



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0090979  
(43) 공개일자 2018년08월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 38/46 (2006.01) A23L 33/18 (2016.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 38/465 (2013.01)  
A23L 33/18 (2016.08)  
(21) 출원번호 10-2018-0091423(분할)  
(22) 출원일자 2018년08월06일  
심사청구일자 없음  
(62) 원출원 특허 10-2016-0091606  
원출원일자 2016년07월19일  
심사청구일자 2016년07월19일

(71) 출원인  
연세대학교 산학협력단  
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)  
(72) 발명자  
김재우  
서울특별시 서초구 방배로 270, 바동 101호(방배동, 방배삼호아파트)  
(74) 대리인  
특허법인이룸리온

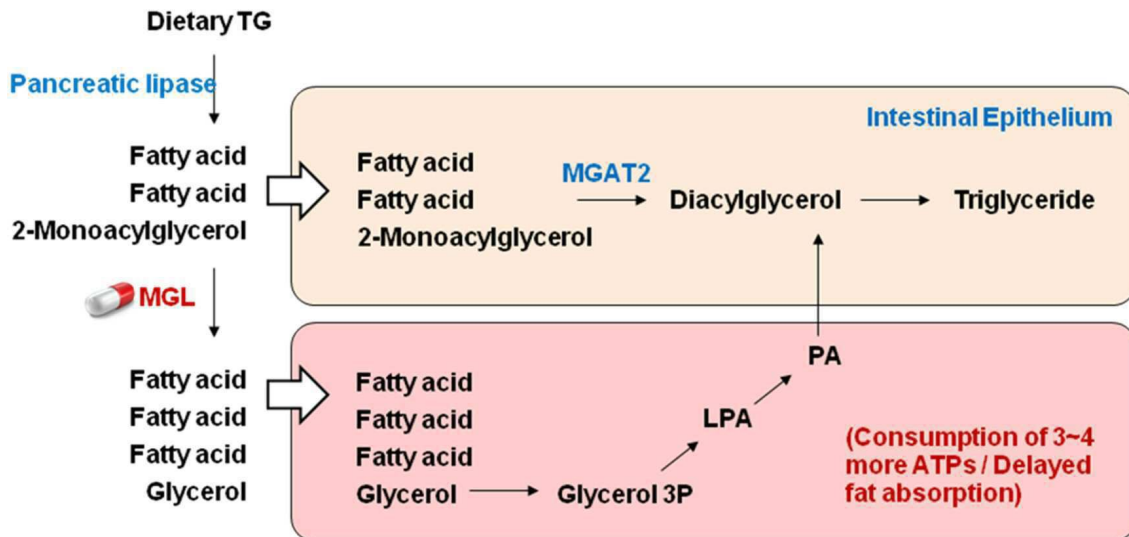
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 2-모노아실글리세롤 분해 효소를 포함하는 간지방증 또는 비알코올성 지방간의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 2-모노아실글리세롤 분해 효소를 포함하는 대사 증후군의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 조성물은 소화관에서 중성지방을 지방산과 글리세롤로 완전히 분해함으로써 지방 흡수를 지연시키고, 중성지방의 혈중 흡수를 감소시키는 효과가 있으며, 소화관에서 모노아실글리세롤을 모노아실글리세롤 리파아제로 분해할 경우, 흡수가 되더라도 소화상피세포에서의 중성지방 재결합을 지연하거나 이 과정의 에너지 소모를 촉진할 수 있으므로, 간지방증, 비알코올성 지방간, 고지혈증, 제2형 당뇨병 및/또는 비만의 예방 또는 치료제로 활용할 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

A23V 2200/328 (2013.01)

A23V 2200/332 (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

2-모노아실글리세롤을 특이적으로 분해하는 리파아제를 유효성분으로 포함하는 간지방증(hepatic steatosis) 또는 비알코올성 지방간의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 2-모노아실글리세롤을 특이적으로 분해하는 리파아제는 사람 및 마우스로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나로부터 유래된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 리파아제는 서열번호 5 또는 6의 염기서열에 의해 코딩되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 상기 리파아제는 서열번호 5 또는 6의 염기서열을 포함하는 재조합 벡터에 의해 발현되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 5

제4항에 있어서, 상기 리파아제는 상기 재조합 벡터로 형질전환된 균주에 의해 생산되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 2-모노아실글리세롤을 특이적으로 분해하는 리파아제는 2-모노아실글리세롤을 지방산과 글리세롤로 완전히 분해하여, 2-모노아실글리세롤의 소화상피세포로의 흡수량을 저감하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 7

2-모노아실글리세롤을 특이적으로 분해하는 리파아제를 유효성분으로 포함하는 간지방증(hepatic steatosis) 또는 비알코올성 지방간의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

#### 청구항 8

2-모노아실글리세롤을 특이적으로 분해하는 리파아제를 유효성분으로 포함하는 고지혈증 또는 제2형 당뇨병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 상기 2-모노아실글리세롤을 특이적으로 분해하는 리파아제는 사람 및 마우스로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나로부터 유래된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, 상기 리파아제는 서열번호 5 또는 6의 염기서열에 의해 코딩되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 상기 리파아제는 서열번호 5 또는 6의 염기서열을 포함하는 재조합 벡터에 의해 발현되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 12

제11항에 있어서, 상기 리파아제는 상기 재조합 벡터로 형질전환된 균주에 의해 생산되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 13

제8항에 있어서, 상기 2-모노아실글리세롤을 특이적으로 분해하는 리파아제는 2-모노아실글리세롤을 지방산과 글리세롤로 완전히 분해하여, 2-모노아실글리세롤의 소화상피세포로의 흡수량을 저감하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 14

2-모노아실글리세롤을 특이적으로 분해하는 리파아제를 유효성분으로 포함하는 고지혈증 또는 제2형 당뇨병의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

#### 청구항 15

2-모노아실글리세롤을 특이적으로 분해하는 리파아제를 유효성분으로 포함하는 비만 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 16

제15항에 있어서, 상기 2-모노아실글리세롤을 특이적으로 분해하는 리파아제는 사람 및 마우스로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나로부터 유래된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 17

제16항에 있어서, 상기 리파아제는 서열번호 5 또는 6의 염기서열에 의해 코딩되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

## 청구항 18

제17항에 있어서, 상기 리파아제는 서열번호 5 또는 6의 염기서열을 포함하는 재조합 벡터에 의해 발현되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

## 청구항 19

제18항에 있어서, 상기 리파아제는 상기 재조합 벡터로 형질전환된 균주에 의해 생산되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

## 청구항 20

제15항에 있어서, 상기 2-모노아실글리세롤을 특이적으로 분해하는 리파아제는 2-모노아실글리세롤을 지방산과 글리세롤로 완전히 분해하고,

상기 분해된 지방산과 글리세롤이 소화상피세포로 흡수되어 중성지방으로 재합성되는 과정으로 인해 에너지 소비가 증가하며,

이때, 상기 에너지 소비 증가는 소화상피세포 내에서 모노아실글리세롤 및 지방산이 중성지방으로 재합성되는 과정에 비해 3 내지 4개의 ATP가 더 소모되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

## 청구항 21

2-모노아실글리세롤을 특이적으로 분해하는 리파아제를 유효성분으로 포함하는 비만 예방 또는 개선용 건강기능 식품 조성물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 2-모노아실글리세롤 분해 효소를 포함하는 간지방증 또는 비알코올성 지방간의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 최근 경제적 발전과 식습관 등의 변화에 따라 비만, 고지혈증, 고혈압, 동맥경화, 고인슐린혈증, 제2형 당뇨병, 간지방증 또는 비알코올성 지방간 등 다양한 질환을 포함하는 대사증후군 관련 질환의 발병이 급증하고 있는 상황이다. 이와 같은 질환들은 각각 발생하기도 하지만 일반적으로는 서로 밀접한 관련을 맺고 있으면서 여러 증상을 동반하여 발생하는 경우가 대부분이다.

[0003] 비만은 현대인의 건강을 가장 강력하게 위협하는 질병군이다. 고도의 비만은 인슐린의 감수성을 떨어뜨려 체내의 여러 대사 변화를 유발하게 되며, 결국 혈관계, 신경계 등 많은 합병증을 유발하여 사망하게 된다. 따라서 비만을 줄일 수 있는 생활습관이나 이에 대한 치료 약물을 개발하는 것이 의료계에서 매우 중요하게 생각되고 있다.

[0004] 비만은 에너지의 섭취와 에너지의 사용의 불균형에서 초래된다. 첫째로 에너지의 섭취는 뇌의 시상하부 그 중추에 있으며, 체내에서 렙틴이나 그렐린 등의 호르몬에 의해 조절된다. 한번 섭취되어 소화관에서 흡수된 영양소는 결코 배설되지 않으며, 에너지로 사용되거나 몸에 저장된다. 따라서 비만 치료에서는 에너지의 섭취를 억제하는 메커니즘으로 비만 억제제를 개발하려는 노력이 있어 왔으며, 푸링이나 리덕틸 같은 식욕억제제가 사용되고 있다.

[0005] 에너지 섭취를 감소하는 또 다른 방법은 소화관에서 지방의 흡수를 억제하는 방법이다. 이 방법을 이용한 약물은 제니칼이 있는데, 이는 이자의 지방분해효소인 리파아제를 억제하는 약물이다. 제니칼을 투여할 경우 중성지방은 분해되지 못하여 소화관에서 흡수되지 않고 대변으로 배출된다.

- [0006] 두 번째 방법은 에너지의 사용을 증대시키는 방법이다. 흔히 비만에 대한 사람들의 대처 방법이 "적게 먹고 운동을 많이 하는 것"이므로 운동을 많이 하여 에너지 소모를 증가시키는 것이 확실한 비만 치료라고 볼 수 있다. 최근에는 약물에 의해 에너지의 소모를 촉진시키기 위한 여러 노력이 이루어지고 있으며, 주로 갈색지방에 존재하는 짝폴립 단백질의 발현을 증가시켜 에너지 소모를 촉진하는 방향으로 연구가 이루어지고 있다.
- [0007] 하지만, 식욕을 억제하는 방법의 경우는 중추 신경에 작용하는 약물이 대부분으로 필연적인 신경계 부작용이 동반되는 경우가 많고, 식욕의 감소는 또한 우울함을 동반할 수 있는 문제점이 있으며, 소화관에서 지방 분해를 억제하는 제니칼의 경우 지방변과 그에 따른 악취 등으로 환자들이 복용하길 꺼려하며, 배변의사의 조절 문제로 사회 생활의 불편함도 초래한다. 짝폴립 단백질을 응용한 에너지 소모 촉진의 방법은 아직도 개발 단계이며, 장기별 특수성에 따라 약물의 특이성이 확보되기 전에는 사람에 이용되기 어려운 형편이다.
- [0008] 또한, 시판되고 있는 항비만제로는 티아졸리디네디온(thiazolidinediones, TZDs), 제니칼(한국로슈)과 시부트라민(sibutramine) 등이 있으나, 이러한 약물들의 부작용으로는 심혈관작용, 중추작용, 간장장애 및 신장장애 등이 있는 것으로 보고되었다. 그러므로 향후 장기 섭취 등에 따른 부작용이 없고 비만 예방과 치료를 겸한 고부가가치의 다기능성 제품의 개발이 시급한 실정이다.
- [0009] 한편, 모노아실글리세롤 리파아제(monoacylglycerol lipase, MGL)는 모노아실글리세롤을 분해하여 유리 지방산 및 글리세롤을 형성하는 것으로 알려져 있으며, 종래의 기술에서는 장내에서 모노아실글리세롤 리파아제의 발현 증가에 의해 과식에 기인한 비만 표현형을 야기하는 것으로 보고된바 있으며(Chon, *et al.*, *FASEB*, 22:807, 2008), 모노아실글리세롤 리파아제를 억제함으로써, 통증, 염증 및 중추신경계(central nervous system; CNS) 장애의 치료에 유용하다고 보고되었다 (Schlossburg *et al.*, *Nat. Neurosci.*, 13(9):1113, 2010). 이들 연구 보고는 모두 모노아실 글리세롤 리파아제가 체내 세포에서 작용할 때의 현상으로, 소화관 내에서 작용할 때에 대한 보고는 없으며, 사람의 소화관에서는 모노아실 글리세롤 리파아제 활성이 없다.
- [0010] 이에 본 발명에서는, 모노아실글리세롤 리파아제를 소화관에서 작용하게 할 경우 소화관에서 중성지방을 지방산과 글리세롤로 완전히 분해함으로써 지방 흡수를 지연시키고, 중성지방의 혈중 흡수를 감소시킬 수 있으며, 소화관에서 2-모노아실글리세롤을 모노아실글리세롤 리파아제로 분해할 경우, 흡수가 되더라도 소화상피세포에서의 중성지방 재결합을 지연하거나 이 과정의 에너지 소모를 촉진할 수 있으므로, 2-모노아실글리세롤 분해 효소가 간지방증, 비알코올성 지방간, 고지혈증, 제2형 당뇨병 및/또는 비만의 예방 또는 치료제로 사용될 수 있을 것이라는 아이디어에 착안하여 이를 입증함으로써 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 2-모노아실글리세롤 분해 효소를 포함하는 간지방증, 비알코올성 지방간, 고지혈증, 제2형 당뇨병 및/또는 비만의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0012] 상술한 과제를 해결하기 위해 본 발명은, 2-모노아실글리세롤 분해 효소를 포함하는 간지방증 또는 비알코올성 지방간의 예방 또는 치료용 약학적 조성물; 및 간지방증 또는 비알코올성 지방간의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한, 2-모노아실글리세롤 분해 효소를 포함하는 고지혈증 또는 제2형 당뇨병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물; 및 고지혈증 또는 제2형 당뇨병의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 2-모노아실글리세롤 분해 효소는 2-모노아실글리세롤을 특이적으로 분해하는 리파아제일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 2-모노아실글리세롤을 특이적으로 분해하는 효소는 사람, 마우스, 효모, 곰팡이 및 박테리아로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나로부터 유래된 리파아제일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 리파아제는 서열번호 5 또는 6의 염기서열에 의해 코딩되는 것일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 리파아제는 서열번호 5 또는 6의 염기서열을 포함하는 재조

합 박터에 의해 발현되는 것일 수 있다.

[0018] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 리파아제는 상기 재조합 박터로 형질전환된 균주에 의해 생산되는 것일 수 있다.

[0019] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 2-모노아실글리세롤 분해 효소는 2-모노아실글리세롤을 지방산과 글리세롤로 완전히 분해하여, 2-모노아실글리세롤의 소화상피세포로의 흡수량을 저감하는 것일 수 있다.

[0020] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 2-모노아실글리세롤 분해 효소는 2-모노아실글리세롤을 지방산과 글리세롤로 완전히 분해하고, 상기 분해된 지방산과 글리세롤이 소화상피세포로 흡수되어 중성지방으로 재합성되는 과정으로 인해 에너지 소비가 증가하며, 이때, 상기 에너지 소비 증가는 소화상피세포 내에서 모노아실글리세롤 및 지방산이 중성지방으로 재합성되는 과정에 비해 3 내지 4개의 ATP가 더 소모되는 것일 수 있다.

### 발명의 효과

[0021] 본 발명의 2-모노아실글리세롤을 분해 효소를 포함하는 조성물은 소화관에서 중성지방을 지방산과 글리세롤로 완전히 분해함으로써 지방 흡수를 지연시키고, 중성지방의 혈중 흡수를 감소시키는 효과가 있으며, 소화관에서 2-모노아실글리세롤을 특이적 리파아제로 분해할 경우, 흡수가 되더라도 소화상피세포에서의 중성지방 재결합을 지연하거나 이 과정에서 에너지 소모를 촉진할 수 있으므로, 간지방증, 비알코올성 지방간, 고지혈증, 제2형 당뇨병 및/또는 비만 등을 예방, 개선 또는 치료하는 의약품 및 건강기능식품에 활용할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 중성지방의 구조를 나타낸 모식도이다.

도 2는 소화관에서 중성지방의 소화 및 흡수과정을 나타낸 모식도이며, 이자의 리파아제에 의해 분해된 지방산 2개와 모노아실글리세롤은 소화상피세포로 흡수되며, 소화상피세포에서 다시 중성지방으로 재결합하여 카일로미크론의 형태로 임파계로 유리된다.

도 3은 중성지방을 소화한 후 소화상피세포에서 흡수된 지방의 중성지방 재합성 경로를 나타낸 모식도이며, 모노아실글리세롤 리파아제(monoacylglycerol lipase, MGL)가 존재하는 경우 중성지방은 지방산 3개와 글리세롤로 완전히 분해되기 때문에 소화상피세포에서 중성지방을 재형성하는데 더 많은 에너지를 소모하게 된다.

도 4는 사람과 마우스의 모노아실글리세롤 리파아제(MGL)의 유전자은행 번호 및 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

도 5는 모노아실글리세롤 리파아제(MGL)의 대량 생산을 위해 제조된 박테리아 발현 박터 시스템을 나타낸 것이다.

도 6은 모노아실글리세롤 리파아제(MGL)의 분리 정제 후 SDS-PAGE를 시행한 결과를 나타낸 데이터로, 1은 투석 전, 2는 투석 후의 단백질을 의미한다.

도 7은 모노아실글리세롤 리파아제(MGL)의 순수분리 정제 과정을 모식화한 그림이다.

도 8은 비만이 유발된 ob/ob 마우스에 모노아실글리세롤 리파아제를 약 3주간 투여하여 체중 변화를 측정한 결과이다.

도 9는 비만이 유발된 ob/ob 마우스에 모노아실글리세롤 리파아제를 약 3주간 투여한 후에 마우스의 모습과 간(liver), 내장지방(epididymal fat, Epi-WAT)을 보여주는 그림이다.

도 10은 6주령 마우스에 돼지 췌장의 리파아제(대조군)와 *Candida rugosa* 리파아제(실험군)를 각각 7주간 투여한 후 체중 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 11은 올리브 오일을 투여한 마우스에서 모노아실글리세롤 리파아제(MGL)에 의한 혈중 중성지방 농도변화를 나타낸 데이터이다.

도 12는 올리브 오일을 투여한 마우스에서 모노아실글리세롤 리파아제에 의한 혈중 중성지방 농도변화를 시간별로 측정한 그림이며, Tyroxapol 투여 유무에 따라 표시하였다.



도 13은 모노아실글리세롤 리파아제 투여 후 1시간과 2시간 후에 마우스를 희생하여 소장 내에 작용하고 있는 효소의 활성을 측정한 결과이다.

도 14는 사람 소장 상피세포주인 Caco-2 세포를 이용하여 소장 상피세포 지방 재결합 능력이 모노아실글리세롤 리파아제의 투여에 의해 감소함을 보여주는 결과이다.

도 15는 비만이 유발된 ob/ob 마우스에 모노아실글리세롤 리파아제를 투여하는 동안 식이량 변화 및 변의 지방 함량을 측정한 것이다.

도 16은 비만이 유발된 ob/ob 마우스에 모노아실글리세롤 리파아제를 약 3주간 투여한 후에 포도당 부하검사를 실시한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [0024] 상술한 바와 같이, 간지방증, 비알코올성 지방간, 고지혈증, 제2형 당뇨병 및/또는 비만의 치료제로 사용되는 약물은 심장질환, 호흡기 질환, 혈압상승 및 불면증과 같은 부작용을 유발하며 그 효능의 지속성이 낮은 문제점이 있다. 따라서 향후 부작용이 없고, 대사증후군의 예방과 치료, 그리고 산화스트레스를 줄여 다양한 질환 예방 효과를 겸한 고부가 가치의 다기능성 제품의 개발이 시급한 실정이다.
- [0025] 이에, 본 발명은 2-모노아실글리세롤을 분해 효소를 포함하는 간지방증 또는 비알코올성 지방간의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공함으로써 상술한 문제의 해결방안을 모색하였다. 본 발명에서 제공되는 조성물은 소화관에서 중성지방을 지방산과 글리세롤로 완전히 분해함으로써 지방 흡수를 지연시키고, 중성지방의 혈중 흡수를 감소시키는 효과가 있으므로, 간지방증, 비알코올성 지방간, 고지혈증, 제2형 당뇨병 및/또는 비만을 예방, 개선 또는 치료하는 의약품 및 건강기능식품에 활용할 수 있다.
- [0026] 비만은 혈압 및 혈당을 상승시키고, 혈중 중성지방을 증가시키며 HDL 콜레스테롤을 감소시켜 결과적으로 대사증후군의 위험을 높이고, 궁극적으로는 심혈관 질환의 위험도를 증가시킬 수 있다. 상기 대사증후군(metabolic syndrome)은 복부 비만, 당뇨병, 이상지혈증(중성지방 상승, 고밀도 콜레스테롤 저하), 고혈압 등이 한 사람에게 동시다발적으로 생기는 것을 말한다. 즉, 본 발명의 2-모노아실글리세롤 분해 효소를 포함하는 조성물은 간지방증, 비알코올성 지방간, 고지혈증, 제2형 당뇨병 및/또는 비만의 예방 또는 치료제로 사용이 가능하므로, 지질 관련 대사증후군 질환의 치료제로도 사용이 가능하다.
- [0027] 모노아실글리세롤 리파아제는 혈중 중성지방을 감소시킬 수 있으며, 상기 모노아실글리세롤 리파아제가 장 내에 존재하는 경우, 2-모노아실글리세롤이 지방산과 글리세롤로 완전히 분해되어, 모노아실글리세롤 및 지방산이 소화상피세포로 흡수되어 중성지방으로 재합성되는 과정을 지연시킬 수 있다.
- [0028] 또한, 상기 2-모노아실글리세롤을 분해 효소에 의해, 2-모노아실글리세롤이 지방산과 글리세롤로 완전히 분해되고, 상기 분해된 지방산과 글리세롤이 소화상피세포로 흡수되어 중성지방으로 재합성되는 과정으로 인해 에너지 소비가 증가하며, 이때, 에너지 소비 증가는 소화상피세포 내에서 모노아실글리세롤 및 지방산이 중성지방으로 재합성되는 과정에 비해 3 내지 4개의 ATP가 더 소모될 수 있다.
- [0029] 본 발명은 소화관에서의 영양소 흡수와 대사 경로의 특성에 착안한 역설적인 발상에서 출발한 것으로서, 소화관에서의 중성지방 소화를 더욱 촉진하여 지방 흡수를 줄이고 에너지 소모를 촉진하는 메커니즘에 기반을 두고 있다.
- [0030] 도 1에 나타난 바와 같이, 중성지방은 글리세롤에 세 개의 지방산이 결합된 형태를 가지고 있으며, 사람의 소화관에서 중성지방을 분해하는 효소는 이자에서 분비되는 리파아제가 대표적이다. 하지만, 상기 리파아제는 불완전한 리파아제로서, 1번과 3번의 지방산을 분해하지만 2번에 결합된 지방산을 유리하지 못하므로, 결국 이 효소에 의한 산물은 2개의 지방산과 1개의 모노아실글리세롤로 존재하게 된다.
- [0031] 도 2는 소화관에서 중성지방의 소화 및 흡수과정을 나타낸 모식도로, 이자의 리파아제에 의해 분해된 지방산 2개와 모노아실글리세롤은 소화상피세포로 흡수되며, 소화상피세포에서 다시 중성지방으로 재결합하여 카일로미크론의 형태로 임파계로 유리된다.
- [0032] 상기 두 개의 지방산과 모노아실글리세롤이 중성지방으로 결합하는 과정에는 소화상피세포에 존재하는 MGAT2라는 효소가 작용하며, 도 3 상단에 나타난 바와 같이, 상기 효소는 모노아실글리세롤에서 지방산 하나를 붙여 다



이아실글리세롤을 형성하며, 형성된 다이아실글리세롤은 곧 중성지방이 된다. 이렇게 중성지방을 재형성한 후 카일로미크론 형태의 지단백을 형성해야지만 임파계 혹은 혈관계로 분비되어 용해된 채로 순환할 수 있다.

- [0033] 도 3 하단에 나타난 바와 같이, 상기 대사경로에서, 모노아실글리세롤 리파아제를 사용하여 2-모노아실글리세롤을 지방산과 글리세롤로 분해한다고 가정하면 결국 중성지방의 재형성 경로가 달라지게 된다. 글리세롤은 에너지를 소모하여 인산화가 되어야 하고, 이에 지방산 2개가 붙어 포스파티딘산이 된 다음 인산이 떨어지고 다이아실글리세롤을 형성하는 과정에 의해서 중성지방을 재형성할 수 있다. 상기 과정은 2-모노아실글리세롤이 직접 중성지방을 형성하는 과정에 비하여 3~4개의 ATP가 더 소모되므로, 에너지 소모를 촉진하여 비만을 예방 또는 치료할 수 있게 된다.
- [0034] 즉, 본 발명에서는, 2-모노아실글리세롤을 분해 효소를 경구 복용하여 소화관 내에서 중성지방을 지방산과 글리세롤로 완전히 분해시키고, 지방의 흡수 및 재형성 지연/에너지 소모를 촉진하여 간지방증, 비알코올성 지방간, 고지혈증, 제2형 당뇨병 및/또는 비만 치료에 사용하고자 하였다.
- [0035] 따라서, 본 발명은 2-모노아실글리세롤 분해 효소를 포함하는 간지방증 또는 비알코올성 지방간 예방의 또는 치료용 약학적 조성물; 또는 간지방증 또는 비알코올성 지방간의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0036] 본 발명은 또한, 2-모노아실글리세롤을 분해 효소를 포함하는 고지혈증 또는 제2형 당뇨병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물; 또는 고지혈증 또는 제2형 당뇨병의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0037] 나아가, 본 발명은 2-모노아실글리세롤을 분해 효소를 포함하는 비만 예방 또는 치료용 약학적 조성물; 또는 비만 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0038] 본 발명의 조성물에 있어서, 상기 2-모노아실글리세롤 분해 효소는 2-모노아실글리세롤을 지방산과 글리세롤로 완전히 분해할 수 있는 것이라면 제한없이 사용될 수 있으며, 바람직하게는 2-모노아실글리세롤을 특이적으로 분해하는 리파아제일 수 있다.
- [0039] 상기 2-모노아실글리세롤을 특이적으로 분해하는 효소의 기원은 특별히 제한되지 않지만, 예를 들어, 사람, 마우스, 효모, 곰팡이 및 박테리아로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나로부터 유래된 일 수 있다.
- [0040] 본 발명의 바람직한 일실시예에서는, 2-모노아실글리세롤을 특이적으로 분해하는 리파아제를 제조하기 위해 사람 또는 마우스 유래 모노아실글리세롤 리파아제(MGL) 유전자 서열을 재조합 벡터에 도입하고 상기 모노아실글리세롤 리파아제 단백질을 대량 발현할 수 있는 *E. coli* 시스템을 이용하여 단백질을 발현하여 부분 정제하였으며, His-tag을 이용하여 목적 단백질의 정제를 용이하게 하였다. 그러나, 사람 또는 마우스 이외에도, 2-모노아실글리세롤을 특이적으로 분해하는 리파아제를 암호화하는 유전자 서열이라면 제한없이 사용할 수 있다.
- [0041] 도 4는 사람과 마우스의 모노아실글리세롤 리파아제(MGL)의 유전자은행 번호 및 아미노산 서열을 나타낸 것으로, 필요에 따라서는 도 4에 제시된 사람 또는 마우스 유래 모노아실글리세롤 리파아제의 일부 아미노산 서열을 변형시켜 효소활성을 증가시킬 수 있으며, 모노아실글리세롤 리파아제의 일부 염기서열을 변형시켜 재조합 미생물에서 모노아실글리세롤의 생산을 증가시킬 수 있다.
- [0042] 도 5는 모노아실글리세롤 리파아제(MGL)의 대량 생산을 위해 제조된 박테리아 발현 벡터 시스템을 나타낸 것이며, 이를 이용하여 단백질을 대량 생산 후 조사한 결과 도 6에 나타난 바와 같이 모노아실글리세롤 리파아제(MGL)의 분리가 성공적으로 수행되었다. 모노아실글리세롤 리파아제의 순수분리를 위한 컬럼 정제 공정을 통해서 이 단백질에 특화된 단백질의 대량 생산 과정을 도출하였으며, 이를 도 7에 나타내었다.
- [0043] 도 8 및 9는 비만이 유발된 ob/ob 마우스에 모노아실글리세롤 리파아제를 약 3주간 투여하여 체중 변화를 측정한 결과이며, 체중 감소와 간의 크기로 보여지는 지방간의 감소, 내장 지방의 감소를 보여준다. 이 결과로 모노아실글리세롤 리파아제의 장기 투여가 간지방증 또는 비알코올성 지방간의 완화 및 체중 감소에 효과가 있음을 확인하였으며, 간지방증 또는 비알코올성 지방간의 치료제와 비만 치료제로 이용할 수 있음을 보여준다.
- [0044] 도 10은 6주령 마우스에 *Candida rugosa* 유래의 위치 비특이적 리파아제를 총 6주간 투여하여 체중 변화를 측정한 결과이다. 본 발명에서 용어 "위치 비특이적 리파아제 (non-specific lipase)"란 모든 트리글리세라이드의 모든 세 가지의 지방 아실기와 반응하는 리파아제를 의미한다.
- [0045] 2-모노아실글리세롤을 특이적으로 분해하는 리파아제는 2-모노아실글리세롤에만 특이적으로 작용하므로, 위치 비특이적 리파아제 보다 기질 특이성 및 분해 활성이 더 우수하여 더욱 효과적으로 비만을 치료할 수 있다. 따

라서, 2-모노아실글리세롤을 특이적으로 분해하는 리파아제는 다른 추가의 성분과의 조합하지 않고 단독으로 사용하여도 비만 치료효과가 탁월하다.

- [0046] 도 8과 10의 결과를 직접적으로 비교하면, 도 8은 2-모노아실글리세롤을 특이적으로 분해하는 모노아실글리세롤 리파아제를 20 unit/day로 투여하고 체중 감량 효과를 본 것이며, 도 10은 위치 비특이적 리파아제의 한 종류인 *Candida rugosa* 유래 리파아제를 2,000 unit/day로 투여한 후 체중 감량 효과를 본 것으로, 상기 두 실시예에서 효과는 비슷하게 약 3 g 정도의 체중 감량 효과를 보였다. 이는 (1) 모노아실글리세롤을 기질로 한 반응에서 2-모노아실글리세롤을 특이적으로 분해하는 리파아제의 단백질당 활성이 비특이적 리파아제보다 월등하게 높음 (50~100배)을 말해주고, (2) 비특이적 리파아제의 2-모노아실글리세롤에 대한 친화력이 2-모노아실글리세롤을 특이적으로 분해하는 리파아제만큼 우수하지 않다는 점을 말해주며, (3) 2-모노아실글리세롤을 특이적으로 분해하는 리파아제는 생리적인 소화액에 의한 중성지방 분해에 영향을 주지 않아 흡수되지 않아도 될 중성지방을 오히려 분해하는 현상이 일어나지 않음을 시사한다. 이러한 사실은 2-모노아실글리세롤을 특이적으로 분해하는 리파아제가 비특이적 리파아제보다 매우 우수한 치료효과를 보일 수 있음을 의미한다.
- [0047] 도 11은 올리브 오일을 투여한 마우스에서 모노아실글리세롤 리파아제(MGL)에 의한 혈중 중성지방 농도변화를 나타낸 데이터이며, 도 12는 올리브 오일을 투여한 마우스에서 모노아실글리세롤 리파아제에 의한 혈중 중성지방 농도변화를 시간 별로 측정한 그림이다. 이 결과로 모노아실글리세롤 리파아제의 투여가 혈중 중성지방의 감소에 효과가 있음을 확인하였으며, 고지혈증 치료제로 이용할 수 있음을 보여준다.
- [0048] 도 13과 14는 모노아실글리세롤 리파아제가 투여 후 소장 내에 작용한다는 것과 사람 소장 상피세포주인 Caco-2 세포에서 지방 재결합 지연 효과를 보여주는 결과이다.
- [0049] 도 15는 모노아실글리세롤 리파아제를 투여하는 동안 식이량 변화 및 변의 지방 함량을 측정한 것으로, 모노아실글리세롤 리파아제의 투여는 식이량에 변화를 가져오지 않으며, 지방변과 같은 부작용도 나타내지 않음을 확인하였다. 지방변은 종래 비만 치료제 중 하나인 제니칼의 심각한 부작용으로, 본 발명의 모노아실글리세롤 리파아제는 이러한 부작용을 전혀 나타내지 않으면서 체중 감소효과가 우수하여 비만 치료제로서 탁월한 효능을 나타냄을 확인하였다.
- [0050] 도 16은 비만이 유발된 ob/ob 마우스에 모노아실글리세롤 리파아제를 약 3주간 투여한 후에 포도당 부하검사를 실시한 결과를 그래프로 나타낸 것으로, 모노아실글리세롤 리파아제의 투여로 인해 비만이 완화되고 이에 따라 체내 대사가 개선되어 포도당 처리 능력이 향상됨을 확인하였다. 이러한 결과는 본 발명의 모노아실글리세롤 리파아제의 투여가 제2형 당뇨병과 같은 대사증후군 치료에 연결될 수 있음을 보여준다.
- [0051] 본 발명에 따른 2-모노아실글리세롤 분해 효소를 포함하는 간지방증, 비알코올성 지방간, 고지혈증, 제2형 당뇨병 및/또는 비만의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 경구를 통해 투여될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 여러 가지 제형으로 제제화할 수 있다. 제제화할 경우에는 2-모노아실글리세롤 분해 효소의 활성을 저해하지 않는 범위에서 통상적으로 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제제화할 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 모노아실글리세롤 리파아제에 적어도 하나 이상의 부형제(예를 들면, 전분, 수크로스, 락토오스 및 젤라틴) 등이 섞여 조제될 수 있다. 바람직하게는, 2-모노아실글리세롤 분해 효소의 활성이 위산과 위액에 의해 파괴되는 것을 방지하기 위해 코팅제제를 사용할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등을 들 수 있는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0052] 본 발명에 따른 2-모노아실글리세롤 분해 효소를 포함하는 약학적 조성물은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 일반적으로 1 내지 500 unit/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있으며, 1 unit은 pH 7.4, 37°C 조건에서 1시간 동안 모노아실글리세롤 1  $\mu$ mole이 완전히 분해되는 양을 의미한다. 또한 모노아실글리세롤 리파아제를 포함하는 조성물의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0053] 또한, 본 발명의 2-모노아실글리세롤을 분해 효소를 포함하는 간지방증, 비알코올성 지방간, 고지혈증, 제2형 당뇨병 및/또는 비만 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 포함하는 건강기능식품의 종류는 특별히 한정되지 않으며, 상기 건강식품은 상기 모노아실글리세롤 리파아제 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 2-모노아실글리세롤 분해 효소를 포함

하는 비알코올성 지방간 예방용 음료는 2-모노아실글리세롤 분해 효소를 포함하는 것 이외에 칼슘, 가시오가피 농축액, 액상과당, 정제수 등을 첨가 혼합하여 드링크용 병에 충전하여 살균한 후 실온으로 냉각하여 음료를 제조할 수 있다. 또한, 상기 2-모노아실글리세롤 분해 효소를 포함하는 간지방증, 비알코올성 지방간, 고지혈증, 제2형 당뇨병 및/또는 비만 예방용 건강보조제는 모노아실글리세롤 리파아제에 영양보조성분(비타민 B1, B2, B5, B6, E 및 초산에스테르, 니코틴산 아미드), 올리고당, 50% 에탄올, 정제수를 첨가 혼합하여 과립상으로 성형하여 진공건조기에서 건조시킨 후, 12~14 메쉬(mesh)를 통과시켜 균일하게 과립을 제조하여 적당량씩 압출 성형하여 정제 또는 분말로 하거나 경질캡슐에 충전하여 경질캡슐제품으로 제조할 수 있다.

[0054] 상기 건강식품에 함유된 상기 2-모노아실글리세롤을 분해 효소의 유효용량은 상기 약학조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으며, 유효성분의 혼합량은 예방 또는 치료적 처치 등의 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있다.

[0055] 이하 본 발명을 바람직한 실시예를 참고로 하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되는 것은 아니다.

## 실시예 1

[0056] **모노아실글리세롤 리파아제 단백질의 제조 및 정제**

[0057] 1-1 : 재조합 벡터 및 재조합 미생물 제조

[0058] 본 발명에서는 모노아실글리세롤 리파아제 단백질을 제조하기 위해 단백질을 대량 발현할 수 있는 *E. coli* 시스템 및 His-tag을 이용하였으며, 사람 유래 모노아실글리세롤 리파아제 mRNA(Genebank Number: NM\_001003794) 및 마우스 유래 모노아실글리세롤 리파아제 mRNA(Genebank Number: NM\_011844)의 전사해독틀(open reading frame; ORF) 부분을 pT7-HMT(His-Myc-TEVprotease) 벡터(Geisbrecht BV et al., Protein Expression Purif 46:23-32, 2006)에 클로닝하였다.

[0059] 상기 pT7-HMT 벡터는 6개의 His-tag과 목적단백질을 융합하여 박테리아에서 발현시키는 벡터이며, 발현되는 단백질을 쉽게 정제할 수 있는 특징이 있고, TEV protease를 이용해서 필요시에 tag를 분리해낼 수 있는 장점이 있다.

[0060] 먼저, 사람 또는 마우스 유래 모노아실글리세롤 리파아제 mRNA의 ORF 부분(ATG 시작 코돈 제외)을 증폭할 수 있는 프라이머를 하기 표 1과 같이 제작하였으며, 증폭된 유전자를 벡터에 삽입할 수 있도록 제한효소 사이트가 포함되도록 제작하였다.

## 표 1

[0061] 프라이머 서열

유전자		프라이머 서열	제한 효소	서열 번호
사람 MGL	forward	5'-GCCATATGccagaggaaagttcccagg-3'	NdeI	서열번호 1
	reverse	5'-CGCTCGAGtcagggtgggacgcagttc-3'	XhoI	서열번호 2
마우스 MGL	forward	5'-GCGTCGACcctgaggcaagttcaccagg-3'	SalI	서열번호 3
	reverse	5'-CGCTCGAGtcagggtggacacccagctc-3'	XhoI	서열번호 4

[0062] (밑줄 친 부분은 제한효소가 작용하는 부분을 표시한 것임)

[0063] 사람 또는 마우스 유래 총 RNA를 지방조직으로부터 추출하고, 이를 주형으로 하여 상기 표 1의 각각의 프라이머 쌍을 사용하여 PCR (Polymerase chain reaction)을 수행하였다. PCR증폭 산물의 서열을 확인한 결과, 사람의 모노아실글리세롤 리파아제 유전자는 서열번호 5로, 마우스 유래 모노아실글리세롤 리파아제 유전자는 서열번호 6으로 표시되는 것을 확인하였다 (표 2).

## 표 2

[0064]

유전자 서열 정보

유전자	유전자 염기서열	서열번호
사람 MGL	GCATATGccagaggaaagt tccccaggcggaccccgagagcat tccctaccaggacctccc tcaactgggtcaatgcagacggacagtacctcttctgcaggctactggaaacccacaggcacaccc aaggccctcatctttgtgtcccatggagccggagagcacagtggccgctatgaagagctggctc ggatgctgatgggctggacctgctgggtgttcgcccacgaccatgttggccacggacagagcga aggggagaggatggtagtgtctgacttccacgttttctgcagggatgtgtgcagcatgtggat tccatgcagaaagactaccctgggcttctgtcttcttctgggccaactccatgggagggcgcca tcgccaactcacggccgcagagaggccgggccaacttcgcccggcatggtagctcatttcgctct gggtcttgccaatcctgaatctgcaacaactttcaaggctcttgcctgcgaaagtgtcaacctt gtgctgcaaaactgtccctcgggcccatcgactccagcgtgctctctcggaataagacagagg tcgacatttataactcagacccctgatctgcccgggagggtgaagggtgtgcttcggcatcca actgctgaatgccgtctcacgggtggagcgcgcccctcccaagctgactgtgcccttctgtctg ctccagggtctgcccgtacgctatgtgacagcaaaaggggcctacctgctcatggagttagcca agagccaggacaagactctcaagattatgaagggtgctaccatgttctccacaaggagcttcc tgaagtaccaactccgtcttccatgaaataaacatgtgggtctctcaaaggacagccacggca ggaactgcgtccccaccctgaCTCGAGCG	서열번호 5
마우스 MGL	GCGTCGACcctgaggcaagt taccaggcgaactccacagaatgttccctaccaggacctgcc tcaactgggtcaatgcagacggacagtacctctttgtagatactggaagccagtgccacaccc aaggccctcatctttgtgtcccatggagctggggaacactgtggccgtatgatgagctggctc atatgttgaaggggctggacatgctggatatttgcctatgacctgttggccatgggcagagtga gggagagaggatgggtgggtcggacttccaagttttgtcagagatgtgctgcaacacgtggac accatccagaaggactaccgcgactcccatcttctcctgggccaactccatgggagggtgcca tctccatcctagtggctgcagagaggccaacctacttttctggcatgggtcctgatttcaacctct gggtccttgccaatccggaatctgcatcgactttgaaggctcttgcctgcaaaactgtcaatttt gtcctgcaaaatgatccttggggcgcatgactccagcgtgctgtctcggaacaagt cggagg ttgacctgtacaactctgacccactcgtctgcccagcagggtgaagggtgtgctttggcataca gctgctgaatgccgtcgcaagagtggagcgcgcaatgccagggtgacactgccattcctgtctg ctgcagggtctgctgaccggcttgcgacagcaaaagggtgctacctgctcatggaatcatccc ggagt caggacaaaacactcaagatgtatgaagggtgctatcacgtcctccacaggagcttcc ggaagt gaccaactccgtcctccatgaagtaaacctcgtgggtgtctcacaggatagcagcagca ggagctgggtgtccaccctgaCTCGAGCG	서열번호 6

[0065]

상기 증폭시킨 사람 또는 마우스 유래 모노아실글리세롤 리파아제 유전자를 NdeI(Cat. No. R0111S; New England BioLabs, 미국) 혹은 SalI(Cat. No. R0138S; New England BioLabs, 미국) 및 XhoI(Cat. No. R0146S; New England BioLabs, 미국) 로 분해한 다음, 동일한 제한 부위를 전달한 pT7-HMT 벡터에 도입하여 재조합 벡터를 제조하였다. 이 경우 6개의 His-tag은 단백질의 정제에, Myc-tag은 항후 웨스턴 분석법에 의한 단백질 검출에 이용될 수 있도록 하였다. 또한 필요시 TEV protease를 적용하여 His-Myc-tag을 제거할 수 있도록 디자인하였다.

[0066]

1-2 : 모노아실글리세롤 리파아제 단백질 생산 및 정제

[0067]

그 다음, 상기 재조합 벡터를 대장균인 BL21(DE3)pCodon plus 균주(Cat. No. #230245; Agilent, 미국)에 형질 전환하였다. 이 균주를 카나마이신(kanamycin) 및 클로람페니콜(chloramphenicol)과 2%의 에탄올이 함유된 LB 배지 500 ml에 접종하여 600 nm의 흡광도가 0.5~0.6이 될 때까지 키운 다음, 단백질 발현을 위해 IPTG를 1 mM로 첨가하여 섭씨 16도에서 16시간 동안 더 배양하였다.

[0068]

배양액에서 균을 원심분리로 수확하여 Lysis buffer(50mM Tris-Cl, pH8.0, 500mM NaCl, 5mM imidazole, pH8.0)에 부유하고, Triton X-100을 1%로 첨가한 다음 lysozyme을 포함한 냉동-해동 방법으로 균을 깨뜨려 단백질 균등액을 만들었다. 초음파 분쇄법으로 핵산을 분해하고 원심분리 후 Ni-NTA agarose bead (Cat. No. 30210, Qiagen, 미국)을 이용하여 His-Myc-MGL 융합 단백질을 컬럼에 결합하였다. 박테리아 용해에 따른 내독소(endotoxin)를 제거하기 위하여 컬럼을 Triton X-114가 0.1%로 포함된 washing buffer를 이용하여 50 컬럼부피로 씻어내고, 그 후 Triton X-114가 없는 washing buffer를 이용하여 10 컬럼부피로 씻어내었다.

[0069]

컬럼에 부착된 단백질의 용출은 여러 테스트 결과 imidazole이 아닌 EDTA를 이용하여 용출하였다. 용출용액(150 mM EDTA, pH 8.0, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 8.0)을 사용하여 수확한 단백질은 이후 200배의 50 mM Tris-Cl, pH 8.0으로 투석을 실시하여 "crude MGL"이라 하여 실험에 이용하였다.

[0070]

도 6은 마우스 유래 모노아실글리세롤 리파아제(MGL)의 분리 정제 후 SDS-PAGE를 시행한 결과를 나타낸 데이터로, 본 발명에서 정제한 마우스 유래 모노아실글리세롤 리파아제(MGL)의 크기는 약 33kDa인 것을 확인하였으며,



실제 마우스 모노아실글리세롤과 동일한 크기를 가지는 것을 확인하였다.

[0071] 동물에 투여할 모노아실글리세롤 리파아제는 상기 crude MGL을 도 7과 같은 공정을 통해 HiTrap Phenyl HP, HiTrap SP, HiTrapQ 컬럼을 순차적으로 적용하여 더욱 순수하게 정제하였다.

## 실시예 2

[0072] **모노아실글리세롤 리파아제 단백질의 활성 측정**

[0073] 본 발명에서는 실시예 1에서 정제한 마우스 유래 모노아실글리세롤 리파아제의 활성을 측정하기 위해 분리한 단백질과 그 기질인 oleoyl-rac-glycerol (Cat. No. M7765, Sigma, 미국)을 반응시키고, 그에 의해 유리되는 glycerol을 Glycerol assay kit(Cat. No. MAK117, Sigma, 미국)를 사용하여 키트에 첨부된 매뉴얼을 참고로 측정하였다. 1 unit은 pH 7.4, 37 °C 조건에서 1시간 동안 모노아실글리세롤 1  $\mu$ mole이 완전히 분해되는 양으로 정의하였다. 이 활성 측정법은 glycerol standard를 참고로 하여 그 양을 계산하였다.

[0074] 또한 단백질의 농도는 Pierce™ BCA assay kit(Cat. No. 23225, ThermoFisher Scientific, 미국)를 이용하여 측정하였으며, 이를 통하여 mg 당 활성도를 계산하였다.

[0075] 단백질에 남아있을 수 있는 내독소(endotoxin)는 Pierce™ LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit (Cat. No. 88282, ThermoFisher Scientific, 미국)을 이용하여 측정하였다.

[0076] 위와 같이 측정한 마우스 유래 모노아실글리세롤 리파아제는 다음과 같은 결과를 보였다.

[0077] 농도 3~5 mg/ml, total 300~500 mg / 40 liter culture

[0078] 활성도 30~100 units/mg protein

[0079] 내독소 <10 EU/ml (\*EU, endotoxin unit)

## 실시예 3

[0080] **모노아실글리세롤 리파아제의 비만 감소 효과**

[0081] 본 실시예에서는 상기 실시예 1에서 제조한 모노아실글리세롤 리파아제를 약 3주간 투여한 비만 ob/ob 마우스에서 체중 감소 혹은 체중 증가 지연 효과를 나타내는지를 확인하였다. 렙틴 유전자의 돌연변이로 식욕억제가 둔화되어 비만 형질을 나타내는 ob/ob 마우스(중앙실험동물, 한국)를 대상으로 11주령 마우스에 매일 200  $\mu$ l (약 20~50 units)의 모노아실글리세롤 리파아제를 경구 가배지(oral gavage)로 약 3주간 매일 투여하였다. 사료의 섭취와 모노아실글리세롤 리파아제의 작용 시점을 동일화하기 위하여 금식을 시킨 다음 가배지를 한 이후 사료를 주는 방법을 선택하였다.

[0082] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이 모노아실글리세롤 리파아제 투여 후 체중이 의미있게 감소하여 3주 후 대조군에 비해 약 4~5 g의 체중 차이가 남을 확인하였다. 또한, 도 9에 나타난 바와 같이 육안으로도 체중 감소와 간지방증 또는 지방간의 완화, 내장 지방의 감소를 확인할 수 있었다.

## 실시예 4

[0083] **2-모노아실글리세롤의 분해와 비만 감소 효과**

[0084] 본 실시예에서는 2-모노아실글리세롤 분해 효소에 의한 비만 감소 효과를 확인하였다. 구체적으로, 1,3-특이적 리파아제로 돼지 췌장의 리파아제(L3126, Sigma, 미국)를 대조군으로 하고 비특이적 리파아제로 *Candida rugosa* 리파아제(L1756, Sigma, 미국)를 선택하여 ob/ob 마우스(중앙실험동물, 한국)에 7주간 가배지로 투여하고 그 결과를 도 10에 나타내었다.

## 실시예 5

[0085] **모노아실글리세롤 리파아제 투여에 의한 혈중 중성지방 감소 효과**

[0086] 본 발명에서는 실시예 1에서 제조한 모노아실글리세롤 리파아제에 의해 실제 혈중 중성지방이 감소하는지 확인하기 위해 마우스에 모노아실글리세롤 리파아제를 경구 투여하였으며, 실시예 2의 활성 측정결과를 바탕으로 마우스에 단위(unit)만큼 투여하였다.

- [0087] 먼저, C57BL6/J 마우스를 4시간 이상 금식한 후에 올리브 오일 250  $\mu$ l를 튜브를 이용한 가베지(gavage) 방법으로 투여하였으며, 동시에 대조군은 식염수 250  $\mu$ l를, 실험군은 250  $\mu$ l의 모노아실글리세롤 리파아제 단백질을 투여하였다.
- [0088] 2시간 후에 마우스를 희생하여 혈액을 채취한 다음 혈중 중성지방의 양을 분석하였으며, Triglyceride Colorimetric Assay Kit(Cat No 10010303, Cayman, 미국)를 사용하여 키트에 포함된 매뉴얼에 따라 흡광도 500nm에서 측정하였다. 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이 모노아실글리세롤 리파아제를 투여한 마우스 군에서 혈중 중성지방이 크게 감소한 것을 확인하였다. 이를 통해, 본 발명의 모노아실글리세롤 리파아제는 소화관에서 중성지방을 지방산과 글리세롤로 완전히 분해함으로써, 중성지방의 혈중 흡수를 감소시키는 효과가 있다는 것을 확인하였다.
- [0089] 또한, 상기와 같은 실험을 시간 별로 측정한 결과 도 12에 나타난 바와 같이 생리식염수 투여군보다 모노아실글리세롤 리파아제 투여 군에서 지방의 흡수가 매우 낮았으며(도 12A), Tyloxopol을 투여하여 지방조직에 혈중 지방이 유리되는 것을 방지한 실험에서 더욱 확실히 나타났다(도 12B).

## 실시예 6

- [0090] 소장에서의 모노아실글리세롤 리파아제 활성화 측정
- [0091] 본 실시예에서는 상기 실시예 5에서 입증된 지방 흡수 감소 효과가 실제로 모노아실글리세롤 리파아제가 작용한 결과임을 증명하기 위하여 경구 투여한 모노아실글리세롤 리파아제의 활성도를 소장에서 측정하였다.
- [0092] 생리식염수 혹은 모노아실글리세롤 리파아제를 투여한 후에 1시간 또는 2시간 이후 마우스를 희생하여 소장 중 공장(jejunum) 부위를 근위부(proximal)와 원위부(distal)로 나누어 해부하고, 이를 PBS에 담가 소장 내의 물질이 PBS에 용출되도록 하였다. 여기에 존재하는 모노아실글리세롤 리파아제의 활성을 실시예 2에서의 방법을 이용하여 측정하였다.
- [0093] 그 결과, 도 13에서 나타난 바와 같이 모노아실글리세롤(MGL)을 투여한 군은 경구 투여 후 1시간 후 근위부에서 2시간 후 원위부로 이용하는 것을 볼 수 있으며, 여기에 남아 있는 단백질의 총 활성은 경구 투여한 단백질의 1/5~1/10에 해당하였다. 이는 투여한 모노아실글리세롤 리파아제가 위산과 위액에 의해 파괴되지만 적어도 1/10에 해당하는 효소 활성이 소장에서 작용하고 있음을 의미한다. 따라서 마우스 실험에는 체내 필요량보다 과량을 투여할 필요가 있음을 말해준다. 향후 코팅제제 등의 방법으로 모노아실글리세롤 리파아제를 위산과 위액으로부터 보호할 수 있다.

## 실시예 7

- [0094] 모노아실글리세롤 리파아제에 의한 소장세포의 중성지방 재결합 지연 효과
- [0095] 본 실시예에서는 상기 실시예 5와 실시예 6에서 확인된 중성지방 흡수 지연 효과가 실제로 소장세포의 중성지방 재결합 및 혈중 유리 과정을 지연함으로써 나타남을 증명하기 위하여 사람의 소장세포주인 Caco-2 세포(Cat No. HTB37, ATCC, 미국)를 이용하여 실험하였다. 이 배양 시스템은 도 11에 나타난 바와 같이 소장관 쪽을 apical side로 놓아 소화 지방과 모노아실글리세롤 리파아제 단백질을 투여하고, 혈액 쪽을 basolateral side로 놓아 이 사이에 놓인 소장상피세포가 소화관에서 지방을 흡수하여 혈액으로 유리할 수 있는지를 검사하는 시스템이다. Caco-2 세포를 21일 동안 분화시키고 양측 배지가 세포를 통하지 않고서는 섞일 수 없도록 분화 후 세포간 연결이 잘 되어있는지를 저항 측정법으로 확인한 다음, 소장관 쪽에 oleic acid와 monooleoylglycerol을 투여하고, 생리식염수 혹은 모노아실글리세롤 리파아제를 투여하였다. 17시간 동안 배양기에 둔 다음 혈액 쪽 배지를 회수하여 이 배지에 포함되어 있는 지단백 표면 단백질인 ApoB 단백질을 ELISA 방법으로 측정하였다.
- [0096] 그 결과, 도 14에 나타난 바와 같이 모노아실글리세롤 리파아제 투여군에서 ApoB의 검출량이 매우 낮아졌음을 확인하였고, 이는 이 효소에 의해 모노아실글리세롤의 흡수를 저해하면 소장 상피세포의 혈중 지방 유리를 지연 또는 감소시킬 수 있다는 직접적인 증명이다.
- [0097] 실시예 5, 6 및 7의 결과를 실시예 3의 결과와 종합하면, 마우스에서 모노아실글리세롤 리파아제의 투여가 소장 상피세포의 중성지방 재결합을 지연 혹은 감소시키고, 이에 따라 혈중에 유리되어 지방조직에 축적되는 지방량이 감소한 결과 체중 감소로 이어짐을 나타내고 있으며, 이는 이 효소에 의해 모노아실글리세롤 흡수를 저해함으로써 모노아실글리세롤 리파아제를 비만 치료제로 이용할 수 있다는 것을 의미한다.

## 실시예 8

[0098] 2-모노아실글리세롤 리파아제의 투여에 따른 식이량 및 지방변 확인

[0099] 소장 내에서 모노아실글리세롤을 분해하여 지방 흡수가 지연되면 식이량도 변화할 수 있고 대변으로 지방이 과다 배출되어 지방변이 유발될 가능성을 생각할 수 있는데, 이를 조사하기 위해 모노아실글리세롤 리파아제를 투여하는 중에 식이량을 측정하고, 또한 랜덤하게 변을 채취하여 지방 함량을 조사하였다. 그 결과, 도 15에 나타난 바와 같이 모노아실글리세롤 리파아제의 투여는 식이량의 변화를 가져오지 않았으며, 지방변과 같은 부작용이 나타나지 않았다. 이는 지방 흡수를 저해하는 작용이 소장에서의 에너지 소모를 촉진함과 동반됨을 의미하며, 제니칼(성분명 orlistat)과 같은 약물이 지방 흡수를 억제하는 것과는 메커니즘이 다르고 지방변 부작용도 없음을 보여주고 있다.

## 실시예 9

[0100] 포도당 부하검사

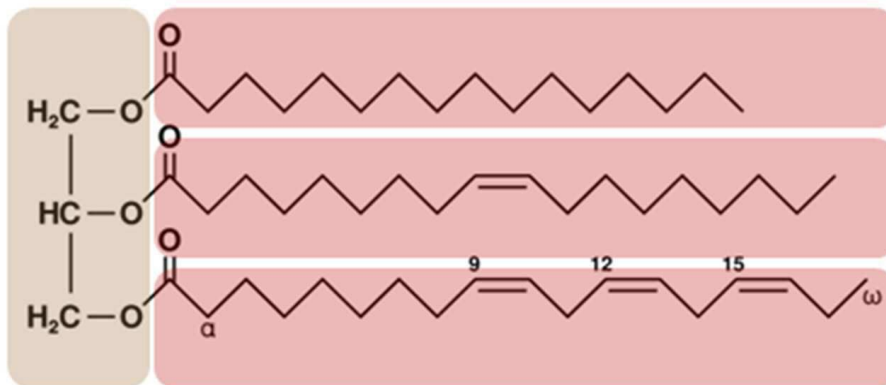
[0101] 본 실시예에서는 상기 실시예 3에서 모노글리세롤 리파아제를 투여한 마우스를 대상으로 포도당 부하검사를 실시하였다.

[0102] 모노글리세롤 리파아제가 투여된 마우스에 포도당 1.5 mg/g body weight을 복강주사로 투여하였으며, 부하전, 부하후 15분, 30분, 60분 및 120분에 채혈하여 혈당치를 측정하였다.

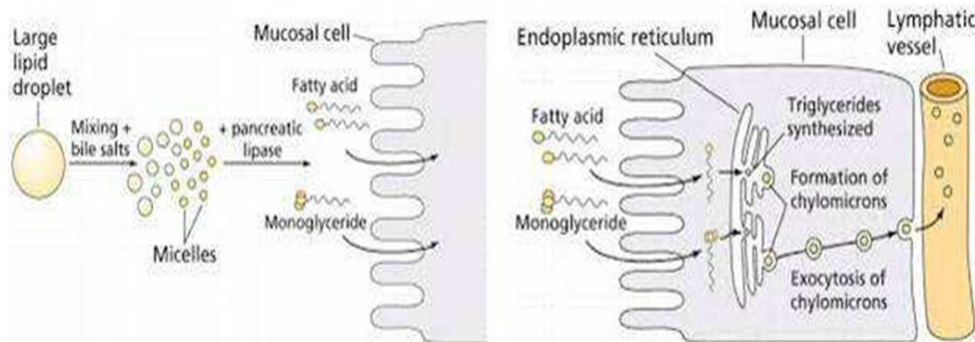
[0103] 그 결과, 도 16에 나타난 바와 같이 포도당 부하검사가 크게 향상된 것을 확인하였다. 이러한 결과는 모노아실글리세롤 리파아제가 당뇨병과 같은 대사증후군 치료에 사용될 수 있음을 시사한다.

## 도면

### 도면1

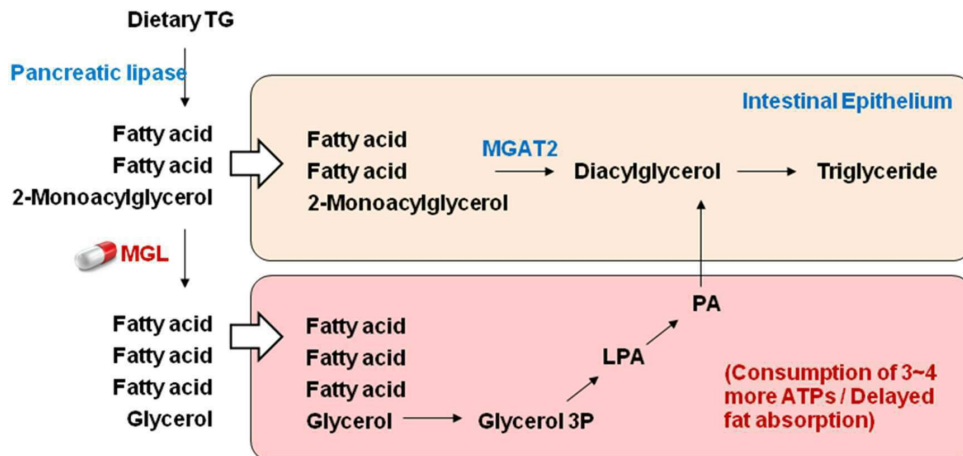


### 도면2





도면3



도면4

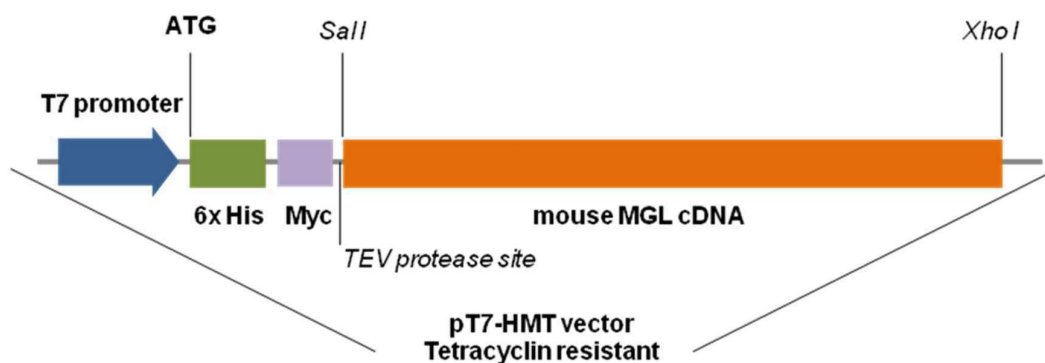
MGL GenBank Number  
human mRNA NM\_001003794, protein Q99685  
mouse mRNA NM\_011844, protein O35678

Human MGL  
MPEESSPRRTPQSIPYQDLPHLVNADGQYLFCRYWKPTGTPKALIFVSHGAGEHSGRYEE  
LARMLMGLDLLVFAHDHVGHGQSEGERMVVSDFHVFVRDVLQHVDSMQKDYPGLPVFLLG  
HSMGGAIAILTAERPGHFAGMVLISPLVLANPESATTFKVLAACKVLNLVLPNLSLGPID  
SSVLSRNKTEVDIYNSDPLICRAGLKVCFGIQLLNAVSRVERALPKLTVPFLLLQGSADR  
LCDSKGAYLLMELAKSQDKTLKIYEGAYHVLHKELPEVTNSVFHEINMWVSQRTATAGTA SPP

Mouse MGL  
MPEASSPRRTPQNVPIYQDLPHLVNADGQYLFCRYWKPSGTPKALIFVSHGAGEHCGRYDE  
LAHMLKGLDMLVFAHDHVGHGQSEGERMVVSDFQVVRDVLQHVDTIQKDYPDVPIFLLG  
HSMGGAISILVAAERPTYFSGMVLISPLVLANPESASTLKVLAAKLLNFVLPNMTLGRID  
SSVLSRNKSEVDLYNSDPLVCRAGLKVCFGIQLLNAVAVRAMPRRLTPFLLLQGSADR  
LCDSKGAYLLMESSRSQDKTLKMYEGAYHVLHRELPEVTNSVLHEVNSWVSHRIAAAGAG CPP

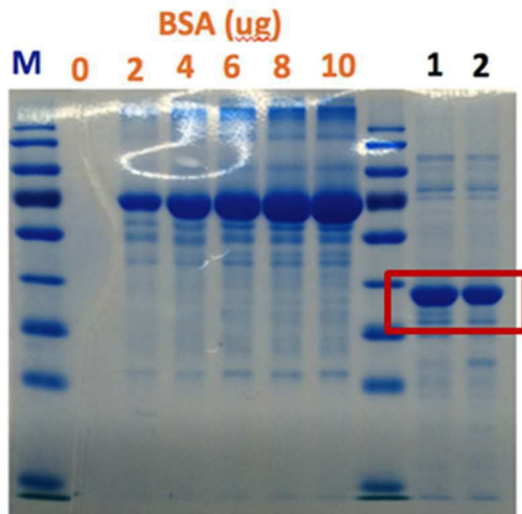
Human and mouse MGL positivity 93.4%, identity 84.2%

도면5



도면6

SDS-PAGE (staining with Coomassie Blue G-250)



M, marker

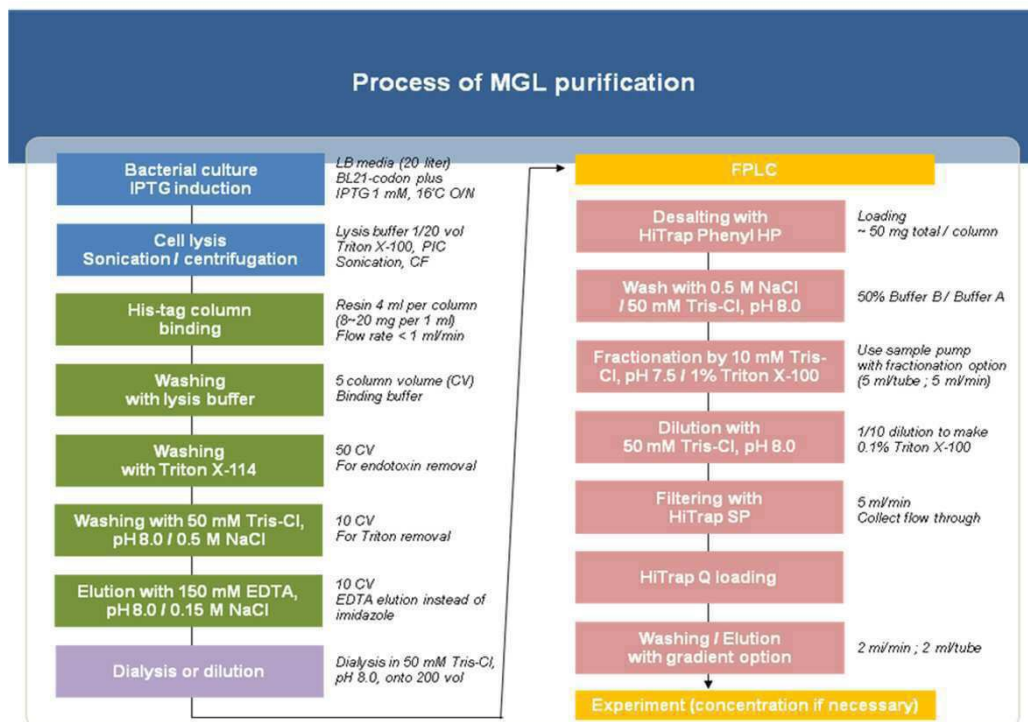
BSA 0~10 ug for standard

1-Input (His-purified protein)  
2-dialyzed protein

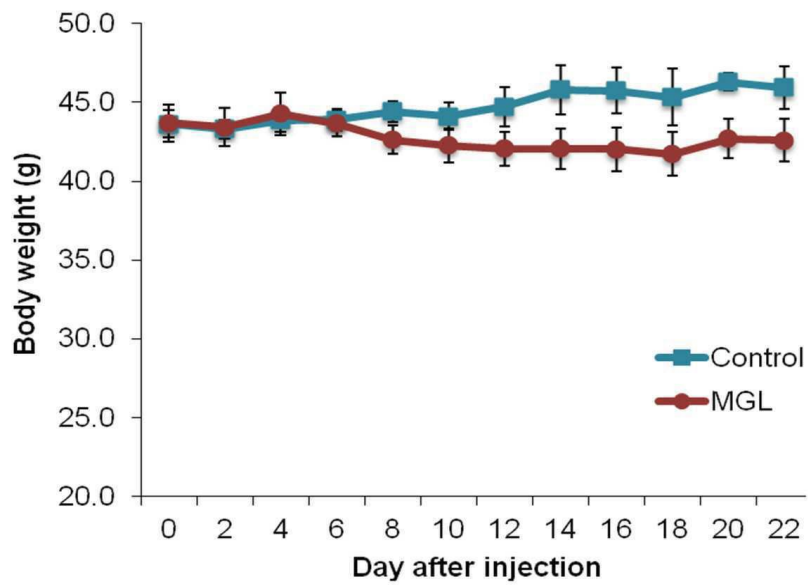
Estimated concentration of dialyzed protein : 3.0 ug/ul

Total >500 mg protein from 40 L culture

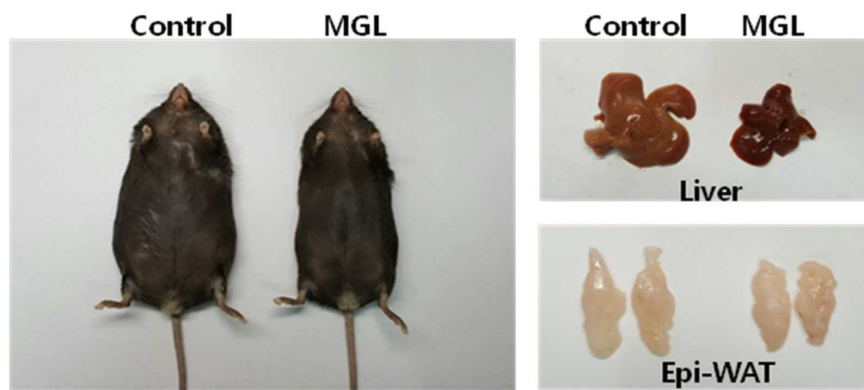
도면7



도면8

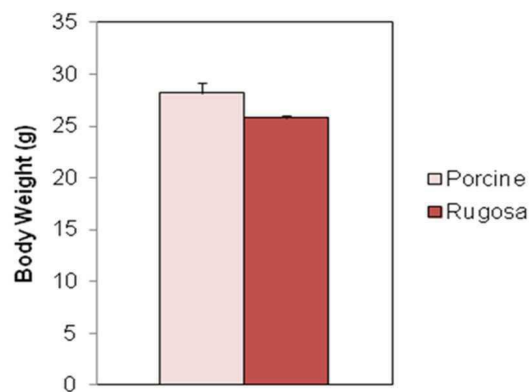


도면9

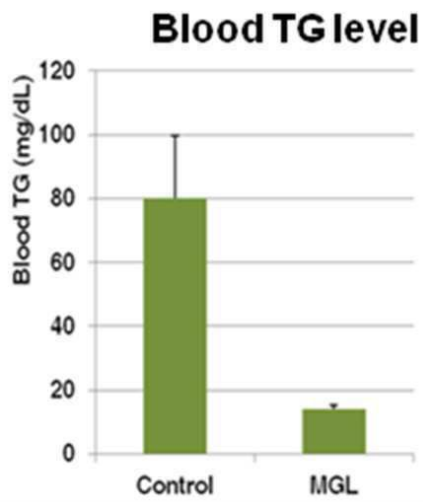


도면10

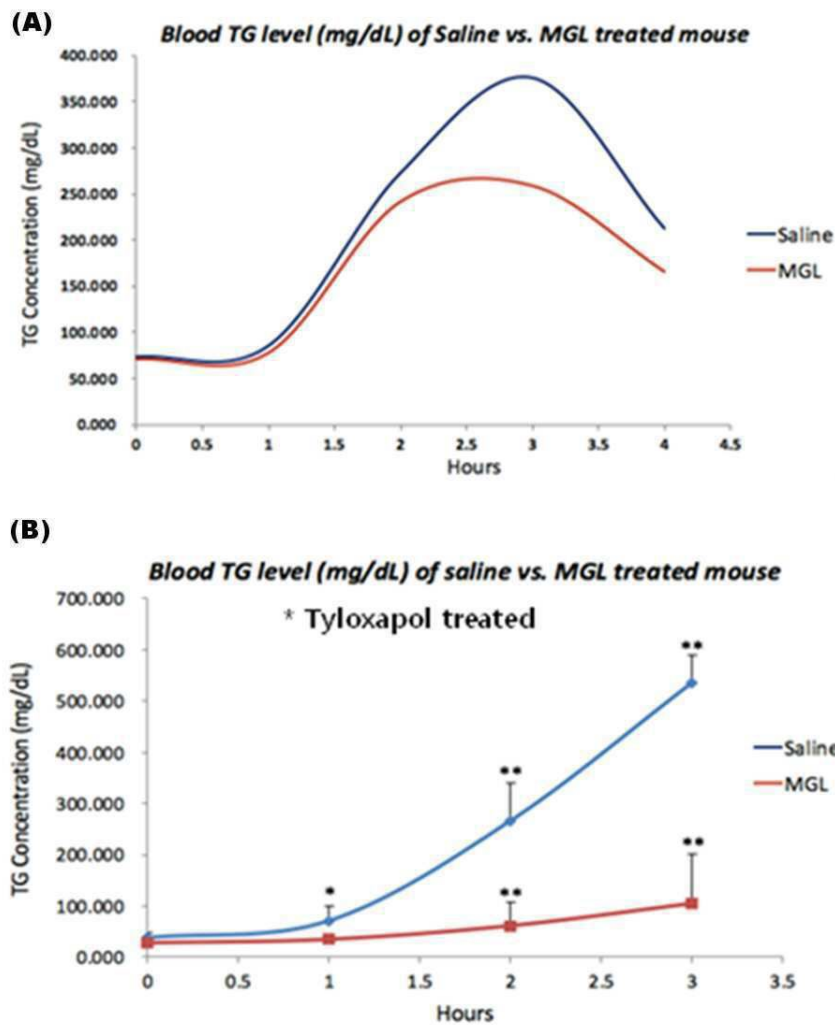
6-week-old  
 Sigma, L3126  
 Lipase from porcine pancreas  
 1, 3-specific lipase  
 Sigma, L1754  
 Lipase from *Candida rugosa*  
 non-specific lipase  
 gavage 2,000 units, daily, total 7 weeks



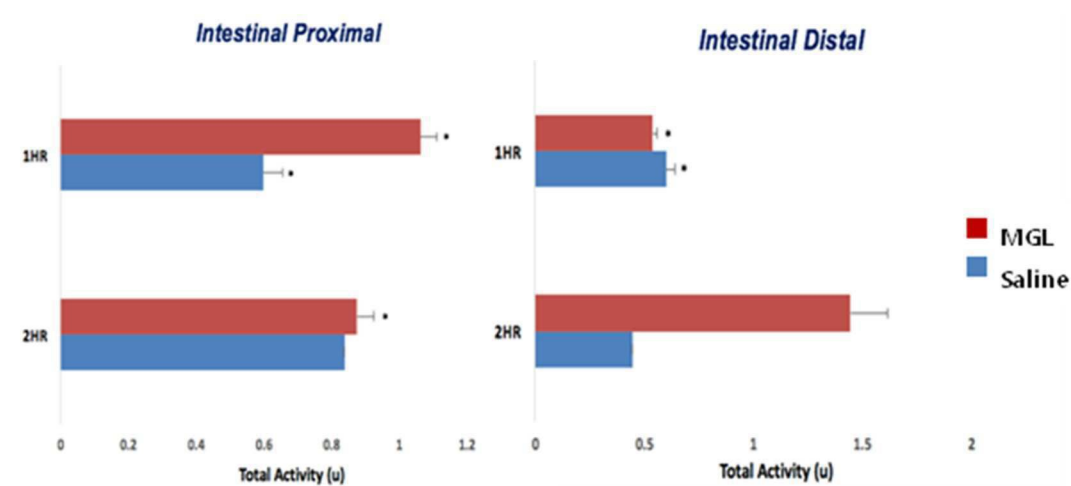
도면11



도면12

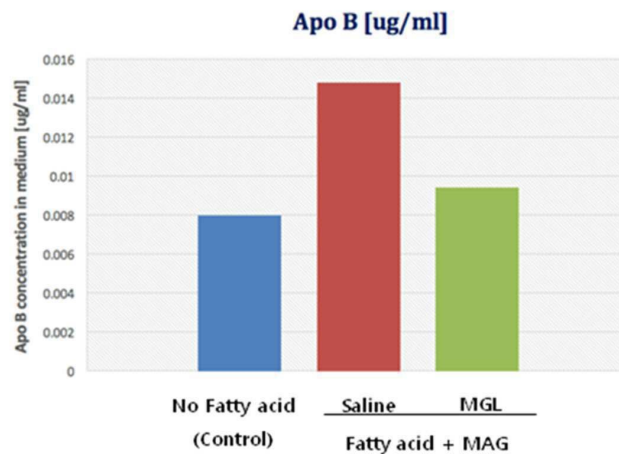
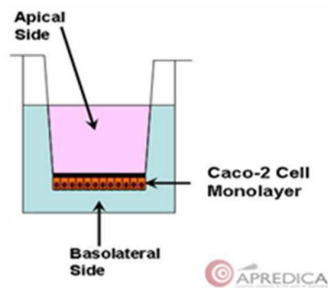


도면13

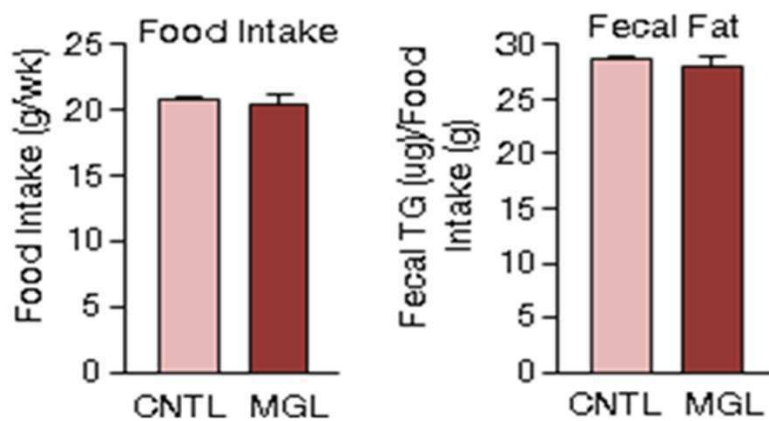


도면14

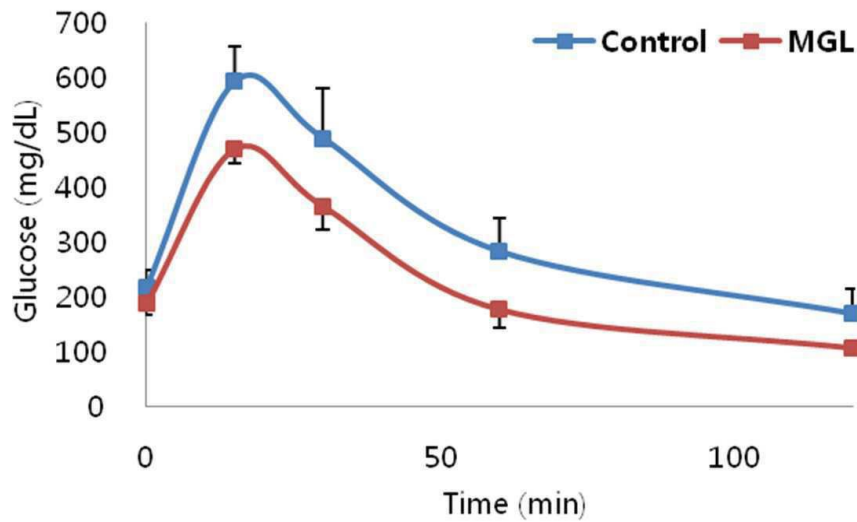
# Caco-2 cells – *in vitro* assay



도면15



도면16



## 서열 목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University

<120> Composition for preventing, improving or treating hepatic steatosis or nonalcoholic fatty liver comprising enzyme degrading 2-monoacylglycerol

<130> 1061057

<160> 6

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human MGL forward primer

<400> 1

gccatatgcc agaggaaagt tccccagg

28

<210

> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human MGL reverse primer

<400> 2

cgctcgagtc aggtgggga cgcagttc

28

<210>	3	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Mouse MGL forward primer	
<400>	3	
gcgtcgaccc tgaggcaagt tcacccagg		29
<210>	4	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Mouse MGL reverse primer	
<400>	4	
cgctcgagtc aggggtggaca cccagctc		28
<210>	5	
<211>	925	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Human monoacylglycerol lipase(MGL)	
<400>	5	
gccatagtc agaggaaagt tccccaggc ggaccccgca gagcattccc taccaggacc		60
tcctcacct ggtcaatgca gacggacagt acctctctg caggctactg aaaccacag		120
gcacaccaa ggccctcacc ttgtgtgcc atggagccgg agagcacagt ggccgctatg		180
aagagctggc tcggatgctg atggggctgg acctgctggt gttcgccac gaccatgttg		240
gccacggaca gacgaaggg gagaggatgg tagtgtctga ctccacgtt ttcgtcaggg		300
atgtgttgca gcatgtggat tccatgcaga aagactacc tgggtctct gctttccttc		360
tgggccactc catgggagc gccatgcga tctcacggc cgcagagagg cggggccact		420
tcgccggcat ggtactcatt tcgctctggt ttcttgcaa tctgaatct gcaacaactt		480
tcaaggtcct tgctgcgaaa gtgtcaacc ttgtgtgcc aaacttgtcc ctggggccca		540
tcgactccag cgtgctctct cggaataaga cagaggtcga cattataac tcagaccccc		600
tgatctgccg ggagggtctg aaggtgtgct tcggcatcca actgtgaat gccgtctcac		660
gggtggagcg cgccctcccc aagctgactg tgcccttct gctgtccag ggctctgccg		720



atcgctatg tgacagcaaa ggggcctacc tgctcatgga gttagccaag agccaggaca 780  
agactctcaa gatttatgaa ggtgcctacc atgtttctca caaggagctt cctgaagtca 840  
ccaactccgt cttccatgaa ataaacatgt ggggtctctca aaggacagcc acggcaggaa 900  
ctgcgtcccc accctgactc gagcg 925

<210> 6

<211> 925

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse monoacylglycerol lipase(MGL)

<400> 6

gcgtcgacc tgaggcaagt tcaccaggc gaactccaca gaatgttccc taccaggacc 60  
tgctcacct ggicaatgca gacggacagt acctcttttg tagatactgg aagcccagtg 120  
gcacacccaa ggcctcatc tttgtgtccc atggagctgg ggaacactgt ggccgttatg 180  
atgagctggc tcatatgttg aaggggctgg acatgctggt atttggccat gaccatgttg 240  
gccatgggca gagttaggga gagaggatgg tgggtgtcga cttccaagtt tttgtcagag 300  
atgtgtgca acacgtggac accatccaga aggactacc cgacgtcccc atcttctcc 360  
tgggccactc catgggcggt gccatctcca tctagtggc tgcagagagg ccaacctact 420

tttctggcat ggtcctgatt tcacctctgg tccttgccaa tccggaatct gcatcgactt 480  
tgaaggtcct tgctgcaaaa ctgtcaatt ttgtctgcc aaatatgacc ttggggcgca 540  
ttgactccag cgtgctgtct cggaacaagt cggagggtga cctgtacaac tctgaccac 600  
tcgtctgccg agcagggtg aaggtgtgct ttggcataca gctgctgaat gccgtcgaa 660  
gagtggagcg agcaatgccc aggtgacac tgccattcct gctgctgcag ggttctgctg 720  
accggctttg cgacagcaaa ggtgcctacc tgctcatgga atcatcccgg agtcaggaca 780  
aaacactcaa gatgtatgaa ggtgcctatc acgtctcca caggagctt ccggaagtga 840

ccaactccgt cttccatgaa gtaaacctgt ggggtgtctca caggatagca gcagcaggag 900  
ctgggtgtcc accctgactc gagcg 925