(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0122865
(43) 공개일자 2020년10월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/40 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01) *A61P 3/04* (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01) *C12N 5/077* (2010.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/40 (2013.01)
A61P 3/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2019-0046220
(22) 출원일자 2019년04월19일
심사청구일자 2019년04월19일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(72) 발명자
이창환
서울특별시 서초구 서초대로64길 83, 101동 702호
김승후
서울특별시 송파구 오금로31길 28, 103동 1312호 (방이동, 코오롱아파트)
한경호
경기도 파주시 심학산로 385, 1001동 1803호 (목동동, 산내마을10단지 운정센트럴 푸르지오)
(74) 대리인
특허법인태백

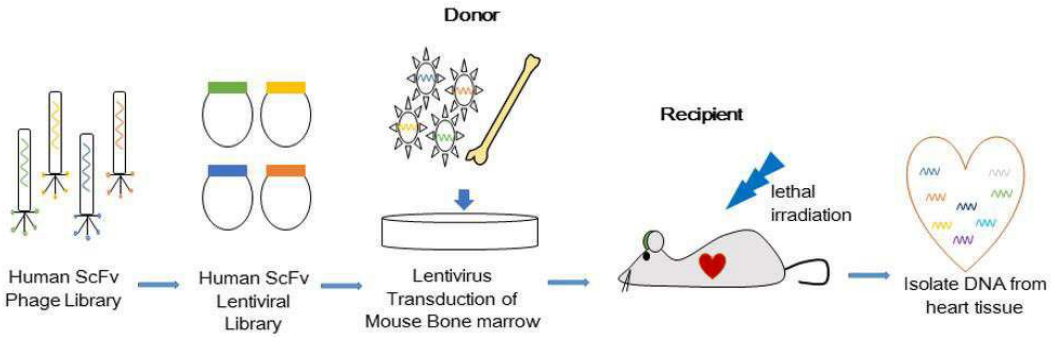
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **갈색지방세포 분화 유도 항체 및 이를 유효성분으로 포함하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 갈색지방세포 분화 유도 항체 및 이를 유효성분으로 포함하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 한 것으로, 본 발명에 따르면, IYD(iodotyrosine deiodinase) 효능제인 신규 H3 항체 및 IYD 기질은 골수 줄기세포에서 갈색지방세포로의 분화를 유도하는 바, 열을 발생시켜 에너지를 소비함으로써 비만 치료 효과를 나타낼 수 있다. 또한, 부작용이 적고 체내 반감기가 긴 항체의 사용은 종래 치료제들의 단점을 보완하고 치료 효과를 향상시킬 수 있다. 이에, 상기와 같은 효과를 가지는 IYD 효능제는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물 등으로 유용하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 3/04 (2018.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 5/0653 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2317/75 (2013.01)
C12N 2501/71 (2013.01)
C12N 2506/1353 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2018R1A5A2020732
부처명	과학기술통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	선도연구센터(ACE)육성사업기초의약학분야(MRC)
연구과제명	줄기세포 면역제어 연구센터
기 여 율	1/1
과제수행기관명	울산대학교 산학협력단
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 상보성 결정 영역(CDR)1, 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 CDR2 및 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시되는 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역(V_H); 및

서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 CDR1, 서열번호 5의 아미노산 서열로 표시되는 CDR2 및 서열번호 6의 아미노산 서열로 표시되는 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역(V_J);

을 포함하는 단일클론 인간항체 H3 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 7의 아미노산 서열로 표시되고, 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 8의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 단일클론 인간항체 H3 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 단일클론 인간항체 H3 또는 이의 항원 결합 단편은 요오드티로신 탈요소효소(iodotyrosine deiodinase; IYD)에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 단일클론 인간항체 H3 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 4

제 1항의 단일클론 인간항체 H3 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 cDNA.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 cDNA는 중쇄 가변영역을 코딩하는 서열번호 9의 염기서열 및 경쇄 가변영역을 코딩하는 서열번호 10의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 cDNA.

청구항 6

제 5항에 따른 cDNA를 포함하는 재조합 바이러스 벡터.

청구항 7

제 6항에 따른 재조합 바이러스 벡터로 형질전환된 세포.

청구항 8

제 7항에 따른 형질전환된 세포를 배지 내에서 배양하는 단계; 및 상기 배양된 세포 또는 배양 배지로부터 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 회수 및 정제하는 단계;를 포함하는 인간항체 H3 또는 이의 항원 결합 단편의 제조 방법.

청구항 9

요오드티로신 탈요소효소(IYD) 효능제(agonist)를 유효성분으로 포함하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 IYD 효능제는 제 1항 내지 제 3항에 따른 단일클론 인간항체 H3, 이의 항원 결합 단편 및 IYD 기질로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 11

제 9항에 있어서, 상기 IYD 기질은 MIT(3-monoiodo-L-tyrosine) 및 DIT(3, 5-diodo-L-tyrosine)로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 12

제 9항에 있어서, 상기 대사성 질환은 비만, 당뇨병, 비알코올성 지방간, 고혈압, 동맥경화, 내당장애, 과인슐린혈증, 과혈당증 및 고지혈증으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 13

제 9항에 있어서, 상기 IYD 효능제는 골수 줄기세포를 갈색지방세포로 분화 유도하는 것을 특징으로 하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 14

세포주에 실험물질을 처리하는 단계;

상기 실험물질이 처리된 세포주에서 IYD의 발현 또는 활성화 정도를 측정하는 단계; 및

대조구 시료와 비교하여 상기 IYD의 발현 또는 활성화 정도가 증가된 시험물질을 선별하는 단계;를 포함하는 대사성 질환 치료제 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 갈색지방세포 분화 유도 항체 및 이를 유효성분으로 포함하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 대사성 질환은 운동부족, 과잉영양 등 생활습관이 원인이 되는 병으로 비만, 당뇨병, 고혈압, 고지혈증, 지방간, 심장병 등을 유발하는 것으로 알려져 있다. 그중 비만은 비정상적으로 과다하게 지방이 체내에 축적되어 개인의 건강에 위협을 주는 일종의 질병으로 정의될 수 있다. 비만은 과식, 운동부족이 주된 원인이 되는 단순성 비만과 내분비계 질환이 원인이 되는 증후성 비만으로 구별된다. 단순성 비만의 원인으로는 과식, 폭식, 간식, 야식, 불규칙적인 식사 등 잘못된 식생활 습관과 운동 부족, 약물의 부작용 등이 있다.

[0003] 경제 성장과 생활 방식의 변화에 따라 식습관에도 최근 많은 변화가 있어 왔다. 특히, 바쁜 현대인들은 패스트푸드 등의 고열량 식이와 적은 운동량으로 인하여 과체중 및 비만이 증가하고 있는 실정이다. 세계보건기구(WHO)에 따르면, 전 세계적으로 10억 명 이상의 성인이 과체중이고, 그 중 적어도 300만 명 이상이 임상적으로 비만이며, 특히, 유럽에서는 매년 25만 명, 전 세계에서 250만 명 이상이 과체중과 관련되어 사망한 것으로 보고된 바 있다.

[0004] 과체중 및 비만은 혈압과 콜레스테롤 수치를 증가시켜 심장 질환, 당뇨병, 관절염, 지방간, 고지혈증, 암 등 다양한 만성 합병증 질환을 유발시키거나 악화시킬 수 있다. 또한, 과체중 및 비만은 성인뿐만 아니라, 어린이나 청소년에서도 동맥경화, 고혈압, 고지혈증 또는 심장질환 등의 발병률을 증가시키는 주요한 요인으로 알려져 있다. 따라서, 비만을 하나의 질환으로 인식하고 적극적으로 치료하고자 하는 필요성이 증대되고 있다.

[0005] 현재까지 비만 치료제에 사용되는 물질은 위장에서 지방 흡수를 감소시키거나 식욕을 억제시키는 약제들이다. 그러나, 소장 및 췌장의 리파아제를 억제하여 지방 흡수를 방지하는 작용을 하는 제니칼(Roche) 및 알리(GlaxoSmithKline)는 위장 관련 부작용 및 지용성 비타민 흡수 감소 등의 부작용을 유발하는 것으로 보고된 바 있다. 또한, 식욕 억제를 통하여 비만 억제 효과를 나타내는 로카세린(5-HT2c receptor agonist) 및 큐넥사(Phentermine/Topiramate)는 주의력 결핍이나 기억력 저하 등 부작용을 일으킬 수 있으며, 항우울제나 편두통제와 함께 복용 시, 심장 판막질환 등 심각한 부작용을 유발할 가능성이 있는 것으로 보고된 바 있고, 시부트라민

(serotin noradrenalin reuptake inhibitor)은 2010년 심혈관 질환 및 뇌경색 발생 증가로 퇴출된 바 있다. 이렇듯 현재 사용되고 있는 비만 치료제는 상기와 같은 심각한 문제점을 가지고 있어 새로운 비만 치료제의 개발이 절실한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-0726281호 (2007.06.01. 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 갈색지방세포로 분화를 유도하는 신규 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하는 데에 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 신규 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조방법을 제공하는 데에 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 대사성 질환 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 상보성 결정 영역(CDR)1, 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 CDR2 및 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시되는 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역(V_H); 및 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 CDR1, 서열번호 5의 아미노산 서열로 표시되는 CDR2 및 서열번호 6의 아미노산 서열로 표시되는 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역(V_J);을 포함하는 단일클론 인간항체 H3 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 단일클론 인간항체 H3 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 cDNA를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 cDNA를 포함하는 재조합 바이러스 벡터를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 재조합 바이러스 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 형질전환된 세포를 배지 내에서 배양하는 단계; 및 상기 배양된 세포 또는 배양 배지로부터 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 회수 및 정제하는 단계;를 포함하는 인간항체 H3 또는 이의 항원 결합 단편의 제조방법을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 요오드티로신 탈요소효소(IYD) 효능제(agonist)를 유효성분으로 포함하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 세포주에 실험물질을 처리하는 단계; 상기 실험물질이 처리된 세포주에서 IYD의 발현 또는 활성화 정도를 측정하는 단계; 및 대조구 시료와 비교하여 상기 IYD의 발현 또는 활성화 정도가 증가된 시험물질을 선별하는 단계;를 포함하는 대사성 질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따르면, IYD(iodotyrosine deiodinase) 효능제(agonist)인 신규 H3 항체 및 IYD 기질은 골수 줄기세포에서 갈색지방세포로의 분화를 유도하는 바, 열을 발생시켜 에너지를 소비함으로써 비만 치료 효과를 나타낼 수 있다. 또한, 부작용이 적고 체내 반감기가 긴 항체의 사용은 종래 치료제들의 단점을 보완하고 치료 효과를 향상시킬 수 있다. 이에, 상기와 같은 효과를 가지는 IYD 효능제는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물 등으로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 마우스 조혈모세포(Hematopoietic stem cell; HSC)의 분화와 이동을 유도하는 항체의 in vivo 선별방법

을 나타낸 것으로, 인간 ScFv 파지 라이브러리(10^8명의 구성원)의 유전자를 렌티바이러스 벡터에 클로닝하여 항체 분자가 원형질 막에 부착되고 세포 표면에 표시되는 렌티바이러스 membrane tethered 라이브러리를 제조하였다. in vitro에서 총 마우스 골수세포를 항체 라이브러리로 감염시키고 치사량의 방사선으로 조사된 C57BL/6J 마우스에 이식하였다. 7일 후 마우스 심장을 회수하고 PCR로 분석하여 심장으로 이동한 세포 내 모든 항체 유전자를 확인하였다.

도 2는 세포의 이동을 조절하는 효능제 항체에 관한 것으로, (A)는 골수에서 심장으로의 세포 이동을 나타낸 것이고, (B)는 회수한 심장에 대한 유세포 분석 결과를 나타낸 것이며, (C)는 렌티바이러스 H3 항체 또는 대조군으로 형질도입된 루시퍼라제 발현 형질전환 마우스로부터 골수를 이식 받은 마우스의 대표적인 이미지를 나타낸 것이다.

도 3은 H3 항체에 의해 인식되는 새로운 항원 동정에 관한 것으로, (A)는 마우스 골수의 세포 용해물을 H3 항체와 반응시킨 후 면역침강된 용출물을 SDS/PAGE로 분리하고 질량 분석을 수행하여 잠재적 표적 항원 후보를 확인한 것이고, (B)는 마우스 골수 용해물에서 H3 항체와 인간 IYD 단백질의 웨스턴 블롯 결과를 나타낸 것이며, (C)는 마우스 골수 및 인간 $CD34^+$ 세포에서 분리된 총 RNA를 이용하여 qRT-PCR로 IYD 발현을 확인한 것이며, (D)는 DAPI, H3 항체, IYD 항체 또는 CD34에 대한 항체를 사용하여 인간 $CD34^+$ 세포에서 IYD의 표면 발현을 공초점 현미경으로 확인한 것이다.

도 4는 항체에 의한 조혈모세포에서 갈색지방세포로의 분화 유도에 관한 것으로, (A)는 H3 항체에 의한 조혈모세포 분화를 나타낸 것이고, (B)는 이식된 GFP 마우스에 H3 항체(50 μg/마우스 i.p. 2회/주, 총 3주)를 주사한 후, 심장을 회수하여 면역형광 조직화학을 위해 동결 OCT 블록을 제작하고, 심장 절편(10 μm)을 DAPI 및 anti-UCP1 항체로 염색 후 공초점 현미경으로 확인한 것이며, (C)는 RNA 시퀀싱 분석에 의한 갈색 및 일반지방세포 유전자 프로파일링을 나타낸 것이며, (D)는 갈색 및 일반지방세포의 주요 마커의 발현을 확인한 것이다.

도 5는 MIT 및 DIT에 의한 줄기세포에서 갈색지방세포로의 분화에 관한 것으로, (A)는 IYD 기질(MIT + DIT)에 의한 조혈모세포의 분화를 나타낸 것이고, (B)는 H3 항체 또는 IYD 기질(MIT + DIT)을 처리한 인간 $CD34^+$ 세포를 회수하여 qRT-PCR 분석을 통해 갈색지방세포(UCP1, PGC1A 및 PRDM16) 및 일반지방세포(AP2, adipoQ 및 PPARG) 유전자 마커의 발현을 확인한 것이며, (C)는 갑상선 세포의 IYD가 줄기세포 분화를 위한 수용체로서 역할함을 확인한 것이다.

도 6은 다양한 장기로 이동한 세포에서 항체의 DNA 염기서열 분석에 의해 생성된 계통수에 관한 것으로, 뇌, 심장, 간 및 비장으로부터 분리된 총 60개의 항체 유전자를 서열화한 것이다. 10개의 심장 유전자를 4개의 주요 상동으로 그룹화 하였으며, H3 항체 유전자가 심장에서 5번 발견되어 가장 풍부한 것을 확인하였다.

도 7은 효능제 항체에 의한 세포 이동 조절에 관한 것으로, (A)는 이식된 GFP 마우스에 H3 항체(50 μg/마우스 i.p. 2회/주, 총 3주)를 주사한 후, 심장을 회수하여 면역형광 조직화학을 위해 동결 OCT 블록을 제작하고, 심장 절편(10 μm)을 DAPI, anti-mCherry 및 anti-UCP1 항체로 염색 후 공초점 현미경으로 확인한 것이며, (B)는 RNA 시퀀싱 분석에 의한 지방세포 유전자 프로파일링을 나타낸 것이며, (C)는 갈색지방세포의 주요 마커의 발현을 확인한 것이다.

도 8은 효능제 항체의 아미노산 서열 및 염기서열을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명의 발명자들은 IYD(iodotyrosine deiodinase) 효능제(agonist)인 신규 H3 항체 및 IYD 기질이 골수 줄기세포를 갈색지방세포로 분화 유도하는 것을 확인한 바, 비만 예방 내지 치료에 활용할 수 있음을 확인하며 본 발명을 완성하였다.

[0022] 본 발명에서 사용된 용어 "ScFv(single-chain Fv, 단일사슬단편항체 또는 항체 단편)"는 경쇄 및 중쇄의 가변영역을 연결한 항체이다. 경우에 따라서, 15개 내외의 아미노산이 연결된 펩타이드 사슬로 이루어진 링커(linker, 연결부위)를 포함할 수 있으며, 이때, ScFv는 경쇄 가변영역-연결부위-중쇄 가변영역, 또는 중쇄 가변영역- 연결부위-경쇄 가변영역의 구조를 가질 수 있으며, 원 항체와 동일 혹은 유사한 항원특이성을 가진다.

[0024] 본 발명에서 사용된 용어 “가변영역(variable region)”은 항원과 특이적으로 결합하는 기능을 수행하면서 서열상의 많은 변이를 보이는 부위를 의미하는데, 대체로 상보성 결정 영역(complementarity determining regions; CDR)과 프레임워크 영역(framework region; FR)을 포함한다.

[0026] 본 발명에서 사용된 용어 “항체(또는 ScFv) 라이브러리”는 서로 다른 서열을 가지는 다양한 항체 유전자들의 집합이다. 항체 라이브러리로부터 임의의 항원에 대해 특이적 항체를 분리하기 위해서는 매우 높은 다양성이 요구되며, 서로 다른 항체 클론들로 이루어진 라이브러리가 구축되어 사용된다. 이러한 항체라이브러리를 이루는 항체 유전자는 예를 들어, 파지미드(phagemid) 벡터에 클로닝되어 형질전환체(대장균)에 형질주입될 수 있다.

[0028] 본 발명에서 사용된 용어 “인간항체”는 광범위하게는 인간의 면역글로불린으로부터 유래된 가변영역(CDR 및 FR)을 포함하는 항체를 의미하고, 보다 좁은 범위로는 인간의 면역글로불린으로부터 유래된 가변영역 및 불변영역(constant region)을 포함하는 항체를 의미한다. 상기 인간항체는 전체 항체(whole) 형태일 뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함할 수 있다. 상기 전체 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결된 형태가 될 수 있는데, 바람직하게는 단일 클론 항체가 될 수 있다. 아울러, 상기 항체 분자의 기능적인 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며 Fab, Fab', F(ab')2, Fv, 이중쇄 Fv(dsFv), scFv 등을 포함할 수 있다. 상기 항체 단편 중 상기 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(CH1)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 포함할 수 있고, 상기 Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C 말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 포함한다는 점에서 Fab와 구별될 수 있으며, 상기 F(ab')2 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 형성한다는 점에서 다른 단편과 구별될 수 있다. 한편, 상기 Fv는 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각을 의미하고, 통상적으로 단쇄 Fv(scFv)와 이중쇄 Fv(dsFv)로 구별되는데, 상기 단쇄 Fv(scFv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 경쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결된 형태가 될 수 있고, 상기 이중쇄 Fv(dsFv)는 디설파이드 결합으로 중쇄 가변부위와 경쇄 가변부위가 연결된 형태가 될 수 있다. 이들 기능적인 단편은 다양한 방법으로 제조될 수 있는데, 통상적으로는 효소를 이용한 항체 단백질의 가수분해를 통해 제조될 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하며 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')2 단편을 얻을 수 있다), 바람직하게는 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있으며, 이들 재조합 기술은 당업계에 이미 공지되어 있다(WO 88/10649, WO 88/106630, WO 88/07085, WO 88/07086 및 WO 88/09344). 상기 인간항체는 모든 구성요소가 인간으로부터 유래되었기 때문에, 기존의 인간화 항체 또는 마우스 항체에 비해서 면역화 반응이 일어날 확률이 적어서 인간에게 투여하였을 경우 원하지 않는 면역반응이 일어나지 않는 장점이 있으므로, 인간을 대상으로 하는 치료용 항체로서 매우 유용하게 사용될 수 있다.

[0030] 본 발명에서 사용된 용어 “단일클론 항체”는 단일한 항원성 부위(단일 에피토프)에 대해서 지시되어 이와 특이적인 결합을 하는 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상 본 발명의 단일 클론 항체는 요오드티로신 탈요소효소(iodotyrosine deiodinase; IYD)에 특이적으로 결합하므로, IYD를 인식하는 단백질 분자이다.

[0032] 항원의 특정 에피토프(epitope)를 인식하여 항원-항체 복합체를 형성하는 항체의 주요 부위는 중쇄 및 경쇄의 가변영역, 특히 CDR이 이러한 복합체 형성에 기여하므로, 본 발명은 상기한 본 발명의 단일 클론 항체의 가변영역, 특히 CDR을 포함하는 이의 키메릭(chimeric) 항체, 인간화(humanized) 항체 등을 본 발명의 범위에 포함한다. 또한, 본 발명은 상기한 바와 같은 결합 특성을 갖는 한 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편들을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab')2 및 Fv 등이 있다.

[0034] 이에, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 상보성 결정 영역(CDR)1, 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 CDR2 및 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시되는 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역(V_H); 및 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 CDR1, 서열번호 5의 아미노산 서열로 표시되는 CDR2 및 서열번호 6의 아미노산

서열로 표시되는 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역(V_J);을 포함하는 단일클론 인간항체 H3 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0035] 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 7의 아미노산 서열로 표시되고, 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 8의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.

[0036] 상기 단일클론 인간항체 H3 또는 이의 항원 단편은 요오드티로신 탈요소효소(iodotyrosine deiodinase; IYD)에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0038] 또한, 본 발명은 상기 단일클론 인간항체 H3 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 cDNA를 제공한다.

[0039] 상기 cDNA는 중쇄 가변영역을 코딩하는 서열번호 9의 염기서열 및 경쇄 가변영역을 코딩하는 서열번호 10의 염기서열로 표시될 수 있다.

[0041] 또한, 본 발명은 상기 cDNA를 포함하는 재조합 바이러스 벡터 및 상기 재조합 바이러스 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.

[0043] 또한, 본 발명은 상기 형질전환된 세포를 배지 내에서 배양하는 단계; 및 상기 배양된 세포 또는 배양 배지로부터 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 회수 및 정제하는 단계;를 포함하는 인간항체 H3 또는 이의 항원 결합 단편의 제조방법을 제공한다.

[0045] 또한, 본 발명은 요오드티로신 탈요소효소(IYD) 효능제(agonist)를 유효성분으로 포함하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0046] 상기 IYD 효능제는 상기 단일클론 인간항체 H3, 이의 항원 결합 단편 및 IYD 기질로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0047] 상기 IYD 기질은 MIT(3-monoiodo-L-tyrosine) 및 DIT(3, 5-diodo-L-tyrosine)로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0048] 상기 대사성 질환은 비만, 당뇨병, 비알코올성 지방간, 고혈압, 동맥경화, 내당장애, 과인슐린혈증, 과혈당증 및 고지혈증으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0049] 상기 IYD 효능제는 골수 줄기세포를 갈색지방세포로 분화 유도할 수 있다. 갈색지방세포는 열을 발생시켜 에너지를 소비함으로써 비만을 예방 내지 치료할 수 있다.

[0051] 본 발명의 조성물이 약학 조성물인 경우, 투여를 위하여, 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0052] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는 제형화할 경우 통상 사용하는 충진제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형 제제는 상기 유효성분 외에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 과제를 포함한다. 비수성 용제 및 현

탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔, 마크로솔, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0053] 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 시간에 따라 다르지만, 당 업자에 의해 적절하게 선택될 수 있는 바, 상기 조성물의 일일 투여량은 바람직하게는 0.001 mg/kg 내지 50 mg/kg이며, 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.

[0055] 또한, 본 발명은 세포주에 실험물질을 처리하는 단계; 상기 실험물질이 처리된 세포주에서 IYD의 발현 또는 활성화 정도를 측정하는 단계; 및 대조구 시료와 비교하여 상기 IYD의 발현 또는 활성화 정도가 증가된 시험물질을 선별하는 단계;를 포함하는 대사성 질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0057] 본 발명에서 사용된 용어 “시험물질”은 유전자의 발현량에 영향을 미치거나, 단백질의 발현 또는 활성에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 후보 물질을 의미한다. 상기 시료는 화학물질, 뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, siRNA(small interference RNA) 및 천연물 추출물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0059] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0061] **실시예 1: 마우스 및 세포주**

[0062] 마우스는 C57BL/6J, FVB/NJ, B6(Cg)-Tyr^{c-2J} Tg(UBC-mCherry) 1Phbs/J, FVB-Tg(CAG-luc,-GFP) L2G85Chco/J 및 CByJ.B6-Tg(UBC-GFP) 30Scha/J(The Jackson laboratory)를 사용하였다. 마우스는 Scripps Research Institute의 동물실험윤리위원회(The Animal Care and Use Committee)의 승인을 받은 프로토콜에 따라 보관 및 취급하였다.

[0063] HEK293T 세포주는 10% FCS, 페니실린 및 스트렙토마이신(Gibco-Invitrogen)이 포함된 DMEM 배지에서 배양하였으며, Expi293F 세포주는 Expi293 Expression 배지(Gibco-Invitrogen)에서 배양하였다. 인간 CD34^{+} 세포(All-Cells)와 마우스 골수 세포는 사이토카인 칵테일 100(STEMCELL Technologies)이 포함된 StemSpan 무혈청 배지, StemSpan 무혈청 배지 또는 1% FBS가 포함된 RPMI 배지에서 배양하였다.

[0065] **실시예 2: 조합 항체 라이브러리(combinatorial antibody libraries) 및 형질 도입**

[0066] Single-chain Fv(ScFv) 유전자는 naive 인간 조합 항체 라이브러리(1 X 10^{11} 라이브러리 다양성)로부터 획득하였고, 렌티바이러스 벡터에 서브 클로닝하였다. 렌티바이러스 벡터를 pCMVD8.91 및 pVSVg 바이러스 패키징 벡터와 1:1:1의 비율로 HEK293T 세포에 공동 형질감염시켜 렌바이러스를 생산하였다. 마우스 골수세포는 렌티바이러스와 함께 37℃에서 3일 동안 배양하였다.

[0068] **실시예 3: 골수 이식**

[0069] 골수세포를 2의 감염 다중도에서 렌티바이러스 항체 라이브러리로 형질감염시키고, 치사량의 방사선으로 조사된 마우스에 이식하였다. 골수 이식 마우스는 1주에서 6개월 동안 사육하였다. 심장은 관류, 고정 및 회수하여 -80℃서 냉동시키고, 심장으로부터 획득한 항체 유전자는 렌티바이러스 벡터에 맞춤화된 프라이머를 사용하여 PCR로 증폭시킨 후 전기영동을 수행하여 분석하였다.

[0071] **실시예 4: scFv-Fc 단백질의 정제**

[0072] ScFv-Fc 태그 융합 단백질을 코딩하는 벡터를 Expi293F 세포로 형질감염시켰다. AKTAxpress purifier(GE)를 가지는 HiTrap Protein G HP 컬럼을 사용하여 상층액의 항체를 정제하였다. 완충액을 PBS(Dulbecco, pH 7.4)로 교환하고, 정제된 단백질은 4℃에서 보관하였다.

[0074] **실시예 5: 면역침강(Immunoprecipitation) 및 질량분석법(mass spectrometry)**

[0075] 면역침강을 위해 마우스 골수세포를 준비하고 용해 완충액에 용해시켰다. 이후 용해물을 H3 항체와 함께 4℃에서 2시간 동안 반응시키고, protein G-Sepharose beads(Pierce) 50 μL와 반응시켰다. 용리액은 2-kV 전기 스프레이 전압을 갖는 나노 이온 소스로부터 선형 트랩 사중극자 질량 분석기로 도입하였다. 분석 방법은 400-2,000 m/z 범위의 전체 MS 스캔으로 구성한 다음, 전체 MS 스캔에서 가장 강력한 3가지 이온에 대한 data-dependent MS/MS로 구성하였다. 선형 트랩 사중극자로부터의 미가공 데이터는 MASCOT(http://www.matrixscience.com/) 검색 엔진을 가지는 IPI 인간 FASTA 데이터베이스를 사용하여 분석하였다.

[0077] **실시예 6: 웨스턴 블랏**

[0078] 세포를 PBS로 세척한 다음 용해 완충액(50 mM Hepes, pH 7.2, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4, 10% 글리세롤, 1% Triton X-100)에 용해시켰다. 용해물은 4℃, 12,000 x g에서 15분 동안 원심분리 하였다. 단백질은 Laemmli 샘플 완충액(95℃에서 5분)으로 변성시키고, SDS/PAGE로 분리한 후, iBlot 블로팅 시스템(Invitrogen)을 사용하여 니트로셀룰로오스 멤브레인으로 이동시켰다. 이후 멤브레인을 5% BSA 및 트윈 20이 포함된 인산완충식염수(PBST)로 30분 동안 블로킹시키고, IYD 단백질(Fitzgerald), IYD DNA(OriGene) 또는 IYD shRNA(OriGene)에 대한 항체와 3시간 동안 항온에서 반응시켰다. 이후 멤브레인을 PBST로 여러 번 세척한 뒤, H3 항체 또는 HRP-conjugated anti-VIM 또는 anti-β actin 항체와 1시간 동안 반응시켰다. 이어서 멤브레인을 PBST로 세척하고 ECL로 현상하였다. 인산화는 phospho-AKT, ERK 및 p38(Cell Signaling Technology)로 수행하였다.

[0080] **실시예 7: 유세포 분석 및 세포 분류**

[0081] 세포를 anti-GFP 및 anti-mCherry(Invitrogen)로 염색하고, 염색된 세포를 LSRII 유세포 분석기(Becton Dickinson)로 분석하였다.

[0083] **실시예 8: 실시간 정량(RT-q) PCR**

[0084] H3 항체로 배양된 세포로부터 RNA를 추출한 후(Qiagen), cDNA를 합성하였다(Bio-Rad Laboratories). PCR은 400 ng의 cDNA, RT SYBR Green supermix 및 C1000 Thermal cycler(Bio-Rad Laboratories)를 사용하여 3회 수행하였다. 인간 UCP1, PGC1A, PRDM16, AP2(FABP4), adipoQ 및 PPARG에 특이적인 프라이머를 사용하였으며, 프라이머 서열은 하기 표 1과 같다.

표 1

[0085]

Gene name	Forward	Reverse	Species
UCP1	ACTGCCACACCTCCAGTCATT	CTTTGCCTCACTCAGGATTGG	human
PRDM16	CAGCACGGTGAAGCCATTC	GCGTGCATCCGCTTGTG	human
PGC1α	CCCTGCCATTGTTAAGACC	TGCTGCTGTTCCTGTTTTC	human
AP2 (FABP4)	ACAAGCTGGTGGTGGAATGTG	CCTTTGGCTCATGCCCTTT	human
AdipoQ	CGATTGTCAGTGGATCTGACG	CAACAGTAGCATCCTGAGCCCT	human
PPAR-γ	GTGCCAGTTTCGATCCGTAGA	GGCCAGCATCGTGTAGATGA	human
18s rRNA	GGCCCTGTAATTGGAATGAGTC	CCAAGATCCAACTACGAGCTT	human

[0087] **실시예 9: 면역조직화학 및 면역 형광 공초점 현미경**

[0088] 면역조직화학은 수평으로 절단된 냉동 심장 절편에서 수행하였다. 항체는 4% 말 혈청 및 0.2% Triton-X100을 포함하는 1x PBS로 희석하였으며, 분석에는 Rat anti-mCherry(1:500, Invitrogen) 또는 rabbit anti-UCP1(1:500, Thermo fisher)를 사용하였다. 절편은 1차 항체와 함께 밤새 반응시키고 세척한 후 2차 항체(goat anti-rabbit 또는 goat anti-mouse, 1:250, Invitrogen)와 1시간 동안 항온에서 반응시켰다. 절편과 커버슬립은 DAPI(ThermoFisher)가 포함된 anti-fade mounting 배지로 유리 슬라이드 위에 마운팅하였다. 공초점 현미경 검사는 Zeiss LSM 710 레이저 스캐닝 공초점 현미경으로 수행하였다.

[0090] **실시예 10: 생물발광 이미징**

[0091] 루시퍼라제 발현 형질전환 마우스(FVB-Tg (CAG-luc,-GFP) L2G85Chco/J)의 골수세포를 렌티바이러스 H3 항체로 형질전환시키고 치사량의 방사선으로 조사된 수컷 마우스(FVB/NJ)에 이식한 후 1주째에 이미지를 분석하였다. IVIS Lumina® 시스템(Perkin-Elmer)을 사용하여 이미지를 획득하기 전, CycLuc1(END Millipore)(100 μL, 5 mM 용액 in PBS)을 수혜자 마우스에 정맥 주사하였다. 이미지는 60초 노출/이미지로 획득하였다.

[0093] **실시예 11: RNA 시퀀싱 및 데이터 분석**

[0094] 아이소타입 항체가 처리된 인간 $CD34^+$ 세포로부터 3개, H3 항체로 처리된 인간 $CD34^+$ 세포로부터 5개 및 M-CSF로 처리된 인간 $CD34^+$ 세포로부터 총 RNA를 분리 하였다. Illumina® NEBNext® Ultra ™ Directional RNA Library Prep Kit를 사용하여 RNAseq 라이브러리에서 총 RNA 시료를 준비하였다.

[0095] 간략하게, 각 시료에서 500 ng의 총 RNA를 이용하여 이중가닥 cDNA를 합성한 다음, 시퀀싱 어댑터의 단편화 및 연장을 수행하였다. 이후 라이브러리는 PCR 프라이머로 15 사이클 증폭시키고, 정제한 후, 75 base single read seqeuncing을 위해 Illumina NextSeq500에 로딩하기 전, AMPure XP beads를 사용하여 크기를 선택하였다. 인간 전사체의 발현 수준은 Salmon(BioRxiv)을 사용하여 측정하였다. 히트맵은 Cluster3 및 JavaTreeView를 사용하여 작성하였다. 차별적으로 발현된 유전자의 기능 분석은 Ingenuity Pathway Analysis 소프트웨어(Ingenuity Systems Inc.)를 사용하여 분석하였다.

[0097] **실험예 1: 세포 이동을 조절하는 in vivo 항체의 선별**

[0098] 본 발명에서는 in vitro에서 세포 내 조합 라이브러리를 사용하여 세포 운명을 조절하는 항체를 선별하는 방법을 고안하고, 골수세포가 심장으로 이동하도록 유도하는 효능제 항체를 선별하기 위해 in vivo 연구를 수행하였다.

[0099] 도 1과 같이, 인간 ScFv 파지 라이브러리(10^8명의 구성원)의 유전자를 렌티바이러스 벡터에 클로닝하여 렌티바이러스 membrane tethered 라이브러리를 제조하고, 항체 분자를 원형질 막에 부착시키고 세포 표면에 표시하였다. in vitro에서 총 마우스 골수세포를 항체 라이브러리로 감염시키고 치사량의 방사선으로 조사된 C57BL/6J 마우스에 이식하였다. 7일 후, PBS로 관류한 마우스 심장을 회수하고 게놈 DNA를 추출하였으며, PCR 분석을 수행하여 심장으로 이동한 세포 내 모든 항체 유전자를 확인하였다.

[0100] 그 결과, 도 6과 같이, H3 항체 유전자가 심장에서 5번 발견되었고, 추가적으로 다른 장기에 대해서도 평가하였으나 H3 항체 유전자는 발견되지 않았다.

[0102] **실험예 2: 항체에 의한 세포의 심장으로의 이동**

[0103] H3 항체가 골수에서 심장으로 세포의 이동을 유도하는지 여부를 확인하기 위해, H3 항체 유전자를 포유동물 발현 벡터에 클로닝하고 H3 항체를 정제하였다. 기증자 $mCherry^+$ 골수세포를 방사선 조사된 GFP 마우스로 이식하

고, 이어서, H3 항체(50 μg/마우스 i.p. 2회/주, 총 3주)를 이식된 GFP 마우스에 주사하였다.

[0104] 이후, 심장을 관류 및 회수하고, mCherry를 편재하게 발현하는 세포를 분석하였다(도 2A). 회수한 심장은 유세포 분석 및 면역조직화학 염색으로 분석하기 위해 2개의 반구로 절단하였다. 유세포 분석과 면역조직화학 염색은 H3 항체가 주입된 마우스의 기증자 $mCherry^+$ 세포가 심장으로 이동하는 것을 보여주었다(도 2B).

[0105] 또한, H3 유전자를 렌티바이러스 벡터에 클로닝하여 $mCherry^+$ 총 골수세포를 감염시킨 다음 방사선으로 조사된 GFP 마우스에 이식하였다. 이 실험은 H3 항체가 주입되었을 때와 유사하게 $mCherry^+$ 세포가 심장으로 이동하는 것을 보여주었다(데이터 표시하지 않음).

[0106] 다음으로 in vivo 생물발광 이미징을 사용하여 통합된 항체 유전자가 골수세포를 심장으로 유도하는지 여부를 확인하였다. 루시퍼라제 발현 형질전환 마우스(luc^+)의 신선한 골수세포를 H3 항체를 코딩하는 렌티바이러스로 감염시키고 방사선 조사된 야생형 마우스로 이식하여 1주일 후에 영상화 하였다. 그 결과, H3 항체에 감염된 기증자 luc^+ 세포가 심장으로 이동한 것을 확인하였다(도 2C).

[0108] **실험예 3: 새로운 표적 동정**

[0109] H3 항체에 의해 인식되는 단백질을 동정하기 위해, Expi293F 세포에서 재조합 H3 항체를 생산하였다. 정제된 H3 항체를 마우스 골수와 배양하고, 세포 용해물로부터 면역 복합체를 protein A/G 컬럼으로 포획하였다. SDS 겔 염색 및 질량 분석기를 이용하여 항체와 반응하는 6개의 후보 단백질을 동정하였다(도 3A). 그 중 막 결합 단백질인 IYD(iodotyrosine deiodinase)가 H3 항체의 표적 항원임을 웨스턴 블롯으로 확인하였다. H3 항체는 마우스 골수뿐만 아니라 정제된 IYD 단백질과 결합하는 것을 확인하였다(도 3B). 또한, IYD가 마우스 골수 및 $CD34^+$ 세포에서 발현하는 것을 qRT-PCR로 확인하였으며(도 3C), $CD34^+$ 세포에서 발현하는 것을 면역형광 조직화학으로 확인하였다(도 3D).

[0111] **실험예 4: 항체에 의한 줄기세포에서 갈색지방세포로의 분화**

[0112] 정제된 항체가 세포를 변형시키는지 여부를 확인하기 위해, 인간 $CD34^+$ 세포를 H3 항체와 in vitro에서 2주간 배양하였다. 그 결과, 정제된 항체가 $CD34^+$ 세포를 지방세포와 유사한 형태로 세포 분화를 유도하는 것을 확인하였다(도 4A).

[0113] 또한, 심장으로 이동한 줄기세포를 확인하기 위해 DAPI와 anti-UCP로 심장 절편을 염색한 결과, 대조군과 비교하였을 때, H3 항체를 주사한 마우스의 $mCherry^+$ 세포 및 $UCP1^+$ 세포가 방사선으로 조사된 GFP 마우스의 심장으로 현저하게 이동하는 것을 확인하였다(도 4B,도 7A).

[0114] 또한, 정제된 H3 항체를 처리한 인간 $CD34^+$ 세포의 RNA 전사체를 서열분석하여 비처리 대조군 세포와 비교하였다. 그 결과, 하기 표 2와 같이, 갈색지방세포에서 높게 발현되는 유전자인 PDK4, EPSTI1, ACVR2B, ADRBK1, ARDC3, ATG7, ATF4, BACE1, EIF4EBP2, FOXO1, ID1, LRP6 및 NR1H3이 발현되는 것을 확인하였다(도 4C 및 D, 도 7B, 7C).

표 2

[0115]

Gene	Control-1	Control-2	Control-3	H3Ab-1	H3Ab-2	H3Ab-3	H3Ab-4	H3Ab-5	Class
BMP7	0.1	0.1	0.1	0.6	0.6	2.4	2.2	2.0	Brown
CEBPB	17.1	35.2	18.8	100.3	94.9	160.9	238.8	239.4	Brown
PDK4	1.4	1.0	1.2	16.7	22.6	9.2	10.5	15.1	Brown
EPSTI1	1.9	2.0	2.3	14.7	13.9	7.9	9.0	5.5	Brown
PPARA	1.7	1.8	1.6	4.7	4.0	7.0	6.7	6.5	Brown
SHOX2	0.1	0.1	0.1	6.3	6.4	15.6	15.9	20.1	General
TMEM26	0.2	0.1	0.1	11.4	11.0	3.6	3.5	2.5	General
FABP4	0.1	0.5	0.3	259.8	306.2	6.1	4.1	8.9	General
PPARG	2.6	4.7	3.5	10.7	10.5	15.0	14.4	17.1	General
NR1H3	1.9	2.0	2.5	83.8	80.3	130.2	115.0	121.8	Adipocyte
TRPV4	0.0	0.1	0.1	3.3	3.3	2.9	2.2	1.9	Adipocyte
TMEM26	0.2	0.1	0.1	11.4	11.0	3.6	3.5	2.5	Adipocyte
BMP2	0.1	0.0	0.0	3.3	3.7	0.2	0.1	0.1	Adipocyte
FGFR1	1.3	1.8	1.4	7.4	6.9	15.1	12.5	15.9	Adipocyte
VEGFB	7.5	10.5	7.0	44.1	40.1	46.8	51.5	46.3	Adipocyte
BMP7	0.1	0.1	0.1	0.6	0.6	2.4	2.2	2.0	Adipocyte
BMPR2	5.8	5.4	6.0	10.5	11.1	12.5	12.3	12.8	Adipocyte
ARRDC3	8.9	6.1	7.7	11.9	13.1	14.4	14.6	12.5	Adipocyte
BACE1	5.1	5.3	5.6	11.2	12.2	9.9	9.2	9.4	Adipocyte
ATG7	9.6	9.5	9.2	18.9	18.0	14.4	14.3	16.5	Adipocyte
PLIN2	50.1	55.5	54.6	70.6	70.9	98.9	86.9	116.0	Adipocyte
PLIN3	35.4	48.1	38.2	55.9	55.4	63.2	63.3	72.0	Adipocyte
OXR1	17.2	16.8	20.4	37.0	38.9	56.8	57.6	55.2	Adipocyte
ACVR2B	0.8	0.6	0.6	1.3	1.4	2.1	1.8	1.7	Adipocyte
FOXO1	1.3	1.6	1.2	3.6	3.4	3.7	3.3	3.5	Adipocyte
IKBKE	5.6	6.8	5.8	19.6	18.3	11.6	11.1	14.0	Adipocyte
ATF4	167.2	175.8	167.2	140.7	133.0	268.2	250.9	234.8	Adipocyte
PRKCB	22.9	27.8	23.7	22.1	22.6	28.4	28.4	32.7	Adipocyte
EIF4EBP1	29.1	45.7	34.3	24.5	23.8	39.3	44.7	49.4	Adipocyte
TNFRSF1A	54.7	70.0	51.7	71.4	66.5	47.0	49.7	45.1	Adipocyte
ID1	2.1	2.7	1.5	0.1	0.3	0.2	0.2	0.2	Adipocyte
ALDH1A1	59.7	53.7	61.6	48.2	45.6	26.9	24.8	22.4	Adipocyte
ADRBK1	71.6	120.8	87.6	54.4	48.4	45.7	60.2	52.3	Adipocyte
PTGS2	3.5	2.5	3.2	1.7	1.8	1.9	1.8	1.8	Adipocyte
EIF4EBP2	44.8	40.3	39.2	24.3	24.5	26.1	23.7	21.8	Adipocyte
RBL1	14.8	15.0	15.9	5.2	5.9	2.8	3.3	4.0	Adipocyte
LRP6	2.5	2.0	2.2	1.2	1.1	0.9	0.7	0.8	Adipocyte
CAT	192.0	185.4	193.9	89.7	82.1	53.4	58.8	57.7	Adipocyte
ACTB	2228.1	2667.5	2247.0	2450.8	2382.0	1091.1	1149.8	1383.0	house keeping

[0117] **실험예 5: MIT 및 DIT에 의한 줄기세포에서 갈색지방세포로의 분화 유도**

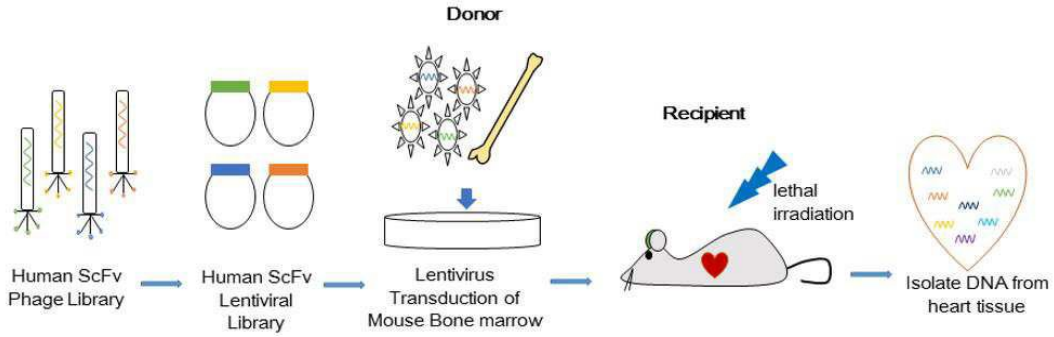
[0118] IYD 기질이 세포를 변형시키는지 여부를 확인하기 위해, 인간 $CD34^+$ 세포를 MIT(3-monoiodo-L-tyrosine) 및 DIT(3, 5-diodo-L-tyrosine)와 in vitro에서 2주간 배양하였다. 그 결과, 기질이 $CD34^+$ 세포를 지방세포와 유사한 형태로 세포 분화를 유도하는 것을 확인하였다(도 5A). 또한, H3 항체 또는 IYD 기질에 의해 유도된 세포의 능력을 비교하기 위해 qRT-PCR을 수행한 결과, 유도된 세포에서 갈색지방세포 마커(UCP1, PGC1A 및 PRDM16) 및 일반지방세포 마커(AP2, adipoQ 및 PPARG)가 발현되는 것을 확인하였다(도 5B).

[0120] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

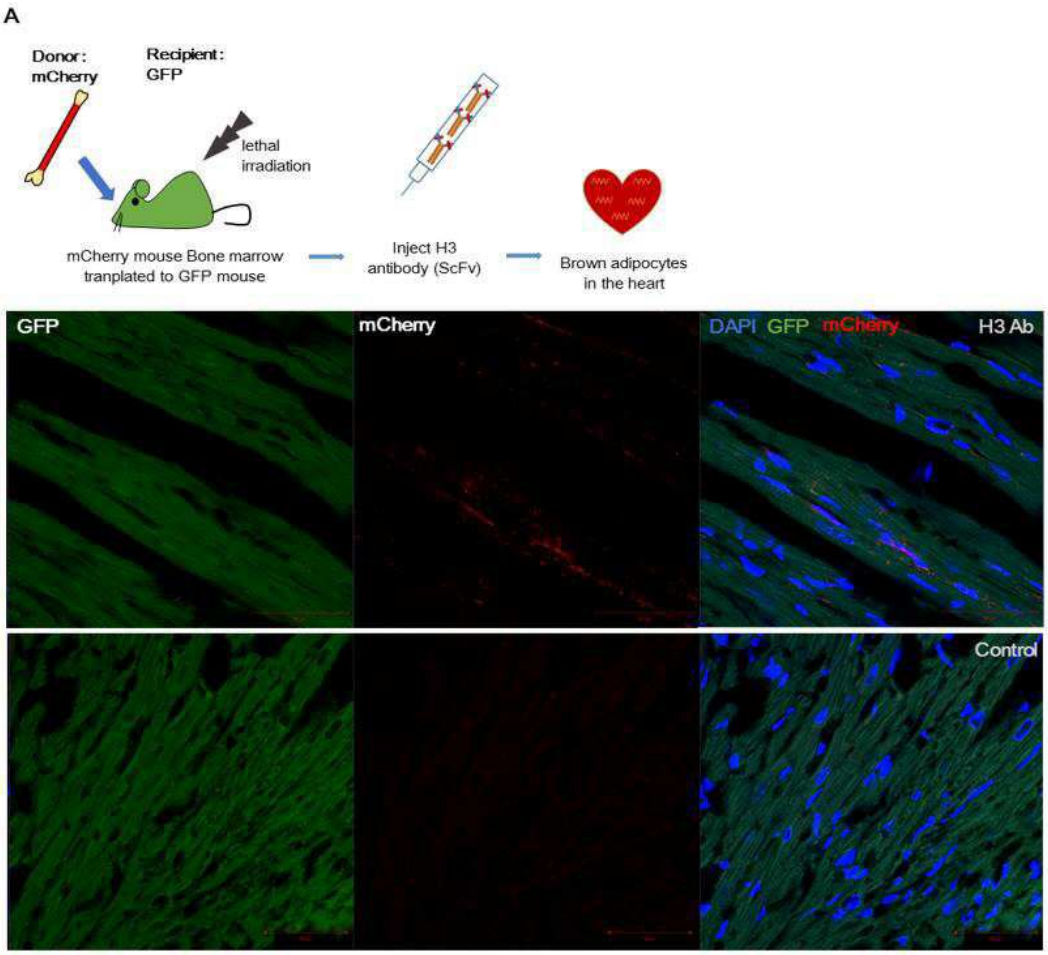
[0121] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

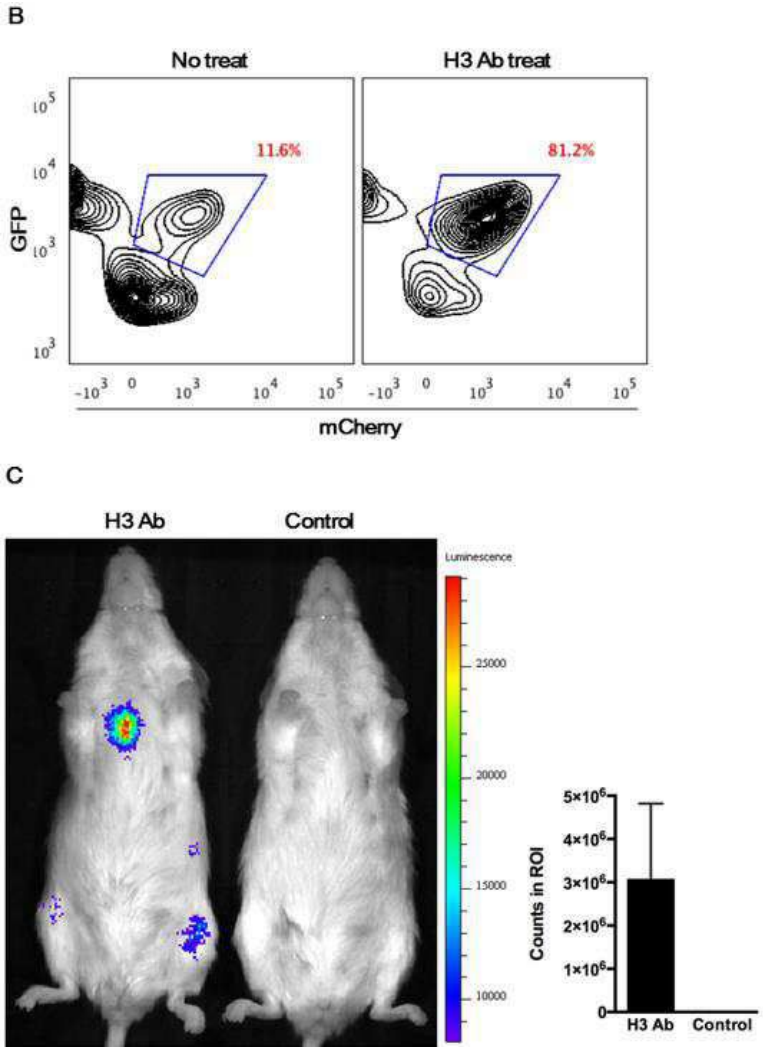
도면1


Donor
Recipient
lethal
irradiation
Human ScFv
Phage Library
Human ScFv
Lentiviral
Library
Lentivirus
Transduction of
Mouse Bone marrow
Isolate DNA from
heart tissue

도면2a

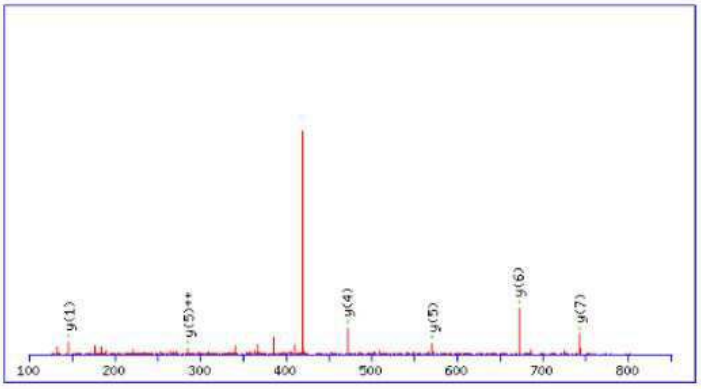

A
Donor:
mCherry
Recipient:
GFP
lethal
irradiation
mCherry mouse Bone marrow
tranplated to GFP mouse
Inject H3
antibody (ScFv)
Brown adipocytes
in the heart
GFP
mCherry
DAPI GFP mCherry
H3 Ab
Control

도면2b


B
No treat
H3 Ab treat
11.6%
81.2%
GFP
mCherry
C
H3 Ab
Control
Luminescence
25000
20000
15000
10000
Counts in ROI
5×10^6
4×10^6
3×10^6
2×10^6
1×10^6
0
H3 Ab
Control

도면3a

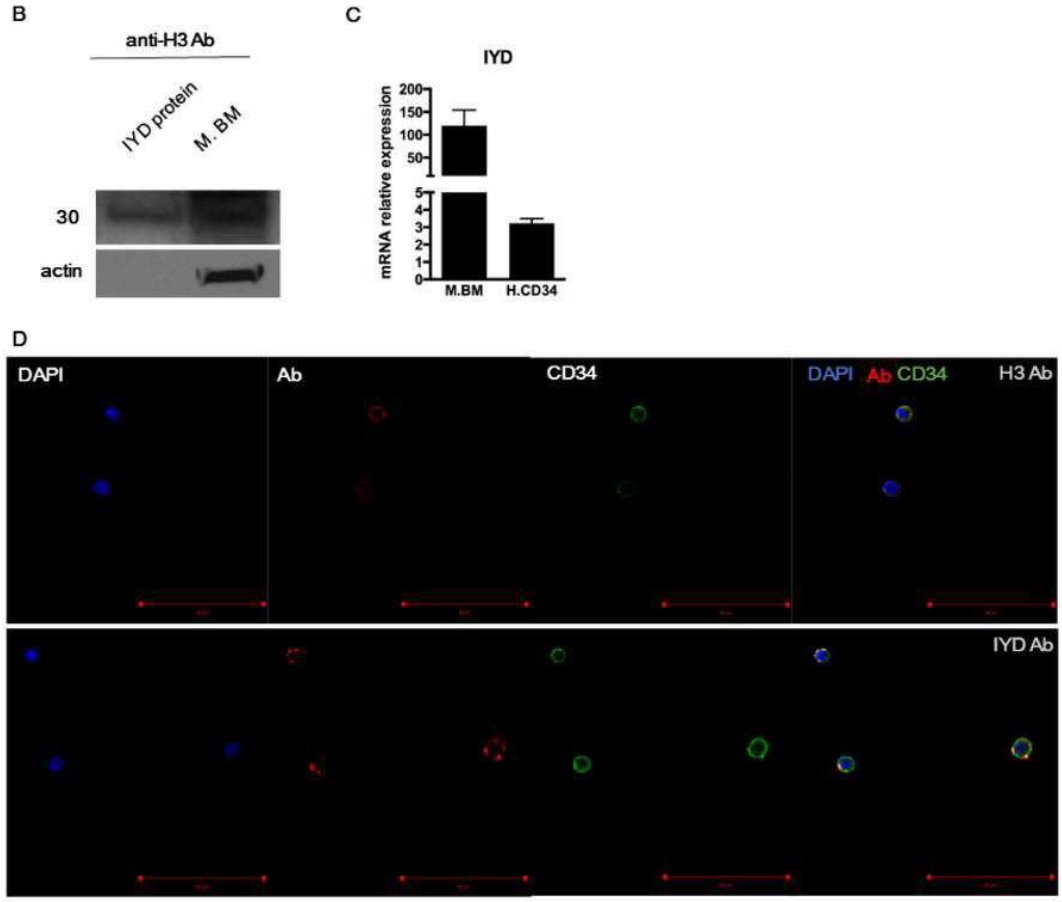
A



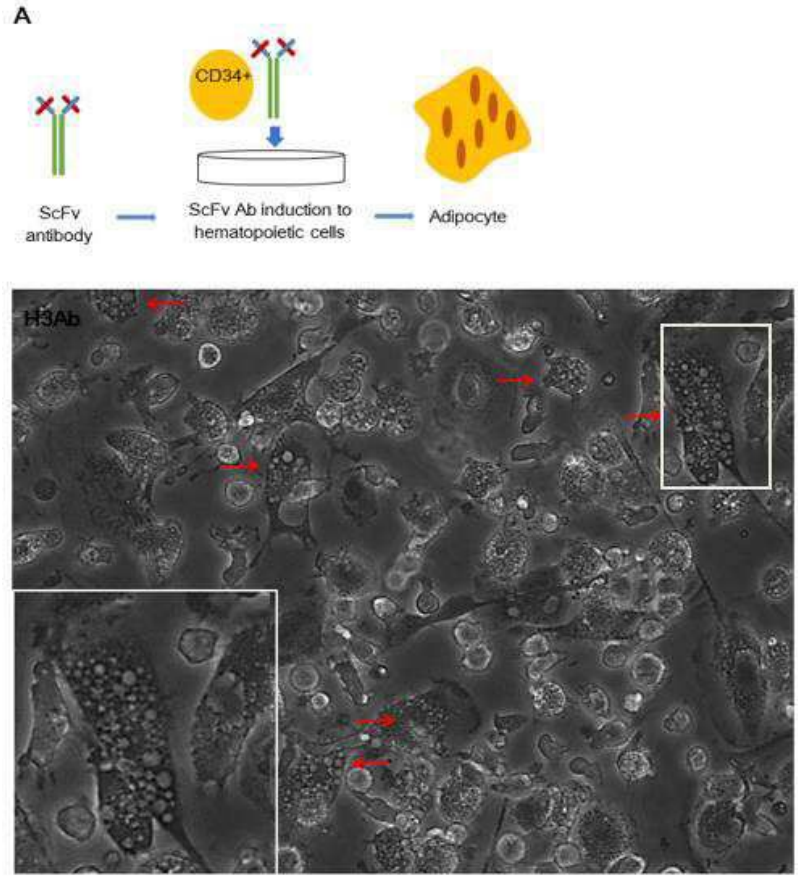
1 MFLLTPVLVA VVCILVVWVF KNADRNLEKK KEEAQVQPWV DEDLKDSTED
51 LQVEEDAEEW QEAEESVEHI PFSHTRYPEQ EMRMRSQEFY ELLNKRRSVR
101 FISSEHVPME VIENVIKAAG TAPSGAHTEP WTFVVVKDPD MKHKIREIIE
151 EEEEINYMKR MGKRWVTDLK KLRTNWIKEY LDTAPVLILI FKQVHGFAAN
201 GKKKVHYYNE ISVSIACGLL LAALQNAGLV TVTTTPLNCG PRLRVLLGRP
251 SHEKLLVLLP VGYPSR**DATV PDLK**RKALDQ IMVTV

gi|21312562	iodotyrosine dehalogenase 1 precursor
gi|3599507	rho/rac-interacting citron kinase short isoform
gi|17390665	Dnajb11 protein
gi|16716569	protease, serine, 1 precursor
gi|6671762	creatine kinase M-type
gi|198845	lipocortin I [Mus musculus domesticus]

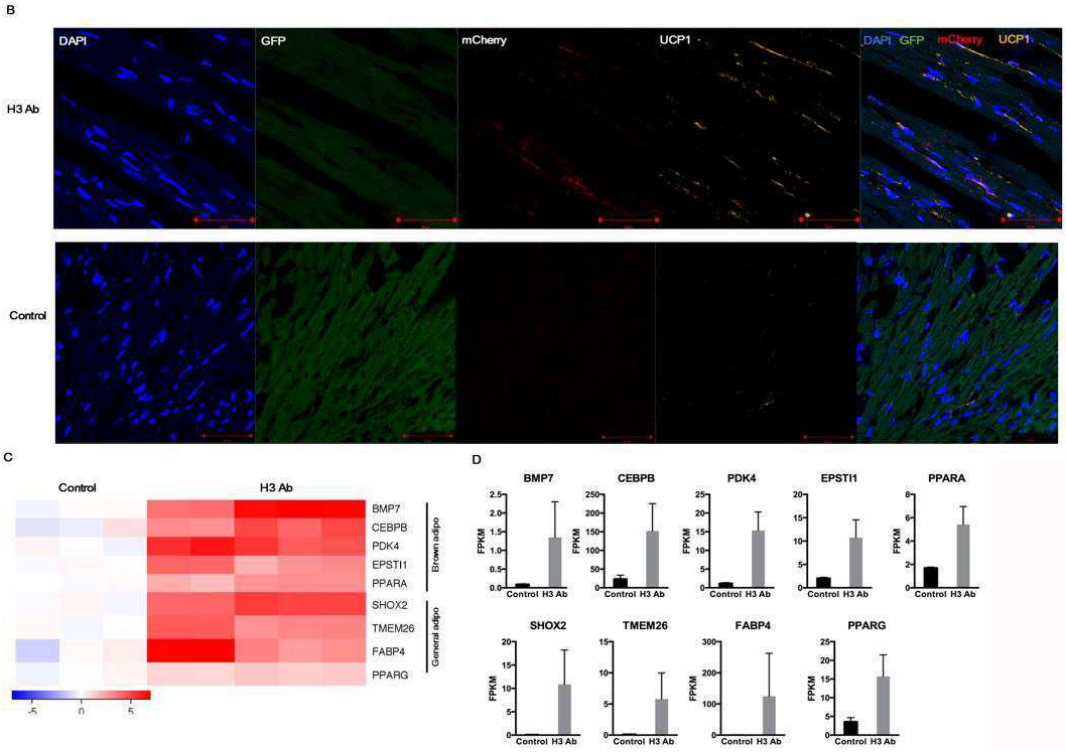
도면3b


B
anti-H3 Ab
IYD protein
M. BM
30
actin
C
IYD
mRNA relative expression
200
150
100
50
5
4
3
2
1
0
M.BM
H.CD34
D
DAPI
Ab
CD34
DAPI Ab CD34
H3 Ab
IYD Ab

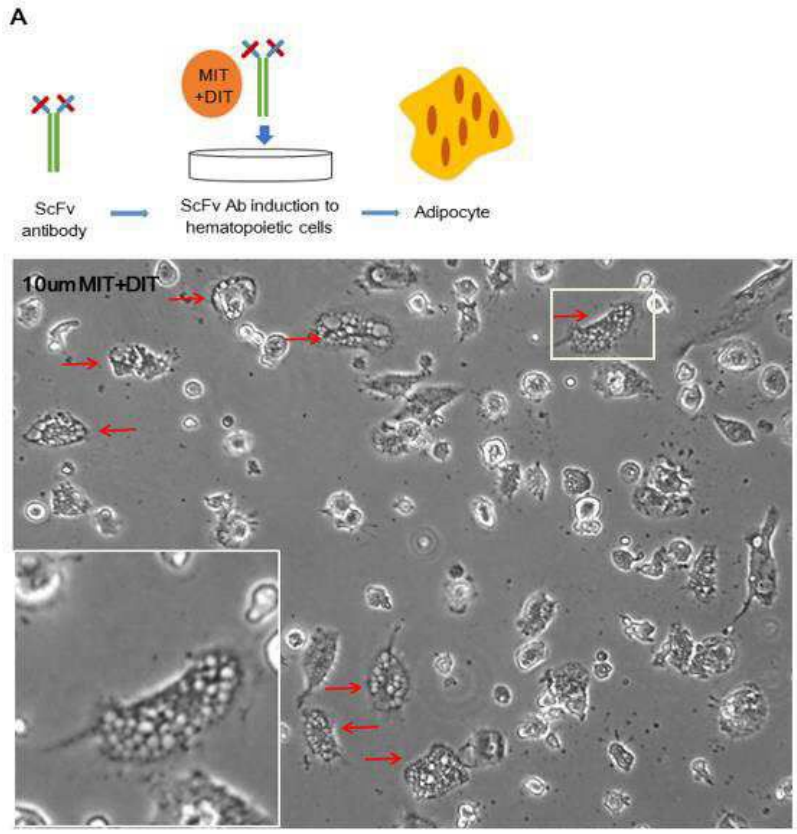
도면4a


A
CD34+
ScFv antibody
ScFv Ab induction to hematopoietic cells
Adipocyte
H3Ab

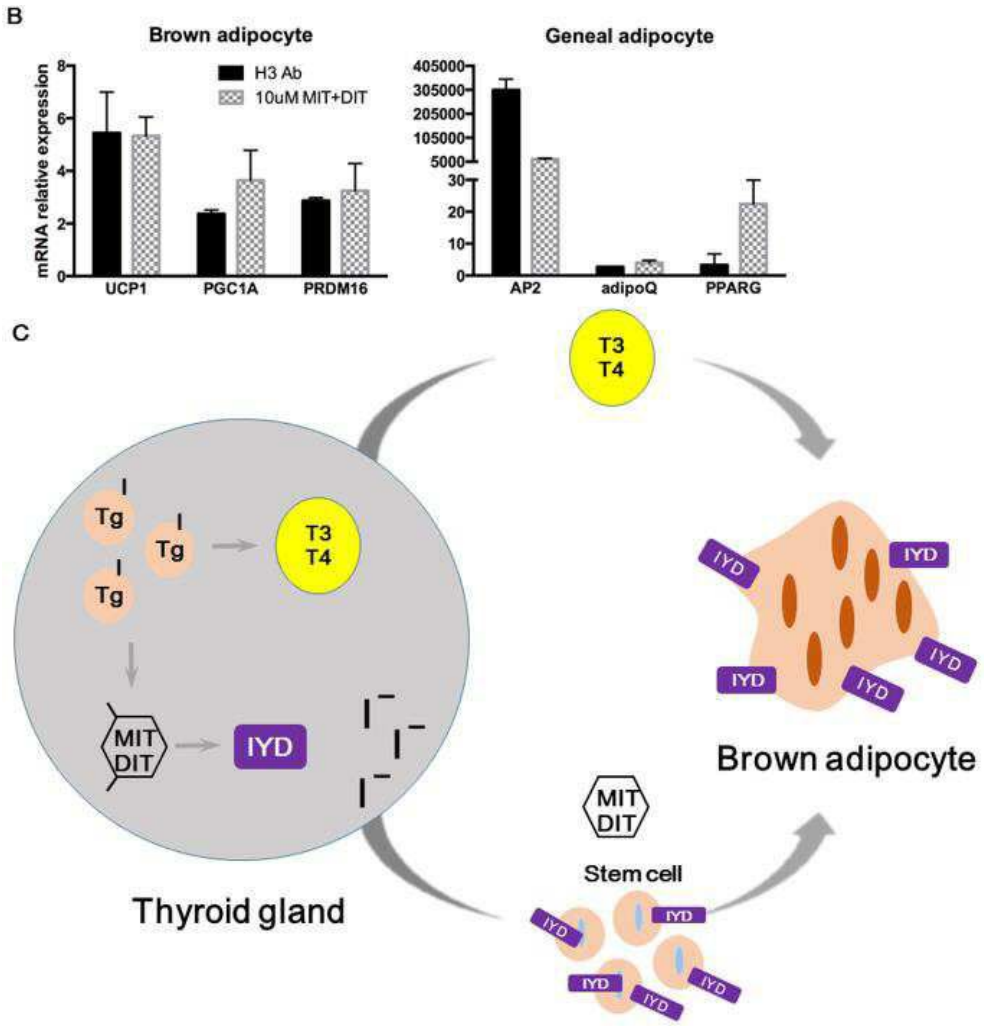
도면4b


B
DAPI
GFP
mCherry
UCP1
DAPI GFP mCherry UCP1
H3 Ab
Control
C
Control
H3 Ab
BMP7
CEBPB
PDK4
EPSTI1
PPARA
SHOX2
TMEM26
FABP4
PPARG
Brown adipo
General adipo
D
BMP7
CEBPB
PDK4
EPSTI1
PPARA
SHOX2
TMEM26
FABP4
PPARG
FPKM
Control H3 Ab

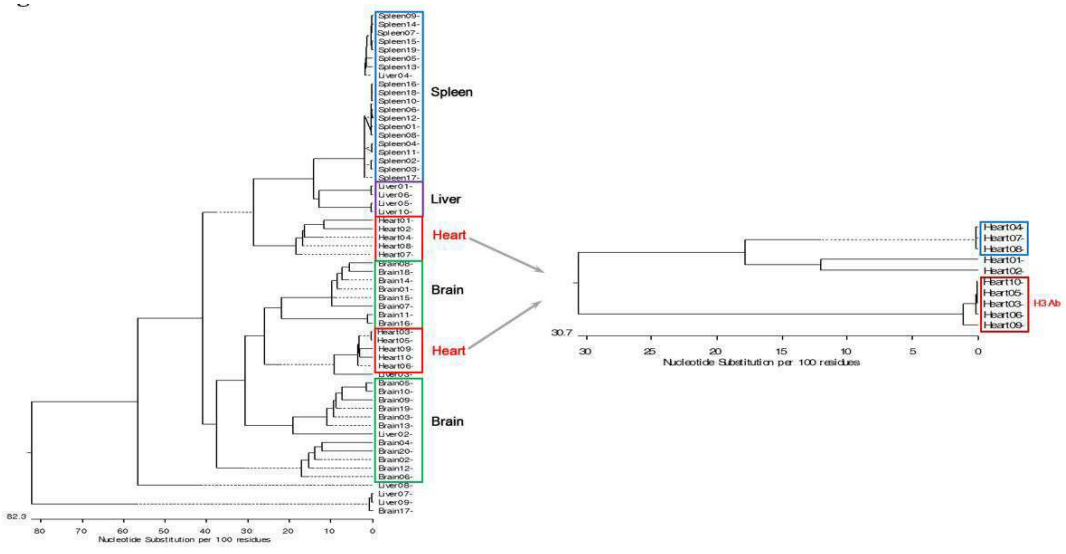
도면5a


A
MIT
+DIT
ScFv
antibody
ScFv Ab induction to
hematopoietic cells
Adipocyte
10um MIT+DIT

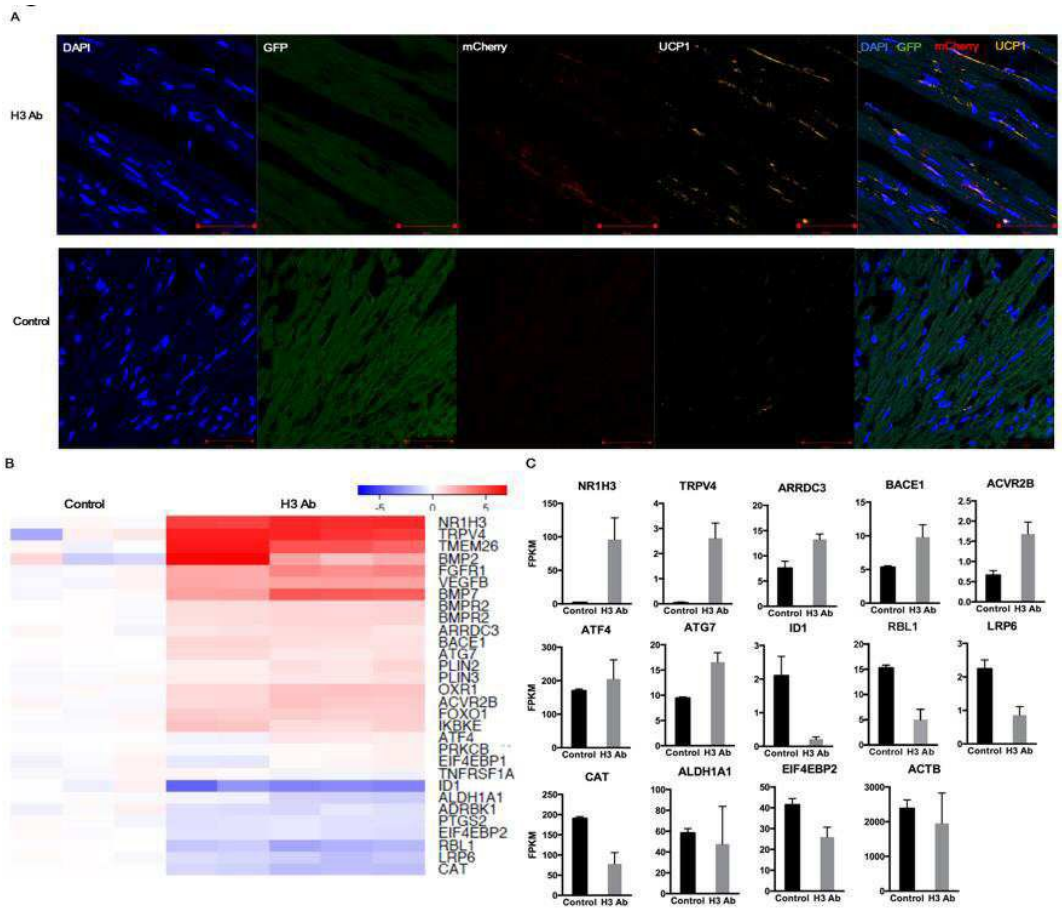
도면5b


B
Brown adipocyte
Geneal adipocyte
H3 Ab
10uM MIT+DIT
mRNA relative expression
UCP1
PGC1A
PRDM16
AP2
adipoQ
PPARG
C
T3
T4
Tg
MIT
DIT
IYD
Thyroid gland
Brown adipocyte
Stem cell

도면6


Spleen
Liver
Heart
Brain
Heart
Brain
H3 Ab
Nucleotide Substitution per 100 residues
Nucleotide Substitution per 100 residues

도면7


A
DAPI
GFP
mCherry
UCP1
DAPI GFP mCherry UCP1
H3 Ab
Control
B
Control
H3 Ab
NR1H3
TRPV4
TMEM26
BMP2
FGFR1
VEGFB
BMP7
BMPR2
BMPR2
ARRDC3
BACE1
ATG7
PLIN2
PLIN3
OXR1
ACVR2B
FOXO1
IKBKE
ATF4
PRKCB
EIF4EBP1
TNFRSF1A
ID1
ALDH1A1
ADRBK1
PTGS2
EIF4EBP2
RBL1
LRP6
CAT
C
NR1H3
TRPV4
ARRDC3
BACE1
ACVR2B
ATF4
ATG7
ID1
RBL1
LRP6
CAT
ALDH1A1
EIF4EBP2
ACTB
FPKM
Control H3 Ab

도면8

H3 antibody 738bp, 246 amino acids

ATGGCACAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCGTGAGACTCTCCTGTGCA
GCCTCTGGATTCACCTTCAGAAACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG
GCAGTGATATGGCATGATGCAAGTAATAAATACCATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGAC
AACTCCAAGGACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTGTGAGAGGTGAGGACACGGCTGTGTATTTCTGTGCGAAA
GATCAGTGGCTGGGACACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGCGGCGGC
TCTGGCGGAGGTGGCAGCGGCGGTGGCGGATCTGCCCTGACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTCTCCTGGACAG
TCAGTCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCTGGTTCCAACAGCAC
CCAGGCAAAGCCCCCAAACTCATGATTTATGAGGTCACTAAGCGGCCCCCAGGGGTCACTGATCGCTTCTCTGGC
TCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCGTCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTGATTATTATTGCAGT
TCATATGCAGGCAGCAACAATTATGTGGTTTTCGGCGGAGGGACCCAGCTCACCGTTTTAGgT

*Heavy chain: 1-366 bp
Linker: 367-408 bp
Light chain: 409-738 bp

*CDR regions for heavy chain
CDR1:
GGATTCACCTTCAGAAACTATGGC
G F T F R N Y G
CDR2:
ATATGGCATGATGCAAGTAATAAA
I W H D A S N K
CDR3:
GCGAAAGATCAGTGGCTGGGACACTACGGTATGGACGTC
A K D Q W L G H Y G M D V

*CDR regions for light chain
CDR1:
AGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTAT
S S D V G G Y N Y
CDR2:
GAGGTCACT
E V T
CDR3:
AGTTCATATGCAGGCAGCAACAATTATGTGGTT
S S Y A G S N N Y V V

서 열 목 록

<110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
THE ASAN FOUNDATION

<120> Antibody for inducing brown adipocyte differentiation and composition for preventing or treating metabolic syndromes containing the same

<130> ADP-2019-0104

<160> 10

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Arg Asn Tyr Gly

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 2

Ile Trp His Asp Ala Ser Asn Lys

1 5

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 3

Ala Lys Asp Gln Trp Leu Gly His Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 4

Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr

1 5

<210> 5

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 5

Glu Val Thr

1

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 6

Ser Ser Tyr Ala Gly Ser Asn Asn Tyr Val Val

1 5 10

<210> 7

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain

<400> 7

Met Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro

1 5 10 15

Gly Arg Ser Val Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg

20 25 30

Asn Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Val Ala Val Ile Trp His Asp Ala Ser Asn Lys Tyr His Ala Asp

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asp Thr

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Val Arg Gly Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

Phe Cys Ala Lys Asp Gln Trp Leu Gly His Tyr Gly Met Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 8

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain

<400> 8

Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val

1 5 10 15

Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr

20 25 30

Val Ser Trp Phe Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile

35 40 45

Tyr Glu Val Thr Lys Arg Pro Pro Gly Val Thr Asp Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu Gln Ala

65 70 75 80

Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Ala Gly Ser Asn Asn

85 90 95

Tyr Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly

100 105 110

<210> 9

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain

<400> 9

atggcacagg tgcagctggt ggagactggg ggaggcgtgg tccagcctgg gaggtccgtg 60

agactctcct gtgcagcctc tggattcacc ttcagaaact atggcatgca ctgggtccgc 120

caggctccag gcaaggggct ggagtgggtg gcagtgatat ggcatgatgc aagtaataaa 180

taccatgcag actccgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaactc caaggacacg 240

ctgtatctgc aaatgaacag tgtgagaggt gaggacacgg ctgtgtattt ctgtgcgaaa 300

gatcagtggc tgggacacta cggtatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 360

tcctca 366

<210> 10

<211> 330

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain

<400> 10

gccctgactc agcctccctc cgcgtccggg tctcctggac agtcagtcac catctcctgc 60

actggaacca gcagtgacgt tggtggttat aactatgtct cctggttcca acagcaccca 120

ggcaaagccc ccaaactcat gatttatgag gtcactaagc ggcccccagg ggtcactgat 180

cgcttctctg gctccaagtc tggcaacacg gcctccctga ccgtctctgg gctccaggct 240

gaggatgagg ctgattatta ttgcagttca tatgcaggca gcaacaatta tgtggttttc 300

ggcggaggga cccagctcac cgttttaggt 330