 프로필히드록시벤조에이트 (propylhydroxybenzoates), 활석 (talc), 스테아린산마그네슘 (magnesium stearate) 및 미네랄 오일을 포함한다. 또한, 제형은 충전제, 항교착제 (anti-agglutinating agents), 윤활제 (lubricating agents), 습윤제 (wetting agents), 향미료 (flavoring agents), 유화제 (emulsifiers), 보존제 (preservative) 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0018] 본 발명에서, 단수형태는 달리 명확하게 기술하지 않는 한 복수형태를 포함한다. 또한, 본 발명에서 구성된, 갖는 이루어진 과 같은 용어는 “포함하는” 과 유사한 의미를 갖는 것으로 해석된다. 본 발명에서, “생리활성 (폴리)펩타이드 또는 단백질” 은 인간을 포함하는 포유동물에 투여되었을 때 유용한 생물학적 활성을 나타내는 (폴리)펩타이드 또는 단백질을 의미한다.
- [0019] 이하, 실시예에 의거하여 본 발명을 보다 더 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0021] **실시 예 1: FSH-β 단백질의 유비퀴틴화 분석 및 반감기 증가 확인과 세포 내 신호전달 확인**
- [0022] 1. 발현벡터의 클로닝 및 단백질 발현 확인
- [0023] (1) 발현벡터 클로닝
- [0024] 중합효소 연쇄반응에 의한 FSH-β DNA 증폭산물과 pcDNA3-myc (5.6 kb)를 제한효소인 BamHI과 XhoI으로 절편을 만든 후 접합하여 클로닝하였으며 (도 1, FSH-β 아미노산 서열: SEQ No.1), 그 결과는 제한효소 절단 후, 아가로스겔 전기 영동을 통해 확인하였다 (도 2). 또한, 도 1의 염기서열 상에 밑줄과 굵은 글씨체로 표시된 부분은 클로닝된 부위를 다시 한 번 확인하고자 중합효소연쇄 반응을 통해 확인할 때 사용된 프라이머 세트의 일부이며, 그 결과는 아가로스겔 전기영동을 통해 확인하였다 (도 2). 중합효소연쇄 반응 조건은 다음과 같았다: 초기 변성을 94℃에서 3분 동안 반응시킨 후, 변성 반응을 위한 94℃에서 30초, 어닐링 반응을 위한 56℃에서 30초, 연장반응을 위한 72℃에서 1분을 25 주기로 반복하여 진행하였고, 이후 72℃에서 10분간 반응시켰다. 이와 같이 제작된 DNA가 단백질로 제대로 발현하는지를 확인하기 위하여 도 1의 맵에 표시된 pcDNA3-myc 벡터에 존재하는 myc을 항-myc (9E10, Santa Cruz Biotechnology, sc-40) 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 통해 발현을 확인하였다. myc에 결합된 FSH-β 단백질이 잘 발현되는 것을 확인하였으며 액틴으로 확인한 블롯을 통해 정량이 로딩된 것으로 나타났다 (도 3).
- [0026] (2) 라이신 (Lysine, K) 잔기의 치환
- [0027] 부위특이적 돌연변이유도 (site-directed mutagenesis)를 이용하여 라이신 잔기를 아르기닌으로 치환하였으며,

특정 돌연변이를 유도할 DNA 서열을 이용하여 프라이머 FSH-β K67R FP 5'-GGCCAAAATCCAGAGAACATGTACCTT-3' (SEQ No.2), RP 5'-AAGGTACATGTCTCTGGATTTGGGCC-3' (SEQ No.3), FSH-β K104R FP 5'-GTCACGTGGCAGGTGTGACAGCGA-3' (SEQ No.4), RP 5'-TCGCTGTACACCTGCCACAGTGAC-3' (SEQ No.5) FSH-β K128R FP 5'-GGTGAATGAGAGAAACGCGTACGCG-3' (SEQ No.6), RP 5'-CCGCGTACGCGTTTCTCTCATTTCACC-3' (SEQ No.7)를 제작한 후, 특정조건에서 PCR을 진행함으로써 특정 아미노산 잔기를 치환시킨 플라스미드 DNA를 제작하였다. pcDNA3-myc-FSH-β를 템플릿으로 사용하고, Lysine 잔기가 아르기닌으로 치환 (K→R)된 각각 3개의 플라스미드 DNA를 제작하였다 (표 1).

표 1

[0028]

Lysine (K) 잔기 위치	Lysine (K)이 Arginine (R)로 치환된 FSH-β 작제물
67	pcDNA3-myc-FSH-β (K67R)
104	pcDNA3-myc-FSH-β (K104R)
128	pcDNA3-myc-FSH-β (K128R)

[0030]

2. 생체 내 유비퀴틴화 분석

[0031]

pcDNA3-myc-FSH-β WT과 pMT123-HA-유비퀴틴 DNA를 코딩하는 플라스미드를 이용하여 HEK 293T세포를 감염시켰다. 유비퀴틴화 과정을 확인하기 위하여 pcDNA3-myc-FSH-β WT 3 μg과 pMT123-HA-유비퀴틴 DNA 1 μg을 세포에 공동형질감염 (co-transfection)시키고 24시간 후에 MG132 (프로테아좀 저해제, 5 μg/ml, Sigma-Aldrich)을 6시간 동안 처리한 후, 면역침강 분석을 실시하였다 (도 4). 또한 WT과 치환체 사이의 유비퀴틴화 정도를 비교하기 위하여 pcDNA3-myc-FSH-β 치환체 (K67R), pcDNA3-myc-FSH-β 치환체 (K104R), pcDNA3-myc-FSH-β 치환체 (K128R) 각 3μg을 pMT123-HA-유비퀴틴 DNA 1 μg과 함께 HEK 293T 세포 (ATCC, CRL-3216)를 공동형질감염 (co-transfection)시키고 24시간 후에 면역침강분석을 실시하였다 (도 5).

[0032]

면역침강을 위해 얻은 샘플은 용해완충액 (1% Triton X, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8 및 1 mM PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride)으로 용해한 후, 항-myc (9E10) 1차 항체와 혼합하고 4℃에서 하룻밤 동안 배양하였다. 면역침강체는 단백질 A/G 비드 (Santa Cruz Biotechnology)를 이용하여 4℃에서 2시간 동안 반응시켜 분리하였다. 이후, 용해완충액으로 2회 세척하였다. 면역블롯팅은 단백질샘플을 2X SDS 완충액과 혼합한 후 100℃에서 7분간 가열 한 후, SDS-PAGE를 실시하여 분리하였다. 분리된 단백질을 PVDF 멤브레인으로 이동시킨 다음, 항-myc (9E10, Santa Cruz Biotechnology, sc-40), 항-HA (Santa Cruz Biotechnology, sc-7392) 및 항-β-actin (Santa Cruz Biotechnology, sc-47778)을 1:1000의 중량비로 포함하는 블로킹 용액과 항-마우스 (Peroxidase-labeled antibody to mouse IgG (H+L), KPL, 074-1806) 2차 항체를 사용하여 ECL 시스템 (Western blot detection kit, ABfrontier, Seoul, Korea)으로 현상하였다.

[0033]

그 결과, 항-myc (9E10, Santa Cruz Biotechnology, sc-40)으로 면역침강을 실시한 경우, pcDNA3-myc-FSH-β WT에는 유비퀴틴이 결합하여 폴리유비퀴틴화가 형성됨에 따라 번진 모양의 유비퀴틴이 탐지되어 밴드가 진하게 나타났다 (도 4, 라인 3, 4). 또한, MG132 (프로테아좀 저해제, 5 μg/ml)을 6시간 동안 처리한 경우에는 폴리유비퀴틴화 형성이 증가되어 유비퀴틴이 탐지되는 밴드가 더욱 진하게 나타났다 (도 4, 라인 4). 또한 pcDNA3-myc-FSH-β 치환체 (K67R), pcDNA3-myc-FSH-β 치환체 (K104R), pcDNA3-myc-FSH-β 치환체 (K128R)의 경우, WT보다 밴드가 연하였으며, pcDNA3-myc-FSH-β 치환체 (K67R), pcDNA3-myc-FSH-β 치환체 (K104R), pcDNA3-myc-FSH-β 치환체 (K128R)이 유비퀴틴과 결합하지 못하여 유비퀴틴이 적게 검출되었다 (도 5, 라인 3 ~ 5). 이상의 결과는 FSHβ가 유비퀴틴과 결합하고 유비퀴틴-프로테아좀 시스템을 통해 폴리유비퀴틴화되어 분해됨을 보여준다.

[0034]

3. 단백질생성 저해제 cycloheximide (CHX)에 의한 FSH-β의 반감기 확인

[0035]

pcDNA3-myc-FSH-β WT, pcDNA3-myc-FSH-β 치환체 (K67R), pcDNA3-myc-FSH-β 치환체 (K104R), pcDNA3-myc-FSH-β 치환체 (K128R) 3 μg씩 HeLa 세포에 형질감염 (transfection)시켰다. 형질감염 48시간 후, 단백질 생성 저해제 cycloheximide (CHX) (Sigma-Aldrich) (100 μg/ml)을 처리하고 30분, 60분, 90분에 걸쳐서 반감기를 측정하였다. 그 결과, 인간 FSH-β의 분해가 억제되는 것을 확인하였다 (도 6). 인간 FSH-β의 반감기는 30분 이내인데 반면 인간 pcDNA3-myc-FSH-β 치환체 (K104R)의 반감기는 60분 이상, pcDNA3-myc-FSH-β 치환체 (K67R), pcDNA3-myc-FSH-β 치환체 (K128R)의 반감기는 90분 이상으로 WT보다 길어졌으며 이 결과는 그래프로 나타내었다 (도 6).

[0036] 4. 세포 내에서의 FSH-β와 FSH-β 치환체들에 의한 신호전달 확인

[0037] FSH 신호전달은 세포 내 cAMP를 증가시키고 이로 인해서 PKA가 활성화 되면 CREBP와 같은 전사인자들의 인산화를 조절하며, 또한 Erk, PI3K/AKT 신호전달과 관련된다는 것이 보고되었다 (Front Endocrinol (Lausanne), 6:142, 2015; Biochem J., 473(11):1483-1501, 2016).

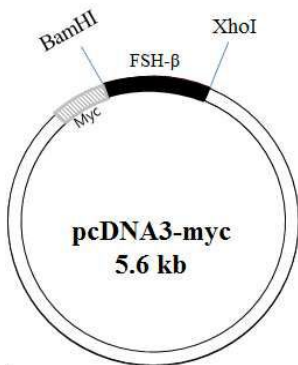
[0038] 본 실시예에서는, 세포 내에서 FSH-β와 FSH-β 치환체들에 의한 신호전달 과정을 확인하였다. pcDNA3-myc-FSH-β WT, pcDNA3-myc-FSH-β 치환체 (K67R), pcDNA3-myc-FSH-β 치환체 (K104R), pcDNA3-myc-FSH-β 치환체 (K128R)를 각각 3 μg씩 이용하여 HeLa 세포를 감염시켰다. 감염 2일 경과 후, 세포에서 단백질을 추출하여 각각 정량하고, 세포 내 신호전달 과정을 확인하고자 웨스턴 블롯팅을 실시하였다. 이 과정에서 pcDNA3-myc-FSH-β WT, pcDNA3-myc-FSH-β 치환체 (K67R), pcDNA3-myc-FSH-β 치환체 (K104R), pcDNA3-myc-FSH-β 치환체 (K128R)으로 감염된 HeLa 세포에서 분리된 단백질을 폴리비닐리덴다이플로라이드 (polyvinylidene difluoride, PVDF) 멤브레인으로 이동시킨 다음, 항-myc (9E10, Santa Cruz Biotechnology, sc-40), 항-STAT3 (Santa Cruz Biotechnology, sc-21876), 항-phospho-STAT3 (Y705, cell signaling 9131S), 항-AKT (H-136, Santa Cruz Biotechnology, sc-8312), 항-phospho-AKT (S473, cell signaling 9271S), 항-Erk1/2 (9B3, Abfrontier LF-MA0134), 항-phospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204, Abfrontier LF-PA0090) 및 항-β-actin (Santa Cruz Biotechnology, sc-47778)을 1:1000~1:3000의 중량비로 포함하는 블로킹 용액과 항-레빗 (goat anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, sc-2004)과 항-마우스 (Peroxidase-labeled antibody to mouse IgG (H+L), KPL, 074-1806) 2차 항체를 사용하여 ECL 시스템 (Western blot detection kit, ABfrontier, Seoul, Korea)으로 현상하였다. 그 결과, pcDNA3-myc-FSH-β 치환체 (K67R), pcDNA3-myc-FSH-β 치환체 (K104R), pcDNA3-myc-FSH-β 치환체 (K128R)는 HeLa 세포내에서 pcDNA3-myc-FSH-β WT과 동일하거나 증가된 phospho-STAT3, phospho-AKT 및 phospho-Erk1/2 신호전달을 보였다 (도 7).

산업상 이용가능성

[0040] 본 발명에 따르면, 반감기가 증가된 여포자극호르몬β가 제공된다. 따라서 본 발명은 치료제로서 이용될 수 있는 여포자극호르몬β에 관한 것으로서, 제약 산업에서 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

도면

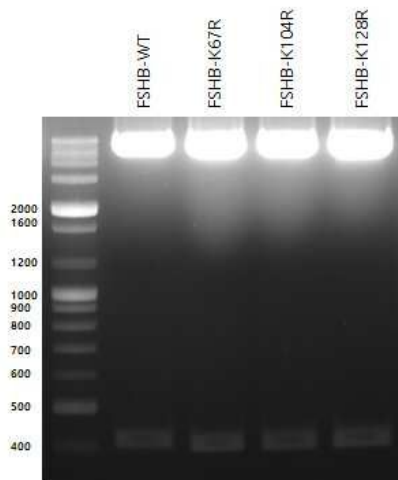
도면1



Homo sapiens follicle stimulating hormone beta subunit (FSHB), transcript variant 1, mRNA
NCBI Reference Sequence: NM_000510.2

GGA TCC ATG AAG ACA CTC CAG TTT TTC TTC CTT TTC TGT TGC TGG
AAA GCA ATC TGC TGC AAT AGC TGT GAG CTG ACC AAC ATC ACC ATT
GCA ATA GAG AAA GAA GAA TGT CGT TTC TGC ATA AGC ATC AAC ACC
ACT TGG TGT GCT GGC TAC TGC TAC ACC AGG GAT CTG GTG TAT AAG
GAC CCA GCC AGG CCC AAA ATC CAG AAA ACA TGT ACC TTC AAG GAA
CTG GTA TAC GAA ACA GTG AGA GTG CCC GGC TGT GCT CAC CAT GCA
GAT TCC TTG TAT ACA TAC CCA GTG GCC ACC CAG TGT CAC TGT GGC
AAG TGT GAC AGC GAC AGC ACT GAT TGT ACT GTG CGA GGC CTG GGG
CCC AGC TAC TGC TCC TTT GGT GAA ATG AAA GAA TAA CTC GAG

도면2

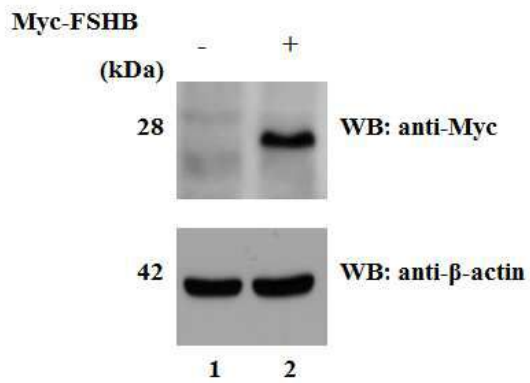


* BamHI, XhoI: two Cut
* Insert DNA : 410 bp
* Vector : 5.6 kb

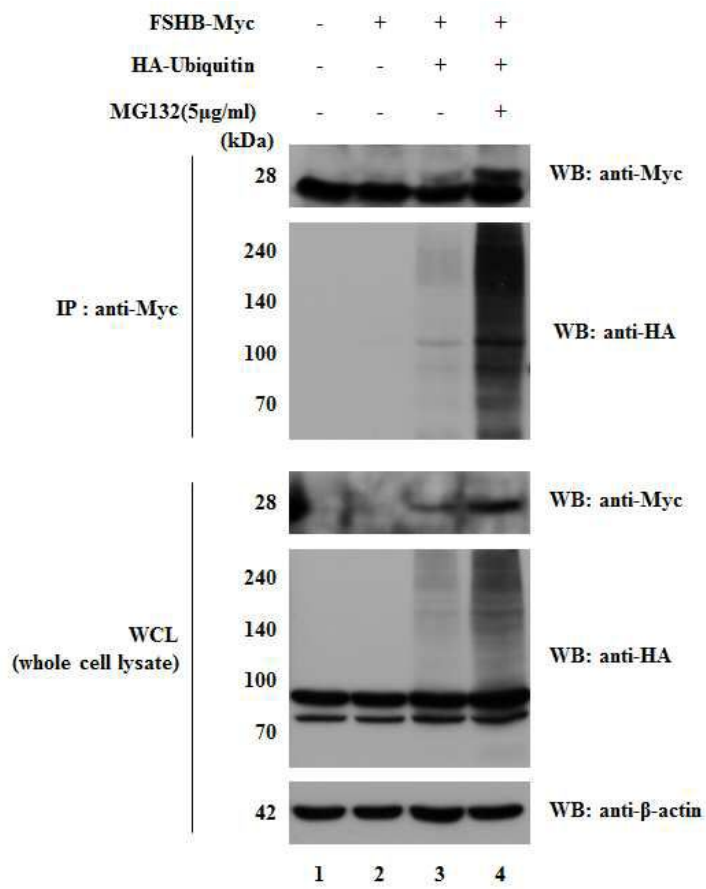


* Insert DNA : 410 bp

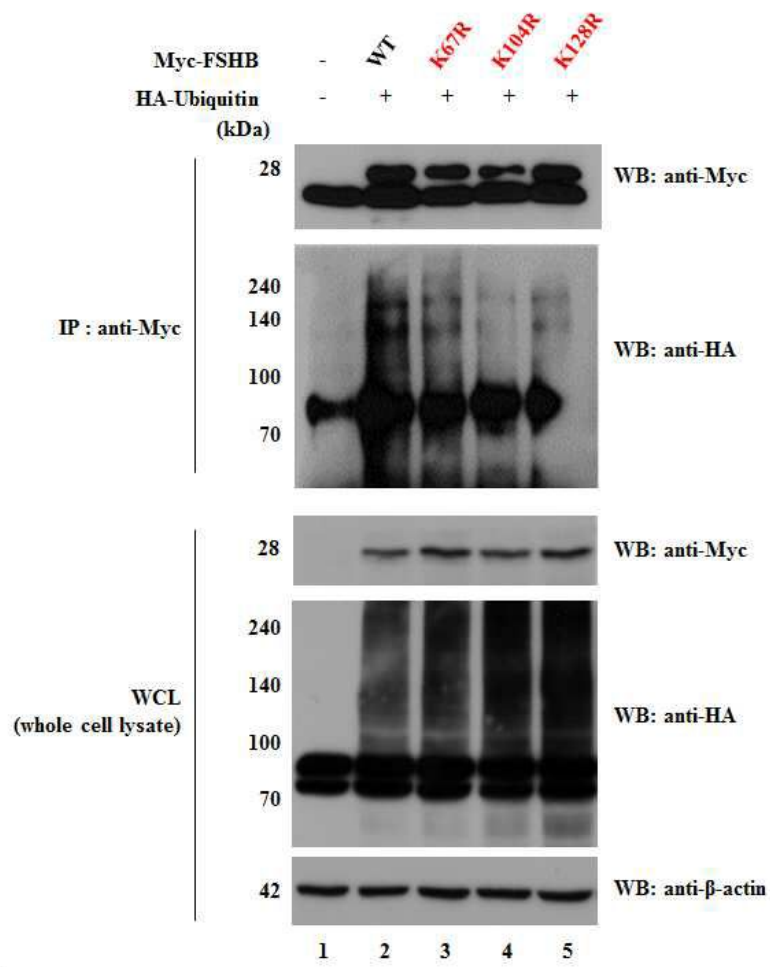
도면3



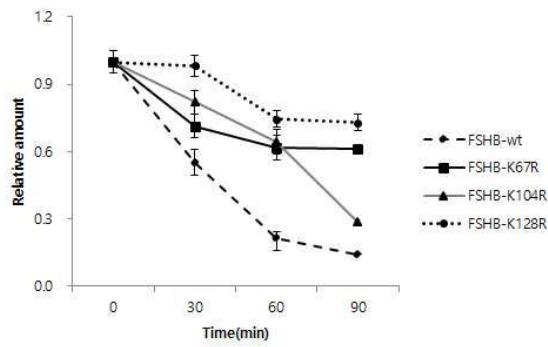
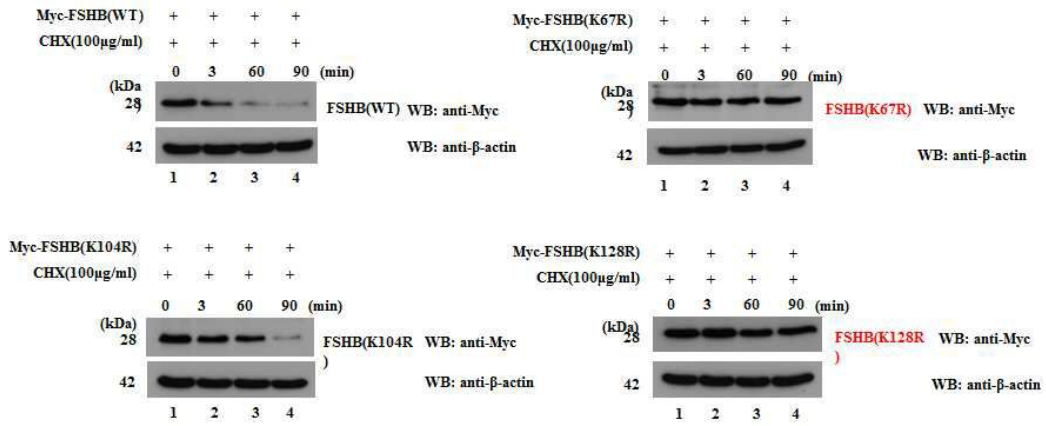
도면4



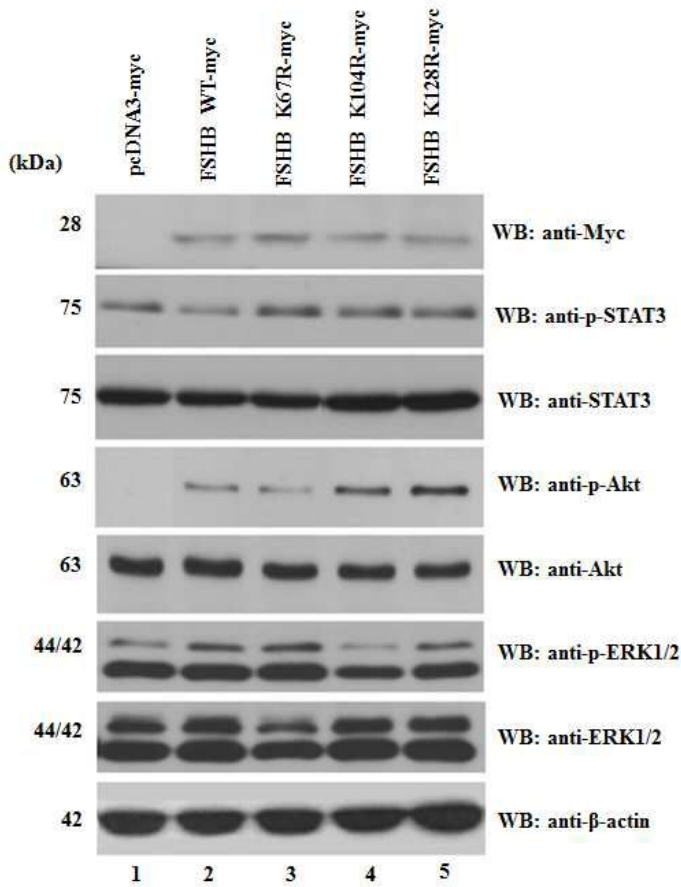
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> UbiProtein. Corp
 - <120> A method for extending half-life of FSH beta
 - <130> UBPRN17P-0007
 - <160> 7
 - <170> KoPatentIn 3.0
 - <210> 1
 - <211> 129
 - <212> PRT
 - <213> Artificial Sequence
 - <220><223> Follicle-stimulating hormone beta
 - <400> 1
- Met Lys Thr Leu Gln Phe Phe Phe Leu Phe Cys Cys Trp Lys Ala Ile
 1 5 10 15
 Cys Cys Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu Lys

20 25 30

Glu Glu Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly
 35 40 45

Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys
 50 55 60

Ile Gln Lys Thr Cys Thr Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg
 65 70 75 80

Val Pro Gly Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val
 85 90 95

Ala Thr Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys
 100 105 110

Thr Val Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Glu Met Lys
 115 120 125

Glu

<210> 2
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 2
 ggcccaaat ccagagaaca tgtacctt 28

<210> 3
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 3
 aaggtacatg ttctctggat tttgggcc 28

<210> 4
 <211> 25
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 4
 gtcactgtgg caggtgtgac agcga 25
 <210> 5
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 5
 tcgctgtcac acctgccaca gtgac 25
 <210> 6
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 6
 ggtgaaatga gagaaacgcg tacgcgg 27

 <210> 7
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 7
 ccgcgtacgc gtttctctca tttcacc 27