

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2018년 1월 4일 (04.01.2018)



(10) 국제공개번호  
**WO 2018/004067 A1**

- (51) 국제특허분류:  
*C12N 15/85* (2006.01) *C12P 21/00* (2006.01)  
*C07K 14/575* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/010584
- (22) 국제출원일: 2016년 9월 22일 (22.09.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2016-0083513 2016년 7월 1일 (01.07.2016) KR
- (71) 출원인: 전남대학교 산학협력단 (INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 61186 광주광역시 북구 용봉로 77 (용봉동), Gwangju (KR).
- (72) 발명자: 김성진 (KIM, Seong Jin); 61496 광주광역시 동구의재로86번길 20 (소태동), Gwangju (KR). 임명 (IM, Myung); 34818 대전시 중구 목동로 37, 107동 801호 (목동, 목양마을아파트), Daejeon (KR). 손경철 (SOHN, Kyung Cheol); 34818 대전시 중구 목동로 37, 112동 1102호 (목동, 목양마을아파트), Daejeon (KR). 정유라 (JUNG, Yu Ra); 35235 대전시 서구 둔산남로 30, 111동 1001호 (둔산동, 녹원아파트), Daejeon (KR). 김창덕

(KIM, Chang Deok); 34957 대전시 중구 계백로1716번길 40, 101동 101호 (문화동, 문화마을금회어울림아파트), Daejeon (KR). 이중훈 (LEE, Jeung Hoon); 34124 대전시 유성구 엑스포로339번길 320, 10동 402호 (원촌동, 싸이언스빌), Daejeon (KR).

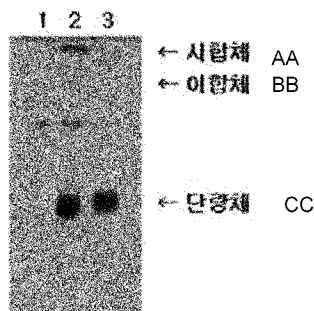
(74) 대리인: 두호특허법인 (DOOHO IP LAW FIRM); 06628 서울특별시 서초구 강남대로 51길 1, 7층 (서초동, 대현블루타워), Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유

(54) Title: ADIPONECTIN OVEREXPRESSION CELL LINE

(54) 발명의 명칭: 아디포넥틴 과발현 세포주



1: HEK293

DD 2: 아디포넥틴 과발현 세포주

EE 3: 아디포넥틴 과발현 아데노바이러스

AA ... Tetramer

BB ... Dimer

CC ... Monomer

DD ... Adiponectin overexpression cell line

EE ... Adiponectin overexpression adenovirus

(57) Abstract: The present invention relates to an adiponectin production method comprising the steps of: (a) producing an adiponectin expression vector by inserting adiponectin cDNA into a pcDNA 3.1 vector; (b) obtaining a cell line by transfecting the adiponectin expression vector into a eukaryotic cell; and (c) expressing the adiponectin in the cell line, and thus, through the adiponectin production method, post-translationally modified adiponectin may be overexpressed, polymer composite-type adiponectin may be produced at an affordable cost, the adiponectin may be used for effectively alleviating symptoms such as obesity, hyperglycemia, hyperinsulinism and cardiovascular diseases, and may be used for effectively alleviating skin diseases such as wounds, fibrosis, skin wrinkles and moisturization by promoting the expression of filaggrin, hyaluronic acid and an extracellular matrix, and polymer composite adiponectin may be produced at an affordable cost.

[다음 쪽 계속]

럼 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**규칙 4.17에 의한 선언서:**

- 신규성을 헤치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

**공개:**

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

---

**(57) 요약서:** 본 발명은 아디포넥틴을 생산하는 방법에 관한 것으로서, (a) 아디포넥틴 cDNA를 pcDNA 3.1 벡터에 삽입하여 아디포넥틴 발현 벡터를 제조하는 단계; (b) 상기 아디포넥틴 발현 벡터를 진핵 세포에 형질감염 (transfection)시켜 세포주를 수득하는 단계; 및 (c) 상기 세포주에서 아디포넥틴을 발현시키는 단계를 포함함으로써, 번역 후 변형된 아디포넥틴을 과발현할 수 있고, 고분자 복합체 형태의 아디포넥틴을 저렴한 가격으로 생산할 수 있으며, 비만, 고혈당, 고인슐린, 심혈관 질환 등의 증상을 효과적으로 완화시키는데 사용될 수 있으며 펠라그린 (filaggrin), 하이루론산 (hyaluronicacid) 및 세포외기질 등의 발현을 촉진함으로써 상처, 섬유화, 피부주름, 보습 등의 피부 질환도 효과적으로 완화시키는데도 사용될 수 있으며, 고분자 복합체 아디포넥틴을 저렴한 가격으로 생산할 수 있는, 아디포넥틴을 생산하는 방법에 관한 것이다.

## 명세서

### 발명의 명칭: 아디포넥틴 과발현 세포주

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 아디포넥틴 과발현 세포주에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [2] 지방조직은 과거 단순히 에너지의 저장고로만 알려졌으나, 최근에는 다양한 아디포카인을 생산, 분비하는 기관으로 알려지고 있다. 이러한 아디포카인은 비만과 인슐린 저항성 등 체내의 다양한 현상에 관여하고 있다. 아디포카인 중 하나인 아디포넥틴 (adiponectin)은 28kDa의 크기를 가지는 244 아미노산 길이의 단백질이다.
- [3] 아디포넥틴은 인슐린 저항성을 유도함으로써 고혈당, 고인슐린증, 비만, 동맥경화와 같은 심혈관 질환 등을 예방하는 중요한 역할을 하며, 암세포의 전이와 염증반응을 억제하는 기능이 있다. 또한, 아디포넥틴은 각질형성세포의 증식뿐만 아니라 피부에서 필라그린(filaggrin), 하이루론산(hyaluronic acid)과 세포외기질의 발현을 촉진함으로써 상처치료, 섬유화 억제, 피부주름개선, 보습 등의 기능을 수행한다.
- [4] 아디포넥틴은 세포 밖으로 배출되어 혈류를 통하여 전신 순환을 하다가 표적 수용체에 결합하여 작용을 한다. 아디포넥틴은 고분자, 중분자 및 저분자 복합체의 세 가지 형태로 존재하는데, 고분자 복합체 형태의 아디포넥틴이 형성되려면 세포 내에서 번역 후 변형과정 (post-translational modifications)이 필요하다. 고분자 복합체는 중분자 및 저분자 복합체보다 더 활성이 높으며, 사람 혈장에 있는 아디포넥틴의 대부분은 고분자 복합체의 형태로 존재한다.
- [5] 현재 상용화되어 있는 아디포넥틴 대부분은 진핵세포에서 이루어지는 번역 후 변형과정이 발생하지 않는 대장균을 기원으로 하여 고분자 복합체 형태의 아디포넥틴을 형성하지 못하고 단량체 또는 이합체 형태만 존재한다고 알려져 있다.
- [6] 이를 해결하기 위해 포유류 혈액에 실제 존재하는 형태의 아디포넥틴을 얻기 위한 시도가 있었으나, 이러한 형태의 아디포넥틴은 수율이 낮고 가격이 높다는 문제점이 있다.
- [7] 따라서 고분자 복합체 형태의 아디포넥틴을 저렴한 가격으로 생산하는 기술의 개발이 절실하다.

#### 발명의 상세한 설명

##### 기술적 과제

- [8] 본 발명은 고분자 복합체 형태의 아디포넥틴을 과발현할 수 있는 세포주의 제공을 목적으로 한다.
- [9] 본 발명은 저렴한 가격으로 아디포넥틴을 공급할 수 있는 세포주의 제공을

목적으로 한다.

[10] 본 발명은 번역 후 변형을 거친 아디포넥틴을 발현하는 세포주의 제공을 목적으로 한다.

[11] 본 발명은 계대배양이 가능한 세포주의 제공을 목적으로 한다.

### 과제 해결 수단

[12] 1. 다음의 단계를 포함하는 아디포넥틴 생산 방법:

[13] (a) 아디포넥틴 cDNA를 pcDNA3.1 벡터에 삽입하여 아디포넥틴 발현 벡터를 제조하는 단계;

[14] (b) 상기 아디포넥틴 발현 벡터를 진핵세포에 형질주입 (transfection)시켜 아디포넥틴 발현 세포주를 수득하는 단계;

[15] (c) 상기 아디포넥틴 발현 세포주에서 아디포넥틴을 발현시키는 단계.

[16] 2. 위 1에 있어서, 상기 아디포넥틴은 올리고머인, 아디포넥틴 생산 방법.

[17] 3. 위 1에 있어서, 상기 올리고머는 아디포넥틴 단량체 2 내지 12가 중합된 것인, 아디포넥틴 생산 방법.

[18] 4. 위 1에 있어서, 상기 진핵세포는 HEK293 (human embryonic kidney 293)세포인, 아디포넥틴 생산 방법.

[19] 5. 위 1에 있어서, 상기 아디포넥틴 cDNA는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 것인, 아디포넥틴 생산 방법.

[20] 6. 위 1에 있어서, 상기 아디포넥틴 발현 벡터는 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 것인, 아디포넥틴 생산 방법.

[21] 7. 서열번호 2의 아디포넥틴 발현 벡터로 형질감염된 HEK293 세포주.

### 발명의 효과

[22] 본 발명에 따른 세포주는 고분자 복합체 형태의 아디포넥틴을 과발현할 수 있다.

[23] 본 발명에 따른 세포주는 번역 후 변형을 거친 아디포넥틴을 발현할 수 있다.

[24] 본 발명에 따르면 세포주에서 발현된 아디포넥틴을 저렴한 가격으로 공급할 수 있다.

[25] 본 발명에 따른 세포주에서 생산된 고분자 복합체 아디포넥틴은 비만, 고혈당, 고인슐린, 심혈관 질환 등의 증상을 효과적으로 완화시키는 사용될 수 있다.

[26] 본 발명에 따른 세포주에서 생산된 고분자 복합체 아디포넥틴은 필라그린 (filaggrin), 하이루론산 (hyaluronic acid) 및 세포외기질 등의 발현을 촉진함으로써 상처, 섬유화, 피부주름, 보습 등의 피부 질환을 효과적으로 완화시키는데 사용될 수 있다.

[27] 본 발명에 따른 세포주는 고분자 복합체 아디포넥틴을 저렴한 가격으로 생산할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[28] 도 1은 인체에서 아디포넥틴이 다양한 형태로 존재함을 나타내는 모식도이다.

- [29] 도 2는 pGEM.T 벡터에 클로닝된 아디포넥틴 유전자가 잘 삽입되었음을 보여주는 겔전기영동 사진이다. M13 forward와 reverse 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응 (PCR, polymerase chain reaction)을 수행한 결과를 나타내고 있다.
- [30] 도 3은 아디포넥틴 과발현 세포주를 만들기 위해 사용한 pcDNA3.1 벡터의 모식도이다.
- [31] 도 4는 pcDNA3.1 벡터에 아디포넥틴 cDNA를 클로닝한 후 HEK293 세포에 transfection 시켜 만든 세포주에서 발현된 아디포넥틴을 Western blot으로 검출한 것을 나타낸 것이다. (1) HEK293 세포에 Mock 벡터를 넣었을 경우 (2) pcDNA3.1 벡터에 아디포넥틴이 클로닝된 벡터를 넣었을 경우 및 (3) 아디포넥틴 유전자를 가진 아데노바이러스를 감염시킨 경우에 아디포넥틴의 발현을 Western blot으로 확인하였다.
- [32] 도 5는 아디포넥틴을 발현하도록 제작된 여러 개의 세포주들의 세포 용해물과 배양배지 각각을 Western blot으로 확인한 결과를 나타낸 것으로, 3번 세포주에서 아디포넥틴의 단백질 발현이 가장 잘 되는 것을 확인하였고, 아디포넥틴 단백질의 분비 또한 가장 잘 이루어지는 것을 확인한 결과이다.
- [33] 도 6은 선별된 아디포넥틴 발현 세포주로부터 분비되는 아디포넥틴의 발현량을 효소 면역 분석법을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [34] 도 7은 선별된 아디포넥틴 발현 세포주로부터 분비되는 아디포넥틴을 원심성의 필터 장치를 이용하여 농축한 후, Western blot으로 확인한 결과이다.
- [35] 도 8은 선별된 아디포넥틴 발현 세포주로부터 분비되는 아디포넥틴을 원심성의 필터 장치를 이용하여 농축한 후, 효소 면역 분석법을 통해 아디포넥틴 발현량을 나타낸 것이다.

### 발명의 실시를 위한 형태

- [36] 본 발명은 아디포넥틴을 생산하는 방법에 관한 것으로서, (a) 아디포넥틴 cDNA를 pcDNA 3.1 벡터에 삽입하여 아디포넥틴 발현 벡터를 제조하는 단계; (b) 상기 아디포넥틴 발현 벡터를 진행 세포에 형질감염 (transfection)시켜 세포주를 수득하는 단계; 및 (c) 상기 세포주에서 아디포넥틴을 발현시키는 단계를 포함함으로써, 번역 후 변형된 아디포넥틴을 과발현할 수 있고, 고분자 복합체 형태의 아디포넥틴을 저렴한 가격으로 생산할 수 있으며, 비만, 고혈당, 고인슐린, 심혈관 질환 등의 증상을 효과적으로 완화시키는데 사용될 수 있으며 필라그린 (filaggrin), 하이루론산 (hyaluronicacid) 및 세포외기질 등의 발현을 촉진함으로써 상처, 섬유화, 피부주름, 보습 등의 피부 질환도 효과적으로 완화시키는데도 사용될 수 있으며, 고분자 복합체 아디포넥틴을 저렴한 가격으로 생산할 수 있는, 아디포넥틴을 생산하는 방법에 관한 것이다.
- [37] 이하 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [38] 본 발명에 따른 아디포넥틴 발현 세포주의 제조방법은 (a) 아디포넥틴 cDNA를

- pcDNA3.1 벡터에 삽입하여 아디포넥틴 발현 벡터를 제조하는 단계; (b) 상기 아디포넥틴 발현 벡터를 진핵세포에 형질주입 (transfection)시켜 세포주를 수득하는 단계; 및 (c) 상기 세포주에서 아디포넥틴이 발현되는 단계를 포함한다.
- [39] 본 발명은 아디포넥틴 cDNA를 pcDNA3.1 벡터에 삽입하여 아디포넥틴 발현 벡터를 제조하는 단계를 포함한다.
- [40] 아디포넥틴은 지방세포 (피하지방)에서 특이적으로 분비되는 단백질 호르몬인 아디포카인의 일종이며 28kDa의 크기를 가지는 244 아미노산 길이의 단백질이다.
- [41] GBP-28, apM1, AdipoQ 및 Acrp30으로도 불리는 아디포넥틴은 콜라겐 VIII 및 X 그리고 보체 인자 C1q에 구조적 상동성을 가지고, 인간의 혈장에 높은 수치로 순환하는 신규한 지방 조직-특이적 단백질이다. 이 단백질은 지방 조직에 의해 분리되는 생리학적으로 활성인 폴리펩티드중 하나로써 이의 다중 기능에 대해서 최근에 알려지기 시작하였다.
- [42] 간에서 아디포넥틴은 지방산 이화작용을 자극하고, 당신생 (gluconeogenesis)을 조절함으로써, 지질 및 에너지 대사를 조절한다.
- [43] 골근육에서 아디포넥틴의 대사 작용은 인슐린 민감성을 강화시키고, 순환 지질 수치를 감소시킨다. 아디포넥틴은 NO 분비를 상승시키고, 어드레신 인자의 생산을 억제함으로써, 내피 및 평활근 세포에 작용하여 죽종생성 (atherogenesis)에 대항하는 보호 효과를 갖는다.
- [44] 심장에서 아디포넥틴은 아직 충분히 이해하지 못한 기전을 통하여 심근세포 비대 및 심근 섬유증을 억제한다. 또한 비만 및 유형2 당뇨병 환자에서 아디포넥틴의 발현이 감소되는 것으로부터 아디포넥틴의 투여가 비만 및 유형2 당뇨병의 치료법이 될 수 있다.
- [45] 암의 경우 아디포넥틴은 종양 억제물질로 기능을 할 수 있으며, 아디포넥틴의 투여는 암의 발달을 억제하거나 또는 치료를 제공하는 치료법이 될 수 있다.
- [46] 아디포넥틴은 자가면역 질환 또는 장애를 포함하는 염증 질환 또는 장애에 또한 중요하다.
- [47] 따라서 체내에서 기능하는 아디포넥틴과 유사한 아디포넥틴을 생산하는 것이 앞서 언급한 질병을 치료하기 위해 절실히 필요하다.
- [48] 아디포넥틴은 형태적 특이성에 따라 선택적으로 세포막 상에 존재하는 단백질인 아디포넥틴 수용체와 결합하여 작용하며, 2가지 주요 수용체로 AdipoR1 및 AdipoR2가 있다.
- [49] 피지선세포에는 아디포넥틴 수용체인 AdipoR1 및 AdipoR2가 위치하고 있는데, 이 수용체들은 아디포넥틴을 신호로 하여 피지세포의 분화를 유도하고, 피지의 분비를 증가시킨다.
- [50] 혈장에 있는 아디포넥틴은 고분자 복합체 아디포넥틴으로 대장균에서 생산된 단량체 또는 이량체의 아디포넥틴은 수용체와 결합이 잘 이루어지지 않을 수 있으며, 위 질환들에 대한 치료에 있어 그 효과가 만족스럽지 못할 수 있다.

포유류 혈장에서 아디포넥틴을 수득하는 방법은 수득할 수 있는 아디포넥틴의 양이 매우 적어 치료제로 사용하기에는 경제성 측면에서 부적합한 면이 있다.

[51] 이에 본 발명자는 치료제로 사용할 경우 그 효과가 대장균에서 생산된 아디포넥틴보다 우수하며, 경제성 측면에서 치료제로 사용하기에 적합한 고분자 복합체 아디포넥틴의 생산 방법 및 아디포넥틴 과발현 세포주를 발명하였다.

[52] cDNA는 게놈 DNA (genomic DNA)와는 달리 인트론(intron)이 존재하지 않는 DNA로서, 게놈 DNA에서 전사과정(transcription)을 거쳐 생성된 mRNA를 이용하여 이에 상보적인 DNA를 제조할 수 있는데 이것을 cDNA라고 한다.

[53] 본 발명에 따른 아디포넥틴 cDNA는 아디포넥틴의 아미노산 서열에 상보적인 DNA를 의미한다. (아미노산 서열을 coding 하는 DNA를 의미한다)

[54] 아디포넥틴 cDNA 유전자를 숙주세포에 도입시키는데 적합한 벡터를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 아디포넥틴 발현 유도가 용이하도록 디자인된 벡터를 사용할 수 있다.

[55] 본 발명의 일 실시예에 따르면, CMV 프로모터와 neomycin 저항성 유전자를 포함하는 발현벡터 pcDNA3.1(Invitrogen, Carlsbad, CA, 미국)에 아디포넥틴 cDNA를 삽입하여 아디포넥틴 발현 벡터를 제작하였다.

[56] 본 발명은 아디포넥틴 발현 벡터를 진핵세포에 형질주입 (transfection)시켜 아디포넥틴 발현 세포주를 수득하는 단계를 포함한다.

[57] 본 발명에 따른 진핵세포는 세포 내에 핵으로 대표되는 다양한 세포소기관을 가진 세포들을 총칭하는 것으로, 진핵세포에서는 아디포넥틴 발현 시 번역 후 변형 과정을 거친 아디포넥틴 및 중량체 아디포넥틴을 발현시킬 수 있어 원핵생물인 대장균에서 발현되는 단량체 아디포넥틴보다 체내에 사용 시 더 효과적인 아디포넥틴의 생산이 가능한 장점이 있다.

[58] 본 발명은 아디포넥틴 발현 세포주를 배양하여 아디포넥틴을 발현시키는 단계를 포함한다.

[59] 세포 배양(cell culture)은 세포의 증식 및 유전자 발현을 지지하는 배지를 포함하는 용기에서의 세포/세포주의 인 비트로 유지를 의미한다. 따라서 세포 배양은 배양 배지에 세포에서 발현된 분비성 단백질의 축적을 유발한다. 배지는 일반적으로 아미노산, 지질, 미량 원소, 비타민 및 기타 성장 촉진 성분들 외에, pH를 안정화시키는 보조제를 포함할 수 있다.

[60] 소 태아 혈청을 포함하지 않는 배양 배지에 적합한 보충제를 넣어 세포를 배양할 수 있으며, 보충제는 아미노산, 지질, 미량 원소 및 기타 성장 촉진 성분으로부터 선택될 수 있다.

[61] 본 발명에서 생산된 아디포넥틴은 올리고머 형태를 가진다.

[62] 올리고머 아디포넥틴은 2개 이상의 아디포넥틴 단량체로부터 형성되는 단백질 복합체를 의미하며, 공유결합이 아닌 아디포넥틴 단량체 간의 상호작용에 의해 형성될 수 있다. 예컨대, 올리고머는 단량체가 2 내지 12개가 결합한 것일 수

있다.

- [63] 현재 상용화된 아디포넥틴은 대장균에서 유래된 것으로 단량체 또는 이합체로만 존재한다.
- [64] 그러나 체내에 존재하는 아디포넥틴은 여러 개의 단량체가 결합하여 중량체로 존재하는 것이 대부분이며, 이러한 단량체끼리의 결합은 번역 후 변형과정이 필수적이다. 대장균은 진핵세포에서 발생하는 번역 후 변형 과정이 일어나지 않으며, 대장균을 이용하여 생산된 아디포넥틴은 중량체를 형성할 수가 없다. 포유동물 유래의 세포주를 이용한 아디포넥틴 발현 세포주를 제작함으로써 대장균을 이용했을 때의 문제점을 극복하였다.
- [65] HEK293는 사람에서 유래한 세포이며, 특정 유전자가 게놈에 삽입되어 세포가 분열 또는 증식하여도 그 유전자가 소실되지 않고 끊임없이 계대 배양이 가능한 스테이블 트랜스포먼트 (stable transformant)를 만들기가 용이한 세포이다.
- [66] HEK293 세포에서 유래한 아디포넥틴은 인체 내에서 생성되는 아디포넥틴과 동일한 성질을 가진다. 따라서 본 발명은 인슐린 조절, 에너지 대사 조절, 비만 치료 등에 우수한 효과를 나타낼 수 있는 아디포넥틴을 제공할 수 있다.
- [67] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 아디포넥틴 cDNA는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열을 가진다.
- [68] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 아디포넥틴 발현 벡터는 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열을 가진다.
- [69] 본 발명은 서열번호 2의 아디포넥틴 발현 벡터로 형질주입된 HEK293 세포주를 제공한다.
- [70] 본 발명에 따른 서열번호 2의 아디포넥틴 발현 벡터는 CMV 프로모터와 neomycin 저항성 유전자를 포함하는 발현벡터 pcDNA 3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, 미국)에 아디포넥틴 cDNA를 삽입하여 제조하였다.
- [71] 본 발명에 따른 세포주는 아디포넥틴을 과발현하는 세포주로, 발현된 아디포넥틴은 올리고머 아디포넥틴을 형성할 수 있다. 아디포넥틴 중량체는 2개 이상의 아디포넥틴 단량체로부터 형성되는 단백질 복합체를 의미하며, 공유결합이 아닌 아디포넥틴 단량체 간의 상호작용에 의해 형성된다.
- [72] 인체 내 존재하는 아디포넥틴은 단량체가 아닌 올리고머이며, 올리고머 아디포넥틴을 사용할 경우 피지선 분화 효과가 더 우수하여 지질 합성을 더 효과적으로 촉진할 수 있다.
- [73] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 구체적으로 설명하지만, 이들이 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

- [74] .
- [75] 서열번호 1의 아디포넥틴 cDNA를 pcDNA 3.1에 삽입하여 pcDNA 3.1-ADIPOQ/HEK293를 제조하였다.
- [76] 도 6에서는 소태아혈청이 들어가 있지 않은 DMEM 배지로 HEK293 세포와 아디포넥틴 과발현 세포주를 각각 24시간, 48시간 배양 후 배양액을 모아 분비된 아디포넥틴 농도를 측정하기 위해 효소면역분석법을 사용하여 농도를 확인하였다.
- [77] 도 6에서 나타난 바와 같이, 아디포넥틴 과발현 세포주를 배양한 배양액에서는 대조군에 비하여 상당량의 아디포넥틴이 분비됨을 확인하였고, 분비된 아디포넥틴은 24시간째 보다 48시간째 더 많이 분비되었다.
- [78] 도 7에서는 아디포넥틴 과발현 세포 용해물과 원심분리 과정을 거치지 않은 아디포넥틴 과발현 세포배양액 원액을 양성대조군으로 사용하였다.
- [79] 도 7에 나타난 바와 같이, 세포배양액을 원심성 필터 장치에 넣은 후 2분 또는 5분간 원심분리하고 각각의 투석유물과 여과액체를 비교하였을 때 같은 양의 배양액을 원심분리를 오래 할수록 투석유물에서 더 많은 아디포넥틴이 농축되어 얻을 수 있음을 확인하였고, 여과액체에 아디포넥틴이 존재하지 않음을 Western blot을 통해 확인하였다.
- [80] 도 8에서는 아디포넥틴 과발현 세포주 배양액을 얻은 후 원심성의 필터 장치를 이용하여 아디포넥틴 발현량을 효소면역분석법으로 확인하였다.
- [81] 아디포넥틴 발현량은 하기의 표 1에 나타났다.

[82] [표1]

|       | 10ml<br>투석유물<br>1/100로<br>희석 | 10ml<br>투석유물<br>1/10로<br>희석 | 10ml<br>투석유물<br>원액 | 50ml<br>투석유물<br>1/1000로<br>희석 | 50ml<br>투석유물<br>1/100로<br>희석 | 50ml<br>투석유물<br>1/10로<br>희석 | 50ml<br>투석유물 |
|-------|------------------------------|-----------------------------|--------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------|--------------|
| ng/ml | 24.12281                     | 208.6842                    | 422.8947           | 22.89474                      | 178.8596                     | 439.386                     | 491.1404     |

[83] 위 실험을 통해 아디포넥틴을 과발현시키는 세포주가 수득된 것을 확인하였다.

**서열목록 Free Text**

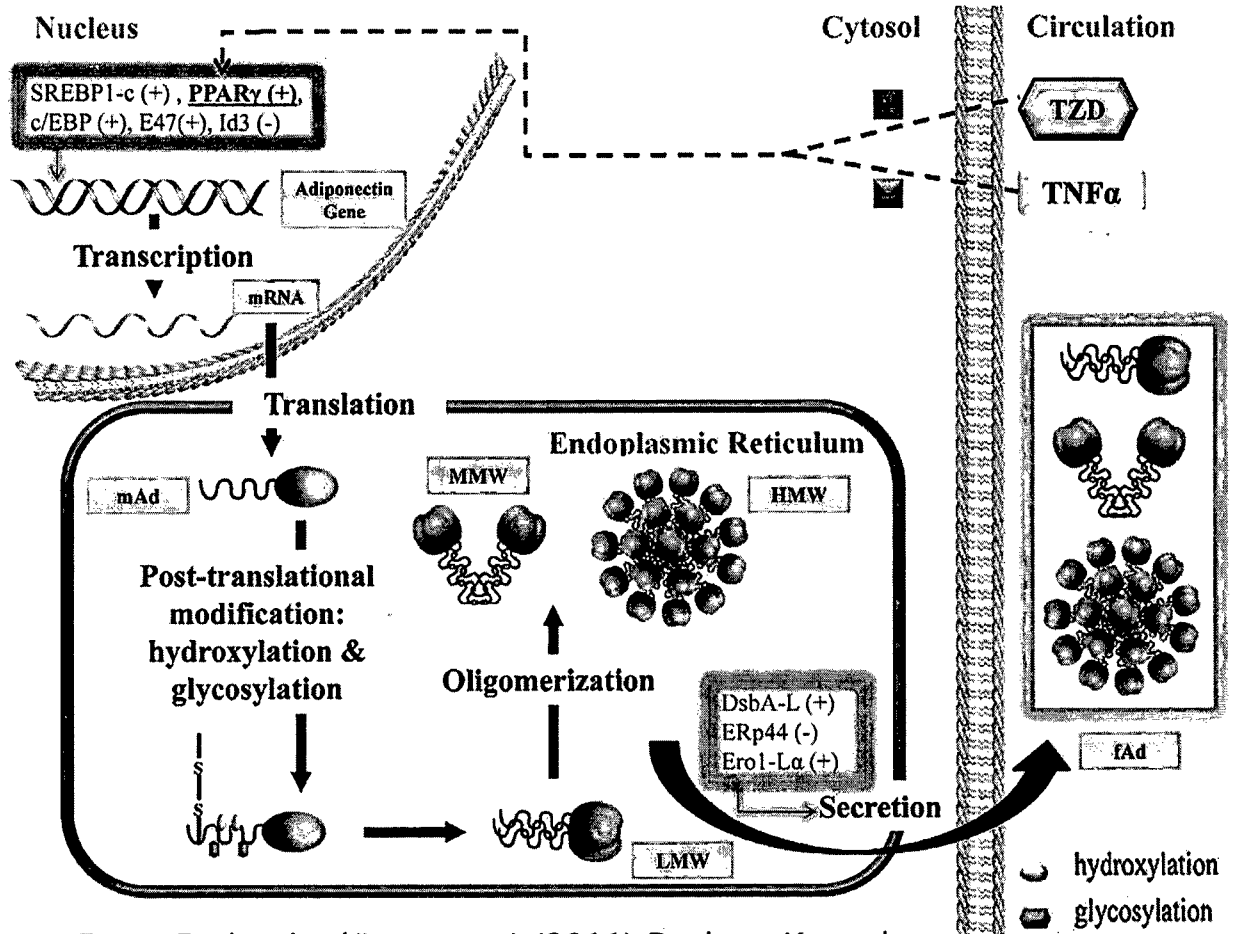
- [84] <110> Chonnam National Academic Foundation
- [85] <120> CELL LINES OF EXPRESSING ADIPONECTIN
- [86] <130> 16P05052
- [87] <160> 2
- [88] <170> KoPatentIn 3.0
- [89] <210> 1
- [90] <211> 735
- [91] <212> DNA
- [92] <213> Artificial Sequence
- [93] <220>
- [94] <223> ADIPONECTIN cDNA
- [95] <400> 1
- [96] atgctgttgc tgggagctgt tctactgcta ttactctgc ccggtcatga ccaggaaacc 60
- [97] acgactcaag ggcccgaggt cctgcttccc ctgcccaagg gggcctgcac aggttggatg 120
- [98] gcgggcatcc cagggcaccc gggccataat ggggccccag gccgtgatgg cagagatggc 180
- [99] acccctggtg agaaggggtga gaaaggagat ccaggtctta ttggtcctaa gggagacatc 240
- [100] ggtgaaaccg gactaccggg ggctgaaggt ccccgaggct ttccgggaat ccaaggcagg 300
- [101] aaaggagaac ctggagaagg tgcctatgta taccgctcag cattcagtgt gggattggag 360
- [102] acttacgtta ctatcccaa catgccatt cgtttacca agatcttcta caatcagcaa 420
- [103] aaccactatg atggctccac tggtaaatc cactgcaaca ttctgggct gtactacttt 480
- [104] gcctaccaca tcacagtcta tatgaaggat gtgaagggtca gcctcttcaa gaaggacaag 540
- [105] gctatgctct tcacctatga tcagtaccag gaaaataatg tggaccaggc ctccggtct 600
- [106] gtgctctgc atctggaggt gggcgaccaa gtctggctcc aggtgtatgg ggaaggagag 660
- [107] cgtaatggac tctatgctga taatgacaat gactccacct tcacaggctt tcttctctac 720
- [108] catgacacca actga 735
- [109] <210> 2
- [110] <211> 1190
- [111] <212> DNA
- [112] <213> Artificial Sequence

[113] <220>  
[114] <223> pcDNA3.1(+) ADIPOQ  
[115] <400> 2  
[116] ccaggtgtga ggctattagc agagctctct ggctactaga gaaccactg cttactggct 60  
[117] tatcgaaatt aatacgactc actataggga gacccaagct tggtagcgag ctcggtacca 120  
[118] tgctgttgcg gggagctgtt ctactgctat tagctctgcc cggatcatgac caggaaacca 180  
[119] cgactcaagg gcccggagtc ctgcttcccc tgcccaaggg ggccctgcaca ggttggatgg 240  
[120] cgggcatccc agggcatccg ggccataatg gggccccagg ccgtgatggc agagatggca 300  
[121] cccctgggtga gaagggtgag aaaggagatc caggtcttat tggctctaag ggagacatcg 360  
[122] gtgaaaccgg agtaccgggg gctgaaggtc cccgaggctt tccgggaatc caaggcagga 420  
[123] aaggagaacc tggagaaggt gcctatgtat accgctcagc attcagtgtg ggattggaga 480  
[124] cttacgttac tatcccaac atgcccattc gctttacca gatctctac aatcagcaaa 540  
[125] accactatga tggctccact ggtaaattcc actgcaacat tcttgggtg tactactttg 600  
[126] cctaccacat cacagtctat atgaaggatg tgaaggtag cctcttcaag aaggacaagg 660  
[127] ctatgctctt cacctatgat cagtaccagg aaaataatgt ggaccaggcc tccggctctg 720  
[128] tgctcctgca tctggagggtg ggcgaccaag tctggctcca ggtgtatggg gaaggagagc 780  
[129] gtaatggact ctatgctgat aatgacaatg actccacctt cacaggcttt cttctctacc 840  
[130] atgacaccaa ctgactcgag catgcatcta gagggcccta ttctatagtg tcacctaaat 900  
[131] gctagagctc gctgatcagc ctgactgtg cttctagtt gccagccatc tgttgtttgc 960  
[132] cctcccccg tgccttctt gacctggaa ggtgccactc cactgtctt ttctaataa 1020  
[133] aatgaggaaa ttgcatcgca ttgtctgagt aggtgtcatt ctatctgggg ggggggggtg 1080  
[134] ggggcaggaa cccaaggggg aggggaattg ggaaaaaaaa attcgggggg ggggggggga 1140  
[135] aggggggggg gttttcttt ttccccctt tccccccc accaccaac 1190

## 청구범위

- [청구항 1] 다음의 단계를 포함하는 아디포넥틴 생산 방법:  
(a) 아디포넥틴 cDNA를 pcDNA3.1 벡터에 삽입하여 아디포넥틴 발현 벡터를 제조하는 단계;  
(b) 상기 아디포넥틴 발현 벡터를 진핵세포에 형질주입 (transfection)시켜 아디포넥틴 발현 세포주를 수득하는 단계;  
(c) 상기 아디포넥틴 발현 세포주에서 아디포넥틴을 발현시키는 단계.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 아디포넥틴은 올리고머인, 아디포넥틴 생산 방법.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 올리고머는 아디포넥틴 단량체 2 내지 12가 중합된 것인, 아디포넥틴 생산 방법.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서, 상기 진핵세포는 HEK293 (human embryonic kidney 293)세포인, 아디포넥틴 생산 방법.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서, 상기 아디포넥틴 cDNA는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 것인, 아디포넥틴 생산 방법.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서, 상기 아디포넥틴 발현 벡터는 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 것인, 아디포넥틴 생산 방법.
- [청구항 7] 서열번호 2의 아디포넥틴 발현 벡터로 형질감염된 HEK293 세포주.

[도 1]

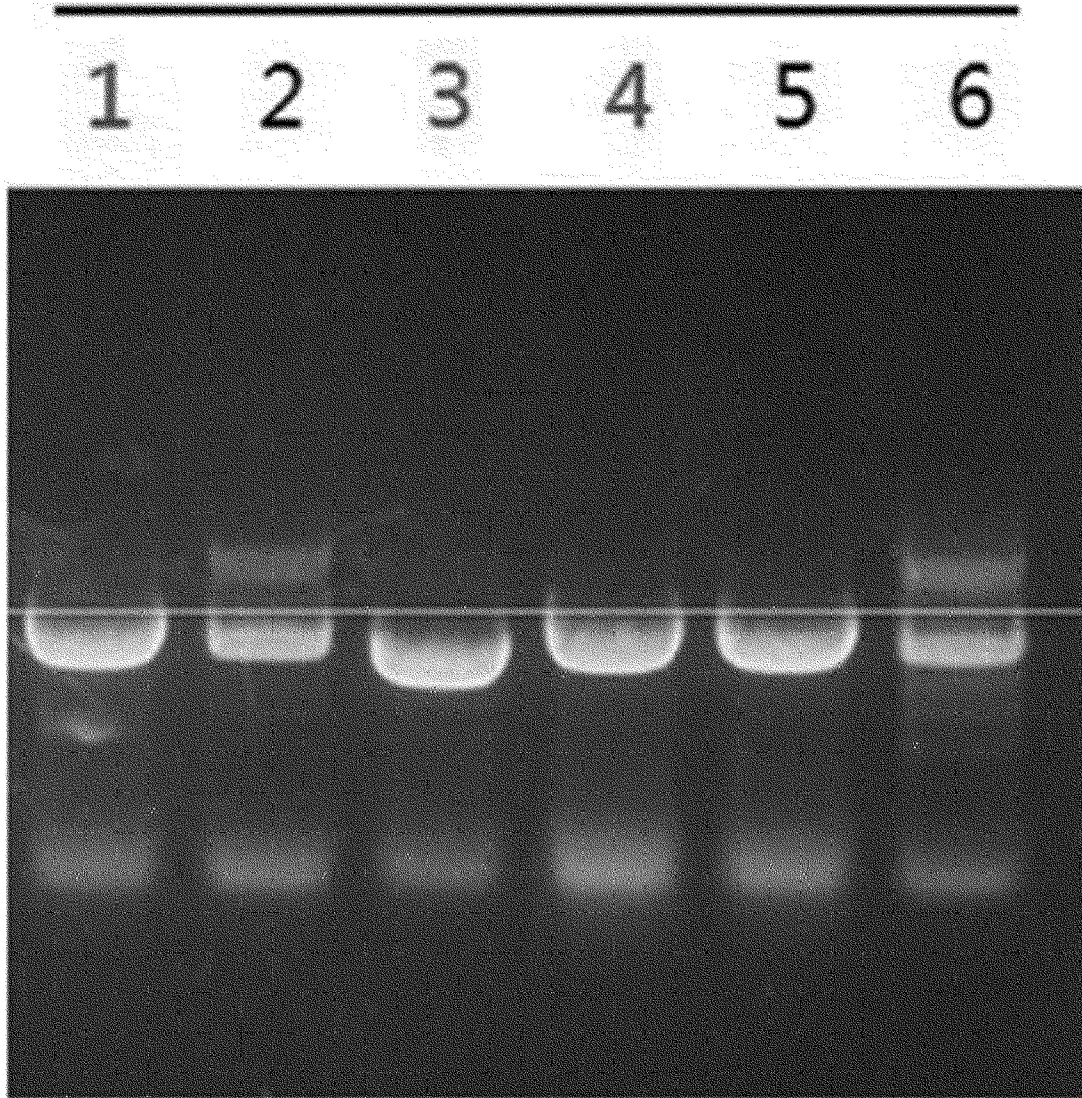


Front Endocrinol(Lausanne) (2011) Dadson K et al.

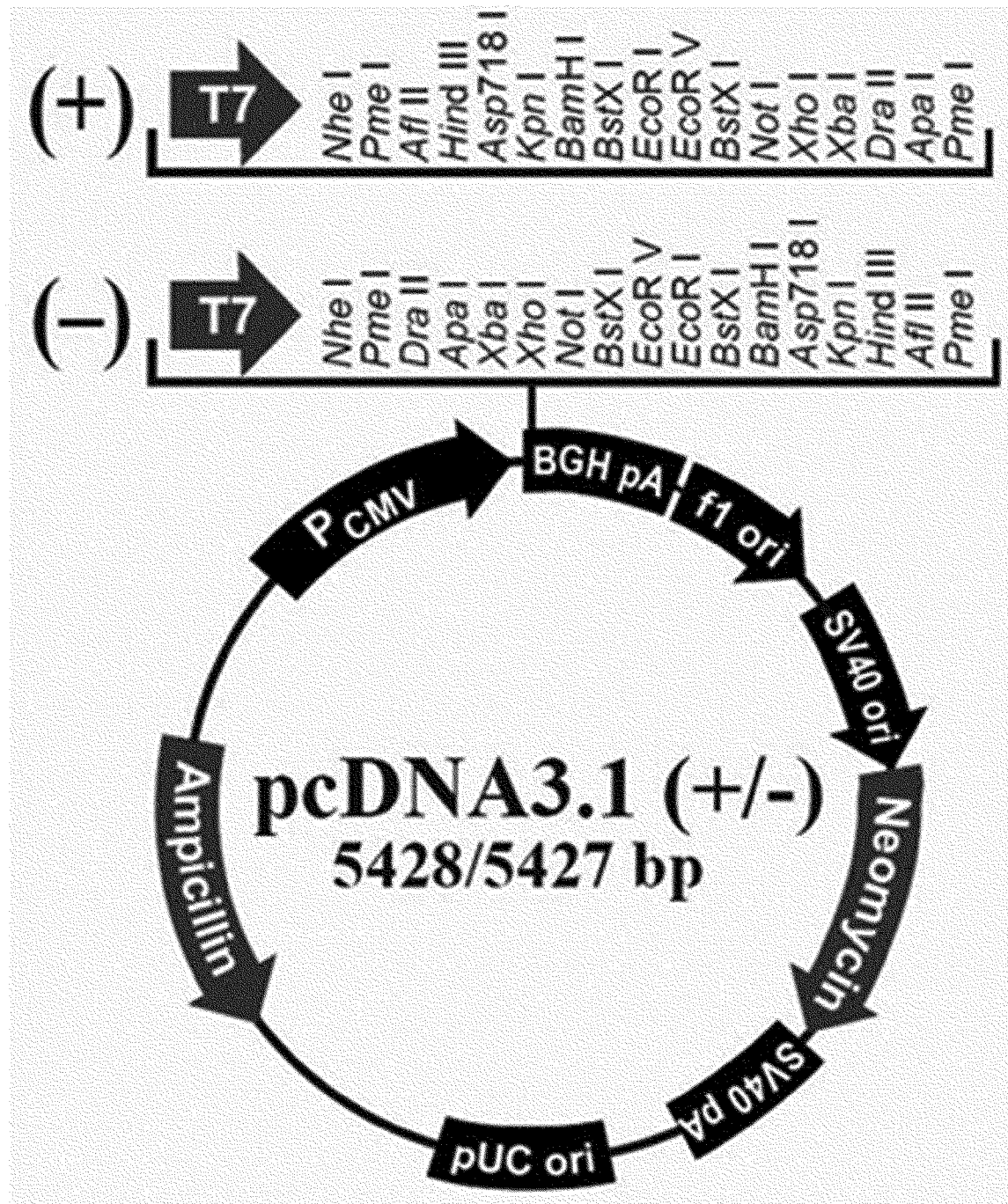
[도2]

pGEM-T easy

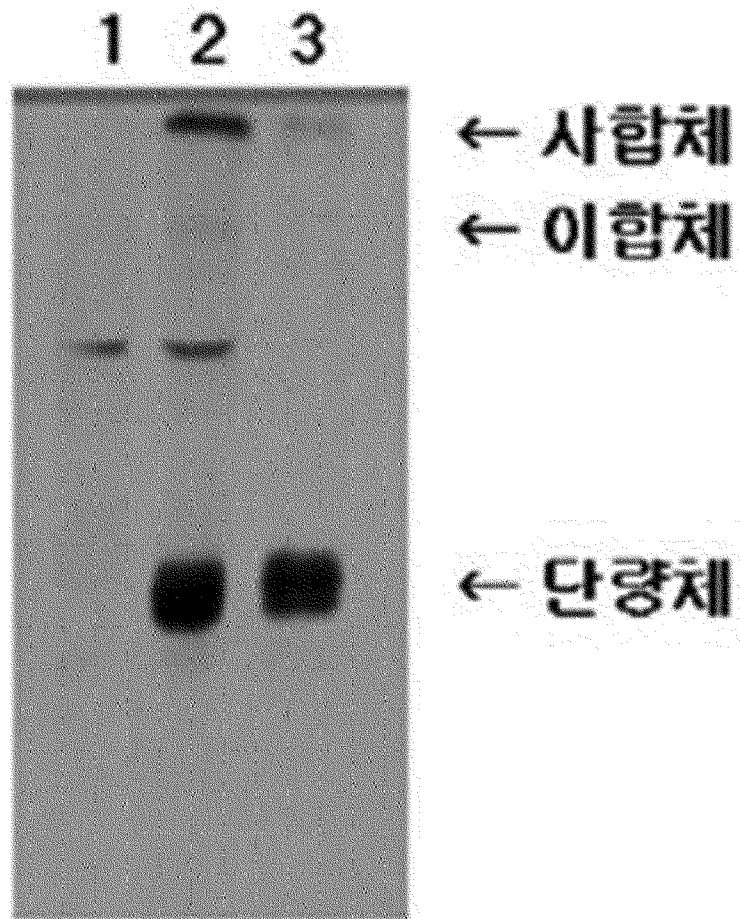
Adiponectin



[도3]



[도4]

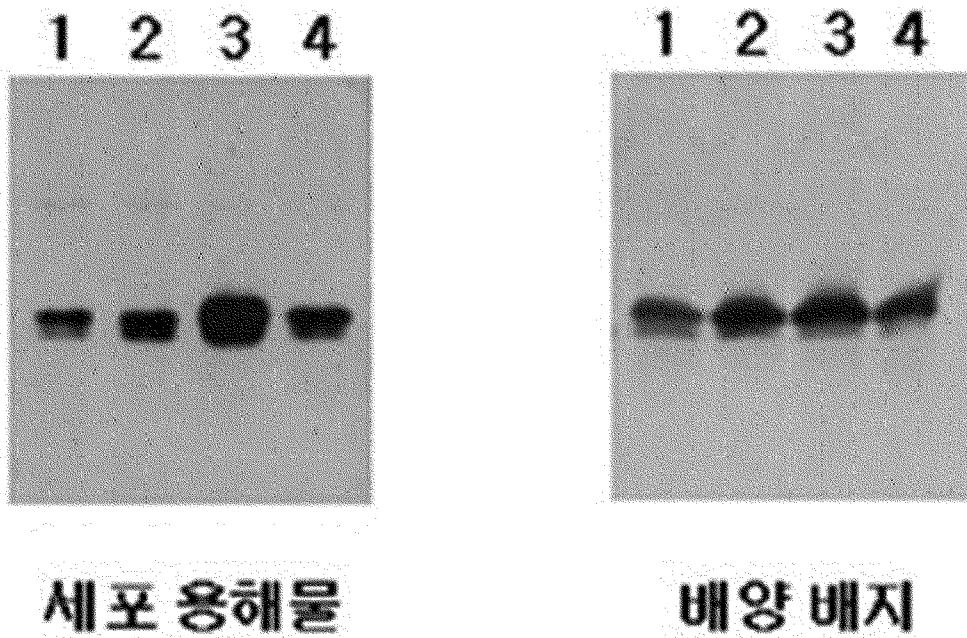


1: HEK293

2: 아디포넥틴 과발현 세포주

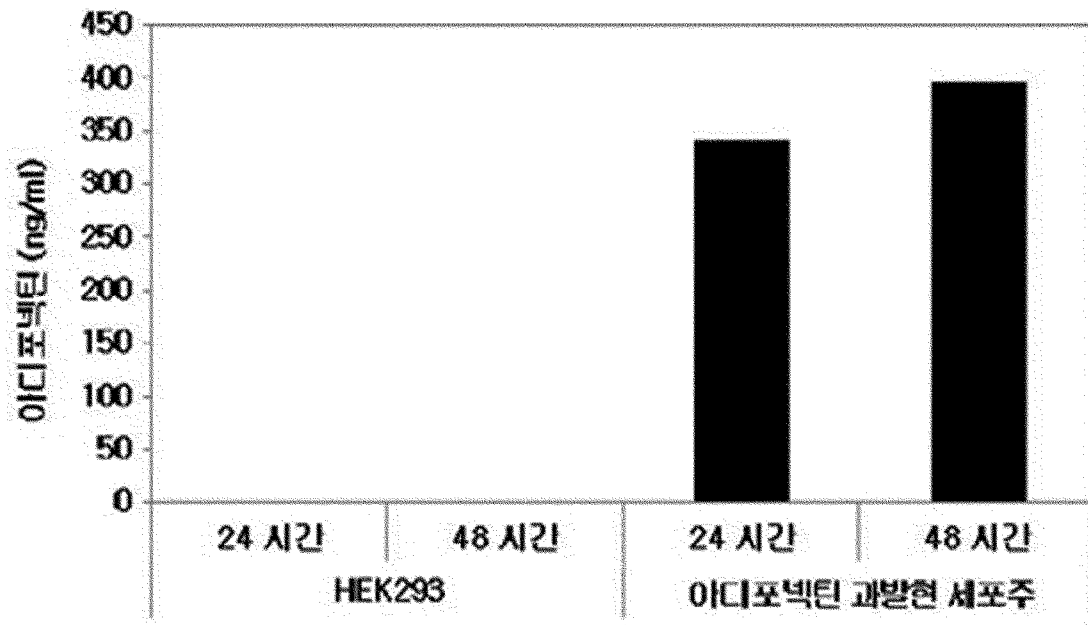
3: 아디포넥틴 과발현 아데노바이러스

[도5]

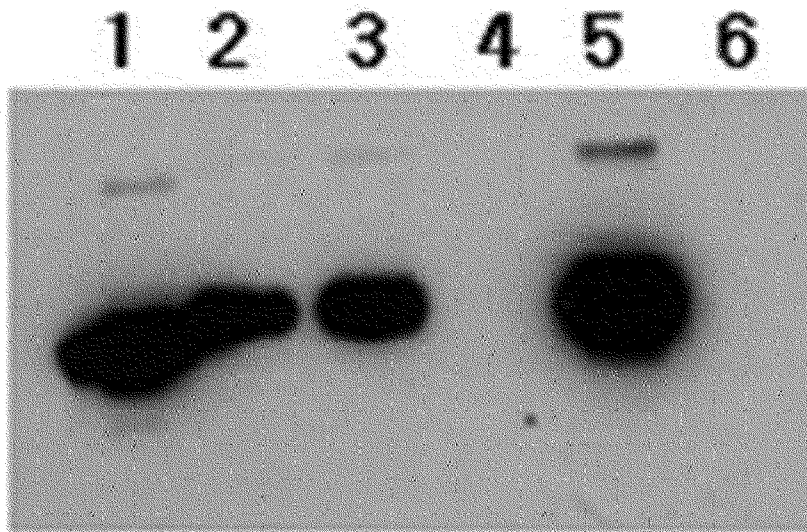


- 1: 아디포넥틴 과발현 세포주 1
- 2: 아디포넥틴 과발현 세포주 2
- 3: 아디포넥틴 과발현 세포주 3
- 4: 아디포넥틴 과발현 세포주 4

[도6]



[도7]



1: 아디포넥틴 과발현 세포 용해물

2: 아디포넥틴 과발현 세포 배양액

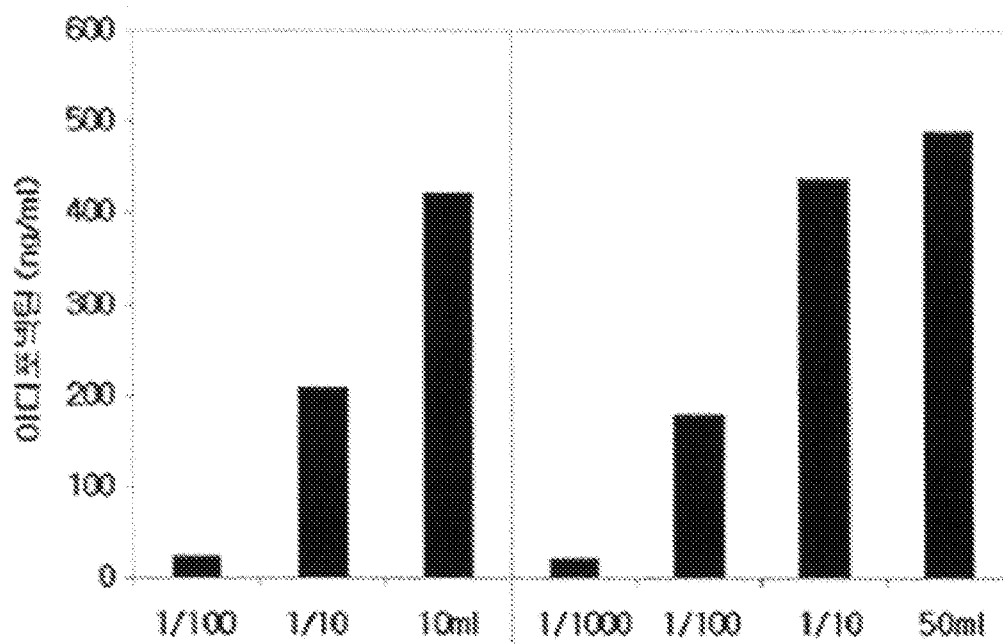
3: 2분 원심분리 후 투석유물

4: 2분 원심분리 후 여과 액체

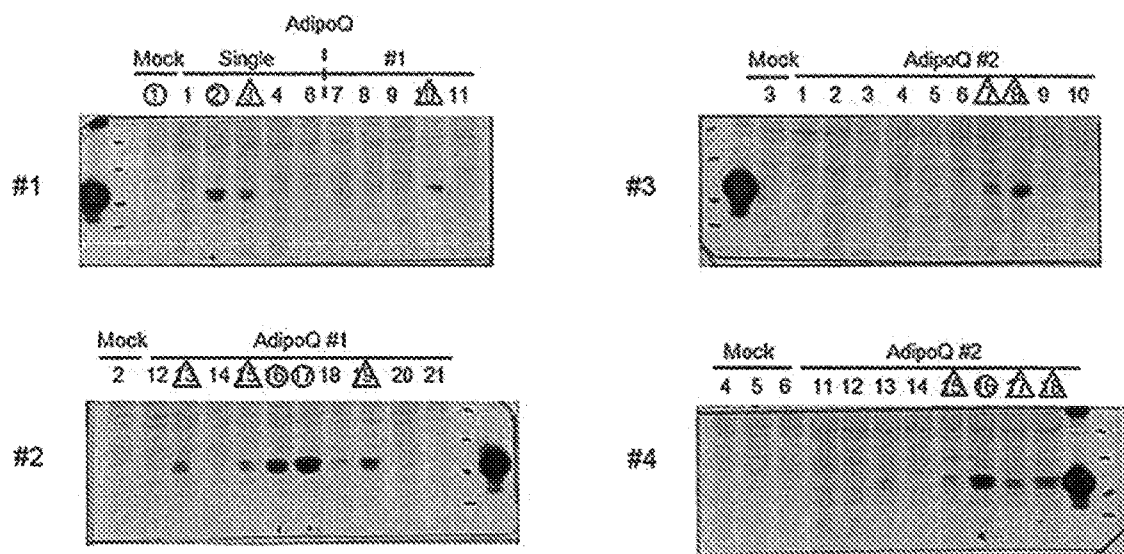
5: 5분 원심분리 후 투석유물

6: 5분 원심분리 후 여과액체

[도8]



[도9]



ADIPOQ/HEK293 : Stable cell stain → Adiponectin expression

Select : Mock1, S-2, 1-16, 1-17, 2-16

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/010584

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*C12N 15/85(2006.01)i, C07K 14/575(2006.01)i, C12P 21/00(2006.01)i*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/85; C12N 1/13; C07K 14/00; C07K 17/00; A61K 38/18; C07K 14/575; C12P 21/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) &amp; Keywords: adiponectin, pcDNA3.1, eukaryotic cell, transfection, HEK293

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                     | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | WO 03-055916 A2 (MAXYGEN APS et al.) 10 July 2003<br>See claims 65-66; example 1; page 4, lines 15-20; sequence no. 9 on page 3 of sequence list.                                                                                                                                                      | 1-7                   |
| A         | WO 2015-105938 A1 (WORLD BIOTECHNOLOGY LLC.) 16 July 2015<br>See claims 1, 9-10 and 15; paragraphs [0008] and [0074].                                                                                                                                                                                  | 1-7                   |
| A         | WO 2005-092040 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA et al.)<br>06 October 2005<br>See claim 9.                                                                                                                                                                                              | 1-7                   |
| A         | US 7365170 B2 (COOPER, Garth et al.) 29 April 2008<br>See claim 1.                                                                                                                                                                                                                                     | 1-7                   |
| X         | JUNG, Yu-Ra et al., "Regulation of Lipid Production by Adiponectin in Human Sebocytes",<br>KSID Research Camp, 31 October 2015, page 1<br>See page 1, paragraph 1.<br><br>(The above document is a document declaring "non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty" by the applicant) | 1                     |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 MARCH 2017 (31.03.2017)

Date of mailing of the international search report

31 MARCH 2017 (31.03.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office  
Government Complex-Daejeon, 189 Sconsa-ro, Daejeon 302-701,  
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2016/010584**

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|
| WO 03-055916 A2                           | 10/07/2003          | AU 2002-358467 A1       | 15/07/2003          |
|                                           |                     | CA 2468619 A1           | 10/07/2003          |
|                                           |                     | EP 1458758 A2           | 22/09/2004          |
|                                           |                     | JP 2005-526492 A        | 08/09/2005          |
|                                           |                     | US 2006-0052292 A1      | 09/03/2006          |
|                                           |                     | WO 03-055916 A3         | 31/12/2003          |
| WO 2015-105938 A1                         | 16/07/2015          | US 2015-0191511 A1      | 09/07/2015          |
| WO 2005-092040 A2                         | 06/10/2005          | EP 1730310 A2           | 13/12/2006          |
|                                           |                     | US 2005-0261362 A1      | 24/11/2005          |
|                                           |                     | WO 2005-092040 A3       | 18/05/2006          |
| US 7365170 B2                             | 29/04/2008          | AU 2003-285686 A1       | 14/07/2004          |
|                                           |                     | AU 2009-217457 A1       | 15/10/2009          |
|                                           |                     | CA 2473781 A1           | 31/07/2003          |
|                                           |                     | CN 1886423 A            | 27/12/2006          |
|                                           |                     | EP 1474445 A1           | 10/11/2004          |
|                                           |                     | EP 1474445 A4           | 21/02/2007          |
|                                           |                     | JP 2005-535561 A        | 24/11/2005          |
|                                           |                     | NZ 534699 A             | 24/12/2008          |
|                                           |                     | US 2004-0023854 A1      | 05/02/2004          |
|                                           |                     | US 2010-0016216 A1      | 21/01/2010          |
|                                           |                     | US 8044182 B2           | 25/10/2011          |
|                                           |                     | WO 03-062275 A1         | 31/07/2003          |
|                                           |                     | WO 2004-056861 A2       | 08/07/2004          |
|                                           |                     | WO 2004-056861 A3       | 30/09/2004          |

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**

C12N 15/85(2006.01)i, C07K 14/575(2006.01)i, C12P 21/00(2006.01)i

**B. 조사된 분야**

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/85; C12N 1/13; C07K 14/00; C07K 17/00; A61K 38/18; C07K 14/575; C12P 21/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 아디포넥틴, pcDNA3.1, 진핵세포, 형질주입, HEK293

**C. 관련 문헌**

| 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                                                                                                                                                                     | 관련 청구항 |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| X     | WO 03-055916 A2 (MAXYGEN APS 등) 2003.07.10<br>청구항 65-66; 실시예 1; 페이지 4, 라인 15-20;<br>Sequence list의 페이지 3, 서열번호 9 참조.                                                                                           | 1-7    |
| A     | WO 2015-105938 A1 (WORLD BIOTECHNOLOGY LLC) 2015.07.16<br>청구항 1, 9-10 및 15; 단락 [0008] 및 [0074] 참조.                                                                                                             | 1-7    |
| A     | WO 2005-092040 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA 등)<br>2005.10.06<br>청구항 9 참조.                                                                                                                   | 1-7    |
| A     | US 7365170 B2 (COOPER, GARTH 등) 2008.04.29<br>청구항 1 참조.                                                                                                                                                        | 1-7    |
| X     | JUNG, YU RA 등, 'Regulation of lipid production by adiponectin<br>in human sebocytes', KSID Research Camp, 2015.10.31, 페이지 1<br>페이지 1, 단락 1 참조.<br>(본 문헌은 출원인에 의해 `신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의<br>예외'가 선언된 문헌임) | 1      |

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

\* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 03월 31일 (31.03.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 03월 31일 (31.03.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



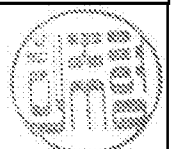
대한민국 특허청  
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,  
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



| 국제조사보고서에서<br>인용된 특허문헌 | 공개일        | 대응특허문헌                                                                                                                                                                                                                                                                 | 공개일                                                                                                                                                                                              |
|-----------------------|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| WO 03-055916 A2       | 2003/07/10 | AU 2002-358467 A1<br>CA 2468619 A1<br>EP 1458758 A2<br>JP 2005-526492 A<br>US 2006-0052292 A1<br>WO 03-055916 A3                                                                                                                                                       | 2003/07/15<br>2003/07/10<br>2004/09/22<br>2005/09/08<br>2006/03/09<br>2003/12/31                                                                                                                 |
| WO 2015-105938 A1     | 2015/07/16 | US 2015-0191511 A1                                                                                                                                                                                                                                                     | 2015/07/09                                                                                                                                                                                       |
| WO 2005-092040 A2     | 2005/10/06 | EP 1730310 A2<br>US 2005-0261362 A1<br>WO 2005-092040 A3                                                                                                                                                                                                               | 2006/12/13<br>2005/11/24<br>2006/05/18                                                                                                                                                           |
| US 7365170 B2         | 2008/04/29 | AU 2003-285686 A1<br>AU 2009-217457 A1<br>CA 2473781 A1<br>CN 1886423 A<br>EP 1474445 A1<br>EP 1474445 A4<br>JP 2005-535561 A<br>NZ 534699 A<br>US 2004-0023854 A1<br>US 2010-0016216 A1<br>US 8044182 B2<br>WO 03-062275 A1<br>WO 2004-056861 A2<br>WO 2004-056861 A3 | 2004/07/14<br>2009/10/15<br>2003/07/31<br>2006/12/27<br>2004/11/10<br>2007/02/21<br>2005/11/24<br>2008/12/24<br>2004/02/05<br>2010/01/21<br>2011/10/25<br>2003/07/31<br>2004/07/08<br>2004/09/30 |