

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

WO 2011/031063 A2

PCT

(43) 국제공개일
2011년 3월 17일 (17.03.2011)

- (51) 국제특허분류:
A61K 39/395 (2006.01) A61P 3/06 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01) A61P 3/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2010/006116
- (22) 국제출원일: 2010년 9월 9일 (09.09.2010)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2009-0084844 2009년 9월 9일 (09.09.2009) KR
10-2010-0088261 2010년 9월 9일 (09.09.2010) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 울산대학교 산학협력단 (UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION) [KR/KR]; 울산광역시 남구 무거 2 동 산 29 번지, 680-749 Ulsan (KR).
- (72) 발명자; 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 유리나 (YU, Ri Na) [KR/KR]; 울산광역시 남구 신정동 대공원파크폴리스 #101-1703, 680-010 Ulsan (KR). 김병삼 (KIM, Byung-Sam) [KR/KR]; 울산광역시 남구 신정 2 동 현대아이파크아파트 #105-501, 680-792 Ulsan (KR). 김추숙 (KIM, Chu-Sook) [KR/KR]; 울산광역시 남구 신정 2

동 현대아이파크아파트 #105-801, 680-792 Ulsan (KR).

(74) 대리인: 위병갑 (WIE, Byoung-Gab) 등; 서울특별시 중구 서소문동 120-23 부영빌딩 6층, 100-764 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

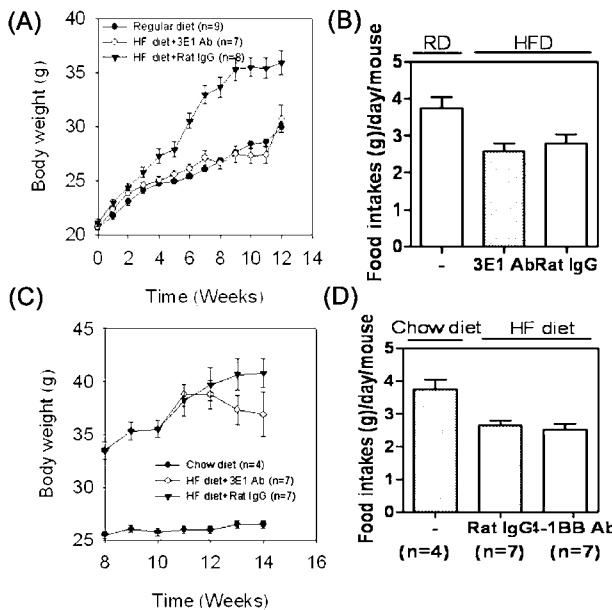
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING METABOLIC DISORDERS, CONTAINING THE ANTI-4-1BB ANTIBODY

(54) 발명의 명칭 : 항 4-1BB 항체를 포함하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물

[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention relates to a novel use of anti-4-1BB antibody, and more particularly, to a composition for preventing or treating metabolic disorders that contains an agonistic anti-4-1BB antibody having specificity to 4-1BB molecules, as an active ingredient. When administered to an induced-obesity animal model, the anti-4-1BB antibody according to the present invention has the effects of inducing weight loss and a reduction in the weight of *in vivo* adipose tissue, has the effects of improving disabilities due to insulin resistance and impaired glucose tolerance caused by obesity, and exhibits superior effects in lowering total serum cholesterol, triglyceride and free fatty acid levels, and the composition of the present invention containing the anti-4-1BB antibody can therefore be used as a pharmaceutical composition or a composition for functional foods for preventing, treating, or improving metabolic disorders such as obesity involving lipid metabolism disorders, type 2 diabetes, hyperlipidemia, hypercholesterolemia, arteriosclerosis, and fatty liver.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2011/031063 A2



규칙 4.17 에 의한 선언서:

— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

본 발명은 항 4-1BB 항체의 신규한 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 본 발명은 4-1BB 분자에 특이성을 갖는 항진성 항 4-1BB 항체를 유효성분으로 포함하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 항 4-1BB 항체는 비만이 유도된 동물모델에 투여하였을 경우, 체중 감소 및 체내 지방조직의 중량을 감소시키는 효과가 있고, 비만으로 유발되는 인슐린 저항성 및 내당증 장애를 개선하는 효과가 있을 뿐만 아니라 혈중 총 콜레스테롤 함량, 중성지방 함량 및 유리 지방산의 함량비를 감소시키는 효과가 우수하므로 항 4-1BB 항체를 포함하는 본 발명의 조성물은 지질대사 이상을 수반하는 비만, 제 2형 당뇨병, 고지혈증, 고콜레스테롤증, 동맥경화증 및 지방간과 같은 대사성 질환을 예방, 치료 또는 개선할 수 있는 약학적 조성물 및 기능성 식품 조성물로 사용할 수 있는 효과가 있다.

명세서

발명의 명칭: 항 4-1BB 항체를 포함하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 항 4-1BB 항체에 대한 신규한 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는, 항진성 항 4-1BB 항체를 포함하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 경제발전에 따른 생활수준의 향상으로 대사성 질환의 주원인이 되는 비만에 속하는 현대인들이 급속히 증가하고 있다. 최근 미국 통계에 의하면 미국 국민의 1/3, 어린이의 20%가 비만 환자로 보고되고 있고, 제2형 당뇨병 환자의 70% 이상이 비만에 속하며 이러한 비만으로부터 고혈압, 고지혈증 및 일부 암 등의 다른 질병이 발병하는 위험도 증가하는 것으로 보고되고 있다. 또한, 비만한 사람에게서 탄수화물의 대사이상 및 인슐린비의존형 당뇨병(제2형 당뇨)과 같은 질병이 함께 발병하는 확률이 높을 뿐만 아니라 체중증가가 기존의 당뇨병 상태를 악화시킨다는 사실도 보고된 바 있다.

[4] 또한, 많은 연구를 통해서 비만이 내당 능력 장애 및 당뇨병에 선행한다는 사실이 관찰되었는데(Carey VJ. et al., Body fat distribution and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women, The nurses' health study, *Am J Epidemiol*, 145, pp.614-619, 1997), 프라밍함(Framingham)의 연구에서는 비만한 사람에게서 내당 능력 장애가 빈발함이 관찰되었고, 대부분의 연구들에서 내당 능력 장애를 갖는 비만한 사람들이 인슐린비의존형 당뇨병 발생의 고위험 군임이 관찰되었다.

[5] 비만증에 있어서, 탄수화물 대사의 경우 당뇨병을 진단하는 방법으로서 일정량의 포도당을 먹기 전 후의 혈당을 측정하는 경부 당부하 검사에서 혈당 반응은 정상적으로 나타나지만 인슐린 분비 반응이 정상보다 높게 나타나는 인슐린 저항성의 양상을 보이고 있고, 인슐린 저항성은 비만 및 인슐린비의존형 당뇨병 환자의 주된 증상의 하나로 비만 초기부터 관찰되고 있다. 따라서 비만증에서 어떤 기전에 의해 인슐린의 작용이 감소되는지에 관해서는 다양한 가설이 제시되고 있으나 아직 확실히 밝혀진 바는 없으며, 단지 인슐린 작용에 관련된 인슐린 수용체, 포도당 수송체, 당원 합성과 당 산화에 관련된 효소들 등의 기능 감소가 비만 시 관찰되지만 비만에 의한 이차적인 현상으로 이해되고 있고(Golay A. et al., Obesity and NIDDM, the retrograde regulation concept, *Diabetes Rev*, 5, pp.69-82, 1997), 최근 발표된 보고서들에 의하면 지방세포에서 분비되는 인자들 또는 대사전달자(metabolic messenger)들이 근육 및 간에서

인슐린의 작용을 억제하는 것으로 밝혀지고 있으며, 이러한 인자(factor)로서 가장 널리 인정받고 있는 것이 지방조직에 저장된 중성지방으로부터 가수분해되어 나오는 유리 지방산(FFA)이다. 이 외에도 지방세포에서 분비되는 TNF- 및 렙틴(leptin) 등도 비만에서 인슐린 저항성의 원인으로 제시되고 있다(Hotamisligil GS. et al., Tumor necrosis factor α , a key component of the obesity-diabetes link, *Diabetes*, 43, pp.1271-1278, 1994).

- [6] 또한, 비만증에서 에너지 대사는 지질이 주를 이루고 있으며 지질 분해와 지질 합성이 모두 증가되는 형태로 나타난다. 지질 분해의 증가와 그에 따른 유리 지방산의 이용 증가는 비만, 특히 복부 비만의 특징이며, 지방 용적과 지질 산화간에 높은 상관관계가 관찰되어 지방 용적의 증가가 혈중 유리 지방산 및 지질 산화 증가의 원인으로 간주되고 있다.
- [7] 따라서 비만 및 비만으로 유도되는 대사성 질환들은 앞서 기술한 바와 같이 세포 내에서 매우 복잡한 메카니즘에 의해 유발되는 것인 만큼, 상기 메카니즘을 보다 효율적으로 조절함으로써 대사성 질환을 정확히 진단하고 효과적으로 예방 및 치료할 수 있는 기술들의 개발이 필요하다.
- [8] 한편, 4-1BB는 면역 반응에서 T세포 및 항원 제시 세포의 표면에 발현되는 공동자극(costimulatory) 분자의 일종으로서(Goodwin et al., *Eur. J. Immunol.*, 23, 2631, 1993), 세포막 단백질인 종양괴사인자(TNF) 수용체군의 한 종류로 알려졌다(Mallett and Barclay, *Immunol.* 220-222, 1991). 이러한 4-1BB는 55 kDa의 호모다이머(homodimer)로서, ConA, 피토헤마글루티닌(PHA)과 이오노마이신, 또는 항-CD3 등으로 활성화된 쥐의 T세포주, 흉선세포 및 성숙 T세포 등에서 다양하게 발현되는 것으로 알려져 있다(Kwon, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1963-1967, 1989; Pollok, et al., *J. Immunol.* 150, 771-781, 1993). 또한, 4-1BB의 일부가 세포 안쪽에 존재하면서 프로테인 키나제의 한 종류인 p56lck와 결합되어 있는 것으로 보아, 4-1BB를 통하여 세포 밖의 신호가 세포 안으로 전달되는 것으로 추측되고 있다(Kim, et al., *J. Immunol.*, 151, 1255-1262, 1993).
- [9] 따라서 최근에는 4-1BB의 조절을 통해 여러 질병들을 예방 또는 치료하기 위한 연구들이 계속되고 있는데, 특히 항진성 4-1BB에 대한 항체가 암을 치료할 수 있는 효과가 있다는 보고가 발표되면서 4-1BB 항체에 대한 연구들이 급증하고 있다. 항진성 4-1BB의 항체를 이용한 암 치료 효과는 자연 살해 세포와 CD8+ T세포 활성화 및 인터페론-감마(IFN- γ)의 생산을 증가시킴으로써 매개되는 것으로 알려져 있고(Xu D et al., *Int. J. Cancer*, 109, pp: 499-506, 2004; Ito F et al., *Cancer Res.*, 64, pp: 8411-8419, 2004; Sun Y et al., *J. Immunol.*, 168, pp: 1457-1465, 2002; Ju SA et al., *Immunol. Cell Biol.*, 83, pp: 344-351, 2005), 항-4-1BB 항체의 단독투여로는 흑색종(melanoma)의 성장을 완전하게 억제하지는 못한다는 결과가 보고된 바 있다(Ju SA et al., *Immunol. Cell Biol.*, 83, pp: 344-351, 2005).
- [10] 이 외에도 4-1BB에 대한 항체를 이용하여 각종 질환의 원인 및 치료를 위한

많은 연구들이 진행되고 있지만, 아직까지 항 4-1BB 항체가 비만 및 비만으로 유도되는 대사성 질환을 예방 또는 치료할 수 있다는 효과에 대해서는 밝혀진 바가 전혀 없다.

[11]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[12] 이에 본 발명자들은 비만 및 비만으로 유도되는 대사성 질환을 효과적으로 예방하고 치료할 수 있는 새로운 치료제를 연구하던 중, 항진성 항 4-1BB 항체를 비만 동물 모델에 투여하였을 경우, 체중 및 체지방이 감소되고, 내당 및 인슐린 저항성이 억제되며, 혈중 총 콜레스테롤, 중성지방 및 유리 지방산의 함량이 감소되는 결과를 통해 항진성 항 4-1BB 항체 투여시 비만 및 비만으로 유도되는 대사성 질환을 예방 및 치료할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[13] 따라서 본 발명의 목적은 항-4-1BB(CD 137) 항체를 유효성분으로 포함하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[14] 또한, 본 발명의 다른 목적은 항-4-1BB(CD 137) 항체를 유효성분으로 포함하는 대사성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

[15] 또한, 본 발명의 다른 목적은 항-4-1BB(CD 137) 항체를 이를 필요로 하는 개체에게 치료상 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는 대사성 질환의 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[16] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 항-4-1BB(CD 137) 항체를 유효성분으로 포함하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[17] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 대사성 질환은 비만, 제2형 당뇨병, 고지혈증, 고콜레스테롤증, 동맥경화증 및 지방간으로 이루어진 군중에서 선택될 수 있다.

[18] 또한, 본 발명은 항-4-1BB(CD 137) 항체를 유효성분으로 포함하는 대사성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[19] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 대사성 질환은 비만, 제2형 당뇨병, 고지혈증, 고콜레스테롤증, 동맥경화증 및 지방간으로 이루어진 군중에서 선택될 수 있다.

[20] 또한 본 발명은 항-4-1BB(CD 137) 항체를 이를 필요로 하는 개체에게 치료상 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는 대사성 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[21] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 항-4-1BB(CD 137) 항체는 상기 항체가 투여된 개체 내에서 체내 지방조직의 중량 감소 효과, 인슐린 저항성 및 내당장애 개선 효과, 염증성 사이토카인의 생성 및 분비 억제 효과, 항염증성

사이토카인의 생성 및 분비 촉진 효과, 또는 면역세포의 확장 및 활성화 효과를 갖는 것일 수 있다.

[22]

발명의 효과

[23] 본 발명에 따른 항 4-1BB 항체는 비만이 유도된 동물모델에 투여하였을 경우, 체중 감소 및 체내 지방조직의 중량을 감소시키는 효과가 있고, 비만으로 유발되는 인슐린 저항성 및 내당능 장애를 개선하는 효과가 있을 뿐만 아니라 혈중 총 콜레스테롤 함량, 중성지방 함량 및 유리 지방산의 함량을 감소시키는 효과가 우수하므로 항 4-1BB 항체를 포함하는 본 발명의 조성물은 지질대사의 이상으로 발생할 수 있는 비만, 제2형 당뇨병, 고지혈증, 고콜레스테롤증, 동맥경화증 및 지방간과 같은 대사성 질환을 예방, 치료 또는 개선할 수 있는 약학적 조성물 및 기능성 식품 조성물로 사용할 수 있는 효과가 있다.

[24]

도면의 간단한 설명

[25] 도 1a는 고지방식이 및 일반식이와 함께 항-4-1BB 항체 또는 IgG 항체를 투여한 마우스를 대상으로 사육 시간별 체중의 변화를 나타낸 그래프이다.

[26] 도 1b는 고지방식이 및 일반식이와 함께 항-4-1BB 항체 또는 IgG 항체를 투여한 마우스를 대상으로 각각의 먹이 섭취량을 비교하여 나타낸 그래프이다.

[27] 도 1c는 고지방식으로 비만을 유도한 마우스를 대상으로 항-4-1BB 항체 또는 IgG 항체를 투여한 마우스 및 일반식이를 투여한 대조군 마우스의 시간별 체중의 변화를 나타낸 그래프이다.

[28] 도 1d는 고지방식으로 비만을 유도한 마우스를 대상으로 항-4-1BB 항체 또는 IgG 항체를 투여한 마우스 및 일반식이를 투여한 대조군 마우스를 대상으로 각각의 먹이 섭취량을 비교하여 나타낸 그래프이다.

[29] 도 2a는 고지방식으로 비만을 유도한 마우스를 대상으로 항-4-1BB 항체 또는 IgG 항체를 투여한 마우스군 및 일반식이만을 투여한 대조군 각각에 대하여 16시간 공복 후의 시간별 혈중 글루코스의 양(내당능 테스트)을 측정된 결과를 나타낸 것이다.

[30] 도 2b는 고지방식으로 비만을 유도한 마우스를 대상으로 항-4-1BB 항체 또는 IgG 항체를 투여한 마우스군 및 일반식이만을 투여한 대조군 각각에 대하여 6시간의 공복 후, 인슐린을 투여한 다음 혈중 글루코스의 양(인슐린 저항성 테스트)을 측정된 결과를 나타낸 것이다.

[31] 도 3a는 고지방식으로 비만이 유도된 마우스에 대하여 항-4-1BB 항체 또는 IgG 항체를 투여한 마우스 군의 지방간 형성 정도를 카메라를 통해 관찰한 사진이다.

[32] 도 3b는 고지방식으로 비만이 유도된 마우스에 대하여 항-4-1BB 항체 또는 IgG 항체를 투여한 마우스 군에서 간 조직에 존재하는 중성지방의 함량을 비교하여 나타낸 그래프이다.

- [33] 도 4는 고지방식이로 비만이 유도된 마우스에 대하여 항-4-1BB 항체 또는 IgG 항체를 투여한 마우스 군 각각의 혈중 총 콜레스테롤, 글루코스, 중성지방 및 유리지방산의 함량을 비교하여 나타낸 그래프이다.
- [34] 도 5는 고지방식이로 비만이 유도된 마우스에 대하여 항-4-1BB 항체 또는 IgG 항체를 투여한 마우스 군 각각의 장간막지방, 정소주변지방, 신장주변지방 및 피하지방조직 중량을 비교하여 나타낸 그래프이다.
- [35] 도 6은 항-4-1BB 항체에 의한 자극에 의해 지방조직 및 간 조직에서 면역 세포의 침윤 및 면역 기관의 확장을 나타낸 것으로서, 6a는 항-4-1BB 항체가 투여된 마우스의 지방조직 및 간의 면역학적 분석 결과를 나타낸 사진이며,
- [36] 도 6b는 항-4-1BB 항체가 투여된 마우스 및 대조군의 지방조직 및 간의 면역 세포 프로파일 결과를 각각 나타낸 그래프이며,
- [37] 도 6c는 항-4-1BB 항체가 투여된 마우스 및 대조군의 흉선(thymus), 비장(spleen) 및 MLN의 중량을 측정한 결과를 각각 비교한 그래프이다.
- [38] 도 7은 항-4-1BB 항체가 투여에 따른 사이토카인의 프로파일을 나타낸 결과로서, 7a는 항-4-1BB 항체가 투여시 혈장, 지방조직 및 간에서 인터페론 감마의 분비량을 비교하여 측정한 결과를 나타낸 것이고,
- [39] 도 7b는 지방 조직에서 TNF-a, IL-6, MCP-1, IL-4 및 IL-10의 분비량을 비교하여 측정한 결과를 나타낸 것이며,
- [40] 도 7c 내지 7e는 간에서 TNF-a, IL-6, MCP-1의 분비량을, 혈장에서 r-GTP 및 아디포넥틴의 분비량을 측정한 결과를 나타낸 것이고,
- [41] 도 7f는 지방조직 및 간에서 말론디알데히드 및 COX-2의 발현정도를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[42]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [43] 본 발명은 항-4-1BB(CD 137) 항체를 유효성분으로 포함하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공함에 그 특징에 있다.
- [44] 4-1BB는 CD 137이라고도 불리는 활성화된 쥐의 T세포에서 발현된 단백질로 처음 발견되었고(Kwon, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2896-2900, 1987; Kwon and Weissman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1963-1967, 1989), 세포막 단백질인 종양괴사인자(TNF) 수용체 군의 한 종류로 밝혀진 바 있다(Mallett and Barclay, *Immunol. Today* 12, 220-222 (1991)). 최근에는 활성화된 사람 말초 T세포의 cDNA 라이브러리로부터 사람의 4-1BB를 암호화하는 유전자가 분리되었는데, 이로부터 밝혀진 아미노산 서열은 쥐의 4-1BB와 60% 동일성을 가지며, 세포질 영역에서 높은 보존율을 갖는 것으로 나타났다. 또한, 4-1BB는 마크로파지 및 활성화된 B세포와 같은 항원제시 세포의 표면에 발현되는 결합친화도가 높은 리간드(4-1BBL)에 결합하여, 4-1BB와 그의 리간드의 상호작용으로 공동자극 신호를 발생시킴으로써 T세포의 활성화와 성장을

유도한다는 사실이 밝혀진 바 있다(Goodwin, R. G. et al., *Eur. J. Immunol.*, 23, 2631-2641, 1993). 따라서 이러한 결과를 통해 T세포-매개 면역반응의 조절에 있어서 4-1BB가 중요한 역할을 한다는 것이 알려지게 되었고, 이에 T세포 상에 발현되는 4-1BB를 선택적으로 표적화하여 면역질환을 치료하고자 하는 노력들이 계속되고 있다.

- [45] 한편, 본 발명에서는 4-1BB를 선택적으로 표적화할 수 있는 항진성(agonist) 항 4-1BB 항체를 비만이 유도된 마우스에 투여하였을 경우, 비만, 당뇨병 및 지방간 등의 대사성 질환을 예방 또는 치료하는 효과가 있음을 최초로 발견하였다.
- [46] 보다 구체적으로 본 발명의 일실시에 따르면, 고지방식을 투여하여 비만을 유도한 마우스 군 및 일반식을 투여한 대조군을 대상으로 항 4-1BB 항체에 대한 항비만 효과를 관찰한 결과, 항 4-1BB 항체를 투여한 군이 IgG 항체를 투여한 대조군에 비해 체중이 현저히 감소되는 것을 확인할 수 있었고(도 1c 참조), 항4-1BB 항체를 고지방식과 함께 사육 초기부터 투여하였을 경우, 체중의 변화 정도는 일반식을 투여한 군과 거의 유사한 것으로 나타났다(도 1a 참조). 또한, 비만이 유도된 마우스를 대상으로 체내 지방조직, 특히 복부 지방조직의 중량 변화를 분석한 결과, 항 4-1BB 항체를 투여한 군이 IgG 항체를 투여한 대조군에 비해 지방조직의 중량이 월등히 감소된 것으로 나타났다(도 5 참조). 따라서 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 항 4-1BB 항체 투여는 비만을 예방적인 차원에서 방지할 수 있는 효과가 있을 뿐만 아니라 이미 비만이 유도된 상태에서도 체중을 감소시키는 효과가 우수함을 알 수 있었다. 따라서 본 발명의 항진성 항-4-1BB(CD 137) 항체는 비만을 효과적으로 억제할 수 있는 특징이 있다.
- [47] 또한, 본 발명의 항진성 항-4-1BB(CD 137) 항체는 비만으로 유도된 당내성 및 인슐린 내성을 감소시킬 수 있는 특징이 있다.
- [48] 일반적으로 당뇨병은 비만과 마찬가지로 동물성 식품과 지방질 섭취의 증가, 신체 활동량의 감소 등 다양한 원인으로 발병되고 있으며, 크게 인슐린 의존형(Insulin-Dependent Diabetes Mellitus; 제1형 당뇨) 및 인슐린 비의존형(Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus; 제2형 당뇨)의 2 가지로 구분되는데, 제1형 당뇨병은 혈액 내의 글루코스 조절 호르몬인 인슐린(insulin)의 분비 결핍으로 야기되며, 제2형 당뇨병은 주로 40대 이후에 발병되며, 우리나라 당뇨병 환자의 대부분을 차지한다. 제2형 당뇨병은 제1형과는 달리 성인형 당뇨병이라고도 불리며, 몸 안에서 과도하게 축적된 체지방에 의해 발병되는 것으로 밝혀진 바 있다. 특히 제2형 당뇨병 환자의 경우, 인슐린의 분비 장애 및 표적세포에서 인슐린 작용의 결함(인슐린 저항성)이 모두 관찰된다.
- [49] 따라서 당뇨병 치료에 있어서, 혈당치를 가능한 정상치에 가깝게 조절하고, 공복혈당과 함께 식후의 혈당을 조절하는 것이 당뇨병 증세의 개선과 합병증의 예방 및 치료에 있어서 매우 중요하다(Jenkins, D.J.A. Wolever et al., *Starchy foods*

and glycemic index, *Diabetes Care*, 11, 149-159, 1988).

- [50] 이에 본 발명자들은 본 발명의 항 4-1BB 항체를 비만으로 발생하는 제2형 당뇨병을 예방 또는 치료하는데 사용할 수 있는지를 조사한 결과, 본 발명의 일실시예에 있어서, 비만이 유도된 마우스를 대상으로 항-4-1BB 항체를 투여한 군이 IgG 항체를 투여한 대조군에 비해 혈중 글루코스의 양이 감소되는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 항-4-1BB 항체를 투여한 군은 항체 투여 후 시간이 지날수록 혈중 글루코스의 양이 정상치에 가깝게 감소되는 것을 확인할 수 있었다(도 2a 및 2b 참조). 따라서 본 발명의 항-4-1BB(CD 137) 항체는 비만으로 유도되는 인슐린 저항성 및 내당능 장애를 개선하는 효과가 있으므로 제2형 당뇨병을 예방 또는 치료하는데 사용할 수 있다.
- [51] 또한, 본 발명의 항-4-1BB(CD 137) 항체는 비만으로 유도되는 지방간의 형성을 억제할 수 있고, 혈중 총 콜레스테롤, 중성지방 및 유리 지방산의 함량을 감소시킬 수 있는 특징이 있다.
- [52] 본 발명의 일실시예에 따르면, 고지방식이로 비만을 유도한 마우스에 항 4-1BB 항체 또는 IgG 항체를 각각 투여한 다음, 상기 마우스의 지방간 형성을 분석한 결과, 항 4-1BB 항체를 투여한 군이 대조군에 비해 지방간의 형성이 억제된 것으로 나타났으며(도 3a 및 3b 참조), 혈중 총 콜레스테롤, 중성지방 및 유리 지방산의 함량도 대조군에 비해 월등히 감소된 것으로 나타났다(도 4 참조).
- [53] 따라서 본 발명의 항 4-1BB(CD 137) 항체는 고지혈증, 고콜레스테롤증, 동맥경화증 및 지방간과 같은 지질대사의 조절 이상으로 발생하는 질환들을 예방 또는 치료하는데 사용할 수 있다.
- [54] 나아가, 본 발명의 항-4-1BB(CD 137) 항체는 비만으로 유도된 지방조직 및 간 조직에서 면역세포인 T 세포의 활성을 촉진시키고 염증과 관련된 사이토카인 및 케모카인의 발현을 조절할 수 있는 특징이 있다.
- [55] 즉, 본 발명의 일실시예에 따르면, 고지방식이를 섭취시켜 비만이 유도된 마우스를 대상으로 항 4-1BB 항체를 투여한 실험군과 항 4-1BB 항체 대신 쥐의 IgG 항체를 투여한 대조군을 대상으로 항 4-1BB 항체가 염증에 미치는 영향을 조사한 결과, 비만이 유도된 마우스를 대상으로 항 4-1BB 항체를 처리한 실험군의 경우 대조군에 비해 지방 조직 및 간에서 면역 세포의 침윤이 증가한 것으로 나타났고, 항 4-1BB 항체를 처리하였을 경우 T 세포 내에서 CD44+ 또는 CD62L- 세포가 많이 존재하는 것으로 나타났다. 또한, 실험군의 경우 대조군에 비해 CD8+/CD44+와 CD8+/CD62L-의 세포수가 월등히 증가한 것으로 나타났는데, 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 침윤된 CD8+ T 세포의 경우 대부분 활성상태를 갖는다는 사실을 감안하여 본 발명에 따른 항 4-1BB 항체를 처리하였을 경우, 침윤된 CD8+ T 세포가 증가한다는 사실을 통해 T 세포가 활성화됨을 알 수 있었다(실시예 6 참조).
- [56] 또한, 본 발명의 다른 일실시예에 따르면, 고지방식이로 비만이 유도된 마우스에 항 4-1BB 항체 또는 IgG 항체를 각각 투여한 군과 저지방식이를 공급한

마우스를 대상으로, 지방 조직과 간으로 활성화된 CD8+ T세포들의 활성화로 염증반응이 개선될 수 있는지를 조사한 결과, 지방조직에서는 항 4-1BB 항체를 투여한 군이 대조군들에 비해 면역반응을 조절하는 IL-4와 IL-10의 수치가 증가한 것으로 나타났고, 동맥경화를 유발할 수 있는 MCP-1의 수치도 감소한 것으로 나타났다(도 7b 참조). 또한 간에서는 항 4-1BB 항체를 투여한 군이 대조군들에 비해 염증반응을 촉진하는 TNF-a의 수치가 유의적으로 감소하였으며, 혈장에서는 염증을 억제하며 지방과 당대사에 관여하여 발현 수준이 감소할 경우 심장병과 당뇨병의 발병원인이 되는 아디포넥틴의 수치가 증가하는 것으로 나타났다(도 7c 내지 7e 참조). 또한 산화와 염증반응의 마커로 알려진 MDA(malondialdehyde)와 COX-2의 발현은 항 4-1BB 항체를 투여한 군이 대조군들에 비해 눈에 띄게 낮은 것으로 나타났다(도 7f 참조).

- [57] 따라서 본 발명의 항 4-1BB 항체는 면역세포의 확장 및 활성을 촉진시키고 동시에 염증성 사이토카인의 양을 감소시키는 작용을 통해 비만을 예방 또는 치료할 수 있으며 나아가 지방간을 예방 또는 치료하는데 사용할 수 있다는 사실을 알 수 있었다.
- [58] 그러므로 본 발명은 항 4-1BB(CD 137) 항체를 유효성분으로 포함하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공할 수 있다.
- [59] 또한, 상기 본 발명의 조성물은 대사성 질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물로 사용될 수 있다.
- [60] 본 발명에서 상기항체란 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미하는 것으로서, 본 발명의 조성물에 포함되는 상기 항 4-1BB 항체는 4-1BB 펩타이드를 특이적으로 인지하는 항체이며, 다클론 항체 및 단클론 항체를 모두 사용할 수 있다. 바람직하게는 단클론 항체를 사용할 수 있다.
- [61] 또한, 본 발명에서 사용된 상기 항 4-1BB 항체는 당업계에 널리 공지된 기술로 제조된 것이라면 모두 사용 가능하며(Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N.Y., Second, 1998 and Third, 2000 Edition), 특히 단클론 항체는 당업계에 널리 공지된 융합 방법(fusion method)(Kohler 및 Milstein, *European Journal of Immunology*, 6:511-519, 1976), 재조합 DNA 방법(미국특허 제4,816,567호) 또는 파지 항체 라이브러리(Clackson et al, *Nature*, 352:624-628, 1991; Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 다클론 항체는 4-1BB 펩타이드를 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있다. 예컨대, 상기 펩타이드를 CFA(Complete Freund's Adjuvant)와 함께 염소나 토끼에 피하주사로 주입하고, 부스터(booster)를 CFA와 함께 피하 또는 복강 내로 주입함으로써 제조될 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소 토끼 이외에 양, 원숭이, 말, 돼지, 소 개 등의 임의의 동물 종 숙주로부터 제조 가능하다. 본 발명의 일실시예에서는 마우스로부터 수득한 항 4-1BB 단클론 항체를 사용하였다.

- [62] 본 명세서에서 상기대사성 질환(또는 대사증후군)은 체내의 에너지 대사 과정의 이상으로 야기되는 질환을 일컫는 용어로서, 지방세포의 분화 및 지질대사의 조절이상으로 야기되는 질환을 말하며 비만으로 야기될 수 있다. 상기 대사성 질환으로는 이에 제한되지는 않으나, 비만, 제2형 당뇨병, 고지혈증, 고콜레스테롤증, 동맥경화증 및 지방간 등이 포함될 수 있다.
- [63] 본 발명에 따른 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 약학적으로 유효한 양의 항-4-1BB 항체를 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기에서 약학적으로 유효한 양이란 대사성 질환을 예방, 개선 및 치료하기에 충분한 양을 말한다.
- [64] 본 발명에 따른 항-4-1BB 항체의 약학적으로 유효한 양은 0.5 ~ 100 mg/day/체중kg, 바람직하게는 0.5 ~ 5 mg/day/체중kg이다. 그러나 상기 약학적으로 유효한 양은 대사성 질환의 증상 정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있다.
- [65] 상기 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 약학적으로 허용되는 담체로는 예를 들면, 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등과 같은 경구 투여용 담체 및 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등과 같은 비경구 투여용 담체 등이 있으며 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995). 본 발명에 따른 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 적합한 형태로 제형화 될 수 있다. 즉, 본 발명의 약학적 조성물은 공지의 방법에 따라 다양한 비경구 또는 경구 투여용 형태로 제조될 수 있으며, 비경구 투여용 제형의 대표적인 것으로는 주사용 제형으로 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하다. 주사용 제형은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제를 사용하여 당업계에 공지된 기술에 따라 제조할 수 있다. 예를 들면, 각 성분을 식염수 또는 완충액에 용해시켜 주사용으로 제형화될 수 있다. 또한, 경구 투여용 제형으로는, 이에 한정되지는 않으나, 분말, 과립, 정제, 환약 및 캡슐 등이 있다.
- [66] 상기와 같은 방법으로 제형화된 약학적 조성물은 유효량으로 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다. 상기에서 '유효량'이란 환자에게 투여하였을 때, 예방 또는 치료 효과를 나타내는 양을 말한다. 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여량은 투여 경로, 투여 대상, 연령, 성별, 체중,

개인차 및 질병 상태에 따라 적절히 선택할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있으나, 바람직하게는 1~10000/체중kg/day, 더욱 바람직하게는 10~1000/체중kg/day의 유효용량으로 하루에 수회 반복 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 대사성 질환을 예방, 개선 또는 치료하는 효과를 가지는 공지의 화합물과 병행하여 투여할 수도 있다.

[67] 따라서 본 발명은 항-4-1BB 항체를 유효성분으로 함유하는 조성물을 포함하는 대사성 질환의 예방 및 치료용 약제를 제공할 수 있으며, 또한 본 발명은 항-4-1BB(CD 137) 항체를 이를 필요로 하는 개체에 치료상 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는 대사성 질환의 예방 또는 치료방법을 제공할 수 있다.

[68] 이는 본 발명에 따른 항-4-1BB(CD 137) 항체의 경우, 상기 항체가 투여된 개체 내에서 항-4-1BB의 투여에 의해 체내 지방조직의 중량 감소 효과, 인슐린 저항성 및 내당능 장애 개선 효과, 염증성 사이토카인의 생성 및 분비 억제 효과, 항염증성 사이토카인의 생성 및 분비 촉진 효과, 또는 면역세포의 확장 및 활성화 효과를 유도할 수 있기 때문이다.

[69] 나아가 본 발명의 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 대사성 질환 증상의 예방 및 개선을 목적으로 하는 식품에 첨가할 수 있으므로, 상기 조성물을 대사성 질환의 예방 및 개선을 위한 식품용 조성물로 사용할 수 있다.

[70] 그러므로 본 발명의 대사성 질환의 예방 및 개선을 위한 식품용 조성물은 대사성 질환의 예방 또는 개선에 효과가 있는 식품, 예컨대, 식품의 주원료, 부원료, 식품 첨가제, 기능성 식품 또는 음료로 용이하게 활용할 수 있다.

[71] 본원에서 상기 식품이란, 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 식품, 식품 첨가제, 기능성 식품 및 음료를 모두 포함하는 것을 말한다.

[72] 본원발명에 따른 대사성 질환의 예방 및 개선용 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본원발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 빵류, 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스낵류), 캔디류, 초코렛류, 껌류, 아이스크림류, 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과일 음료, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등)를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

[73] 또한, 상기 기능성 식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한

체내조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미하며, 구체적으로는 건강 기능성 식품일 수 있다. 상기 기능성 식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[74] 또한, 본원발명에서 상기음료란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며 기능성 음료를 포함한다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 대사성 질환의 예방 및 개선용 조성물을 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[75] 나아가 상기 기술한 것 이외에 본 발명의 대사성 질환의 예방 및 개선용 조성물을 함유하는 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있으며, 상기 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[76] 본 발명에 따른 대사성 질환의 예방 및 개선용 조성물을 함유하는 식품에 있어서, 상기 본 발명에 따른 조성물의 양은 전체 식품 중량의 0.001중량% 내지 90중량%로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 0.1중량% 내지 40중량%로 포함할 수 있고, 음료의 경우, 100ml를 기준으로 0.001g 내지 2g, 바람직하게는 0.01g 내지 0.1g의 비율로 포함할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있으므로 상기 범위에 한정되는 것은 아니다.

[77] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[78]

[79] <실시예 1>

[80] 항 4-1BB 항체 처리에 의한 비만 억제 효과

[81] 본 발명자들은 항 4-1BB 항체 처리시 비만을 억제하는 효과가 있는지 확인하기 위하여 마우스 모델을 대상으로 다음과 같은 실험을 수행하였다. 즉, 동물 모델로는 오리엔트사(부산, 한국)로부터 구입한 8주령의 C57BL/6 마우스를 사용하였으며, 상기 C57BL/6 마우스에게 다이어트 리서치사로부터 구입한 고지방식이(45% 칼로리의 라드(lard)기름 및 콩기름. 21.22% 지방, 48.48%의 탄수화물, 17.01% 단백질 및 0.15%의 콜레스테롤 함유식이)를 섭취하게 함으로써 비만을 유도하였다. 이때 대조군으로는 오리엔트사(부산, 한국)로부터 구입한 8주령의 C57BL/6 마우스에게 해런 텍라드(harlan teklad)로부터 구입한

일반 펠렛 식이(콩기름 유래의 13% 칼로리)를 섭취한 마우스를 사용하였다. 이후 항 4-1BB에 대한 항체 처리에 의해 비만을 억제하는 효과가 있는지 확인하기 위하여, 12주 동안 고지방식이를 공급함과 동시에 일주일에 한 번씩 항진성 항 4-1BB 단클론 항체(3E1) 또는 쥐의 IgG(시그마 알드리치)를 100ug씩 각각 마우스의 복강내에 투여한 후, 마우스 각각의 체중 및 먹이 섭취량을 매주 측정하였다.

[82] 또한, 고지방식이를 10주 동안 섭취하게 하여 이미 비만이 유도된 마우스에 대해서 일주일에 2번씩 3주 동안 항 4-1BB에 대한 항체(3E1) 또는 쥐의 IgG(시그마 알드리치)를 100ug씩 각각 복강내 투여한 후, 마우스 각각의 체중 및 먹이 섭취량을 매주 측정하였다.

[83]

[84] 그 결과, 고지방식이와 함께 항 4-1BB 항체(3E1)를 사육 초기부터 투여한 마우스의 경우, 체중 증가량이 일반식이를 섭취한 마우스와 거의 유사한 것으로 나타났으며, 반면, 고지방식이와 함께 쥐의 IgG를 투여한 군의 경우에는 시간이 경과함에 따라 계속적으로 체중이 증가하는 것으로 나타났다(도 1a 참조). 반면, 먹이 섭취량의 변화를 조사한 결과에서는 고지방식이와 항 4-1BB 항체(3E1)를 투여한 마우스 및 쥐의 IgG를 투여한 마우스 모두 비슷한 먹이 섭취량을 보였다(도 1b 참조).

[85] 또한, 고지방식이로 비만이 유도된 마우스에 항 4-1BB 항체(3E1)를 투여하였을 경우, 쥐의 IgG를 투여한 경우에 비해 체중이 현저히 감소됨을 확인할 수 있었으며(도 1c 참조), 먹이 섭취량을 조사한 결과에서는 항 4-1BB 항체(3E1)를 투여한 마우스 및 쥐의 IgG를 투여한 마우스 모두 비슷한 먹이 섭취량을 보였다(도 1d 참조).

[86] 따라서 상기 결과를 통해 본 발명자들은 본 발명의 항 4-1BB 항체 투여시 비만을 예방적인 차원에서 방지할 수 있는 효과가 있으며, 이미 비만이 유도된 상태에서도 체중을 감소시키는 효과가 있음을 알 수 있었다. 나아가 비슷한 양의 먹이를 섭취했을 경우에도 항 4-1BB 항체를 투여하였을 경우가 IgG를 투여한 경우에 비해 체중이 더 감소되는 결과를 통해 항 4-1BB 항체를 비만의 예방 및 치료용으로 매우 유용하게 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

[87]

[88] <실시예 2>

[89] 항 4-1BB 항체 처리 시 내당능 및 인슐린 내성 테스트

[90] 항 4-1BB 항체 처리 시 당대사에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. 먼저, 고지방식의 공급으로 비만이 유도된 마우스에 항 4-1BB 항체(3E1) 또는 쥐의 IgG를 각각 투여한 후, 상기 마우스를 16시간 동안 금식시킨 다음, 글루코스의 농도가 2g/kg이 되도록 20%의 글루코스 용액을 상기 각 마우스에게 경구 투여시켰다. 이후, 마우스의 꼬리부분 혈액을 조금 채취한 후 혈당기기를 이용하여 15, 30, 60, 120, 150분 후에 혈당을

측정하였다. 또한, 인슐린 내성 테스트를 위해, 고지방식의 공급으로 비만이 유도된 마우스에 항 4-1BB 항체(3E1) 또는 쥐의 IgG를 각각 투여한 후, 6시간 동안 금식시킨 다음, 인간 인슐린(1IU/kg 체중)을 복강내로 투여하였다. 이후 15, 30, 45 및 60분 후의 혈액의 글루코스 양을 조사하였다. 이때 대조군으로 일반식이만을 섭취한 마우스를 사용하였다.

[91]

[92]

그 결과, 도 2a에 나타낸 바와 같이, 고지방식으로 비만이 유도된 마우스에 대하여 항 4-1BB 항체(3E1) 또는 쥐의 IgG를 투여한 군 및 대조군 모두에서 공복으로 인해 초기 30분 동안은 글루코스의 양이 증가한 것으로 나타났다. 또한, 30분 이후부터는 글루코스의 양이 모두 감소하는 경향을 보였으나, 항 4-1BB 항체를 투여한 마우스의 경우, 시간이 경과할수록 혈중 글루코스의 양이 일반식을 섭취한 정상 마우스인 대조군과 거의 유사한 양으로 나타났다. 또한, 도 2b에 나타낸 바와 같이, 인슐린을 투여한 뒤의 글루코스의 양은 항 4-1BB 항체(3E1) 또는 쥐의 IgG를 투여한 군 모두에서 감소되는 것으로 나타났으나, 항 4-1BB 항체를 투여한 마우스의 경우에는 인슐린 투여 후 30분 만에 일반식을 섭취한 정상 마우스 군과 거의 동일한 글루코스의 양으로 감소된 반면, 쥐의 IgG를 투여한 마우스 군은 항 4-1BB 항체(3E1) 투여 군에 비해 높은 수준의 글루코스의 양을 유지하고 있는 것으로 나타났다.

[93]

따라서 상기 결과를 통해 본 발명자들은 비만이 유도된 마우스 군에서 항 4-1BB 항체 투여시 혈중 글루코스의 양이 빠르게 감소되어 당내성이 효과적으로 감소됨을 확인할 수 있었으며, 인슐린 내성 또한 신속히 억제할 수 있음을 확인함으로써 항 4-1BB 항체를 비만으로 유도되는 당뇨병의 예방 및 치료에 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

[94]

[95]

<실시예 3>

[96]

항 4-1BB 항체 처리 시간의 중성지방 함량 분석

[97]

본 발명자들은 비만이 유도된 마우스 군에 대하여 항 4-1BB 항체 투여에 의해 중성지방 함량이 감소되는지를 조사하였다. 이를 위해 상기 실시예 1에서 고지방식으로 비만을 유도한 마우스를 대상으로 항 4-1BB 항체를 투여한 마우스 및 IgG를 투여한 마우스 각각으로부터 간 조직을 분리한 후, 분리된 간 조직을 얼렸다. 이후, 얼린 간 조직(100mg)을 55에서 16시간 동안 알콜성의 수산화칼륨으로 비누화(saponified)시켰다. 이후 간 추출물을 수성/알콜에 첨가한 후 1500 rpm에서 5분 동안 원심분리시켜 글리세롤을 제거하고, 이후 200ul씩 분주한 수성/알콜 층의 용액을 1M의 MgCl₂(215ul)으로 중화시켰다. 비누화 및 중화된 간 추출물의 중성지방(triglyceride: TG) 함량은 GPO Trinder 시약(시그마)을 이용하여 측정하였다.

[98]

또한, 항 4-1BB 항체 또는 쥐의 IgG를 투여한 비만 마우스 군으로부터 분리된 간 조직에 대하여 염색 및 현미경 관찰을 통해 지방조직을 관찰하였는데, 상기

관찰은 각 마우스 군으로부터 분리된 간 조직을 10%의 포르말린 용액으로 24시간 고정화 시킨 후, 파라핀 처리한 후, 처리된 조직을 8 μ m의 두께로 잘랐다. 이후 상기 잘라진 조직을 유리 슬라이드에 고정시킨 후, 헤마토크실렌-에오신 용액으로 염색한 다음 100배의 배율에서 디지털 카메라(Infinity digital camera)를 이용하여 이미지를 얻었고 Adobe photoshop를 통해 처리하였다.

[99]

[100] 그 결과, 비만이 유도된 마우스를 대상으로 항 4-1BB 항체를 투여하였을 경우, 쥐의 IgG를 처리한 대조군에 비해 간에 존재하는 중성지방의 함량이 감소한 것으로 나타났으며(도 3b), 카메라 관찰을 통해서도 항 4-1BB 항체를 투여한 경우가 대조군에 비해 지방간의 형성이 크게 억제되었음을 알 수 있었다(도 3a).

[101]

[102] <실시예 4>

[103] 항 4-1BB 항체 처리시 혈당 및 지질 함량 분석

[104] 상기 실시예 1에서 고지방식으로 비만이 유도된 마우스에 대하여 항 4-1BB 항체 처리시 혈중 글루코스의 양, 콜레스테롤의 양 및 중성지방(triglyceride)의 양이 감소되는 효과가 있는지를 조사하였는데, 상기 조사는 아산 약리학교실로부터 수득한 글루코스 E, 콜레스테롤 E 및 중성지방 E를 사용하여 측정하였으며, Wako NEFA-C를 이용하여 유리 지방산의 함량도 측정하였다.

[105]

[106] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 비만 마우스의 혈중에 존재하는 글루코스의 양, 콜레스테롤의 양 및 중성지방(triglyceride)의 양 모두는 항 4-1BB 항체를 투여하였을 경우, 쥐의 IgG를 처리한 대조군에 비해 훨씬 감소하는 것으로 나타났다.

[107] 따라서 상기 결과를 통해 본 발명자들은 항 4-1BB 항체가 혈중 총 콜레스테롤 및 중성지방의 함량을 감소시키는 효과가 우수할 뿐만 아니라 유리 지방산의 함량도 감소시키는 효과를 통해 비만으로 유도되는 지질 대사 장애를 개선할 수 있는 효과가 있음을 알 수 있었다.

[108]

[109] <실시예 5>

[110] 항 4-1BB 항체 처리에 의한 복부지방축적 억제 효과

[111] 항 4-1BB 항체 투여시 복부에 축적된 지방 조직이 감소되는 효과가 있는지를 조사하기 위해 상기 실시예 1에서 고지방식으로 비만을 유도한 마우스에 대하여 항 4-1BB 항체를 투여한 다음 상기 마우스의 복부지방조직, 즉, 장간막지방, 정소주변지방, 신장주변지방 및 피하지방조직을 채취하여 천칭을 사용하여 무게를 측정하였다. 이때 대조군으로는 항 4-1BB 항체 대신 IgG를 투여한 마우스를 사용하였다.

[112]

[113] 그 결과, 항 4-1BB 항체(3E1)를 투여한 마우스의 복부지방조직 및

피하지방조직의 중량이 IgG를 투여한 마우스보다 유의적으로 감소되어 있음을 확인할 수 있었다(도 5 참조). 그러므로 이러한 결과에 따라 항 4-1BB 항체(3E1)투여에 따른 체중 감량효과가 체지방조직의 감소에 기인하고 있음을 알 수 있었다.

[114]

[115] <실시예 6>[116] 항 4-1BB 항체 처리시 T세포에 미치는 영향 분석

[117] 4-1BB 자극이 비만으로 인한 염증에 영향을 미치는지 알아보기 위해, 상기 실시예 1의 고지방식이를 섭취시켜 비만이 유도된 마우스를 대상으로 항 4-1BB 항체(3E1)(100ug/mouse)를 투여한 실험군과 대조군으로서 항 4-1BB 항체 대신 쥐의 IgG를 투여한 군의 지방 조직과 간 조직에서 면역 세포 침윤(infiltration)과 사이토카인 프로파일을 각각 측정 및 분석하였다. 이때 상기 항체들의 투여는 마우스를 대상으로 일주일에 2번씩 4주 동안 투여하였고, 투여 후 지방 조직과 간 조직의 면역 세포 침윤 정도 및 사이토카인의 프로파일 분석은 당업계에 공지된 방법(The endocrine society's journals online web site at <http://endojournals.org> 참조)에 따라 수행하였다.

[118]

[119] 그 결과, 비만이 유도된 마우스를 대상으로 항 4-1BB 항체를 처리한 실험군의 경우 대조군에 비해 지방 조직 및 간에서 면역 세포의 침윤이 증가한 것으로 나타났고, 항 4-1BB 항체를 처리하였을 경우 T 세포 내에서 CD44+ 또는 CD62L-세포가 많이 존재하는 것으로 나타났다.(도 6a 참조). 또한, 실험군의 경우 대조군에 비해 CD8+/CD44+와 CD8+/CD62L-의 세포수가 월등히 증가한 것으로 나타났는데(도 6b 참조), 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 침윤된 CD8+ T 세포의 경우 대부분 활성화상태를 갖는다는 사실을 감안하여 본 발명에 따른 항 4-1BB 항체를 처리하였을 경우, 침윤된 CD8+ T 세포가 증가한다는 사실을 통해 T 세포가 활성화 되었다는 것을 알 수 있었다.

[120] 또한, 대조군에 비해 항 4-1BB 항체를 처리한 실험군의 경우, 지방조직에서는 대식세포가 감소하였고, 간에서는 대식세포가 증가하였으며, 이차 림프 조직이 현저하게 증가한 것으로 나타났다(도 6b 및 도 6c 참조).

[121]

[122] 따라서 상기 통해 본 발명자들은 4-1BB 자극이 림프구 세포를 확장 또는 활성화시킬 수 있다는 사실을 알 수 있었으며, 나아가 지방조직과 간과 같은 주변 조직으로의 림프구 세포들의 수송을 유도할 수 있는 역할을 한다는 사실을 알 수 있었다.

[123]

[124] <실시예 7>[125] 항 4-1BB 항체 처리에 따른 사이토카인 및 케모카인의 발현변화 분석

[126] 나아가 본 발명자들은 4-1BB로 자극된 지방 조직과 간에서 증가된 CD8+

T세포들로 인해 염증반응을 개선할 수 있는지를 조사하기 위해 사이토카인(cytokine) 및 케모카인(chemokine)의 수치를 측정하였다. 이때 대조군으로는 항 4-1BB 항체 대신 IgG를 투여한 비만이 유도된 마우스와 저지방식이로 공급한 지방이 적은 마우스를 사용하였으며, 사이토카인 및 케모카인의 수치는 상기 실시예 6에 기재된 방법과 동일하게 수행하였다.

[127]

[128] 그 결과, 비만이 유도된 마우스에 대하여 항 4-1BB 항체를 처리한 결과, 혈장, 지방 조직 및 간에서 인터페론 감마(IFN- γ)가 대조군에 비해 현저하게 증가하는 것으로 나타났고(도 7a 참조), 이러한 결과는 상기 실시예 6의 결과에도 나타낸 바와 같이 대부분의 사이토카인을 생성하는 CD8+ T 세포가 항 4-1BB 항체에 의해 활성화 된다는 사실과 일치한다. 또한, 항염증성 사이토카인의 발현양을 분석한 결과, IL-4와 IL-10과 같은 항염증 사이토카인 수치는 증가한 반면 MCP-1과 같은 케모카인의 수치는 두드러지게 감소하는 것으로 나타났다(도 7b 참조).

[129] 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 상기 결과와 같이 MCP-1가 항 4-1BB 항체 처리에 의해 감소됨으로써 지방 조직 내로 대식세포의 침윤(infiltration)이 감소된다는 것을 알 수 있었고, 항 4-1BB 항체 처리에 의해 인터페론 감마가 증가함에도 불구하고 항염증성 사이토카인의 발현 상승으로 인해 지방조직에서의 염증 반응이 활성화되지 못한다(즉, 염증 반응이 증가하지 않음)는 것을 알 수 있었다.

[130] 또한, 비만이 유도된 마우스에 대하여 항 4-1BB 항체 처리한 마우스의 간의 경우, 대조군에 비해 TNF-a가 유의적으로 감소하였고, 반면 MCP-1 및 IL-6과 혈장 단백질인 아디포넥틴은 대조군에 비해 증가한 것으로 나타났다(도 7c 내지 7e 참조).

[131] 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 간 지방증의 발전 과정에서 악영향을 주는 사이토카인으로 알려진 TNF-a가 항 4-1BB 항체 처리에 의해 그 양이 감소된 반면, 간 보호 효과작용을 하는 것으로 알려진 IL-6 및 아디포넥틴은 그 양이 증가한다는 사실을 통해 본 발명의 항 4-1BB 항체 처리에 따른 4-1BB 자극은 지방간을 감소시키고 예방할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

[132] 나아가, 산화반응 및 염증 마커로 알려진 말론디알데히드(malondialdehyde:MDA) 및 COX-2(cyclooxygenase-2)는 항 4-1BB 항체가 처리된 비만 마우스의 경우 대조군에 비해 상기 인자들의 발현이 감소된 것으로 나타났으며, 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 본 발명에 따른 항 4-1BB 항체 처리에 따른 4-1BB 자극시 CD8+ T세포 및 대식세포와 사이토카인의 축적이 간세포 손상이나 병인을 유발시키지 않는다는 사실을 알 수 있었다.

[133]

[134] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의

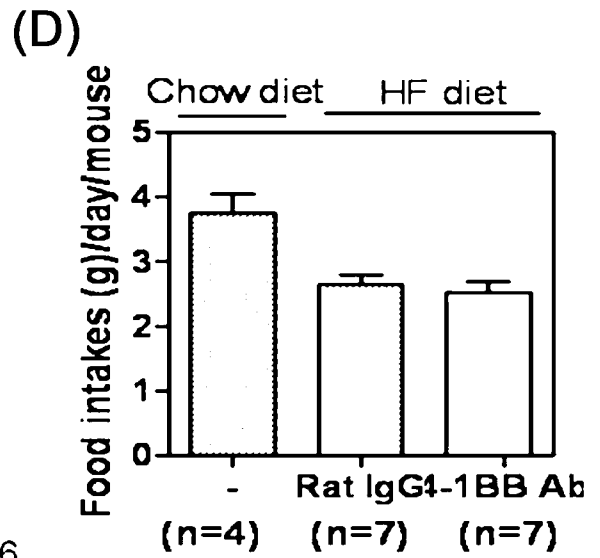
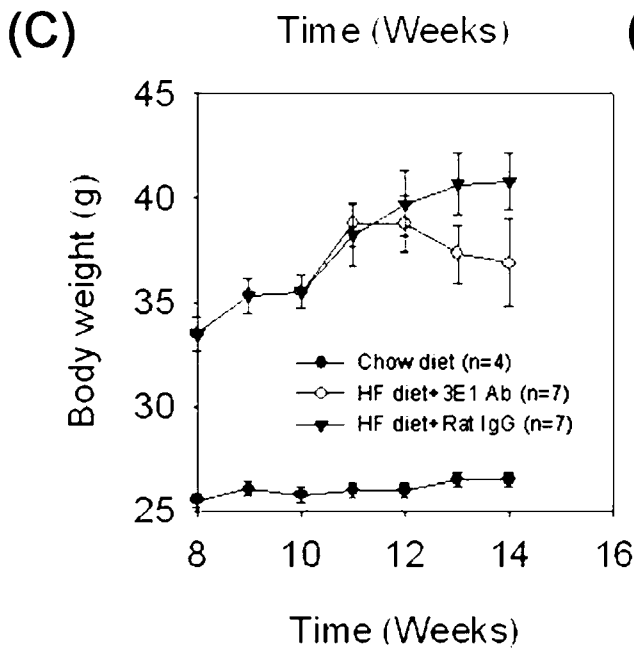
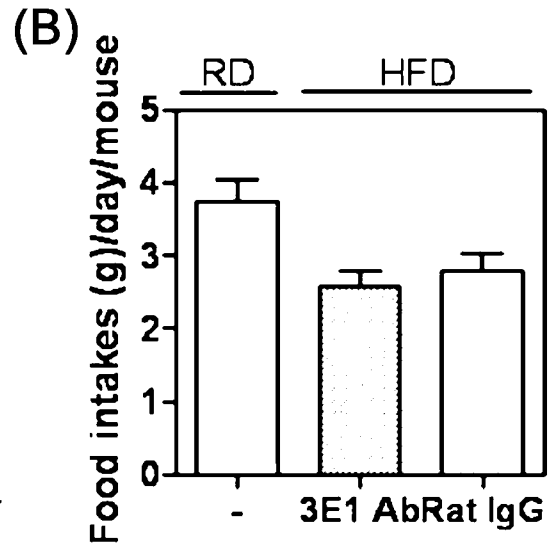
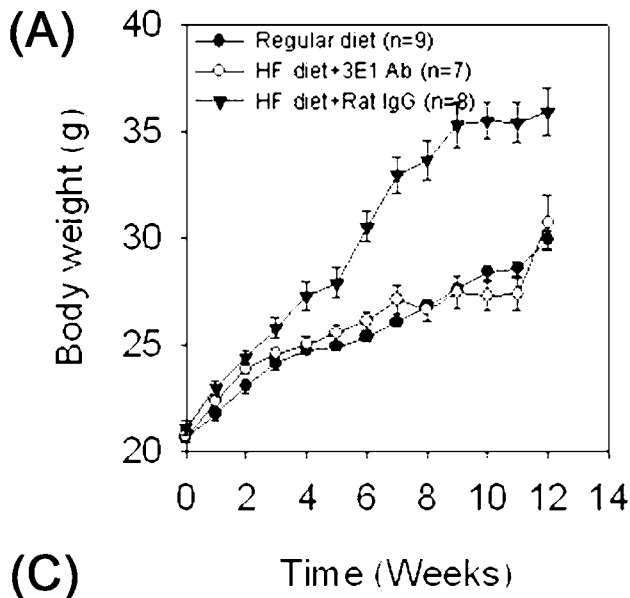
본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

[135]

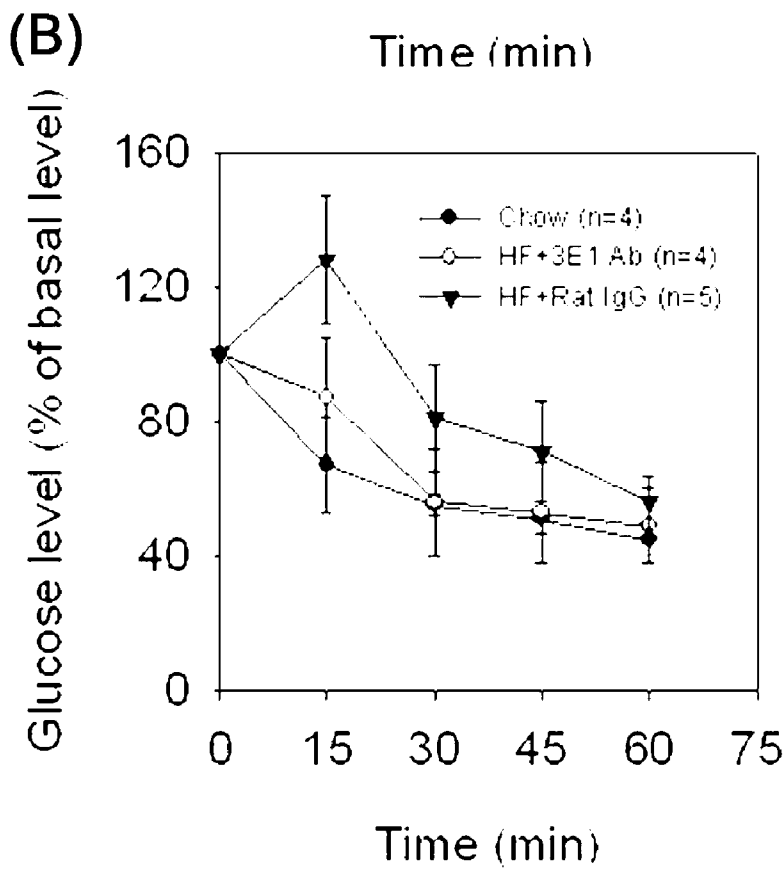
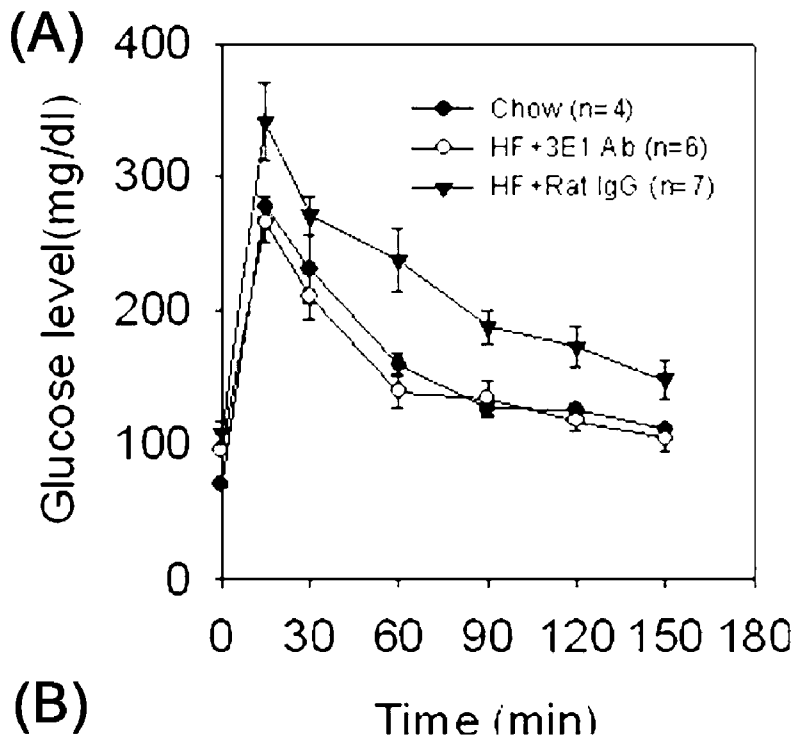
청구범위

- [청구항 1] 항-4-1BB(CD 137) 항체를 유효성분으로 포함하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 대사성 질환은 비만, 제2형 당뇨병, 고지혈증, 고콜레스테롤증, 동맥경화증 및 지방간으로 이루어진 군중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 3] 항-4-1BB(CD 137) 항체를 유효성분으로 포함하는 대사성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 대사성 질환은 비만, 제2형 당뇨병, 고지혈증, 고콜레스테롤증, 동맥경화증 및 지방간으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 대사성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.
- [청구항 5] 항-4-1BB(CD 137) 항체를 이를 필요로 하는 개체에 치료상 유효양으로 투여하는 단계를 포함하는 대사성 질환의 예방 또는 치료방법.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 항-4-1BB(CD 137) 항체는 상기 항체가 투여된 개체 내에서 체내 지방조직의 중량 감소 효과, 인슐린 저항성 및 내당증 장애 개선 효과, 염증성 사이토카인의 생성 및 분비 억제 효과, 항염증성 사이토카인의 생성 및 분비 촉진 효과, 또는 면역세포의 확장 및 활성화 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 대사성 질환의 예방 또는 치료방법.

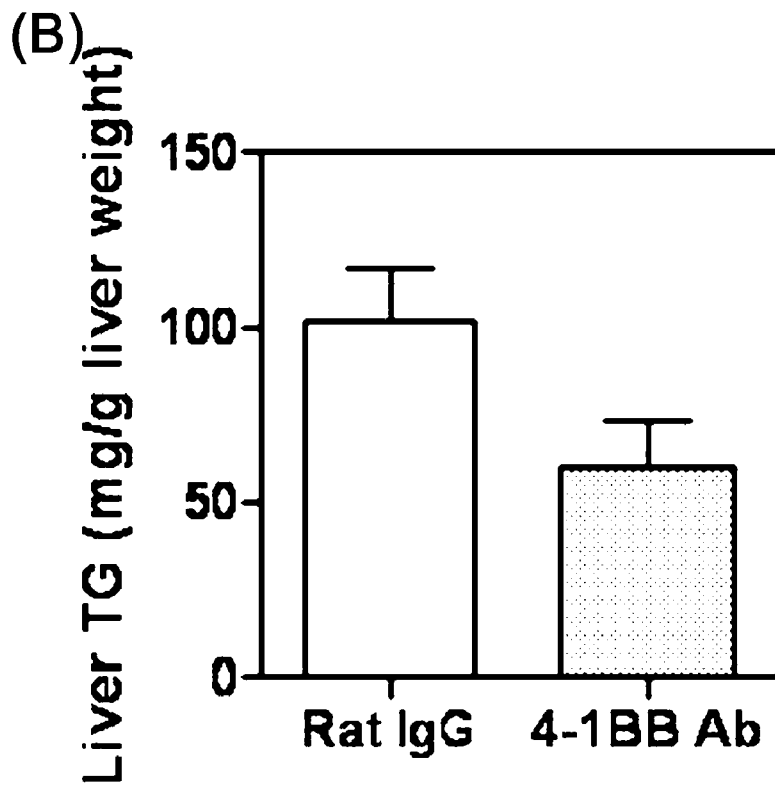
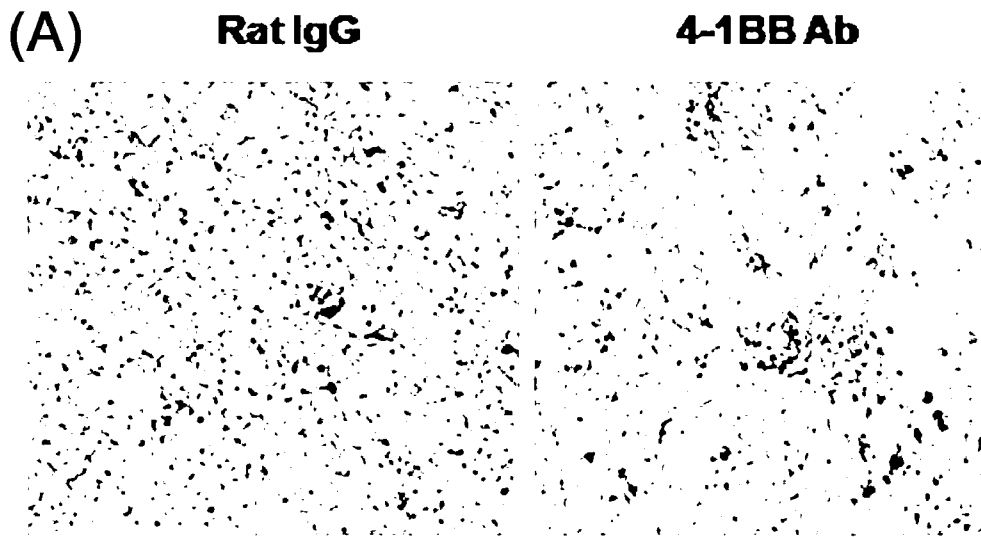
[Fig. 1]



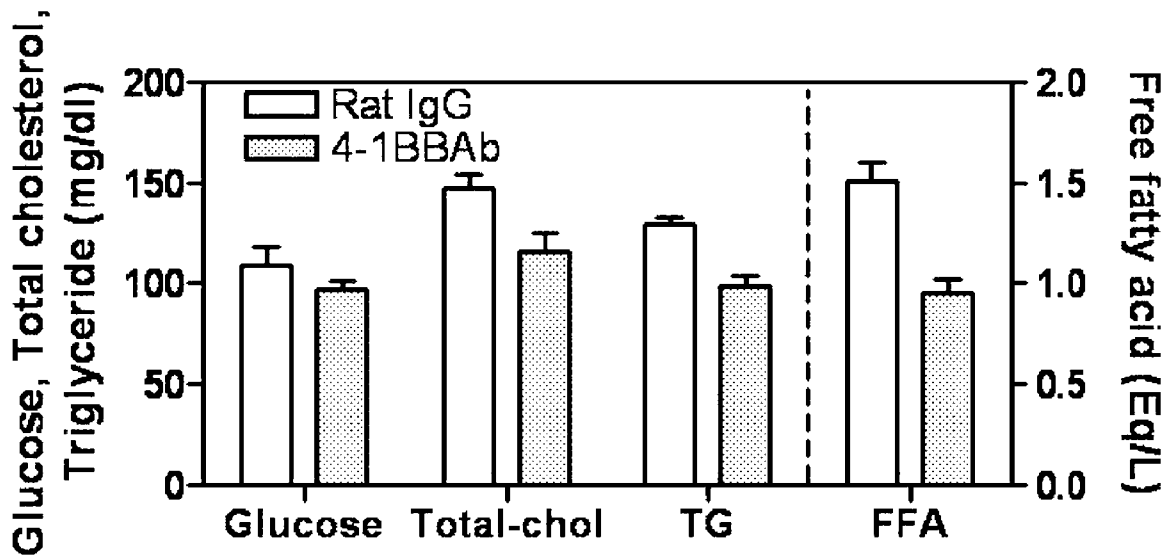
[Fig. 2]



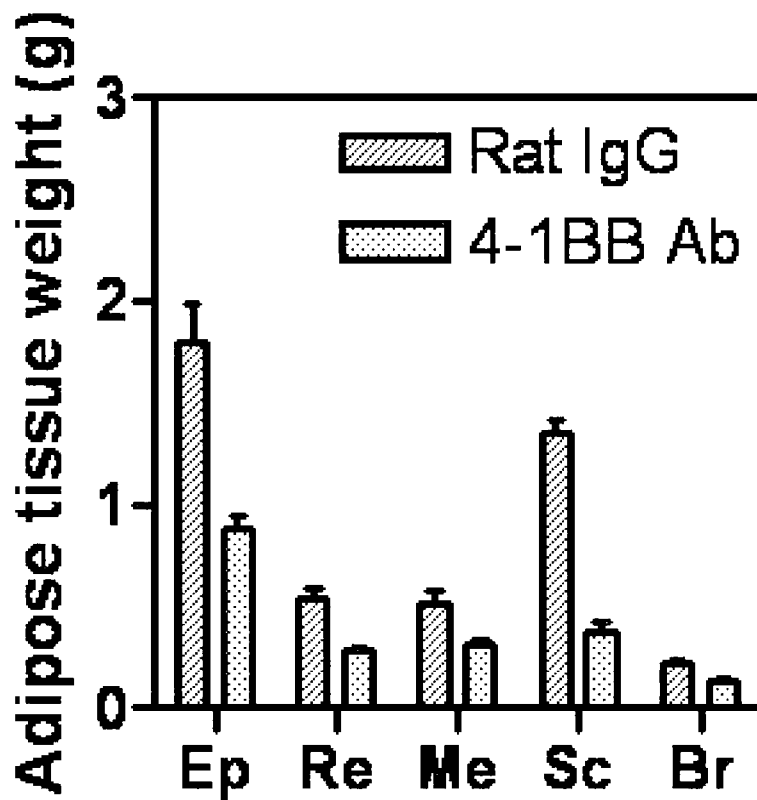
[Fig. 3]



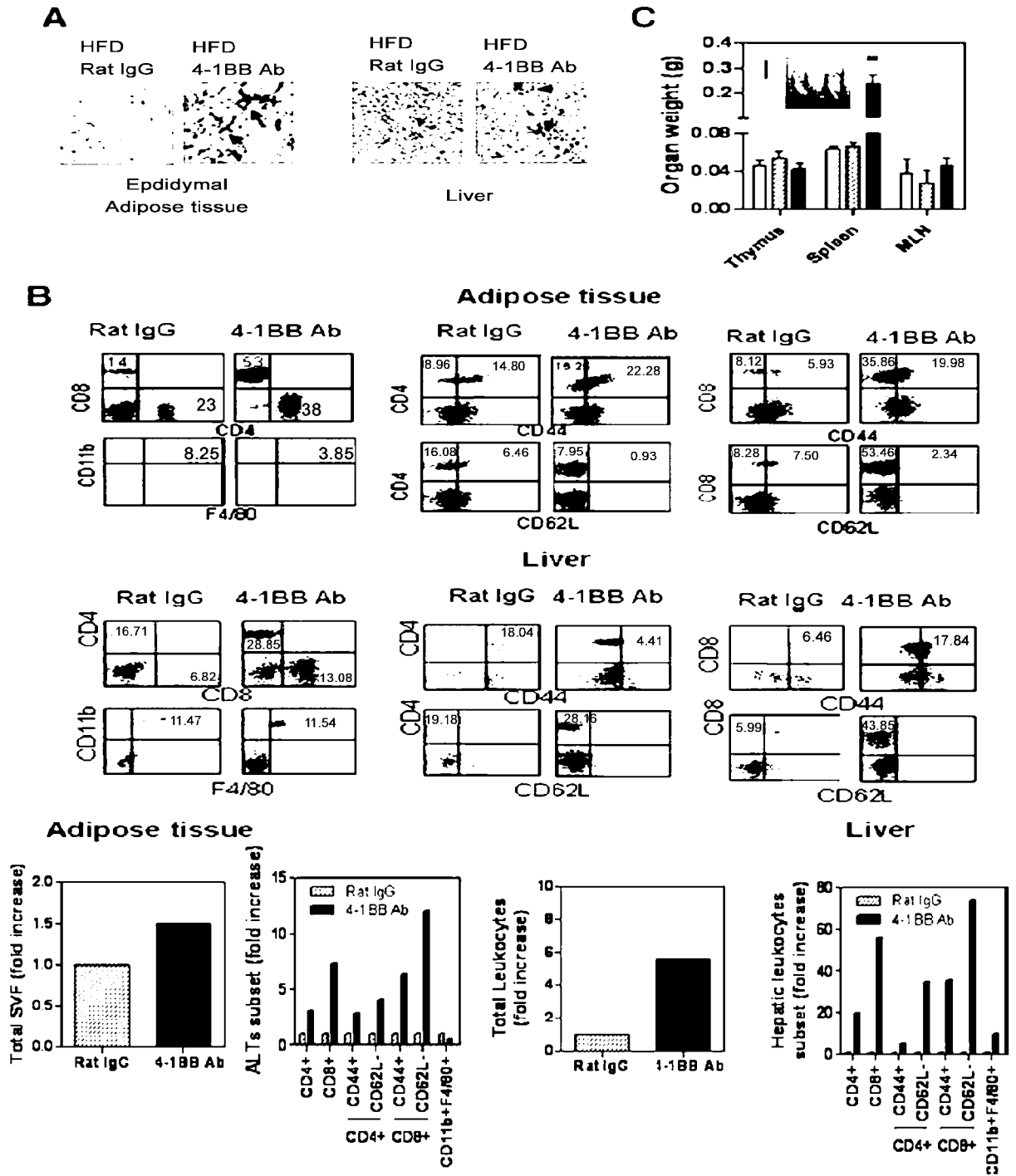
[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]

