

명세서

발명의 명칭: TM4SF19 억제제 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 TM4SF19(transmembrane 4 L six family member 19; 막 관통 4L 6 패밀리 멤버 19)의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 골 질환, 비만 또는 비만 매개 대사성 질환, 암, 암 전이 예방 또는 치료용 조성물, 상기 질환 치료 약물의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 뼈는 일생 동안 지속적으로 변화하는 활동적인 조직이다. 뼈는 육안으로 외부의 피질골(치밀골)과 내부의 소주골(해면골, 스폰지뼈)로 구분하는데, 피질골은 물리적인 강도가 강하여 신체를 보호하고 지지하는 역할을 하고, 소주골은 충격을 흡수하거나 칼슘의 변화를 일정하게 유지하는 역할을 한다.
- [4] 뼈의 성장이 중단된 후에도 오래된 뼈는 파괴되어 없어지고(골 흡수), 새로운 뼈가 없어진 곳을 메우는 고정(골 형성)이 일생동안 반복되는, 이러한 현상을 뼈의 재형성(remodeling)이라 한다.
- [5] 조골세포(osteoblast)에 의한 골형성과 파골세포(osteoclast)에 의한 골흡수 사이의 상호작용이 균형을 이루어 골의 항상성이 유지되고 혈액 속의 칼슘 농도가 일정하게 유지되는데, 골대사 불균형으로 골다공증과 같은 골 관련 질환이 발생한다.
- [6] 파골세포와 조골세포의 상호작용으로 골흡수와 골형성 과정이 순차적으로 일어나면서 골항상성(bone homeostasis)을 유지하는 현상을 골재형성(bone remodeling)이라 하며, 파골세포와 조골세포 간 활성의 균형에 따라 골량이 결정된다. 골재형성은 과정은 파골세포가 골흡수를 진행하고 이후 조골세포에 의한 골형성이 커플링되어 균형 있게 일어난다. 이러한 효율적인 균형이 깨지게 되면, 골 소실이 일어난다.
- [7] 파골세포는 분화(differentiation) 과정을 거치면서 다핵성 파골세포(multinucleated osteoclast)가 되며, 다핵성 파골세포에 의해 골흡수가 일어난다. 파골세포의 기능부전은 골화석증(osteopetrosis)을 유발하고, 파골세포의 과활성화에 의한 골흡수 증가는 폐경에 의한 골다공증과 염증성 관절염 등을 유발한다. 지금까지, 비스포스포네이트(bisphosphonates)계 약물과 항-RANKL 항체가 파골세포의 과활성화를 타겟으로 개발된 약물이나, 파골세포의 전반적인 억제는 파골세포와 조골세포의 밸런스에 영향을 주어 골 형성에 지대한 영향을 미치며, 이러한 전반적인 억제로 인한 부작용도 수반된다. 따라서, 보다 선택적으로 파골세포를 억제할 수 있는 치료제의 개발이 요구된다.
- [8] 파골세포는 조혈모세포(hematopoietic stem cell)에서 기원하며,

M-CSF(monocyte/macrophage colony-stimulating factor) 자극과 RANK(receptor activator of nuclear factor κ B)의 리간드(RANKL)에 의한 활성화를 통해 단핵구/대식구 계열로부터 분화하는 다핵성 세포(multinucleated cell)이다. 파골세포의 분화는 파골세포 전구체(osteoclast precursor)가 TRAP-positive 단핵 파골세포(mononuclear osteoclast)로 분화하며, 이후 세포-세포간 융합으로 다핵성 파골세포(multinucleated osteoclast)로 성숙한다[도 2c 참조]. 이러한 성숙(mature), 다핵성 파골세포는 골흡수를 일으킨다[Int J Mol Sci. 2020 Aug 8;21(16):5685.].

- [9] 비만은 유전적, 대사적, 환경적, 그리고 행동학적인 복잡한 요인의 상호작용에 의해 발생하는 생물학적 현상으로, 비정상적 또는 과다한 지방의 축적으로 정의되며, 건강에 악영향을 미칠 수 있다. 특히 비만은 고혈압, 제2형 당뇨병, 암, 간질환, 고지혈증, 동맥경화 등과 같은 각종 성인병을 일으키는 중요한 위험 인자로 알려져 있다. 비만은 칼로리 섭취량과 에너지 소모량 사이의 만성적인 불균형의 결과로 지방조직의 대사, 내분비 및 면역기능의 상실을 동반하며, 대사이상과 주요한 지방 저장 신호 전달 호르몬인 인슐린에 대한 반응성 저하(저항성)가 발생되며, 이로 인해 지방조직 이외의 다른 대사 기관에서의 지방 축적을 야기하여 여러 지방독성(lipotoxicity)을 나타낸다. 지방독성의 가장 대표적인 병리현상은 염증 반응이며, 낮은 상태의 만성 염증 질환(chronic low-grade inflammation)으로 특징지을 수 있다. 비만에서 대사이상과 인슐린 저항성이 나타나기 전에 지방조직에서 대식세포(adipose tissue macrophage)의 활성화가 일어나서 염증전단계에 들어서게 된다. 이처럼 비만은 체내에 저장도의 만성 염증 상태를 유발해서 각종 대사성 질환을 일으킨다. 이처럼 비만에 의한 체내 만성염증과 대사성 합병증의 발생에서 지방조직의 대식세포가 중요한 역할을 차지하고 있다.
- [10] 지방세포(adipocyte)에 저장된 지방은 체내의 중요한 에너지원으로 사용된다. 과다한 지방세포의 분화와 불균형적인 에너지의 과잉공급에 의해 비만이 유발된다. 지방조직(adipose tissue)은 지방세포뿐만 아니라, 지방유래줄기세포(adipose-derived stem cell, ASC), 면역세포, 내피세포 등 다양한 세포들이 조직 내에 존재하며, 이를 기질혈관분획(stromal vascular fraction, SVF)이라 부른다. 지방조직은 에너지를 지질 형태로 저장하는 것이지만, 몸의 보온 작용을 하기도 한다. 영양소를 저장하는 지방인 백색지방조직(white adipose tissue, WAT)과 영양소를 소비해 열을 발생시키는 갈색지방조직(brown adipose tissue, BAT)로 구분된다. 또한, 지방조직은 렙틴(leptin), 레시스틴(resistin), 아디포넥틴(adiponectin), 종양괴사인자- α (tumor necrosis factor- α , TNF α) 등을 만들어 내기도 한다. 지방세포 분화는 여러 호르몬과 다양한 전사인자들의 상호작용을 통하여 매우 복잡하게 이루어지는데, 인슐린이나 인슐린 성장인자-1(insulin like growth factor-1), 성장호르몬 등의 자극에 의하여 촉진되며 이 과정에 CCAAT 인핸서 결합 단백질(CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP)) 패밀리, 퍼옥시좀증식자-활성화 수용체 감마(peroxisome proliferator-activated receptor

(PPAR) gamma)등의 전사인자들의 증가가 관찰된다. 이들, 전사인자들은 지방세포 조절인자와 더불어 지방세포의 분화를 촉진시키며 지방산 결합단백질인 aP2 나 지방산 생합성효소 (fatty acid synthase)과 같은 효소들의 발현량이 증가한다. 한편, 지방간의 진행에도 과다한 중성지방의 축적이 관여되고 있음이 보고되어 있다 [J. Clin. Invest., 98, 1575 1584 (1996).].

- [11] 현재 사용되고 있는 비만치료제로는 스위스 로슈의 제니칼과 같은 지방흡수 억제제와 미국 애보트의 메리디아와 같은 식욕감퇴제가 많이 사용되고 있으나, 이러한 약제들에서 두통, 혈압상승, 설사 등의 부작용이 발생하는 문제점이 있다. 따라서 부작용이 없는 새로운 타겟의 비만 치료제의 개발이 필요한 실정이다.
- [12] 암은 인류의 건강을 위협하는 최대의 질병 중의 하나로서, 세포가 일련의 돌연변이 과정을 거쳐, 무제한적이고 비조절적인 방식으로 증식하고 불사화되어 발생하는 질병이다. 초기에 발견된 암일 경우 수술, 방사선 치료, 화학적 요법 등의 치료법이 있으나 그 부작용이 큰 문제로 대두되고 있으며, 말기 암이나 전이된 암의 경우 특별한 치료법 없이 시한부 인생으로 삶을 마감하는 상황이다.
- [13] 최근, 암과 관련된 다양한 생화학적 기전이 규명되고 그에 따른 치료제가 개발되어 오고는 있지만, 아직까지 암에 대한 근본적인 치료방법은 제시되지 않고 있다. 이에 따라, 암과 관련된 다양한 생체 내 분자를 동정하고 이를 표적으로 하는 약물을 개발하려는 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 이러한 약물 중 일부를 조합하여 암 치료 효과를 증진시키고자 하는 노력 역시 시도되고 있다.
- [14] 따라서 암과 관련된 표적 분자를 추가적으로 발굴하는 노력은 매우 중요한 일이라고 할 수 있다.
- [15] 한편, TM4SF19은 막 관통 4L 6 패밀리 멤버 19(transmembrane 4 L six family member: TM4SF19)으로 대한민국 등록특허 제10-1781200호[대한민국 등록 특허 제10-1781200호]에서는 비만 진단용 마커로서의 TM4SF19의 용도에 대해 개시한 바 있다. 그러나, 이제까지 TM4SF19와 관련하여 골 관련 질환 치료, 비만 또는 비만 관련 대사성 질환 치료, 암 치료 또는 암 전이 억제 효과에 대해서는 보고된 바 없다.

[16]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [17] 이에, 본 발명자들은 골 질환, 비만 및 비만으로 매개되는 다양한 대사성 질환, 암 치료 또는 암 전이 억제의 근본적인 치료를 목적으로 관련된 유전자들을 찾고자 다양한 유전자들을 대상으로 골 질환, 비만 또는 비만 매개 대사성 질환, 암과의 관련성을 연구를 진행하였으며, 그 결과 TM4SF19의 여러 기능을

확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[18]

[19]

과제 해결 수단

[20] 본 발명의 목적은 TM4SF19 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 골 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[21] 본 발명의 또 다른 목적은 골 질환 의심 검체에 골 질환 치료용 후보물질을 처리하는 단계; 및 대조군과 TM4SF19 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현수준을 비교하는 단계를 포함하는, 골 질환 치료 약물의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[22] 본 발명의 또 다른 목적은 TM4SF19 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 비만 또는 비만 매개 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[23] 본 발명의 또 다른 목적은 비만 또는 비만 매개 대사성 질환 의심 검체에 비만 또는 비만 매개 대사성 질환 치료용 후보물질을 처리하는 단계, 및 대조군과 TM4SF19 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준을 비교하는 단계를 포함하는, 비만 또는 비만 매개 대사성 질환 치료 약물의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[24] 본 발명의 또 다른 목적은 TM4SF19 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 암 예방, 치료 또는 암 전이 억제용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[25] 본 발명의 또 다른 목적은 암 예방, 치료 또는 암 전이 의심 검체에 암 예방, 치료 또는 암 전이 억제용 후보물질을 처리하는 단계, 및 대조군과 TM4SF19 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준을 비교하는 단계를 포함하는, 암 치료 또는 암 전이 치료 약물의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[26] 본 발명의 또 다른 목적은 TM4SF19 발현 또는 활성 억제용 융합 단백질을 제공하는 것이다.

[27] 본 발명의 또 다른 목적은 치료학적으로 유효한 양의 TM4SF19 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 골 질환 예방 또는 치료용 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 골 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[28] 본 발명의 또 다른 목적은 치료학적으로 유효한 양의 TM4SF19 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 비만 또는 비만 매개 대사성 질환 예방 또는 치료용 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 비만 또는 비만 매개 대사성 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[29] 본 발명의 또 다른 목적은 치료학적으로 유효한 양의 TM4SF19 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 암 예방, 치료 또는 암 전이 억제용 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 암 예방, 치료 또는 암 전이를 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[30]

발명의 효과

[31]

본 발명에 따른 TM4SF19 발현 또는 활성 억제제는 골 질환, 비만, 비만 매개 대사성 질환, 암, 암 전이 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

[32]

또한, TM4SF19를 저해하는 골 질환, 비만, 비만 매개 대사성 질환, 암, 암 전이 치료용 후보물질을 스크리닝하는 방법에 의하면 골 질환, 비만, 비만 매개 대사성 질환, 암, 암 전이를 치료할 수 있는 후보물질을 효율적으로 선별할 수 있다.

[33]

도면의 간단한 설명

[34]

도 1은 마우스 골수에서 세포를 뽑아 M-CSF와 RANKL(Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)을 처리하여 시간별로 분화시킨 후 TM4SF19 유전자 발현을 qPCR로 확인한 결과이다.

[35]

도 2a는 야생형(WT) 마우스와 CRISPR 녹아웃 마우스인 TM4SF19KO의 마우스 골수 유래 세포를 M-CSF(25 ng/ml) + RANKL(100 ng/ml)을 처리하여 분화시킨 후 TRAP 염색을 진행한 결과이다. 도 2b는 CRISPR를 이용한 TM4SF19 녹아웃 마우스인 TM4SF19KO와 야생형(WT) 마우스의 골수로부터 세포를 뽑아 RANKL의 농도를 100 ng/ml로 고정하고 M-CSF의 농도를 25, 40, 60 ng/ml로 달리한 조건에서 분화시킨 후 파골세포 관련 마커인 TRAP 염색(Tartrate-resistant acid phosphatase staining)을 수행한 결과를 보여준다. 도 2c는 파골세포 분화 과정을 나타낸 모식도이다.

[36]

도 3은 야생형(WT) 마우스와 TM4SF19KO의 마우스 골수에서 세포를 뽑아 M-CSF 또는 M-CSF + RANKL(M-CSF 25 ng/ml, RANKL 100 ng/ml)을 처리하여 분화시킨 4일 후 파골세포(osteoclast, OC) 분화에 관련된 타겟 유전자인 Ctsk, Acp5, c-Fos, 및 Nfatc1 발현을 qPCR로 확인한 결과이다.

[37]

도 4a는 야생형과 TM4SF19KO 마우스 골수를 분화시킨 후 다핵성 파골세포 분화 시 형성되는 액틴 벨트의 형성 여부를 F- 액틴 염색으로 확인한 것이다.

[38]

도 4b는 Dentin disc 위에 BMM 세포를 플레이팅하고 분화시킨 후 pit formation을 1% toluidine blue 염색으로 확인한 것이다.

[39]

도 5a는 8주령 야생형(WT)과 TM4SF19KO 암컷 마우스에 ovary를 떼지 않고 열기만 하거나(sham) 난소절제술(OVX)하여 31일째 대퇴부를 고정 한 후 micro CT 분석한 결과이다.

[40]

도 5b는 micro CT의 촬영 이미지를 3차원 영상분석 프로그램으로 분석하여 얻은 골부피(BV), 조직 부피에 대한 골 부피의 비율(% BV/TV), 골소주의 평균 수(Tb.N), 골소주 간극(Tb.Sp), 골소주 두께(Tb.Th)를 포함한 3차원 micro CT 지표(골 미세구조 지표)들을 나타낸 것이다.

[41]

도 6은 8주령 야생형(WT) 마우스와 TM4SF19KO의 마우스의 대퇴골을

- 고정하고 석회질 제거(decalcification)한 후 TRAP 염색한 결과이다.
- [42] 도 7a는 야생형(WT) 마우스와 CRISPR로 TM4SF19 extracellular domain 2 (116~165)를 녹아웃시킨 TM4SF19EC2Δ 마우스의 골수에서 세포를 뽑아 M-CSF 25 ng/ml 또는 M-CSF + RANKL 100 ng/ml을 처리하여 분화시킨 후 TRAP 염색을 진행한 결과이다. 도 7b는 야생형(WT) 마우스와 TM4SF19EC2Δ 마우스의 골수에서 세포를 뽑아 RANKL의 농도를 100 ng/ml로 고정하고 M-CSF의 농도를 25 ng/ml 또는 100 ng/ml로 처리하여 분화시킨 후 TRAP 염색한 결과이다. 도 7c는 야생형과 TM4SF19EC2Δ 마우스 골수를 분화시킨 후 다핵성 파골세포 분화 시 형성되는 액틴 벨트의 형성 여부를 F-액틴 염색으로 확인한 것이다. 도 7d는 Dentin disc 위에 야생형과 TM4SF19EC2Δ의 BMM 세포를 플레이팅하고 분화시킨 후 pit formation을 1% toluidine blue 염색으로 확인한 것이다.
- [43] 도 8은 야생형(WT) 마우스와 TM4SF19EC2Δ 마우스에 대해 파골세포 분화에 관련된 타겟 유전자 (Ctsk, Acp5, c-Fos, Nfatc1) 발현을 qPCR로 확인한 결과이다.
- [44] 도 9a는 8주령 WT과 TM4SF19EC2Δ 암컷 마우스에 ovary를 떼지 않고 열기만 하거나(sham) 난소절제술(OVX)하여 31일 후 대퇴부를 고정하여 micro CT 분석한 결과이다.
- [45] 도 9b는 micro CT의 촬영 이미지를 3차원 영상분석 프로그램으로 분석하여 얻은 골부피(BV), 조직 부피에 대한 골 부피의 비율(% BV/TV), 골소주의 평균 수(Tb.N), 골소주 간극(Tb.Sp), 골소주 두께(Tb.Th)를 포함한 3차원 micro CT 지표(골 미세구조 지표)들을 나타낸 것이다.
- [46] 도 10은 8주령 야생형(WT)과 TM4SF19KO, TM4SF19EC2Δ 암컷 마우스에 난소를 떼지 않고 열기만 하거나(sham) 난소절제술(ovariectomy, OVX)하고 31일 후 대퇴부를 고정한 후 micro CT 분석한 결과, 골 미세구조 지표들을 보여준다.
- [47] 도 11은 8주령 야생형(WT)과 TM4SF19KO, TM4SF19EC2Δ 암컷 마우스에 ovary를 떼지 않고 열기만 하거나(sham) 난소절제술(OVX)하고 31일 후 대퇴부를 고정하여 micro CT 촬영 이미지이다.
- [48] 도 12a는 TM4SF19의 일부 서열을 결실시킨 hTm4sf19 변이체(hTM4SF19_{115-175Δ}, hTm4sf19_{105-186Δ}, hTm4sf19_{105-196Δ}, hTm4sf19_{94-186Δ} 및 hTm4sf19_{94-196Δ})의 구조를 모식화한 도면이다. 도 12b는 TM4SF19가 자기 자신과 결합하며 세포간 상호 작용에 관여함을 보여주는 결과이다. TM4SF19의 일부 서열을 결실시킨 변이체들 중 94-196 결실 변이체가 TM4SF19 자기 자신과의 결합되지 않음을 보여주는 결과이다. 도 12c는 hTm4sf19 중 94-196 서열만을 남기고 나머지 서열들을 결실시킨 hTm4sf19₉₄₋₁₉₆(상단)가 야생형(WT)과 유사하게 자기 자신과 결합하며 세포간 상호 작용에 관여함을 보여주는 결과(하단)이다. 도 12d 및 도 12e는 TM4SF19 단편으로 사용된 hTm4sf19 131~160, hTm4sf19 145~169, hTm4sf19 131~169, hTm4sf19 120~160, hTm4sf19 120~169, hTm4sf19 120~180, hTm4sf19 120~186, hTm4sf19 120~196, hTm4sf19 120~209, hTm4sf19 131~196 및 hTm4sf19 145~196의 구조와 N-말단에 3Flag를 태깅 한 TM4SF19과 상기

TM4SF19 단편의 hIgG1-Fc 융합 단백질 간의 상호결합을 면역침전으로 확인한 결과를 보여준다. 도 12f는 C-말단에 3HA를 태깅한 인테그린 α v와 TM4SF19 단편의 hIgG1-Fc 융합 단백질 간의 상호작용을 면역침전으로 확인한 결과를 보여준다. 도 12g는 C-말단에 3HA를 태깅한 인테그린 β 3과 TM4SF19 단편의 hIgG1-Fc 융합 단백질 간의 상호작용을 면역침전으로 확인한 결과를 보여준다. 도 12h는 293T 세포 또는 파골세포 전구체 Raw 264.7 cell에 TM4SF19과 파골세포 기능을 조절하며 다핵성 파골세포 형성 시 세포골격 재배열에 관여하는 단백질인 인테그린 α v 또는 인테그린 β 3를 과발현한 후 interaction 여부를 확인한 결과이다. 또한 C-말단에 3HA를 태깅한 인테그린 α v 또는 인테그린 β 3와 N-말단에 3Flag를 태깅한 TM4SF19과 TM4SF19 EC2 (115-175)를 결실시킨 변이체와의 interaction 여부를 확인한 결과이다. 도 12i는 TM4SF19과 파골세포 기능을 조절에 관여하며 다핵성 파골세포 형성 시 세포골격 재배열에 관여하는 membrane protein인 DC-Stamp와 siglec-15과의 상호작용을 면역침전으로 확인한 결과를 보여준다.

- [49] 도 13은 마우스 유래 유방암 세포 E0771에 TM4SF19을 과발현시켜 세포 증식, 콜로니 형성, 세포 이동을 확인한 결과이다[LPCX: retroviral control vector명].
- [50] 도 14는 마우스 유래 유방암 세포 E0771를 야생형(WT)과 TM4SF19KO 마우스, TM4SF19EC2Δ 마우스 꼬리 정맥에 주입 후 폐 전이 억제를 확인한 결과이다.
- [51] 도 15는 야생형(WT) 마우스와 TM4SF19KO 마우스에서 골수를 뽑아 골수 유래대식세포로 분화시킨 후 유방암 세포와 공동 배양(co-culture)하여 세포 이동시킨 후 세포 이동에 관여하는 타겟 유전자(CDH2, SNAI1, SNAI2)의 발현(도 15a)을 qPCR로 확인하고(도 15a)과 전이 관련 단백질(비멘틴, slug, bnail, E-cadherin, 베타-액틴) 발현을 웨스턴 블랏팅으로 확인(도 15b)한 결과이다[BMDM: bone marrow derived macrophages].
- [52] 도 16은 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포(hADMSC)를 지방세포로 분화시킨 후 유전자(C/EBP α , PPAR γ) 발현을 qPCR로 확인(상단)하고 웨스턴 블랏팅으로 단백질(TM4SF19, PPAR γ , FABP4) 발현을 확인한 결과(하단)이다.
- [53] 도 17은 정상식이를 먹인 6주령 야생형(WT) 마우스와 TM4SF19KO 마우스에게 16주 동안 고지방 식이(60% fat)를 먹이며 몸무게 증가를 확인한 결과를 보여준다.
- [54] 도 18은 정상식이를 먹인 6주령 야생형(WT) 마우스와 TM4SF19KO 마우스에게 12주 동안 고지방 식이를 먹인 후 인슐린 저항성을 HOMA-IR로 확인하고(A), 간 표현형(phenotype)을 확인하며, 간 조직을 고정 후 H&E 염색하고(B), 간 내의 트리글리세라이드 레벨을 측정된 결과(C)를 보여준다.
- [55] 도 19는 정상식이를 먹인 6주령 야생형(WT) 마우스와 TM4SF19KO 마우스에 18주 동안 고지방 식이를 먹이며 몸무게 증가(a)와 각 조직의 무게(b)를 확인하고, 피하지방 및 내장지방 무게(c)를 확인하였으며, 부고환 백색지방(eWAT: epididymal white adipose tissue)의 H&E 염색으로 지방의

표현형과 지방 주변의 지방 조직(adipose tissue) 대식세포를 확인(d)하고, 혈청 내 항 비만 사이토카인인 아디포넥틴의 분비도 확인한 결과이다[rtWAT:

retroperitoneal white adipose tissue, sWAT: subcutaneous white adipose tissue, ingWAT: inguinal white adipose tissue, iWAT: interscapular white adipose tissue, iBAT: interscapular brown adipose tissue].

- [56] 도 20은 정상식을 먹인 6주령 야생형(WT) 마우스와 TM4SF19KO 마우스에 12주 동안 고지방 식이를 먹인 후 eWAT(부고환 백색지방조직)와 sWAT(피하 백색지방조직)에서 지방분화 마커(상단)와 대식세포(macrophage), M1-유사 대식세포 마커(M1-like macrophage marker)의 발현(하단)을 확인한 결과이다.
- [57] 도 21은 정상식을 먹인 6주령 야생형(WT) 마우스와 TM4SF19KO 마우스에 12주 동안 고지방 식이를 먹인 후 부고환 백색지방 조직의 FACS 분석으로 대식세포(A) % 및 수지상 세포(B) %를 확인한 결과이다.
- [58] 도 22는 야생형(WT)과 TM4SF19KO 마우스를 12주 동안 고지방 식이를 먹인 후 부고환 백색지방 조직에서 기질 혈관 분획(SVF: stromal vascular fraction)에서 대식세포 마커 유전자인 MCP1 및 F4/80의 발현, M1-유사 대식세포 마커인 IL6 및 TNF α 발현 및 M2-유사 대식세포 마커인 IL10의 발현을 확인한 결과이다.
- [59] 도 23는 eWAT에서 염증, 인슐린 저항성 및 지방간에 대한 TM4SF19 역할을 보여주는 결과이다.
- [60] 도 24a는 정상식을 먹인 6주령 마우스에 고지방 식이를 주기 시작하여 12주간 먹인 고지방 식이 유도 비만 마우스 모델에서 TM4SF19KO 마우스의 부고환 백색지방으로부터 베이지 또는 갈색지방 표현형(phenotype)으로의 전환을 확인한 결과이다.
- [61] 도 24b는 고지방 식이 유도 비만 마우스 모델에서 TM4SF19KO 마우스의 백색지방에서의 Ucp1 발현이 증가함을 확인한 결과이다.
- [62] 도 24c는 갈색지방 분화 인 비트로 모델의 제작 과정이다.
- [63] 도 24d는 갈색지방 분화 인 비트로 모델에서 TM4SF19KO에서 Ucp1이 증가되었음을 확인한 결과이다.
- [64] 도 24e는 TM4SF19가 백색 지방세포를 베이지 지방세포로 바꾸는데 관여함을 확인한 결과이다.
- [65] 도 25a는 백색지방을 collagen type I으로 digestion한 후 원심분리하여 adipose tissue, infranatant, SVF fraction으로 나누었다. 각 fraction에 있는 cell 종류에 대한 모식도이다.
- [66] 도 25b는 고지방 식이 60% fat을 24주간 먹인 마우스의 부고환 백색지방과 피하 백색지방에서 지방세포와 SVF를 나눠서 TM4SF19의 발현을 확인한 결과이다.
- [67] 도 26은 야생형(WT)과 TM4SF19KO 마우스의 피하 백색지방에서 SVF를 뽑아 이소프로판올로 갈색지방으로 분화를 유도하고 thermogenic gene expression과 베이지 지방 마커 유전자 발현을 확인한 것이다.
- [68] 도 27은 인 비트로 모델로 지방세포를 분화시킨 후 macrophage와 contact

- co-culture(우) 후 대식세포, 염증, 아디포넥틴 등의 마커 유전자를 확인(좌)한 결과이다[대조군: macrophage와 지방세포를 각각 키운 후 RNA를 뽑아 합친 후 사용함].
- [69] 도 28은 야생형(WT) 마우스에서 SVF를 뽑아 지방 생성을 시키고, WT 골수 대식세포로 분화시킨 후 각각 또는 contact co-culture하여 염증 변화 유도한 결과이다[대조군(ctrl): 대식세포와 지방세포를 각각 키운 후 RNA를 뽑아 합친 후 사용함].
- [70] 도 29는 야생형(WT) 마우스와 TM4SF19KO 마우스에서 SVF를 뽑아 adipogenesis를 시키고, 각각의 마우스에서 골수를 뽑아 대식세포로 분화시킨 후 contact co-culture하여 염증 변화 유도한 결과이다.
- [71] 도 30은 야생형(WT) 마우스와 TM4SF19KO 마우스에서 SVF를 뽑아 adipogenesis를 시키고, 각각의 마우스에서 골수를 뽑아 대식세포로 분화시킨 후 각각 또는 contact co-culture하여 염증 변화 유도한 결과이다[대조군(ctrl): 대식세포와 지방세포를 각각 키운 후 RNA를 뽑아 합친 후 사용함].
- [72] 도 31은 인 비트로 인슐린 내성 모델 제작과정(상단) 및 지방세포를 12일간 분화시킨 후 $TNF\alpha$ 를 24시간 처리한 후 지방 분화 마커인 C/EBP α , insulin resistance in vitro model marker인 C/EBP β 를 확인(중앙)하고, TM4SF19의 증가도 확인한 결과(하단)이다.
- [73] 도 32는 인 비트로 인슐린 내성 모델로 야생형에 비해 TM4SF19KO에서 insulin resistance가 감소함을 보여주는 결과이다.
- [74] 도 33은 야생형(WT) 마우스에서 골수를 뽑아 대식세포 분화시킨 후 M1 polarization에 관여하는 마커를 확인한 결과이다.
- [75] 도 34는 야생형(WT) 마우스와 TM4SF19KO 마우스에서 골수를 뽑아 대식세포 분화시킨 후 M1 polarization을 진행하고, 야생형 마우스와 TM4SF19KO 마우스에서 골수를 뽑아 대식세포 분화시킨 후 M1 polarization에 관여하는 마커를 확인한 결과(하단)이다.
- [76] 도 35는 293T 세포에 인간 TM4SF19(hTM4SF19), 인간 EC2 Δ (hTM4SF19 115~175 Δ), 마우스 TM4SF19(mTM4SF19), 마우스 EC2 Δ (mTM4SF19 116~165 Δ)를 일시적으로 과발현시킨 후 앞서 제작한 폴리클로날 마우스TM4SF19 항체로 발현을 확인하기 위해 웨스턴 블랏팅을 수행한 결과를 나타낸 것이다.
- [77] 도 36은 야생형 마우스에서 골수를 뽑아 파골세포로 분화시키면서 TM4SF19 항체를 처리하고 TRAP 염색으로 확인한 결과이다.
- [78] 도 37은 인간 TM4SF19₁₂₀₋₁₆₉-Fc와 마우스 TM4SF19₁₁₆₋₁₆₅-Fc를 제작하여 정제한 후 쿠마시 염색(좌, 우) 및 웨스턴 블랏팅(중) 결과를 나타낸 것이다.
- [79] 도 38a는 mTM4SF19₁₁₆₋₁₆₅-Fc를 파골세포 분화 과정 처리하여 다핵성 파골세포 형성 저해를 TRAP 염색으로 확인한 것이다 [E1; Elution buffer (20 mM glycine)로 elution한 sample. E1-1; Buffer A(50mM phosphate, 50 mM NaCl, pH 7.0)로

- Ultrafiltration/Diafiltration (UF/DF) 진행한 샘플 (Fc가 좀 더 안정적일 수 있음)].
- [80] 도 38b는 hTM4SF19₁₂₀₋₁₆₉-Fc를 파골세포 분화 과정 처리하여 다핵성 파골세포 형성 저해를 TRAP 염색으로 확인한 것이다.
- [81] 도 38c는 hIgG1-Fc, hTM4SF19₁₂₀₋₁₆₉-Fc 및 mTM4SF19₁₁₆₋₁₆₅-Fc를 파골세포 분화 과정에 처리하여, hTM4SF19₁₂₀₋₁₆₉-Fc 및 mTM4SF19₁₁₆₋₁₆₅-Fc가 다핵성 파골세포 형성을 저해함을 TRAP 염색으로 확인한 결과이다.
- [82] 도 38d는 야생형 마우스 골수를 분화시키면서 IgG-Fc와 mTM4SF19-Fc를 10 µg/ml 처리한 후 다핵성 파골세포 분화 시 형성되는 액틴 벨트 형성 여부를 F-액틴 염색으로 확인한 것이다.
- [83] 도 38e는 골 재흡수가 mTM4SF19-Fc에 의해 block된 것을 Toluidine blue 염색으로 확인한 것이다.
- [84] 도 39a는 마우스 TM4SF19-Fc에 의한 골 손실 억제 효과를 보여주는 micro CT의 촬영 이미지이다.
- [85] 도 39b는 도 39a의 micro CT의 촬영 이미지를 3차원 영상분석 프로그램으로 분석하여 얻은 골부피(BV), 조직 부피에 대한 골 부피의 비율(% BV/TV), 골소주의 평균 수(Tb.N), 골소주 간극(Tb.Sp)를 포함한 3차원 micro CT 지표들을 나타낸 것이다.
- [86] 도 39c는 마우스 대퇴골 조직을 H&E 염색을 통해 조직병리학적으로 분석한 것이다.
- [87] 도 39d는 8주령 female 마우스에 ovariectomy 후 hIgG1-Fc, 마우스 TM4SF19-Fc (116~165), 인간 TM4SF19-Fc (131~169)를 꼬리 정맥 주사 후 골 손실이 현저하게 억제됨을 확인한 것이다.
- [88] 도 40a는 M-CSF 또는 M-CSF와 RANKL을 처리하면서 마우스 TM4SF19-Fc를 10µg/ml 처리하는 조건에서 분화된 세포들의 Ctsk 및 Acp5의 mRNA 발현을 그래프로 표현한 것이다.
- [89] 도 40b는 야생형(WT) 마우스의 골수로부터 세포를 뽑아 M-CSF 또는 M-CSF와 RANKL(M-CSF 25 ng/ml, RANKL 100 ng/ml)을 처리하는 조건에서 분화시키면서 mTM4SF19-Fc를 5 µg/ml 처리한 후 파골세포 분화 마커 단백질의 발현을 확인한 결과를 보여준다.
- [90] 도 41은 Raw264.7 세포의 분화 전 후 mTM4SF19-Fc와의 surface binding을 FACS 분석으로 확인한 것이다.
- [91] 도 42a는 TM4SF19-Fc를 이용한 류마티스 관절염의 예방 및 치료를 확인하기 위한 실험 스케줄을 모식화한 것이다. 도 42b는 콜라겐 유도 관절염(Collagen Induced Arthritis, CIA) 유발 후 42일 후 마우스의 관절 상태를 확인한 결과를 나타낸다. 도 42c는 실험 기간 동안 조사된 CIA 스코어와 부은 관절의 수를 분석한 결과를 보여준다. 도 42d는 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델의 발에 발생한 염증과 뼈 손상이 mTM4SF19-Fc 처리에 의해 용량 의존적으로 억제되었음을 보여주는 micro CT 이미지이다. 도 42e는 콜라겐 유도 관절염

마우스 모델의 발에 발생한 염증과 뼈 손상이 mTM4SF19-Fc 처리에 의해 용량 의존적으로 억제됨을 보여주는 결과이다. 도 42f는 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델 femur의 micro CT의 촬영 이미지를 3차원 영상분석 프로그램으로 분석하여 골부피(BV), 조직 부피에 대한 골 부피의 비율(% BV/TV), 골소주의 평균 수(Tb.N), 골소주 간극(Tb.Sp)을 포함한 3차원 micro CT 지표(골 미세구조 지표)들을 나타낸 것이다. 도 42g는 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델의 연골 손상을 toluidine blue로 확인한 결과이다. hIgG1-Fc 처리군에 비해 mTM4SF19-Fc 처리군의 연골 손상이 억제된 것을 나타낸 것이다. 도 42h는 Collagen antibody treatment 3일 후 LPS injection한 관절염 유발 마우스 모델에서 mTM4SF19-Fc과 hTM4SF19-Fc(120-169)의 semi-therapeutic effect를 arthritis score로 확인한 것이다. hIgG1-Fc에 비해 TM4SF19-Fc 처리에 의해 arthritis disease score가 낮아지고, paw thickness가 감소하는 것을 확인한 결과이다. 도 42i는 collagen antibody treatment 3일 후 LPS injection한 관절염 유발 마우스 모델에서 arthritis disease score가 maximum인 8일 후 mTM4SF19-Fc의 therapeutic effect를 확인한 것이다. Untreated group에 비해 TM4SF19-Fc 처리에 의해 arthritis disease score가 낮아지고 paw thickness가 감소하고, toluidine blue로 연골 손상이 억제된 것으로 치료효과를 확인한 결과이다.

- [92] 도 43a는 mTM4SF19-Fc를 이용한 유방암의 뼈 전이 억제 효과를 확인하기 위한 실험 스케줄을 모식화한 것이다. 도 43b는 생물발광 영상 분석을 통하여 암 진행(cancer progression) 상태를 확인한 결과를 보여준다. 도 43c는 유방암의 뼈전이기가 일어난 마우스의 관절을 micro CT 스캔한 결과를 보여준다. 도 43d는 유방암의 뼈전이기가 일어난 마우스의 관절에 대해 H&E 염색을 통해 조직학적 분석을 수행한 결과를 나타낸 것이다.
- [93] 도 44a는 hTM4SF19-Fc(145-169)를 이용한 유방암의 뼈 전이 억제 효과를 확인하기 위한 실험 스케줄을 모식화한 것이다. 도 44b는 생물발광 영상 분석을 통하여 암 진행(cancer progression) 상태를 확인한 결과를 보여준다. 도 44c는 유방암의 뼈 전이가 일어난 마우스의 관절에 대해 luminescence 분석을 수행한 결과를 나타낸 것이다. 도 44d는 유방암의 뼈전이기가 일어난 마우스의 관절을 micro CT 스캔한 결과를 보여준다.
- [94] 도 45는 마우스 유래 E0771 유방암 세포를 야생형 마우스의 꼬리 정맥에 주입하여 폐 전이를 유발시킨 후 mTM4SF19-Fc (116~165) 및 hTM4SF19-Fc(145-169)에 의해 폐 전이가 현저하게 억제됨을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [95] 도 46a는 mTM4SF19-Fc 처리에 의해 고지방 식이에 의한 비만이 억제됨을 보여준다.
- [96] 도 46b는 mTM4SF19-Fc 처리에 의해 고지방 식이에 의한 장기 내 백색 지방의 무게 감소 및 지방간 억제 효과를 Organ weight과 body weight에 대비 organ weight으로 확인한 것이다.

- [97] 도 47은 H&E 염색 및 Masson & trichrome 염색을 통해 확인한 mTM4SF19-Fc 처리에 따른 간 조직 내 지방간 감소 효과 및 혈장 내 중성지방 감소 효과를 보여준다.
- [98] 도 48은 mTM4SF19-Fc(116~165)의 처리에 의해 지방세포 분화가 용량 의존적으로 억제됨을 Oil-red-O 염색으로 lipid droplet을 염색하여 확인하고, 지방 생성 마커인 C/EBP α 와 PPAR- γ 의 유전자 발현으로 확인한 결과이다
- [99] 도 49는 TM4SF19-Fc에서 파골세포 분화에 의해 유도된 암세포 이동을 억제하는 것을 Crystal violet solution 0.05%로 염색하여 확인한 것이다.
- [100] 도 50a는 TM4SF19KO에서 파골세포 분화에 의한 암세포 이동 억제를 Crystal violet solution 0.05%로 염색하여 확인한 것이다.
- [101] 도 50b는 TM4SF19EC2 Δ 에서 파골세포 분화에 의한 암세포 이동 억제를 Crystal violet solution 0.05%로 염색하여 확인한 것이다.
- [102] 도 51은 3Flag-hTM4SF19를 MG63 골육종 세포주에 안정적으로 과발현시킨 후 세포의 성장을 MTT 분석으로 확인하고, 콜로니 형성 과 이동을 확인한 결과이다.
- [103] 도 52는 3Flag-hTM4SF19를 HOS 골육종 세포주에 안정적으로 과발현시킨 후 세포의 성장을 MTT 분석으로 확인하고, 콜로니 형성 과 이동을 확인한 결과이다.
- [104] 도 53은 143b 골육종 세포주에 TM4SF19를 CRISPR로 녹아웃시킨 후 각각 다른 clone (#4와 #6)으로 세포의 성장을 MTT 분석으로 확인하고, 군집 능력을 콜로니 형성으로 확인한 결과이다.
- [105] 도 54는 143b 골육종 세포에 hTM4SF19-Fc(120-169 aa)를 처리하면서 세포의 성장을 MTT 분석(도 54a)과 세포 계수로 확인(도 54 c)하고, 군집능력을 콜로니 형성으로 확인(도 54b)하고, 세포의 이동(도 54d)을 확인한 결과이다.
- [106] 도 55는 인간 TM4SF19-Fc(120-169 aa) (10 μ g/ml) 처리에 의해 U2OS, MG63 골육종 콜로니 형성이 억제됨을 확인한 것이다.
- [107] 도 56은 HOS 골육종 세포의 세포 이동 능력이 10 μ g/ml hTM4SF19-Fc (120-169 aa)와 hTM4SF19-Fc (145~169 aa) 처리에 의해 억제됨을 확인한 것이다.
- [108] 도 57a는 인간 TM4SF19-Fc(120~169 aa)의 췌장암 세포 콜로니 형성 억제를 확인한 것이다.
- [109] 도 57b는 인간 TM4SF19-Fc(120~169 aa)의 췌장암 세포 성장 억제를 세포 계수로 확인한 것이다.
- [110] 도 58a-d는 본원 실시예에 사용된 TM4SF19 단편 및 TM4SF19-Fc 융합 단백질 서열 정보를 나타낸다 [각 도면에서 해당 타겟 서열은 볼드체로 표시한 부분으로, SEQ ID NOs: 8, 12, 15, 18로 표시되어 있으며; 효소 부위는 타겟 서열과 면역글로불린 Fc 영역 사이에 있는 부위이고; 면역글로불린 Fc 영역은 하이라이트로 표시된 부분으로, SEQ ID NO: 9로 표시되어 있음].
- [111]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [112] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [113] 한편, 본 발명의 실시 형태는 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 이하 설명하는 실시형태로 한정되는 것은 아니다. 또한 본 발명의 실시 형태는 당해 기술분야에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 더욱 완전하게 설명하기 위해서 제공되는 것이다. 나아가, 명세서 전체에서 어떤 구성요소를 "포함"한다는 것은 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있다는 것을 의미한다.
- [114]
- [115] 본 발명은 TM4SF19 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 골 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [116] 또한, 본 발명은 TM4SF19 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 비만 또는 비만 매개 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [117] 또한, 본 발명은 TM4SF19 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 암 예방, 치료 또는 암 전이 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [118] 본 발명에서 용어, "TM4SF19"는 막 관통 4L 6 패밀리 멤버 19(transmembrane 4 L six family member 19; TM4SF19, OCTM4)으로, 막 관통 4L 6 슈퍼패밀리에 속한다. 이러한 슈퍼패밀리 멤버는 인테그린과의 상호 작용을 통해 세포 증식, 운동성 및 접착을 포함한 다양한 세포 과정에서 관여하고, 간 섬유화, 암 등의 질환과 관련이 있다고 알려져 있다. 그러나, TM4SF19에 대해서는 그 기능과 관련하여 제대로 연구된 바 없다.
- [119] TM4SF19 단백질은 인간(Homo sapiens) 또는 마우스(Mus musculus) 뿐만 아니라, 원숭이, 소, 말, 개, 고양이 등의 다른 포유동물에서도 동일한 단백질이 발현될 수 있다.
- [120] 인간 유래의 TM4SF19는 각각 GenBank Accession No. NM_138461.4, NM_001204897.2, NM_001204898.2 각각을 포함하는 mRNA로부터 각각 NP_612470.2, NP_001191826.1, NP_001191827.1로 나타나는 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 또는 단백질로 번역될 수 있다. 즉, 인간 유래의 TM4SF19는 3가지 전사체 변이체(transcript variant); GenBank Accession No. NM_138461.4 (transcript variant 1), NM_001204897.2(transcript variant 2), NM_001204898.2 (transcript variant 3) 가 있으며, 3종의 아이소폼; GenBank Accession No. NP_612470.2 (isoform 1), NP_001191826.1 (isoform 2), NP_001191827.1(isoform 3)이 있다. 본 발명의 실시예에서 사용된 TM4SF19는 GenBank Accession No. NM_138461.4 (transcript variant 1)을 포함하는 mRNA로부터 얻어진 NP_612470.2(isoform 1)이다. isoform 1은 마우스 TM4SF19와 상동성이 높다.

- [121] 마우스 TM4SF19는 GenBank Accession No. NP_001153874.1로, SEQ ID NO: 7로 표시된다.
- [122] <GenBank Accession No. NP_612470.2 (isoform 1) [SEQ ID NO: 1]>
- [123] MVSSPCTQAS SRTCSRILGL SLGTAALFAA GANVALLLPN WDVTYLLRGL
LGRHAMLGTG 60
- [124] LWGGGLMVL T AAILISLMGW RYGCFSKSG L CRSVLTALLS GGLALLGALI
CFVTSGVALK 120
- [125] DGPFCMFDVS SFNQTQAWKY GYPFKDLHSR NYLYDRSLWN
SVCLEPSAAV VWHVSLFSAL 180
- [126] LCISLLQLLL VVVHVINSLL GLFCSLCEK
- [127] <GenBank Accession No. NP_001191826.1 (isoform 2) [SEQ ID NO: 2]>
- [128] MVSSPCTQAS SRTCSRILGL SLGTAALFAA GANVALLLPN WDVTYLLRGL
LGRHAMLGTG 60
- [129] LWGGGLMVL T AAILISLMGW RYGCFSKSG L CRSVLTALLS GGLALLGALI
CFVTSGVALK 120
- [130] DGPFCMFDVS SFNQTQAWKY GYPFKDLHRI ICMTVRSGTP SAWSPLQLLS
GTCPPSPFFC 180
- [131] ASACSSFSWW SFMSSTASWA FSAASARSDR QNLHLQAWVF SSSAVLNPFY
KEWVRIINKL 240
- [132] PL
- [133] <GenBank Accession No. NP_001191827.1 (isoform 3) [SEQ ID NO: 3]>
- [134] MVSSPCTQAS SRTCSRILGL SLGTAALFAA GANVALLLPN WDVTYLLRGL
LGRHAMLGTG 60
- [135] LWGGGLMVL T ALLSGGLALL GALICFVTSG VALKDGPFCM FDVSSFNQTQ
AWKYGYPFKD 120
- [136] LHSRNYLYDR SLWNSVCLEP SAAVVWHVSL FSALLCISLL QLLLVVVHVI
NSLLGLFCSL 180
- [137] CEK
- [138] <GenBank Accession No. NM_138461.4 (transcript variant 1) [SEQ ID NO: 4]>
- [139] 1 aaagagtctt ggaaagacaa ccttcaggtc cagccctgga gctggaggag tggagcccca
- [140] 61 ctctgaagac gcagccttc tccaggttct gtcttccca ttctgattct tgacaccaga
- [141] 121 tgcaggatgg tgcctctcc ctgcacgcag gcaagctcac ggacttgctc ccgtatcctg
- [142] 181 ggactgagcc ttgggactgc agccctgttt gctgctgggg ccaacgtggc actcctcctt
- [143] 241 cctaactggg atgtcaccta cctgttgagg ggccctcctg gcaggcatgc catgctggga
- [144] 301 actgggctct ggggaggagg cctcatggtc ctactgcag ctatcctcat ctcttgatg
- [145] 361 ggctggagat acggctgctt cagtaagagt gggctctgtc gaagcgtgct tactgctctg
- [146] 421 ttgtcaggtg gcctggcttt acttgagacc ctgatttctt ttgtcacttc tggagtgtg
- [147] 481 ctgaaagatg gtcctttttg catgtttgat gtttcactct tcaatcagac acaagcttgg

[148] 541 aaatatggtt acccattcaa agacctgcat agtaggaatt atctgtatga ccgttcgtc
 [149] 601 tggaaactcg tctgcctgga gccctctgca gctgttgtct ggcacgtgtc cctcttctcc
 [150] 661 gcccttctgt gcatcagcct gctccagctt ctctggtgg tcgttcatgt catcaacagc
 [151] 721 ctctggggcc tttctgcag cctctgcgag aagtgcacagg cagaaccttc acttgcaaga
 [152] 781 atgggtgttt tcatcatcgg ctgtctttaa tctttctac aaggagtggg tacgaattat
 [153] 841 aaacaaactt ccccttagg taccctgga gtaataatga caacaaaatt cactgcaggt
 [154] 901 cgggtggaatg atagaatgca ttttaaatca cattgtaaac ttccagggtga tccatggata
 [155] 961 ggataaataa ctaagtatt ataattgtt aggaatttat agtcataaa atactctca
 [156] 1021 gccagg
 [157]
 [158] <GenBank Accession No. NM_001204897.2(transcript variant 2) [SEQ ID NO: 5]>
 [159] 1 aaagagtcct ggaaagacaa ccttcaggtc cagccctgga gctggaggag tggagcccca
 [160] 61 ctctgaagac gcagccttc tccaggttct gtctctcca ttctgattct tgacaccaga
 [161] 121 tgcaggatgg tctctctcc ctgcacgcag gcaagctcac ggacttgctc ccgtatcctg
 [162] 181 ggactgagcc ttgggactgc agccctgttt gctgctgggg ccaacgtggc actcctcctt
 [163] 241 cctaactggg atgtcaccta cctgttgagg ggctccttg gcaggcatgc catgctggga
 [164] 301 actgggctct ggggaggagg cctcatggta ctactgcag ctatcctcat ctcttgatg
 [165] 361 ggctggagat acggctgctt cagtaagagt gggctctgtc gaagcgtgct tactgctctg
 [166] 421 ttgtcaggtg gcctggcttt acttgagacc ctgatttct ttgtcacttc tggagtgtg
 [167] 481 ctgaaagatg gtctttttg catgtttgat gtttcactt tcaatcagac acaagcttg
 [168] 541 aaatatggtt acccattcaa agacctgcat agaattatct gtatgacctg tgcctctgga
 [169] 601 actcctctg cctggagccc tctgcagctg ttgtctggca cgtgtccctc ttctccgcc
 [170] 661 ttctgtgcat cagcctgctc cagcttctcc tgggtgctgt tcatgtcacc aacagcctcc
 [171] 721 tgggctttt ctgcagcctc tgcgagaagt gacaggcaga accttactt gcaagcatgg
 [172] 781 gtgttttcat catcggctgt ctgaaactt ttctacaagg agtgggtacg aattataaac
 [173] 841 aaactcccc ttaggtatc cctggagtaa taatgacaac aaaattcact gcaggctggt
 [174] 901 ggaatgatag aatgcatttt aatcacatt gtaaaactcc aggtgatcca tggataggat
 [175] 961 aaataactaa gttattataa ttgttttaga atttatagtc cataaaatat cctccagcca
 [176] 1021 gg
 [177]
 [178] <GenBank Accession No. NM_001204898.2(transcript variant 3) [SEQ ID NO: 6]>
 [179] 1 aaagagtcct ggaaagacaa ccttcaggtc cagccctgga gctggaggag tggagcccca
 [180] 61 ctctgaagac gcagccttc tccaggttct gtctctcca ttctgattct tgacaccaga
 [181] 121 tgcaggatgg tctctctcc ctgcacgcag gcaagctcac ggacttgctc ccgtatcctg
 [182] 181 ggactgagcc ttgggactgc agccctgttt gctgctgggg ccaacgtggc actcctcctt
 [183] 241 cctaactggg atgtcaccta cctgttgagg ggctccttg gcaggcatgc catgctggga
 [184] 301 actgggctct ggggaggagg cctcatgggt ctactgctc tttgtcagg tggcctggct
 [185] 361 ttacttgag cctgatttg ctgtgactt tctggagtg ctctgaaaga tggctctttt

- [186] 421 tgcattgttg atgtttcatc cttaaatcag acacaagctt ggaaatatgg ttaccattc
 [187] 481 aaagacctgc atagtaggaa ttatctgtat gaccgttcgc tctggaactc cgtctgcctg
 [188] 541 gagccctctg cagctgttgt ctggcacgtg tccctcttct ccgcccttct gtgcattcagc
 [189] 601 ctgctccagc ttctcctggt ggctgttcat gtcattcaaca gcctcctggg ccttttctgc
 [190] 661 agcctctgcg agaagtgaca ggcagaacct tcaattgcaa gcatgggtgt ttcatcatc
 [191] 721 ggctgtcttg aatccttct acaaggagtg ggtacgaatt ataaacaaac ttcccttta
 [192] 781 ggatccctg gagtaataat gacaacaaaa ttactgcag gtcgggtgaa tgatagaatg
 [193] 841 cattttaaat cacattgtaa acttcagggt gatccatgga taggataaat aactaagtta
 [194] 901 ttataattgt ttaggaattt atagtcata aaatatctc cagccagg
 [195] <GenBank Accession No. NP_001153874.1[SEQ ID NO: 7]>
 [196] MLSFSRVVNC SRTCSRFLGL SLGTASLCAA GANIALLPN WDVTYLMRGL
 IGKHAMLGSG
 [197] LWGGGLMVLL AATLISMTGS FSKSAPCLQV LIALSSGLA LLGAVICFVT
 SGVALKDGP
 [198] CMFDVSSFNQ TQAWKFGYPF KDLHNRNYLY DRSLWTSVCL
 EPSKAVVWHV AFFSILLCIS
 [199] LLQLLLVAIH LVNSILGLFC SFCEKH
 [200]

- [201] 본 발명의 TM4SF19 발현 또는 활성 억제제는 TM4SF19 유전자의 발현 또는 TM4SF19 단백질의 활성을 감소시키는 물질을 의미하는 것이다. 구체적인 형태에서 본 발명의 TM4SF19 유전자의 발현을 억제하는 억제제는 TM4SF19 유전자에 직접적으로 작용하거나 또는 TM4SF19 유전자의 상위 조절자에 간접적으로 작용하여 TM4SF19 유전자의 발현을 전사 수준에서 감소시키거나, 발현된 TM4SF19 유전자의 분해를 증가시키거나, 그 활성을 방해함으로써, TM4SF19 유전자의 발현 수준 또는 그 활성을 감소시키는 물질을 의미한다. 구체적으로, TM4SF19 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 짧은 헤어핀 RNA(small hairpin RNA, shRNA), 작은 간섭 RNA(small interfering RNA, siRNA), 마이크로 RNA(microRNA, miRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [202] 본 발명에서 용어, 안티센스 뉴클레오티드는 특정 유전자에 상보적이고, TM4SF19 mRNA에 결합할 수 있는 DNA, RNA 서열을 의미한다. 안티센스 뉴클레오티드는 모노머 단위의 긴 사슬이기 때문에 이들은 표적 유전자서열에 대해 쉽게 합성될 수 있다.
- [203] 본 발명에서 용어, "siRNA(small interfering RNA)"는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통해 RNAi(RNA interference)를 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. siRNA는 표적 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 갖는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 갖는 안티센스 RNA 가닥을 포함한다.

siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있으므로, 유전자 녹다운 방법 또는 유전자치료 방법 등에 사용된다.

- [204] 본 발명에서 용어, "shRNA(short hairpin RNA)"는 단일가닥 RNA로서 수소결합에 의해 이중가닥 부분을 형성하는 줄기(stem) 부분과 고리 형태를 띠는 루프(loop) 부분으로 구분되며, Dicer 등의 단백질에 의해 프로세싱되어 siRNA로 변환되고 siRNA와 동일한 기능을 수행할 수 있다.
- [205] 본 발명에서 용어, "miRNA(microRNA)"는 표적 RNA의 분해를 촉진시키거나 또는 이들의 번역을 억제시킴으로써 유전자 발현을 전사 후에 조절하는 21 내지 23개의 비코딩 RNA를 말한다.
- [206] 본 발명에서 용어, "리보자임(ribozyme)"은 특정 염기 서열을 인식하여 자체적으로 이를 절단하는 효소와 같은 기능을 가진 RNA 분자를 의미한다. 리보자임은 타겟 전령 RNA 가닥의 상보적인 염기서열로 특이성을 가지고 결합하는 영역과 타겟 RNA를 절단하는 영역으로 구성된다.
- [207] 또한, 구체적인 형태에서 본 발명의 TM4SF19 단백질의 활성을 억제하는 억제제는 TM4SF19 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 모방체, 앵타머, 융합 단백질 및 항체로 구성된 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [208] 본 발명에서 용어, "화합물"은 TM4SF19 단백질에 특이적으로 결합하여 이의 활성을 억제할 수 있는 임의의 화합물을 모두 포함한다.
- [209] 본 발명에서 용어, "펩티드"는 표적 물질에 대한 결합력 높은 장점이 있으며, 열/화학 처리시에도 변성이 일어나지 않는다. 또한 분자 크기가 작기 때문에 다른 단백질에 붙어서 융합 단백질로의 이용이 가능하다. 구체적으로 고분자 단백질 체인에 붙어서 이용이 가능하므로 진단 키트 및 약물전달 물질로 이용될 수 있다.
- [210] 본 발명에서 용어, "펩티드 모방체(peptide mimetics)"는 TM4SF19 단백질의 결합 도메인을 억제하여 TM4SF19 단백질의 활성을 억제하는 것이다. 펩티드 모방체는 펩티드 또는 비펩티드일 수 있고, psi 결합과 같은, 비펩티드 결합에 의해 결합된 아미노산으로 구성될 수 있다. 또한, "구조적으로 강제된(conformationally constrained)" 펩티드, 사이클릭 모방체(cyclic mimetics), 적어도 하나의 엑소사이클릭 도메인(exocyclic domain), 결합 부분(결합 아미노산) 및 활성 부위를 포함하는 사이클릭 모방체일 수 있다. 펩티드 모방체는 TM4SF19 단백질의 이차구조 특성과 유사하게 구조화되고 항체 또는 수용성 수용체와 같은 거대한 분자 억제 특성을 모방할 수 있으며, 천연의 길항제와 동등한 효과로 작용할 수 있는 신규한 소분자일 수 있다.
- [211] 본 발명에서 용어, "앵타머(aptamer)"는 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지면서 표적 분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)을 의미한다.
- [212] 본 발명에서 용어, "융합 단백질"은 서로 다른 2개 이상의 단백질 또는 동종의

단백질이 결합된 형태로 만들어진 새로운 단백질로 키메라(chimera) 단백질이라고도 많이 불린다. 2개 이상의 이종 단백질이 일부와 일부, 일부와 전체, 또는 전체와 전체가 결합한다. 많은 경우 필요에 의해 하나의 유전자의 서열과 다른 유전자의 서열을 코돈을 맞추어서 접합해 잡종유전자를 만들어 단백질로 발현시켜서 생산한다.

- [213] 일 구현예로서, 본 발명에 따른 융합 단백질은 TM4SF19 단백질에 특이적으로 결합하는 TM4SF19의 단편을 포함할 수 있다.
- [214] 상기 단편 외에 면역글로불린 Fc 영역이 추가로 포함될 수 있다.
- [215] 상기 단편은 TM4SF19의 세포외 루프 2(extracellular loop 2, EC2) 유래 단편 전체 또는 일부 부위일 수 있다. 상기 EC2 전체에 해당하는 아미노산 서열 부위는 인간 TM4SF19 단백질의 120-169번째 아미노산 부위 또는 마우스 TM4SF19 단백질의 116-165 번째 아미노산 부위일 수 있다. 상기 EC2 일부에 해당하는 아미노산 서열 부위는 인간 TM4SF19 단백질의 145-169번째 또는 131-169번째 아미노산 부위를 포함할 수 있다.
- [216] 본 발명에 따른 바람직한 융합 단백질은 SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16 또는 SEQ ID NO: 19로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [217] 일 구현예로서, 본 발명은 TM4SF19의 단편에 면역글로불린 Fc 영역이 결합된 융합 단백질, 예컨대, TM4SF19의 세포외 루프(extracellular loop) 전체 또는 일부 부위에 면역글로불린 Fc 영역이 결합된 융합 단백질; 또는 TM4SF19의 세포외 루프의 전체 또는 일부 부위와 막 단백질의 전체 또는 일부 부위에 면역글로불린 Fc 영역이 결합된 융합 단백질을 포함할 수 있다. 여기에서, TM4SF19의 단편에 면역글로불린 Fc 영역이 결합된 융합 단백질은 TM4SF19의 단편에 면역글로불린 Fc 영역이 직접적으로 결합된 것 외에 TM4SF19의 단편에 면역글로불린 Fc 영역이 간접적으로 결합된 것을 포함한다. TM4SF19의 단편에 면역글로불린 Fc 영역이 간접적으로 결합되는 경우, 링커, 스페이서 또는 효소 사이트에 해당하는 1 내지 10개, 예를 들어, 1 내지 9개, 1 내지 8개, 1 내지 7개, 1 내지 6개, 1 내지 5개, 1 내지 4개, 1 내지 3개, 1 내지 2개, 예컨대, 1개의 아미노산 서열이 TM4SF19의 단편과 면역글로불린 Fc 영역 사이에 추가로 존재할 수 있다.
- [218] 본 발명에서 사용 가능한 TM4SF19의 단편은 이에 제한되는 것은 아니나 다양한 예(hTm4sf1994~196, hTm4sf19 131~160, hTm4sf19 145~169, hTm4sf19 131~169, hTm4sf19 120~160, hTm4sf19 120~169, hTm4sf19 120~180, hTm4sf19 120~186, hTm4sf19 120~196, hTm4sf19 120~209, hTm4sf19 131~196 및 hTm4sf19 145~196)를 포함한다. 한편, TM4SF19 단백질의 안정성을 위해 면역글로불린 Fc 영역이 예시적으로 사용되었으나, TM4SF19 단백질과 결합될 수 있는 융합 파트너가 면역글로불린 Fc 영역에 국한되는 것은 아니다.
- [219] 이에 제한되는 것은 아니나, 본 발명은 또한 TM4SF19 단백질의 세포외 루프 2(extracellular loop 2) 유래 단편 및 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 TM4SF19 발현 또는 활성 억제용 융합 단백질에 관한 것이다.

- [220] 상기 TM4SF19 단백질의 세포외 루프 2(extracellular loop 2, EC2) 유래 단편은 EC2 전체 또는 일부에 해당하는 아미노산 서열 부위일 수 있다.
- [221] 상기 EC2 전체에 해당하는 아미노산 서열 부위는 인간 TM4SF19 단백질의 120-169번째 아미노산 부위 또는 마우스 TM4SF19 단백질의 116-165 번째 아미노산 부위일 수 있다.
- [222] 상기 EC2 일부에 해당하는 아미노산 서열 부위는 인간 TM4SF19 단백질의 145-169번째 아미노산 부위를 포함할 수 있다.
- [223] 상기 EC2 일부에 해당하는 아미노산 서열 부위는 인간 TM4SF19 단백질의 131-169번째 아미노산 부위를 포함할 수 있다.
- [224] 본 발명에 따른 바람직한 융합 단백질은 SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16 또는 SEQ ID NO: 19로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [225] 상기 TM4SF19 단백질의 세포외 루프 2(extracellular loop 2, EC2) 유래 단편과 면역글로불린 Fc 영역 사이에 효소 사이트를 포함할 수 있다.
- [226] 융합단백질의 제작을 위해 TM4SF19의 단편으로 사용된 인간 TM4SF19의 세포외 루프 2의 부위는 예시적인 것일 뿐 이에 제한되는 것은 아니다.
- [227] 본 발명에서 용어, "Fc 영역"은 면역글로불린의 중쇄 불변 영역 2(CH2) 및 중쇄불변 영역 3(CH3)을 포함하며, 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 및 경쇄 불변 영역 1(CL1)은 포함하지 않는 단백질을 말한다. 그것은 중쇄 불변 영역의 힌지 영역을 추가로 더 포함할 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, "Fc 영역"은 IgG, IgA, IgD, IgE 또는 IgM 유래 Fc 영역일 수 있다. 하기 실시예에서, 융합 단백질 제작을 위해 사용된 인간 IgG1-Fc는 예시적인 것일뿐, 이에 제한되지 않는다.
- [228] 또한, 상기 "Fc 영역"은 "변형된 면역글로불린의 Fc 영역" 또는 "Fc 영역 변이체"를 포함할 수 있으며, 이는 Fc 영역 중 일부 아미노산이 치환되거나, 서로 다른 종류의 Fc 영역을 조합하여 제조된 것을 의미한다. 바람직하게는, Fc 수용체와 결합력 및/또는 보체(complement)와 결합력이 변형되어 항체의존성세포독성(ADCC) 또는 보체의존성세포독성(CDC)이 야생형의 Fc 영역에 비하여 약화된 Fc 영역을 의미한다. 이때, 변형된 면역글로불린의 Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgD, IgG4 및 이들 서열의 조합으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [229] 본 발명에서 용어, "항체"란 항원성 부위에 대하여 지시되는 특이적인 면역 글로불린을 의미한다. "항체"는 단일클론 항체, 다클론 항체, 이중특이적 항체, 다중특이적 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체를 포함하며, 신규 항체 외에 이미 당해 기술분야에서 공지되거나 시판되는 항체들도 포함된다. 상기 항체는 TM4SF19에 특이적으로 결합하는 한, 2개의 중쇄와 2개의 경쇄를 포함하는 전체 길이의 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 상기 항체 분자의 기능적인 단편은 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, 여기에는 Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv 등이 포함될 수 있지만 이에

한정되는 것은 아니다.

- [230] 인간 TM4SF19의 세포외 루프 2(extracellular loop 2) 전체 또는 일부 부위에 특이적인 항-TM4SF19 항체에 대한 것이다. 구체적인 형태로서 본 발명은 GenBank Accession No. NP_612470.2의 인간 TM4SF19의 서열번호 115~175의 세포외 루프2 영역의 전체 또는 일부에 특이적인 항-TM4SF19 항체에 대한 것이다. 다른 구체 형태에서, 본 발명은 GenBank Accession No. 138461.4의 인간 TM4SF19의 서열번호 120-169의 세포외 루프2 영역의 전체 또는 일부에 특이적인 항-TM4SF19 항체에 대한 것이다. 항체 제작을 위해 사용된 인간 TM4SF19의 세포외 루프 2의 타겟 부위는 예시적인 것일 뿐 이에 제한되는 것은 아니다.
- [231] 본 발명의 실시예에 따르면, TM4SF19 단백질은 셀프-바인딩(self-binding)을 통해 세포간 상호작용에 관여하는 것으로 밝혀졌다.
- [232] 특히 본 발명자들은 TM4SF19 단백질의 세포외 루프 영역을 타겟으로 하여, TM4SF19 단백질의 셀프-바인딩을 억제할 수 있는 TM4SF19 단백질에 대한 항체, 및 TM4SF19의 단편(예를 들어, 세포외 루프 영역, 세포외 루프 영역 및 막 단백질)과 Fc를 융합한 융합단백질을 제작하여, TM4SF19 단백질 활성 억제제의 효능을 평가하였다.
- [233]
- [234] 본 발명에서 용어, "골 질환"은 대사성 골 질환, 정형외과적 골 질환, 무형성 골 질환, 퇴행성 골 질환, 퇴행성 관절염, 류마티스성 관절염, 건선성 관절염, 건선성 척추염, 노화성 골감소증(age-related bone loss), 골다공증, 골 형성 부전증, 골연화증, 골량 감소증, 골절, 골 결손 및 고관절 감소증, 구루병, 파제트 골 질환, 치주질환, 암세포의 골전이에 의해 초래되는 골 손상으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [235] 본 발명에서 용어, "비만"이란 비정상적 또는 과도한 지방 축적이 있는 상태를 의미한다.
- [236] 본 발명에서 용어, "비만 매개 대사성 질환"이란 당뇨, 고혈압, 고지혈증, 비알코올성 지방간염 및 특정 암을 포함하며, 보다 넓게는 고혈압, 당뇨, 인슐린 내성 증후군, 대사 증후군, 비만관련 위식도 역류성 질환, 동맥경화증, 고지혈증, 과중성지방혈증, 과콜레스테롤혈증, 지방이영양증, 비알코올성 지방간염, 심혈관 질환, 다낭성 난소 증후군 등을 포함한다. 본 발명의 조성물을 이용할 경우 상기 질환의 치료도 동시에 이루어질 수 있을 것이다. 또한 이러한 비만 관련 질환의 치료 대상은 체중을 줄이려는 욕구가 있는 대상도 포함된다.
- [237] 본 발명에서 용어, "암(cancer)"은 세포가 정상적인 성장 한계를 무시하고 분열 및 성장하는 공격적(aggressive) 특성, 주위 조직에 침투하는 침투적(invasive) 특성 및 체내의 다른 부위로 퍼지는 전이적(metastatic) 특성을 갖는 세포에 의한 질병을 총칭하는 의미이다.
- [238] 본 발명에서 사용되는 암의 종류에는 제한이 없으나, 대장암, 위암, 결장암,

유방암, 폐암, 비소세포성폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 흑색종, 자궁암, 난소암, 소장암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관 암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(central nervous system, CNS) 종양, 척수 종양, 뇌간 신경교종, 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

- [239] 본 발명에서는 "암"뿐만 아니라 "암 전이"의 억제와 관련한 TM4SF19의 용도를 또한 포함한다.
- [240] 한편, 본 발명에서 용어, "예방"이란 본 발명의 조성물을 투여하여 목적하는 증상 또는 질병이 발생하지 않도록 하거나, 이의 발생 또는 발현을 늦추는 모든 행위를 의미한다.
- [241] 본 발명에서 용어, "치료"란 본 발명의 조성물을 투여하여 목적하는 증상 또는 질병을 호전시키거나 사라지게 하는 모든 행위를 의미한다.
- [242] 한편, 본 발명의 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있으며, 담체와 함께 제제화 될 수 있다.
- [243] 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 액상 용액으로 제제화 되는 조성물에 있어서 허용되는 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로스 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.
- [244] 본 발명의 TM4SF19 발현 또는 활성 억제제 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물은 이를 유효성분으로 포함하는 어떠한 제형으로도 적용가능하며, 경구용 또는 비경구용 제형으로 제조할 수 있으며, 투여의 용이성과 투여량의 균일화를 위해 단위 투여 형태로 제형화 할 수 있다. 본 발명의 약학적 제형은 구강(oral), 직장(rectal), 비강(nasal), 국소(topical; 붙 및 허 밑을 포함), 피하, 질(vaginal) 또는 비경구(parenteral; 근육내, 피하 및 정맥 내를 포함) 투여에 적당한 형태 또는 흡입(inhalation) 또는 주입(insufflation)에 의한 투여에 적당한 형태를 포함한다. 본 발명의 조성물을 유효성분으로 포함하는 경구 투여용 제형으로는, 예를 들어 정제, 트로키제, 로렌지, 수용성 또는 유성 현탁액, 조제분말 또는 과립, 에멀전, 하드 또는 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제로 제제화 할 수 있다.
- [245] 본 발명의 조성물을 유효성분으로 포함하는 비경구 투여용 제형으로는,

피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사 등의 주사용 형태, 좌제 주입방식 또는 호흡기를 통하여 흡입이 가능하도록 하는 에어로졸제 등 스프레이용으로 제제화 할 수 있다. 주사용 제형으로 제제화 하기 위해서는 본 발명의 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여용으로 제제화 할 수 있다.

- [246] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양, 즉 치료학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "치료학적으로 유효한 양"은 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 즉, 본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [247] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다. 일일 투여량으로는, 비경구 투여 시 하루에 체중 1 kg당 바람직하게 0.01 μ g 내지 100 mg, 더 바람직하게는 1 μ g 내지 50 mg이다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [248] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [249] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 치료학적으로 유효한 양의 TM4SF19 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는 골 질환 예방 또는 치료용 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 골 질환을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [250] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 치료학적으로 유효한 양의 TM4SF19 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 비만 또는 비만 매개 대사성 질환 예방 또는 치료용 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 비만 또는 비만 매개 대사성 질환을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [251] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 치료학적으로 유효한 양의 TM4SF19 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 암 예방, 치료 또는 암 전이 억제용 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 암 예방, 치료 또는 암 전이를 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [252] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 개체에 소정의 물질을

도입하는 것을 의미하며, 본 발명에 따른 예방 또는 치료용 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 연골 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 유효성분이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

- [253] 본 발명의 용어 "대상체"는 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 증상이 호전될 수 있는 관련 질환을 가진 마우스, 랫트, 토끼, 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개 등의 포유동물 또는 인간을 포함한다.
- [254] 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 구체적으로, 구강, 직장, 국소, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 경피, 비측내, 흡입, 안구 내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여될 수 있다.
- [255] 본 발명의 예방 또는 치료 방법은 본 발명의 조성물을 치료적 유효량으로 투여하는 것을 포함한다. 상기 치료적 유효량은 체중 감소 또는 지방세포의 크기 감소 효과를 증진시키는 양을 의미한다. 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 일이다. 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적인 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 및 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다. 따라서 본 발명의 목적에 적합한 약학적 조성물의 유효량은 전술한 사항을 고려하여 결정하는 것이 바람직하다. 또한, 경우에 따라, 본 발명의 조성물과 함께 공지의 관련 질환 치료제를 병용 투여하여 치료 효과를 증대시킬 수 있다.
- [256] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 골 질환 의심 검체에 골 질환 치료용 후보물질을 처리하는 단계; 및
- [257] 대조군과 TM4SF19 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준을 비교하는 단계를 포함하는, 골 질환 치료 약물의 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [258] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 비만 또는 비만 매개 대사성 질환 의심 검체에 비만 또는 비만 매개 대사성 질환 치료용 후보물질을 처리하는 단계; 및
- [259] 대조군과 TM4SF19 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준을 비교하는 단계를 포함하는, 비만 또는 비만 매개 대사성 질환 치료 약물의 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [260] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 암 예방, 치료 또는 암 전이 의심 검체에 암 예방, 치료 또는 암 전이 억제용 후보물질을 처리하는 단계; 및
- [261] 대조군과 TM4SF19 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현수준을 비교하는 단계를 포함하는, 암 또는 암 전이 치료 약물의 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [262] 본 발명에서 용어, "검체"란 관련 질환 치료용 후보물질을 스크리닝하기 위해

사용되는 개체 또는 시료를 의미하며, 이는 개, 소, 돼지, 토끼, 닭, 마우스, 인간을 포함한 포유동물을 제한 없이 포함하며, 상기 개체로부터 분리된 전혈, 혈청, 혈액, 혈장, 타액, 뇨, 객담, 림프액, 세포, 조직과 같은 시료 등을 포함한다.

- [263] 본 발명에서 용어, "대조군"은 후보물질을 처리하지 않은 검체를 의미한다. 또한 본 발명에서 사용된 용어, "후보물질"이란 TM4SF19의 발현 또는 활성 변화를 테스트할 약제를 의미하며, TM4SF19의 발현 수준 또는 활성을 직접 또는 간접적으로 변화시킴으로써 관련 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 능력을 측정하는 대상으로서, 예컨대 단백질, 올리고펩타이드, 소형 유기 분자, 다당류, 폴리뉴클레오타이드 및 광범위한 화합물 등 임의의 분자를 포함한다. 이런 후보 물질은 또한 천연 물질뿐만 아니라 합성 물질을 모두 포함한다.
- [264] 본 발명에서 용어, "치료 약물"란 관련 질환을 예방 또는 치료하는 물질을 의미한다.
- [265] 본 발명의 스크리닝 방법은 관련 질환 의심 개체에 치료용 후보물질을 처리한 후 후보물질을 처리하지 않은 대조군과 TM4SF19 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준을 비교하여, 대조군에 비해 TM4SF19 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현을 감소시키는 물질을 관련 질환 치료제라고 판단하여 수행할 수 있다. mRNA 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는 역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅, DNA 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.
- [266] 단백질 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는, 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS, 단백질 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.
- [267]
- [268] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따르면, TM4SF19의 발현이 파골세포 분화 과정에서 증가함을 확인하였다. TM4SF19 결핍 모델(TM4SF19 녹아웃 마우스, TM4SF19KO 및 TM4SF19 extracellular domain 2 (116~165) 녹아웃 마우스, TM4SF19EC2Δ)의 경우, 파골세포의 분화 과정에서 단핵성 파골세포(mononuclear osteoclast)는 형성시키는 반면, 다핵성 파골세포(multinucleated osteoclast) 형성은 억제함을 확인하였다. 다핵성 파골세포로 분화되지 못한 파골세포는 파골세포로서의 표현형(phenotype)은 그대로 갖고 있으며, 낮은 수준의 골 흡수 활성을 유지한다. 즉, 다핵성 파골세포의 형성을 선택적으로 억제할 수 있는 본 발명의 TM4SF19 억제제는 골흡수 기능을 완전히 소멸시키는 것이 아닌 골 흡수를 보다 선택적으로 조절할 수 있어 항-RANKL 항체와 같은 단핵 파골세포의 형성 단계부터 억제하는 치료제에 비해 부작용을 현저히 낮춘다. 또한, TM4SF19 결핍 모델은 난소 절제술로 인한 골 손실을 예방함을 확인하였다. 추가로, 항-마우스 TM4SF19 폴리클로날 항체 및 마우스 TM4SF19 EC2(GenBank Accession No.

NP_001153874.1의 116-165)-Fc 융합 단백질, 인간 TM4SF19 EC2(GenBank Accession No. NP_612470.2 (isoform 1)의 120-169)-Fc 융합 단백질을 파골세포의 분화과정에 처리한 결과, 이러한 저해제가 파골세포 분화 과정에서 단핵 파골세포는 형성시키는 반면, 다핵 파골세포의 형성은 억제함을 확인하였다. 따라서, TM4SF19의 발현을 저해하는 물질 또는 TM4SF19의 활성을 저해하는 물질은 골 질환 예방 또는 치료에 효과적임을 알 수 있다.

[269] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따르면, TM4SF19 발현은 hADMSC(인간 지방 유래 중간엽 줄기세포)의 지방세포 분화 과정에서 증가하였다. TM4SF19 녹아웃 마우스에서 고지방식 식이 유도 비만 모델에서 체중 증가가 억제됨을 확인하였고, 비만으로 인해 생기는 지방 조직 관련 대식세포 양이 감소하여, TM4SF19은 지방세포 분화와 대식세포를 포함한 염증 반응에 작용함을 확인하였다. 그 결과 TM4SF19KO 마우스는 고지방 식이 유도 비만 마우스 모델에서 인슐린 저항성을 낮추고 지방간을 억제하는 것을 확인하였다. 따라서, TM4SF19 발현 또는 활성을 저해하는 물질은 비만, 비만 매개 대사성 질환의 예방 또는 치료에 효과적임을 알 수 있다.

[270] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따르면, TM4SF19 과발현은 마우스 유래 유방암 및 인간 골육종 세포 증식, 이동 및 콜로니 형성을 증가하고, TM4SF19 결핍은 유방암 세포의 폐 전이를 억제하며, 골육종 세포 증식, 이동 및 콜로니 형성을 억제하며, 유방암 세포의 뼈 전이 억제 효과를 확인하였으므로, TM4SF19 발현 또는 활성을 저해하는 물질이 암, 암 전이 예방 및 치료에 효과적임을 알 수 있다.

[271] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 인간 TM4SF19 EC2(GenBank Accession No. NP_612470.2 (isoform 1)의 120-169)-Fc 융합 단백질 처리에 의해 췌장암 세포의 성장, 군집 능력이 억제되고, 골육종 세포 증식, 이동, 콜로니 형성 억제 효과를 확인하였다. 따라서, TM4SF19의 발현을 저해하는 물질 또는 TM4SF19의 활성을 저해하는 물질이 암, 암 전이 예방 및 치료에 효과적임을 알 수 있다.

[272]

발명의 실시를 위한 형태

[273] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실험예 및 제조예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실험예 및 제조예에 한정되는 것이 아니라, 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[274]

[275] [실시예]

[276] 실시예 1: 파골세포형성(Osteoclastogenesis)에서의 TM4SF19의 역할

[277] 도 1은 마우스 골수에서 세포를 뽑아 M-CSF와 RANKL(Receptor activator of

nuclear factor kappa-B ligand)을 처리하여 파골세포(osteoclast, OC)로의 분화를 유도한 후, 분화 유도 시간에 따른 TM4SF19의 mRNA 발현을 qPCR로 확인한 결과이다. 도 1에서 볼 수 있는 바와 같이, TM4SF19 발현이 파골세포 분화 진행에 따라 증가하였음을 확인하였다. 파골세포 분화 관련 유전자인 ACP5 CTSK 발현도 파골세포 분화 진행에 따라 증가하였다.

[278]

[279] 실시예 2: TM4SF19 녹아웃 마우스를 이용한 TM4SF19의 역할 확인

[280] (1) TM4SF19 녹아웃과 다핵화된 파골세포 형성 억제 확인

[281] CRISPR를 이용한 TM4SF19 녹아웃 마우스인 TM4SF19KO와 야생형(WT) 마우스의 골수로부터 세포를 뽑아 M-CSF 25 ng/ml + RANKL 100 ng/ml을 처리하여 분화시킨 후 파골세포 관련 마커인 TRAP 염색(Tartrate-resistant acid phosphatase staining)을 수행하였다.

[282] 도 2a에서 볼 수 있는 바와 같이, TM4SF19KO 마우스 골수세포를 파골세포로 분화 유도 시 단핵성 파골세포(mononuclear osteoclast)로는 분화가 되지만 다핵성 파골세포(multinucleated osteoclast)로는 분화가 진행되지 않았다.

[283] 동일한 방법으로 CRISPR를 이용한 TM4SF19 녹아웃 마우스인 TM4SF19KO와 야생형(WT) 마우스의 골수로부터 세포를 뽑아 RANKL의 농도를 100 ng/ml로 고정하고 M-CSF의 농도를 25, 40, 60 ng/ml로 달리한 조건에서 분화시킨 후 파골세포 관련 마커인 TRAP 염색(Tartrate-resistant acid phosphatase staining)을 수행하였다.

[284] 도 2b에서 볼 수 있는 바와 같이, TM4SF19KO 마우스 골수세포를 파골세포로 분화 유도 시 고농도의 M-CSF 처리에 의해서도 다핵세포 형성 장애는 회복되지 않는 것으로 확인되었다.

[285] 도 2c는 파골세포의 분화 과정을 보여주는 모식도이다. 도 2c에서 볼 수 있는 바와 같이, 파골세포 전구체가 먼저 TRAP 양성 단핵성 파골세포로 분화한 다음, 세포-세포간 융합과 불완전한 세포질분열(cytokinesis)을 통해 거대한 다핵성 세포로 성숙한다. 성숙한, 다핵화된 파골세포는 골 흡수 활성이 높은 반면, 다핵성 파골세포로 분화되지 못한 파골세포는 파골세포의 표현형(phenotype)은 그대로 갖고, TRAP 및 카텝신 K와 같은 파골세포-관련 마커를 발현하나, 낮은 수준의 골 흡수 활성을 유지하는 것으로 보고되어 있다.

[286] 따라서, TM4SF19 녹아웃이 파골세포의 분화 과정에서 다핵성 파골세포로의 분화 및 성숙을 막는다는 점은 TM4SF19의 저해를 통해 골 손실 관련 질환의 예방 또는 치료를 시도할 수 있음을 시사한다. 특히, TM4SF19 억제제는 다핵성 파골세포의 형성을 선택적으로 억제할 수 있으며, 이는 파골세포의 골 흡수 기능을 완전히 소멸시키는 것이 아닌 골 흡수를 보다 선택적으로 조절할 수 있어 항-RANKL 항체와 같은 단핵 파골세포의 형성 단계부터 억제하는 치료제에 비해 부작용을 현저히 낮출 수 있다.

[287]

- [288] (2) TM4SF19KO 마우스에서의 파골세포 분화에 관여하는 유전자의 발현 억제 확인
- [289] CRISPR를 이용한 TM4SF19 녹아웃 마우스인 TM4SF19KO와 야생형(WT) 마우스의 골수로부터 세포를 뽑아 M-CSF와 RANKL을 처리하거나 처리하지 않은 조건에서 분화시킨지 4일 후, 파골세포 분화에 관여하는 유전자인 Ctsk, Acp5, c-Fos, 및 Nfatc1의 발현을 qPCR을 통해 확인하였다.
- [290] 도 3은 M-CSF와 RANKL을 처리하거나 처리하지 않은 조건에서 분화된 세포들에서의 Ctsk, Acp5, c-Fos, 및 Nfatc1의 mRNA 발현을 그래프로 표현한 것이다.
- [291] 도 3에서 볼 수 있는 바와 같이, 파골세포 분화에 관여하는 유전자들의 발현이 TM4SF19KO 마우스 유래 골수세포의 파골세포로의 분화 시 대조군(WT)에 비해 유의성 있게 억제되었다.
- [292]
- [293] (3) 액틴 벨트 형성 및 골 흡수 억제 확인
- [294] 야생형(WT)과 TM4SF19KO 마우스 골수를 분화시킨 후 다핵성 파골세포 분화 시 형성되는 액틴 벨트 형성 여부를 F-액틴 염색으로 확인하였다. 야생형(WT)은 정상적인 액틴 벨트를 형성한 반면, TM4SF19KO는 액틴 벨트가 형성되지 않았다(도 4a).
- [295] Dentin disc 위에 BMM 세포를 플레이팅 한 후 분화 시킨 후 pit formation을 확인하였다. 야생형(WT)에서는 골 흡수(bone resorption)가 확인되나 TM4SF19KO에서는 골 흡수(bone resorption)가 block 된 것을 확인하였다(도 4b).
- [296]
- [297] (4) OVX에 의한 골 손실 억제 확인
- [298] 8 주령 야생형(WT)과 TM4SF19KO 암컷 마우스에 ovary를 떼지 않고 열기만 하거나(sham) 난소절제술(OVX)후 31일째 femur를 고정한 후 micro CT 분석하였다.
- [299] 추가로, micro CT의 촬영 이미지를 3차원 영상분석 프로그램으로 분석하여 골부피(BV), 조직 부피에 대한 골 부피의 비율(% BV/TV), 골소주의 평균 수(Tb.N), 골소주 간극(Tb.Sp)를 포함한 3차원 micro CT 지표(골 미세구조 지표)들을 얻었다.
- [300] TM4SF19KO 마우스에서 난소절제술에 의한 골 손실이 억제됨을 확인하였다(도 5).
- [301] 난소절제술과 상관없이 TM4SF19KO 마우스의 골밀도는 야생형(WT) 마우스에 비해 높다.
- [302]
- [303] (5) 대퇴골 TRAP 염색을 통한 파골세포 형성 확인
- [304] 8주령 야생형(WT) 마우스와 TM4SF19KO 마우스의 대퇴골을 고정하고 석회질 제거(decalcification)한 후 TRAP 염색을 진행하였다.

- [305] 그 결과, 도 6에서 볼 수 있는 바와 같이, TM4SF19KO 마우스 대퇴골의 TRAP 염색으로 다핵성 파골세포 형성 결핍이 확인되었다.
- [306]
- [307] **실시예 3-1: TM4SF19 세포 외 루프 2 (EC2) 결핍 마우스의 다핵성 파골세포 형성 손상 확인**
- [308] (1) 다핵성 파골세포 형성 손상 확인
- [309] 야생형(WT) 마우스와 CRISPR로 TM4SF19 extracellular domain 2 (116~165)을 녹아웃시킨 TM4SF19EC2 Del(TM4SF19EC2Δ로도 표시)의 마우스 골수에서 세포를 뽑아 M-CSF 25ng/ml와 RANKL 100 ng/ml을 처리하거나 처리하지 않고 분화시킨 후 TRAP 염색을 진행하였다.
- [310] 그 결과, 도 7a에서 볼 수 있는 바와 같이, TM4SF19EC2Δ 마우스의 골수를 파골세포로 분화 시 단핵성 파골세포로는 분화가 되지만 다핵성 파골세포로는 분화가 되지 않음을 확인하였다.
- [311] 도 7b는 야생형(WT) 마우스와 CRISPR로 TM4SF19 extracellular domain 2 (116~165)를 녹아웃시킨 TM4SF19EC2Δ의 마우스 골수에서 세포를 뽑아 RANKL의 농도를 100 ng/ml로 고정하고 M-CSF의 농도를 25 ng/ml 또는 100 ng/ml로 처리하여 분화시킨 후 TRAP 염색한 결과이다. TM4SF19EC2Δ마우스의 골수를 파골세포로 분화 시 고농도의 M-CSF 처리에 의해서도 다핵성 파골세포 형성 손상은 회복되지 않았다.
- [312]
- [313] **실시예 3-2: TM4SF19EC2Δ에 의한 세포골격 재배열 영향**
- [314] (1) 액틴 벨트 형성 및 골 흡수 억제 확인
- [315] 파골세포 분화 과정 중 다핵성 파골세포(성숙 파골세포)가 형성되면 포도솜(podosome)으로 이루어진 액틴 벨트(actin belt)가 형성되고 포도솜이 뼈에 부착(adhesion)되어 골 재흡수(bone resorption)가 이뤄지게 된다.
- [316] 야생형 마우스와 TM4SF19EC2Δ 마우스의 골수에서 세포를 뽑아 MCSF 60 ng/ml, RANKL 100 ng/ml로 분화시킨 후 세포를 고정하고 phalloidin FITC 염색하여 공초점 현미경(400x)으로 F-액틴 벨트 형성 여부를 확인하였다.
- [317] TM4SF19EC2Δ이 다핵성 파골세포 형성을 저해하고, 인테그린 신호 관련 세포골격 재배열(cytoskeleton rearrangement)에 영향을 주는 것을 확인하였다. 도 7c에 나타난 바와 같이, 야생형의 경우 다핵성 파골세포 분화에 의해 액틴 벨트가 형성되나 TM4SF19EC2Δ에서는 형성되지 않음을 확인하였다.
- [318] Dentin disc 위에 BMM 세포를 플레이팅하여 분화시킨 후 pit formation을 1% toluidine blue 염색으로 확인하였다. 그 결과, 야생형(WT)에서는 bone resorption이 확인되나 TM4SF19EC2Δ에서는 bone resorption이 block된 것을 확인하였다(도 7d).
- [319]
- [320] (2) 파골세포 관여 유전자 발현 억제 확인

- [321] 야생형(WT) 마우스와 CRISPR로 TM4SF19 extracellular domain 2 (116~165)를 녹아웃시킨 TM4SF19EC2Δ의 마우스에 대해 파골세포 분화에 관련된 타겟 유전자 (Ctsk, Acp5, c-Fos, Nfatc1) 발현을 확인하기 위해 qPCR을 수행하였다.
- [322] 도 8에서 볼 수 있는 바와 같이, 파골세포 분화에 관여하는 유전자들(Ctsk, Acp5, c-Fos, Nfatc1)의 발현이 TM4SF19EC2Δ 마우스 파골세포 분화 시 대조군에 비해 유의성 있게 억제되었다.
- [323]
- [324] (3) 골 손실 억제 확인
- [325] 8 주령 야생형(WT)과 TM4SF19EC2Δ 암컷 마우스에 ovary를 떼지 않고 열기만 하거나(sham) 난소 절제술(OVX) 후 31일째 femur를 고정한 후 micro CT 분석하였다.
- [326] 추가로, micro CT의 촬영 이미지를 3차원 영상분석 프로그램으로 분석하여 골부피(BV), 조직 부피에 대한 골 부피의 비율(% BV/TV), 골소주의 평균 수(Tb.N), 골소주 간극(Tb.Sp)를 포함한 3차원 micro CT 지표(골 미세구조 지표)들을 얻었다.
- [327] TM4SF19EC2Δ 마우스에서 난소절제술에 의한 골 손실이 억제됨을 확인하였다(도 9).
- [328] 8주령 야생형(WT) 마우스, TM4SF19KO 마우스, TM4SF19EC2Δ 마우스(모두 암컷)에서 난소를 떼지 않고 열기만 하거나(sham) 난소절제술(ovariectomy, OVX)을 하고 31일 후 대퇴부를 고정한 후 micro CT(μ CT) 분석을 수행하였다.
- [329] 도 10은 micro CT의 촬영 이미지를 3차원 영상분석 프로그램으로 분석하여 얻은 골부피(BV), 조직 부피에 대한 골 부피의 비율(% BV/TV), 골소주의 평균 수(Tb.N), 골소주 간극(Tb.Sp), 골소주 두께(Tb.Th)를 포함한 3차원 micro CT 지표(골 미세구조 지표)들을 나타낸 것이다.
- [330] 도 11은 micro CT의 촬영 이미지를 보여준다.
- [331] 그 결과, 도 10 및 도 11에서 볼 수 있는 바와 같이, TM4SF19KO 마우스와 TM4SF19EC2Δ 마우스가 난소절제술에 의해 유도되는 골 손실을 억제함을 확인하였고, 난소절제술(OVX)을 하지 않은 sham군에서도 TM4SF19KO 마우스와 TM4SF19EC2Δ 마우스의 골 밀도가 야생형(WT)에 비해 높음을 확인하였다.
- [332]
- [333] 실시예 4: TM4SF19의 self-binding 및 인테그린과의 상호 결합 확인
- [334] (1) TM4SF19-TM4SF19 간의 self interaction 확인
- [335] TM4SF19이 세포 상호간의 결합(cell to cell interaction)에 관여하는지 확인하기 위하여, HA와 flag를 각각 태깅한 TM4SF19를 제작하였다. 293T 세포에 N-terminus에 3HA를 태깅한 TM4SF19과 N-terminus에 3Flag를 태깅한 야생형(wild type)과 TM4SF19 deletion mutant를 transient overexpression을 하여 immunoprecipitation으로 결합 여부를 확인하였다. TM4SF19 deletion mutant는 도

12a에 도시된 바와 같이 제작하였다. 도 12a에 도시한, TM4SF19의 일부 서열을 결실시킨 hTm4sf19 변이체(hTM4SF19₁₁₅₋₁₇₅Δ, hTm4sf19₁₀₅₋₁₈₆Δ, hTm4sf19₁₀₅₋₁₉₆Δ, hTm4sf19₉₄₋₁₈₆Δ 및 hTm4sf19₉₄₋₁₉₆Δ)에 대해서도 3Flag를 각각 태깅한 다음, 세포 상호 간의 결합을 immunoprecipitation으로 분석하였다.

[336] 그 결과, TM4SF19이 cell to cell interaction에 관여하며 자신과 결합함을 확인하였다(도 12b). 그러나, TM4SF19의 transmembrane 3(TM3)와 extracellular region 2(EC2)와 transmembrane 4(TM4)를 결실시킨 mutant(hTm4sf19₉₄₋₁₉₆Δ)는 self binding을 하지 않는 것을 확인하였다. 이러한 결과로부터 TM4SF19의 transmembrane 3-extracellular region 2-transmembrane 4 region이 TM4SF19 self interaction에 중요하며, TM4SF19의 94~196 번 위치가 특히 TM4SF19-TM4SF19 간의 self interaction에 중요한 영역임을 확인하였다.

[337] (2) TM4SF19-TM4SF19 간의 self interaction에 관여하는 영역 확인

[338] TM4SF19의 94~196 번 위치가 TM4SF19-TM4SF19 간의 self interaction에 중요한 영역임을 검증하기 위해, 이번에는 3Flag-hTm4sf19₉₄₋₁₉₆Δ와 달리 hTm4sf19 중 94-196 서열만을 남기고 나머지 서열들을 결실시킨 hTm4sf19₉₄₋₁₉₆를 TM4SF19 deletion mutant로서 제작하였다(도 12c의 상단). 앞선 방법과 마찬가지로, 293T cell에 N-terminus에 3HA를 태깅한 TM4SF19과 N-terminus에 3Flag를 태깅한 야생형과 TM4SF19 deletion mutant를 transient overexpression을 하여 immunoprecipitation으로 결합 여부를 확인하였다. 그 결과, TM4SF19의 transmembrane 3와 EC2 (extracellular region 2)와 transmembrane 4를 발현한 mutant(hTm4sf19₉₄₋₁₉₆)가 야생형(WT)과 유사하게 self-binding 하는 것을 확인하였다(도 12c의 하단). 이러한 결과로부터 TM4SF19의 94~196 aa 영역이 TM4SF19-TM4SF19 self interaction에 중요한 부위임을 재확인하였다.

[339]

[340] (3) TM4SF19 및 TM4SF19-Fc 상호결합

[341] 293T 세포에 N-말단에 3Flag를 태깅한 TM4SF19과 TM4SF19 단편의 hIgG1-Fc 융합 단백질 간의 상호결합을 위와 같은 방법을 이용하여 면역침전으로 확인하였다. TM4SF19 단편으로는 hTm4sf19 131~160, hTm4sf19 145~169, hTm4sf19 131~169, hTm4sf19 120~160, hTm4sf19 120~169, hTm4sf19 120~180, hTm4sf19 120~186, hTm4sf19 120~196, hTm4sf19 120~209, hTm4sf19 131~196 및 hTm4sf19 145~196 영역을 사용하였다(도 12d 상단). 그 결과, 도 12d 하단 및 도 12e에서 볼 수 있는 바와 같이, hTm4sf19의 160~169 aa 영역이 결합에 중요한 역할을 함을 확인하며, 또한 hTM4SF19-Fc의 145~196 영역이 TM4SF19와의 결합을 증가시키는데 중요한 역할을 함을 확인할 수 있었다.

[342]

[343] (4) 인테그린 αv-TM4SF19 간의 interaction 확인

[344] 파골세포 분화에 중요한 역할을 하는 인테그린 αv과 TM4SF19 간의 interaction을 확인하였다. TM4SF19-Fc가 인테그린 αv-TM4SF19에 결합하는

중요 결합 영역(binding region)을 확인하기 위해 293T cell에 C-말단에 3HA를 태깅한 인테그린 α_v 와 TM4SF19 단편의 hIgG1-Fc 융합 단백질 간의 상호작용을 면역침전으로 확인하였다(도 12f).

[345]

[346] (5) 인테그린 β_3 -TM4SF19 간의 interaction 확인

[347] 파골세포 분화에 중요한 역할을 하는 인테그린 β_3 과 TM4SF19 간의 interaction을 확인하였다. TM4SF19-Fc가 인테그린 β_3 -TM4SF19에 결합하는 중요 결합 영역(binding region)을 확인하기 위해 293T 세포에 C-말단에 3HA를 태깅한 인테그린 β_3 와 TM4SF19 단편의 hIgG1-Fc 융합 단백질 간의 상호작용을 면역침전으로 확인하였다(도 12g).

[348] 도 12h는 293T 세포 또는 파골세포 전구체 Raw 264.7 세포에 TM4SF19과 파골세포 기능을 조절하며 multinucleated osteoclast 형성 시 세포골격 재배열에 관여하는 단백질인 인테그린 α_v 또는 인테그린 β_3 를 과발현한 후 interaction 여부를 확인한 결과이다. TM4SF19이 인테그린 α_v 와 결합하고, 인테그린 β_3 와도 결합하는 것을 확인한 결과이다.

[349] TM4SF19은 Tetraspanins family로 이들 family의 extracellular region 2 (Large extracellular loop)가 다른 binding partner와의 결합에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. TM4SF19의 extracellular region이 partner와 interact하는데 필수적인지 확인하기 위해 TM4SF19 wt 또는 extracellular region 2 인 115~175가 deletion된 단백질과 인테그린 α_v 또는 인테그린 β_3 와의 상호결합을 면역침전으로 확인한 결과이다. TM4SF19 wt은 이들과의 상호작용이 확인되는 반면 hTM4SF19_{115-175Δ}와의 결합은 이루어지지 않음을 확인한 결과이다.

[350] 도 12i는 TM4SF19과 파골세포 기능 조절에 관여하며 multinucleated osteoclast 형성 시 세포골격 재배열에 관여하는 막 단백질인 DC-Stamp와 siglec-15과의 상호작용을 면역침전으로 확인한 결과를 보여준다. TM4SF19은 N-terminal 3HA 태깅이고 DC-Stamp는 N-terminus에 3Flag를 태깅하였고, Siglec-15은 C-terminus에 3Flag를 태깅하여 293T에 발현시킨 후 면역 침전으로 상호작용을 확인한 결과이다.

[351]

[352] 실시예 5: TM4SF19의 과발현에 따른 암 세포의 증식, 콜로니 형성, 이동 증가 확인

[353] 마우스 유래 유방암 세포 E0771에 TM4SF19을 과발현(hTM4SF19)한 후 시간에 따른 세포 증식과 콜로니 형성 어세이(colony formation assay)와 세포 이동 어세이(cell migration assay)를 수행하였다.

[354] 도 13a는 TM4SF19 과발현에 의해 24, 48, 72 시간 후 유방암세포 E0771의 세포 증식이 유의성 있게 증가하는 것을 그래프로 표현한 것이다. 도 13b는 유방암세포 E0771에 TM4SF19 과발현한 세포와 대조군 세포 1000개를 플레이팅한 후 콜로니 형성 능력을 확인한 것으로 TM4SF19 과발현에 의해

콜로니 형성이 증가함을 나타낸다. 도 13c는 유방암세포 E0771에 TM4SF19 과발현한 세포와 대조군 세포를 이동 챔버(migration chamber)에 플레이트한 후 시간에 따른 세포의 이동(migration) 능력을 평가한 것으로 TM4SF19 과발현에 의해 세포 이동이 증가함을 나타낸다.

[355]

[356] 실시예 6: TM4SF19 결핍의 암 세포 전이 억제 확인

[357] (1) TM4SF19 결핍의 유방암 세포 폐 전이 억제 확인

[358] 야생형(WT) 마우스, TM4SF19KO 마우스, TM4SF19EC2Δ 마우스 꼬리 정맥에 유방암 세포 E0771을 주입하고 12일 후 희생시킨 후 폐를 Indian ink로 염색하여 폐 전이를 확인하였다.

[359] 야생형(WT) 마우스, TM4SF19KO 마우스, TM4SF19EC2Δ 마우스의 유방암 세포의 폐 전이 표현형(phenotype)을 확인하였고, 폐에 생긴 nodule의 수를 측정하였다.

[360] 그 결과, TM4SF19KO 마우스와 TM4SF19EC2Δ 마우스가 야생형(WT) 마우스에 비해 유방암 세포의 폐전이가 유의성 있게 억제됨을 확인하였다(도 14).

[361]

[362] (2) TM4SF19 결핍의 유방암 세포 전이 관련 유전자 및 단백질 발현 억제 확인

[363] 암세포의 주변 환경은 암 전이의 중요한 인자로 작용하고, 그 중 대식세포(macrophage)에서 나오는 항-종양 인자(anti-tumor factor)들에 의해 전이 정도가 달라질 수 있다. TM4SF19KO 마우스(TMKO)와 야생형(WT) 마우스에서 골수를 얻어 골수 유래 대식세포(bone marrow derived macrophage; BMDM)로 분화시킨 후 이동 챔버(migration chamber)의 아래 부분에 넣고 위의 챔버에는 유방암 세포를 넣고 공동-배양(co-culture)한 후 이동된 세포에서 세포 이동에 관여하는 타겟 유전자(CDH2, SNAI1, SNAI2)의 발현을 qPCR로 확인하고 전이 관련 단백질(비멘틴, slug, bnail, E-cadherin, 베타-액틴) 발현을 확인하기 위해 웨스턴 블랏팅(Western blotting)을 수행하였다.

[364] 그 결과, TM4SF19KO 마우스 대식세포와의 공동-배양에 의해 세포 이동에 관여하는 타겟 유전자(CDH2, SNAI1, SNAI2)의 발현이 억제되고(도 15a), 전이에 관계된 단백질(비멘틴, slug, bnail, E-cadherin, 베타-액틴) 발현이 억제됨을 확인하였다(도 15b). 이는 TM4SF19의 결핍에 의해 암 세포 전이 관련 유전자 및 단백질 발현 억제됨을 나타낸다.

[365]

[366] 실시예 7: TM4SF19의 인간 ADMSC 지방 분화 관여 확인

[367] 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포(human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell, hADMSC)를 10 µg/ml insulin, 1 nM 3,3', 5-Triiodo-L-thyronine, 1 µM dexamethasone, 1 µM rosiglitazone을 넣은 DMEM/F12 배지에서 키우면서 지방세포로 분화시킨 후 0일, 14일, 21일째에 유전자(C/EBPα, PPARγ) 발현을

qPCR로 확인하고 웨스턴 블랏팅으로 단백질(PPAR γ , FABP4) 발현을 확인하였다.

[368] 그 결과, TM4SF19 발현량이 인간 ADMSC 지방 분화에 따라 증가함이 확인되었다(도 16).

[369]

[370] 실시예 8: TM4SF19의 비만 및 대사 질환 관련 역할 확인

[371] (1) TM4SF19KO에 고지방 식이를 먹이며 몸무게 증가를 확인함

[372] 정상식이를 먹인 6주령 야생형(WT) 마우스와 TM4SF19KO 마우스에게 16주 동안 고지방 식이(60% fat)를 먹이며 몸무게 증가를 확인하였다.

[373] 그 결과, TM4SF19KO 마우스는 고지방 식이에도 불구하고 비만이 억제되었다(도 17).

[374]

[375] (2) 인슐린 및 지방간 내성 확인

[376] 야생형(WT) 마우스와 TM4SF19KO 마우스에 고지방 식이를 먹인 후 인슐린 내성을 HOMA-IR로 확인하고(A), 간 표현형(phenotype)을 확인하며, 간 조직을 고정 후 H&E 염색하고(B), 간 내의 트리글리세라이드 레벨을 측정(C)하였다

[377] 그 결과, TM4SF19KO 마우스는 고지방 식이 유도 비만 마우스 모델에서 인슐린 내성을 낮추고, 지방간 형성을 억제하였다. 따라서, TM4SF19KO 마우스는 (정상 식이를 먹인 6주령 마우스에 12주 동안 고지방 식이를 먹인) 고지방식으로 유도된 인슐린 내성과 지방간에 내성이 있음을 확인하였다(도 18).

[378]

[379] (3) 고지방유도 비만 내성 확인

[380] 정상식이를 먹인 6주령 야생형(WT) 마우스와 TM4SF19KO 마우스에 18주 동안 고지방 식이를 먹이며 몸무게 증가(도 19a)를 확인하고, 18주 후 마우스를 희생시켜 각 조직의 무게(도 19b)를 확인하고, 피하지방 및 내장지방 무게(도 19c)를 확인하였으며, 부고환 백색지방(eWAT: epididymal white adipose tissue)의 H&E 염색으로 fat의 표현형(phenotype)과 fat 주변의 지방조직 대식세포를 확인(도 19d)하고, 혈청 내 항 비만 사이토카인인 아디포넥틴의 분비도 확인하였다(도 19e)[rtWAT: retroperitoneal white adipose tissue, sWAT: subcutaneous white adipose tissue, ingWAT: inguinal white adipose tissue, iWAT: interscapular white adipose tissue, iBAT: interscapular brown adipose tissue].

[381] 그 결과, TM4SF19KO 마우스는 고지방 식이 유도 비만 마우스 모델에서도 비만이 억제되며, 혈청 내 아디포넥틴 분비량도 증가되었다. 따라서, TM4SF19KO 마우스는 고지방 유도 비만 (18 주)에 내성이 있음을 확인하였다(도 19).

[382]

[383] (4) 지방분화 및 대식세포 마커, M1-유사 대식세포 마커 발현 확인

[384] 정상 식이를 먹인 6주령 야생형(WT) 마우스와 TM4SF19KO 마우스에 12주

동안 고지방 식이를 먹인 후 eWAT(부고환 백색지방조직)와 sWAT(피하 백색지방조직)에서 지방분화 마커(위)와 대식세포, M1-유사 대식세포 마커 발현(아래)을 qPCR로 확인하였다.

- [385] 그 결과, 고지방 식이에도 불구하고 TM4SF19KO 마우스의 epididymal과 subcutaneous 백색지방에서의 지방 분화 마커와 대식세포 마커, M1-유사 대식세포 마커 발현이 감소되었다(도 20).
- [386]
- [387] (5) 지방 조직 관련 대식세포 양 확인
- [388] 정상 식이를 먹인 6주령 야생형(WT) 마우스와 TM4SF19KO 마우스에 12주 동안 고지방 식이를 먹인 후 부고환 백색지방 조직의 FACS 분석으로 대식세포(A) 및 수지상 세포(B)의 백색지방에서의 %를 확인하였다.
- [389] 그 결과, 고지방 식이에도 불구하고 TM4SF19KO 마우스의 부고환 백색지방에서의 % 대식세포와 수지상 세포가 감소되었으며, 비만으로 인해 생기는 지방 조직 연관 대식세포 양이 TM4SF19KO에서 감소되었다(도 21).
- [390]
- [391] (6) 백색 지방조직의 기질 혈관 분획에서 마커 유전자의 발현
- [392] 정상 식이를 먹인 6주령 야생형(WT) 마우스와 TM4SF19KO 마우스에 12주 동안 고지방 식이를 먹인 후 부고환 백색지방 조직에서 기질 혈관 분획(SVF: stromal vascular fraction)에서 대식세포 마커 유전자의 발현을 확인하기 위해 qPCR을 수행하였다.
- [393] 그 결과, TM4SF19KO 마우스의 부고환 백색지방에서 SVF(stromal vascular fraction)을 분리하여 대식세포 마커인 MCP1 및 F4/80(도 22a)과, M1-유사 대식세포 마커인 IL6 및 TNF α 의 발현이 감소하고(도 22b), M2-유사 대식세포 마커인 IL10의 발현이 증가함을 확인하였다(도 22c).
- [394]
- [395] (7) eWAT에서의 염증, 인슐린 저항성 및 지방간에 대한 TM4SF19의 역할 확인
- [396] eWAT에서 염증, 인슐린 저항성 및 지방간에 대한 TM4SF19의 역할을 확인하기 위해 고지방 식이 유도 비만 마우스 모델 실험을 수행하였다.
- [397] 그 결과, TM4SF19은 지방세포 분화와 대식세포를 포함한 염증 반응에 작용하며, 이로서 TM4SF19 결핍이 인슐린 저항성을 낮추고 지방간을 억제하는 것을 확인하였다(도 23).
- [398]
- [399] (8) TM4SF19 결핍에 의한 백색 지방세포로부터 베이지 지방세포로의 전환 확인
- [400] (정상식이를 먹인 6주령 마우스에 고지방 식이를 주기 시작하여 12주간 먹인) 고지방 식이 유도 비만 마우스 모델에서 TM4SF19KO 마우스의 부고환 백색지방으로부터 베이지 또는 갈색지방 표현형(phenotype)으로의 전환을 확인하였다. 또한, 12주 고지방 식이 유도 비만 마우스 모델에서 TM4SF19KO

마우스의 백색지방에서의 Ucp1 발현이 증가함을 확인하였으며, 갈색지방 분화인 비트로 모델에서 TM4SF19KO에서 Ucp1이 증가되었음을 확인함으로써, TM4SF19가 백색 지방세포를 베이지 지방세포로 바꾸는데 관여함을 확인하였다(도 24).

- [401] 도 24a는 고지방 식이 유도 비만 WT 또는 TM4SF19KO 마우스의 부고환 백색지방에서 베이지 또는 갈색지방의 phenotype과 fatty liver 형성을 H&E staining으로 확인하였다.
- [402] 도 24b는 고지방 식이 유도 비만 WT 또는 TM4SF19KO 마우스의 부고환 백색지방과 subcutaneous 지방에서의 갈색지방 마커인 Ucp1의 expression를 확인한 결과이다. TM4SF19KO의 백색 지방에서 Ucp1 발현이 증가함을 확인하였다.
- [403] 도 24c는 백색지방의 beige/brown adipocyte differentiation 방법을 나타내는 모식도이다. WT과 TM4SF19KO 마우스의 백색 지방에서 뽑은 adipocyte progenitor cell을 DMEM/F-12 media에 T3와 insulin을 넣고 키우면서 confluent한 상태가 된 이틀 후 DMI와 indometacine을 처리하여 분화를 시작하고, day 2부터 rosiglitazone을 처리하면서 day 7~day 8까지 배양하여 beige/brown adipocyte differentiation을 유도하였다.
- [404] 도 24d와 도 24e는 beige/brown adipocyte differentiation 후 Ucp1의 gene expression과 protein 발현을 확인한 결과이다.
- [405]
- [406] (9) TM4SF19의 발현을 백색지방의 지방세포(adipocyte)와 기질혈관분획(SVF)에서 확인
- [407] 고지방 식이를 24주간 먹인 마우스의 부고환 백색지방과 피하 백색지방에서 지방세포와 SVF를 나눠서 TM4SF19의 발현을 확인하였다.
- [408] 고지방 식이 유도 (정상식이를 먹인 6주령 마우스에 고지방 식이를 주기 시작하여 24주간 먹인) 마우스의 eWAT 및 sWAT에서 지방조직과 대식세포를 포함하는 SVF를 모두에서 TM4SF19의 발현을 확인함으로써 TM4SF19이 지방세포에서의 기능뿐만 아니라 대식세포와 단핵구(monocyte)가 포함된 SVF에서의 기능도 있을 것임을 의미한다(도 25).
- [409] 도 25a는 백색지방을 collagen type I으로 digestion 한 후 원심분리하여 adipose tissue, infranatant, SVF fraction으로 나누었다. 각 fraction에 있는 cell 종류에 대한 모식도이다.
- [410] 도 25b는 고지방 식이 60% fat을 24주간 먹인 마우스의 부고환 백색지방과 피하 백색지방에서 지방세포와 SVF를 나눠서 TM4SF19의 발현을 확인한 결과이다.
- [411]
- [412] (10) TM4SF19KO 및 야생형 마우스의 sWAT로부터 분리된 기질혈관분획(stromal vascular fraction, SVF)의 이소프로테레놀 처리에 의한 갈색지방 분화 유도

- [413] 야생형(WT)과 TM4SF19KO 마우스의 피하 백색지방에서 SVF를 뽑아 이소프로테레놀로 갈색지방으로 분화를 유도하고 thermogenic gene expression과 베이지 지방 마커 유전자 발현을 확인하기 위해 qPCR을 수행하였다.
- [414] TM4SF19KO 마우스 SVF에서 thermogenic 유전자 발현과 베이지 지방 마커의 발현이 증가하였으며, TM4SF19KO 마우스가 백색지방의 갈색 또는 베이지 지방화에 관여할 수 있음을 시사하였다(도 26).
- [415]
- [416] (11) 대식세포와 3T3-L1지방세포의 공동 배양에서 TM4SF19 발현
- [417] 고지방 식이에 의한 비만에서 3T3-L1 지방조직과 대식세포 간의 상호작용이 중요한 역할을 한다.
- [418] 도 27의 우측 도면과 같이, 인 비트로 모델로 지방세포를 분화시킨 후 대식세포와 접촉 공배양(contact co-culture)을 한 후 대식세포, 염증, 항비만 등의 마커 유전자[Macrophage maker; MCP-1, inflammation marker; TNF α , IL6, MMP3, anti-obesity marker; adiponectin]의 발현을 qPCR로 확인하였다. 대조군으로는 대식세포와 지방세포를 각각 키운 후 RNA를 뽑아 합친 후 사용하였다.
- [419] 3T3-L1 지방세포와 대식세포 공배양에 의해서 염증에 관련된 유전자인 MMP3의 발현이 증가하며 TM4SF19도 증가하였다.
- [420]
- [421] (12) 접촉 시스템에서 지방세포와 대식세포의 공동 배양에 의한 염증 변화 유도
- [422] 야생형(WT) 마우스에서 SVF를 뽑아 adipogenesis를 시킨 후 야생형(WT) 골수를 대식세포로 분화시킨 후 각각 또는 접촉 공배양하여 염증 변화 유도하였다. 대조군으로는 대식세포와 지방세포를 각각 키운 후 RNA를 뽑아 합친 후 사용하였다.
- [423] SVF의 지방세포 분화와 골수의 대식세포 분화 후 co-culture에 의해서 TM4SF19가 증가하였다(도 28).
- [424] 야생형(WT) 마우스와 TM4SF19KO 마우스에서 SVF를 뽑아 지방 생성을 시키고, 각각의 마우스에서 골수를 뽑아 대식세포로 분화시킨 후 접촉 공배양하여 염증 변화 유도하였다.
- [425] 그 결과, 도 29에서 볼 수 있는 바와 같이, WT 분화 지방세포+ 대식세포 분화 공배양에 비해 TM4SF19KO의 분화 지방세포 + 대식세포 분화에서 MCP1과 IL6가 감소되었다.
- [426] 야생형(WT) 마우스와 TM4SF19KO 마우스에서 SVF를 뽑아 지방 생성을 시키고, 각각의 마우스에서 골수를 뽑아 대식세포로 분화시킨 후 ctrl culture 또는 co-culture하여 염증 변화 유도하였다. 대조군(ctrl culture)으로는 대식세포와 지방세포를 각각 키운 후 RNA를 뽑아 합친 후 사용하였다.
- [427] SVF의 지방세포 분화와 골수의 대식세포 분화 후 공배양 모델에서 TM4SF19KO BMDM은 염증 반응 마커의 발현을 줄이고, wt 지방세포 -wt 대식세포 보다 TM4SF19KO 지방세포 -TM4SF19KO 대식세포 co-culture에서

염증 반응이 줄어들었다(도 30).

- [428] 분화된 지방세포와 BMDM을 co-culture할 경우 염증 신호가 증가하였다.
- [429]
- [430] (13) 인 비트로 인슐린 내성 모델에서 TM4SF19 확인
- [431] 인 비트로 인슐린 내성 모델을 제작하였다.
- [432] 3T3-L1 지방세포를 12일간 분화하고 TNF α 를 24시간 처리한 후 지방 분화 마커인 C/EBP α , 인슐린 저항성인 비트로 모델 마커인 C/EBP β 및 TM4SF19를 qPCR로 확인하였다.
- [433] TNF α 는 염증을 유도하는 것으로 인 비보에서 비만이 유도되었을 때 주변에 inflammation signal이 증가하는 것을 mimic한 모델이다.
- [434] 야생형(WT) 마우스와 TM4SF19KO 마우스에서 SVF를 뽑아 지방 분화를 시키고, TNF α 를 24시간 처리한 후 지방 분화 마커인 C/EBP α , 인슐린 저항성인 비트로 모델 마커인 C/EBP β 및 TM4SF19를 qPCR로 확인하였다. 그 결과, 인 비트로 인슐린 저항성 모델에서 TM4SF19가 증가함을 확인하였다(도 31. 도 32). TM4SF19KO는 인슐린 저항성이 감소함을 확인하였다(C/EBP β 는 insulin resistance marker임).
- [435]
- [436] (14) 대식세포 분화 및 분극화에서 TM4SF19의 역할
- [437] 야생형(WT) 마우스와 TM4SF19KO 마우스에서 골수를 뽑아 대식세포로 분화시킨 후 M1 polarization에 관여하는 마커를 확인하였다. M1 대식세포는 전-염증 시그널링에 관여한다.
- [438] 야생형(WT) 마우스 골수 유래 M1 대식세포 분화에 의해 염증마커 및 TM4SF19가 증가하고(도 33) 골수 유래 M1 대식세포 분화 마커가 TM4SF19KO에서 감소함(도 34)을 확인하였다.
- [439]
- [440] **제조예 1: TM4SF19 항체 제작 및 검증**
- [441] (1) 폴리클로날 마우스 TM4SF19항체 제작
- [442] 항체 면역원성 예측하여 가능한 타겟을 정한 후 마우스 TM4SF19 extracellular loop 2에 있는 141~159 aa 부위를 타겟에 대한 폴리클로날 마우스 TM4SF19 항체를 제작하였다. (마우스 TM4SF19 단백질은 SEQ ID NO: 7 참조.)
- [443]
- [444] (2) TM4SF19 항체 검증
- [445] 293T 세포에 인간 TM4SF19(hTM4SF19), 인간 EC2 Δ (hTM4SF19 115~175 Δ), 마우스 TM4SF19(mTM4SF19), 마우스 EC2 Δ (mTM4SF19 116~165 Δ)를 일시적으로 과발현시킨 후 앞서 제작한 폴리클로날 마우스 TM4SF19 항체로 발현을 확인하기 위해 웨스턴 블랏팅을 수행하였다.
- [446] 폴리클로날 마우스 TM4SF19 항체는 인간 TM4SF19과 마우스 TM4SF19을 인식하였다. 그러나 extracellular loop 2 deletion mutant는 인식하지 못하였다(도

35).

[447]

[448] 실시예 9: TM4SF19 항체를 이용한 TM4SF19 역할 검증

[449] (1) TM4SF19 항체의 파골세포 분화 억제 확인

[450] 야생형(WT) 마우스에서 골수를 뽑아 파골세포로 분화시키면서 TM4SF19 항체를 처리하고 TRAP 염색으로 확인하였다.

[451] 그 결과, TM4SF19 항체는 용량 의존적으로 파골세포 다핵화를 저해하였다(도 36).

[452]

[453] 제조예 2: TM4SF19-Fc 제작

[454] TM4SF family에 대한 서열 정보와 계통수 정보를 이용하여 인간 TM4SF19과 마우스 TM4SF19 extracellular loop2에 대한 TM4SF19-Fc 융합 단백질을 제작하였다.

[455] TM4SF19-Fc는 인간 TM4SF19 또는 마우스 TM4SF19 extracellular loop2의 c-terminus에 인간 IgG1-Fc가 융합된 형태이다.

[456] 마우스 TM4SF19-Fc(116-165)는 분비가 잘되어 purification하여 in vitro test를 진행하였다.

[457] 인간 TM4SF19-Fc (115-175)는 분비가 잘되지 않아 새로운 region (120-169)에 대한 Fc를 제작하였다.

[458] 마우스 TM4SF19-Fc는 분비가 잘 되어 정제하였다.

[459] 마우스 TM4SF19EC2-Fc(116-165)를 제작하여 정제하고, 이를 이후 실험에 사용하였다.

[460] 인간 TM4SF19-EC2-Fc (115-175)는 발현이 잘 되지 않아 마우스 TM4SF19-EC2-Fc와 보존된 sequence로 다시 제작하여 발현을 확인하였다. 인간 TM4SF19-Fc (120-169)는 extracellular loop 2 (115-175)에 비해 media로 secretion이 더 많이 이루어져 이를 이후 실험에 사용하였다(도 37).

[461] 본 발명에 따른 실시예에 사용된 융합 단백질은 도 58에 나타내었다.

[462]

[463] 이하, "hTM4SF19-Fc"는 hTM4SF19-Fc (120-169 aa) 융합 단백질을 의미한다. "mTM4SF19-Fc"는 마우스 TM4SF19-Fc (116~165 aa) 융합 단백질을 의미한다.

[464]

[465] 실시예 10: TM4SF19-Fc를 이용한 TM4SF19 역할 검증

[466] hIgG1-Fc, hTM4SF19₁₂₀₋₁₆₉-Fc 및 mTM4SF19₁₁₆₋₁₆₅-Fc를 파골세포 분화 과정에 처리하였다. 파골세포 분화를 위해 골수 유래 세포에 MCSF 60 ng/ml 및 RANKL 100 ng/ml을 처리한 후, TRAP 염색을 수행하였다.

[467] 그 결과는 도 38a 내지 도 38c에 나타난 바와 같다. 정제된 mTM4SF19 EC2-Fc를 파골세포 분화 과정 처리하여 다핵성 파골세포 형성 저해를 확인하였다[E1; Elution buffer (20 mM glycine)로 elution한 sample. E1-1; Buffer A(50mM phosphate,

- 50 mM NaCl, pH 7.0)로 UF/DF (Ultrafiltration/Diafiltration) 진행한 샘플 (Fc가 좀 더 안정적일 수 있음)]. 또한, 정제된 hTM4SF19₁₂₀₋₁₆₉-Fc를 처리하여 multinucleated osteoclast formation 저해를 확인하였다
- [468] 야생형 마우스 골수를 분화시키면서 IgG-Fc와 mTM4SF19-Fc를 10 µg/ml 처리한 후 다핵화 파골세포 분화 시 형성되는 액틴 벨트 형성 여부를 F-액틴 염색으로 확인하였다. mTM4SF19-Fc에 의해 액틴 벨트 형성이 억제되고, 마우스 TM4SF19 항체로 TM4SF19이 액틴 벨트에 localize됨을 확인하였다 (도 38d).
- [469] Dentin disc 위에 BMM 세포를 플레이팅한 후 분화시키면서 IgG-Fc와 mTM4SF19-Fc를 10 µg/ml 처리한 후 pit formation을 1% toluidine blue 염색으로 확인하였다. 도 38e에 나타낸 바와 같이, 골 재흡수가 mTM4SF19-Fc에 의해 block된 것을 확인하였다.
- [470]
- [471] **실시예 11: TM4SF19-Fc를 이용한 골 손실 회복 확인**
- [472] 8주령 암컷 마우스에 난소절제술을 실시한 후 일주일 후부터 일주일에 한번 3주 동안 마우스 TM4SF19-Fc를 꼬리 정맥을 통해 주사하고 마지막 주사 후 일주일 뒤에 희생하여 대퇴골을 고정한 후 micro CT를 측정하였다. 마우스 TM4SF19-Fc 농도는 2.5 mg/kg, 5 mg/kg를 사용하였다.
- [473] 도 39a는 마우스 TM4SF19-Fc에 의한 골 손실 회복을 보여주는 micro CT의 촬영 이미지이다.
- [474] 도 39a의 micro CT의 촬영 이미지를 3차원 영상분석 프로그램으로 분석하여 골부피(BV), 조직 부피에 대한 골 부피의 비율(% BV/TV), 골소주의 평균 수(Tb.N), 골소주 간극(Tb.Sp)를 포함한 3차원 micro CT 지표(골 미세구조 지표)들을 얻었다(도 39b).
- [475] 도 39b에 나타낸 바와 같이, 총 BMD(Bone mineral density), % BV/TV(bone volume per tissue volume), Tb.N(trabecular number)이 난소절제술에 의해 감소하고 mTM4SF19-Fc에 의해 용량 의존적으로 증가함을 확인하였다. 반면 Tb.Sp(trabecular separation)은 mTM4SF19-Fc에 의해 감소함을 확인하였다. 이러한 결과로부터 마우스 TM4SF19-Fc가 난소절제술로 유발된 골 손실(ovariectomy induced bone loss)이 회복(rescue)되었음을 확인할 수 있다.
- [476] 추가로, 마우스 대퇴골 조직을 H&E 염색을 통해 조직병리학적으로 분석하였다. 그 결과, 도 39c에서 볼 수 있는 바와 같이, 난소절제술에 의해 골소주(trabecular) 수가 감소하였고, TM4SF19-Fc 처리에 의해 용량 의존적으로 골소주의 수 감소가 회복되는 것을 확인할 수 있다.
- [477] 또한, 8주령 암컷 마우스에 난소 절제술한 후 마우스 TM4SF19-Fc (116~165), 인간 TM4SF19-Fc (131~169)를 iv injection하였다. Untreated group에 비해 인간과 마우스 TM4SF19-Fc에 의해 골 손실이 현저하게 억제됨을 확인하였다 (도 39d). 마우스 TM4SF19-Fc (116~165)는 10 mg/kg, 인간 TM4SF19-Fc (131~169)는 25 mg/kg 처리하였다.

- [478] 인간 TM4SF19 region은 131~169를 포함하는 영역이 난소 절제술에 의한 bone loss를 rescue할 수 있다.
- [479] 위 결과들은 TM4SF19-Fc의 골다공증 치료제로서의 개발 가능성을 시사한다.
- [480]
- [481] **실시예 12: TM4SF19-Fc를 이용한 TM4SF19의 역할 검증**
- [482] (1) 파골세포 형성(Osteoclastogenesis)
- [483] 야생형(WT) 마우스의 골수로부터 세포를 뽑아 M-CSF 또는 M-CSF와 RANKL을 처리하는 조건에서 분화시키면서 mTM4SF19-Fc를 10 µg/ml 처리(대조군은 버퍼 처리)한 후, 파골세포 분화에 관여하는 유전자인 Ctsk 및 Acp5의 발현을 qPCR을 통해 확인하였다.
- [484] 도 40은 M-CSF 또는 M-CSF와 RANKL을 처리하는 조건에서 분화된 세포들에서의 Acp5 및 Ctsk의 mRNA 발현을 그래프로 표현한 것이다 (WT1, 2, 3, 4, 5는 야생형 마우스 5마리 각각에서 얻은 골수 세포를 파골세포 분화시켜 얻은 결과를 의미함; M-CSF만을 처리한 군은 분화하지 않은 군을 의미함).
- [485] 도 40a에서 볼 수 있는 바와 같이, mTM4SF19-Fc 처리에 의해 파골세포 분화에 관여하는 유전자들의 발현이 대조군(WT)에 비해 유의성 있게 억제되었다.
- [486] 마찬가지로, 야생형(WT) 마우스의 골수로부터 세포를 뽑아 M-CSF 또는 M-CSF와 RANKL을 처리하는 조건에서 분화시키면서 mTM4SF19-Fc를 5 µg/ml 처리한 후 파골세포 분화 마커 단백질의 발현을 확인한 결과, 도 40b에서 볼 수 있는 바와 같이, 대조군(WT)에 비해 mTM4SF19-Fc의 처리에 의해 유의성 있게 파골세포 분화 마커 단백질의 발현이 억제됨을 확인하였다.
- [487]
- [488] (2) mTM4SF19-Fc 와의 surface binding
- [489] TM4SF19-Fc가 파골세포 다핵화를 차단하는 이유가 분화 과정 중 표면에 결합하는 능력이 높아져서 가능할 것으로 판단하여 Raw264.7 세포의 분화 전 후 mTM4SF19-Fc 와의 표면 결합을 FACS 분석을 통해 진행하였다. 도 41에 나타난 바와 같이, 분화 전 control인 IgG1 (붉은색 graph)와 mouse TM4SF19-Fc (파란색 graph) 간 표면 결합 차이가 거의 없으나, 분화 후 control인 IgG1 (붉은색 graph)에 비해 mTM4SF19-Fc (파란색 graph)가 오른쪽으로 이동한 것으로 실제로 분화 후 mTM4SF19-Fc와의 표면 결합이 증가함을 확인하였다.
- [490] 도 41에 나타난 바와 같이, 분화 후 mTM4SF19-Fc와의 결합이 증가하는 것으로 확인되었다.
- [491]
- [492] **실시예 13: TM4SF19-Fc를 이용한 류마티스 관절염의 예방 및 치료**
- [493] 도 42a의 실험 스케줄에 따라, 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델(Collagen induced arthritis mouse model)에서 mTM4SF19-Fc의 semi-therapeutic effect를 확인하였다.
- [494] DBA/1 마우스를 14일간 순화시킨 후 chicken collagen II를 Complete Freund's

Adjuvant (CFA)와 혼합하여 주사한 뒤 18일 후에 Chicken collagen II를 IFA(Incomplete Freund's Adjuvant)와 혼합하여 부스트 주사(boost injection)하였다. mTM4SF19-Fc는 첫번째 주사 후 15일에 투여하기 시작하였으며, 주 2회 10 mg/kg 또는 25 mg/kg i.v. 투여하였다. 마우스를 희생시키는 63일까지, 주 2회 CIA 스코어를 확인하였다.

- [495] CIA score는 다음과 같은 방법으로 평가된다: Score 0 (normal paw), Score 1 (one or two toes inflamed and swollen), Score 2 (3+ toes inflamed w/no paw swelling, or mild swelling of entire paw), Score 3 (entire paw inflamed and swollen), Score 4 (severely swollen paw and all toes, or ankylosed paw and toes)
- [496] CIA(Collagen Induced Arthritis) 유발 후 42일 후 마우스의 관절 상태를 확인한 결과, 도 42b에서 볼 수 있는 바와 같이, 아무것도 처리하지 않은 Sham group과 비교하여 IgG1을 처리한 대조군에서는 발가락과 발등이 모두 부었으나 10 mg/kg의 mTM4SF19-Fc를 처리한 군에서는 발가락과 발등 부종이 다소 억제되었고, 25 mg/kg에 의해서는 부종 현상이 뚜렷이 억제됨을 확인할 수 있었다.
- [497] 한편, 도 42c의 그래프는 실험 기간 동안 조사된 CIA 스코어와 부은 관절의 수를 분석한 결과를 보여준다. IgG1을 처리한 대조군에 비해 mTM4SF19-Fc 처리군이 용량 의존적으로 CIA 스코어와 부종을 감소시키는 것을 확인되었다.
- [498] 추가로, 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델 femur의 발을 micro CT 촬영하고 그 이미지를 분석하였다.
- [499] 도 42d는 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델의 발에 발생한 염증과 뼈 손상이 mTM4SF19-Fc 처리에 의해 용량 의존적으로 억제되었음을 보여주는 micro CT 이미지이다. 콜라겐 유도 관절염에 의해서 발가락이 휘어지고, 발가락 마디와 발목에 염증이 의한 뼈 손상이 발생하였으나, 대조군인 hIgG1-Fc를 처리한 마우스에 비해 mTM4SF19-Fc를 처리한 마우스의 관절 부분 염증과 뼈 손상이 용량 의존적으로 억제되었다.
- [500] 도 42e는 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델의 발에 발생한 염증과 뼈 손상이 mTM4SF19-Fc 처리에 의해 용량 의존적으로 억제되어, 동일한 RA 스코어를 갖는 마우스들을 비교할 때, 대조군인 hIgG1-Fc를 처리한 마우스에 비해 mTM4SF19-Fc를 처리한 마우스의 뼈 손상이 억제됨을 확인할 수 있었다.
- [501] 추가로, 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델 femur의 micro CT의 촬영 이미지를 3차원 영상분석 프로그램으로 분석하여 골부피(BV), 조직 부피에 대한 골 부피의 비율(% BV/TV), 골소주의 평균 수(Tb.N), 골소주 간극(Tb.Sp)를 포함한 3차원 micro CT 지표(골 미세구조 지표)들을 얻었다.
- [502] 도 42f는 콜라겐 유도 관절염에 의해 BMD(Bone mineral density)와 Tb.N(trabecular number)이 sham군에 비해 감소하나, TM4SF19-Fc에 의해 골 손실이 억제됨을 보여준다.
- [503] 도 42g는 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델의 연골 손상을 톨루이딘 블루로

확인한 결과이다. hIgG1-Fc 처리군에 비해 mTM4SF19-Fc 처리군의 연골 손상이 억제된 것을 나타낸 것이다.

- [504] 또한, 콜라겐 항체 유도 관절염 마우스 모델에서 mTM4SF19-Fc와 hTM4SF19-Fc(120-169)의 semi-therapeutic effect를 관절염 스코어로 확인하였다. Balbc 마우스에 콜라겐 항체 투여 후 3일 후 LPS를 injection하여 관절염을 유발하였다. 대조군에 비해 mTM4SF19-Fc 25 mg/kg와 hTM4SF19-Fc (120-169) 25 mg/kg에서 관절염 억제 효과가 보였다(도 42h). hIgG1-Fc에 비해 TM4SF19-Fc 처리에 의해 관절염 질환 스코어가 낮아지고, 발 두께가 감소하는 것을 확인하였다.
- [505] 또한, 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에서 콜라겐 항체 투여 3일 후 LPS를 injection 하여 관절염을 유발 한 후 mTM4SF19-Fc의 therapeutic effect를 관절염 스코어로 확인하였다.
- [506] 콜라겐 항체 투여 3일 후 LPS를 injection하여 관절염을 유발한 후 mTM4SF19-Fc의 치료효과를 확인하기 위하여 관절염 질환 스코어가 가장 높게 확인되는 8일부터 mTM4SF19-Fc를 50 mg/kg 처리하고 9일부터 19일까지 관절염 질환 스코어를 2일 마다 확인하였다.
- [507] Untreated group에 비해 mTM4SF19-Fc 처리에 의해 관절염 스코어가 낮아지고 발 두께가 감소하고, 톨루이딘 블루로 확인한 연골 손상이 억제되는 것을 확인하였다(도 42i). 즉, mTM4SF19-Fc에서 관절염 치료 효과를 보였다.
- [508]
- [509] 실시예 14: TM4SF19-Fc를 이용한 유방암의 뼈 전이 억제
- [510] 도 43a의 실험 스케줄에 따라, NOD-SCID 6주령의 암컷 마우스의 꼬리에 MDA-MB231-luc 유방암 세포(이미징을 위해 MDA-MB231에 루시페레이즈를 발현시킨 세포주)를 CA (caudal artery) 주사하여 뼈 전이를 유도하였다. 뼈 전이 유도 후, hIgG1 또는 TM4SF19-Fc를 정맥 주사하였다. TM4SF19-Fc는 암 세포 주사 2일 후부터 정맥 주사하기 시작하여 일주일에 2번씩 10 mpk 또는 25 mpk 투여하였다. 생물발광 영상분석(bioluminescence imaging analysis)를 통하여 암 진행(cancer progression) 상태를 확인하였다.
- [511] 암 세포 주사 후 45일에 생물발광 영상분석(bioluminescence imaging analysis)를 통하여 뼈 전이 여부를 확인하였다. 도 43b(좌)에서 볼 수 있는 바와 같이, 대조군인 hIgG1 투여군에 비하여 hTM4SF19-Fc 투여군의 뼈 전이가 억제되어 있음을 확인하였다. 45일에 루시페린 주사 후 마우스를 희생하여 다리를 떼어내어 발광(luminescence) 분석을 한 결과, 도 43b(우)에서 볼 수 있는 바와 같이, TM4SF19-Fc 처리에 의해 뼈 전이가 억제됨을 확인하였다.
- [512] 도 43c는 유방암의 뼈 전이가 일어난 마우스의 관절을 micro CT 스캔한 결과를 보여준다. micro CT 분석 결과에 따르면, 유방암의 뼈 전이에 의해 뼈 손상이 일어났으며 TM4SF19-Fc 처리에 의해 용량 의존적으로 뼈 손상이 복구됨을 확인하였다.

- [513] 추가로 유방암의 뼈 전이가 일어난 마우스의 관절에 대해 H&E 염색을 통해 조직학적 분석을 수행하였다. 그 결과, 도 43d에서 볼 수 있는 바와 같이, 유방암 뼈 전이와 종양 성장이 TM4SF19-Fc 처리에 의해 용량 의존적으로 억제됨을 확인할 수 있었다.
- [514] 도 44a의 실험 스케줄에 따라, NOD-SCID 6주령의 암컷 마우스의 꼬리에 MDA-MB231-luc 유방암 세포(이미징을 위해 MDA-MB231에 루시페레이즈를 발현시킨 세포주)를 CA (caudal artery) 주사하여 뼈 전이를 유도하였다. 유도 후 30일 이후부터 control hIgG1 또는 TM4SF19-Fc를 50 mg/kg iv 투여를 시작하였다.
- [515] Injection 후 21일까지 7일 간격으로 생물발광 영상분석하였고, 뼈 전이가 hTM4SF19-Fc(120-169)에 의해 억제됨을 확인하였다(도 44b). 루시페린 주사 후 희생하여 다리를 떼어내어 luminescence 분석한 결과 TM4SF19-Fc 처리에 의해 뼈 전이가 억제됨을 확인하였다(도 44c). micro CT로 유방암 뼈 전이에 의해 뼈 파괴가 일어났으며 TM4SF19-Fc 처리에 rescue됨을 확인하였다(도 44d).
- [516]
- [517] 실시예 15: TM4SF19-Fc를 이용한 유방암의 폐 전이 억제
- [518] 마우스 유래 E0771 유방암 세포를 야생형 마우스의 꼬리 정맥에 주입하여 폐 전이를 유발시켰다. hIgG1-Fc, 마우스 TM4SF19-Fc (116~165), 인간 TM4SF19-Fc (145~169)를 각각 10 mg/kg iv injection한 후 유방암 세포의 폐 전이 억제 여부를 Indian ink로 염색한 후 폐에 생긴 nodule 수를 세서 확인하였다. 도 45에서 볼 수 있는 바와 같이, 마우스 TM4SF19-Fc (116~165), 인간 TM4SF19-Fc (145~169)에 의해 폐 전이가 현저하게 억제됨을 확인할 수 있었다.
- [519]
- [520] 실시예 16: TM4SF19-Fc 처리에 의한 고지방 식이 유도 비만의 억제 및 지방간 억제 효과
- [521] 6주령 마우스에 7주 동안 고지방 식이를 먹인 마우스를 구입하여 1주 동안 고지방 식이를 먹이며 순화시킨 후 9주 동안 고지방 식이를 먹이면서 마우스 TM4SF19-Fc를 일주일에 2번씩 피하 주사 또는 정맥 주사를 통해 투여하였다. 그 결과, 도 46a에서 볼 수 있는 바와 같이, mTM4SF19-Fc 10 mg/kg 투여에 의해 고지방 식이에 의한 비만이 억제됨을 확인할 수 있었다.
- [522] 마우스를 희생시키고 장기 내 백색 지방의 분포를 분석한 결과, 도 46b에서 볼 수 있는 바와 같이, TM4SF19-Fc 처리에 의해 백색 지방의 무게가 감소함을 확인하였고, 뚜렷한 지방간 억제 효과도 확인할 수 있었다.
- [523] 또한, 간 조직을 H&E 염색 및 마손&트라이크롬(Masson and trichrome) 염색을 통해 관찰한 결과, 도 47(좌)에서 볼 수 있는 바와 같이, hIgG1-Fc을 처리한 대조군에 비해 지방간 감소 효과가 뚜렷하였다. 또한 혈장 내에서 중성지방이 감소함을 확인할 수 있었다(도 47(우)).
- [524]
- [525] 실시예 17: TM4SF19-Fc 처리에 의한 지방세포 분화 억제 효과

- [526] 정제된 마우스 TM4SF19-Fc (116~165)를 C3H10T1/2 세포에 처리하여 지방세포 분화가 용량 의존적으로 억제됨을 확인하였다(도 48).
- [527] 대조군에는 분화유도인자를 처리하지 않고, 실험군에는 분화유도인자(덱사메타손 1 μ M, IBMX 500 μ M, 인슐린 4 μ g/ml (DMI), Rosiglitazone 5 μ M로 지방세포 분화 시 처리)와 함께 마우스 TM4SF19₁₁₅₋₁₆₅-Fc를 0 ng/ml, 1.25 ng/ml, 2.5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml로 처리하여 지방세포 분화를 관찰하였다.
- [528] 추가로, 지방세포 분화의 주요 마커인 C/EBP α 와 PPAR- γ 의 발현을 확인한 결과, 분화를 유도하지 않은 군(no DMI)에 비해 DMI를 처리한 군의 발현이 증가하였으며 마우스 TM4SF19-Fc(116~165) 처리에 의해 발현이 억제됨을 확인하였다.
- [529]
- [530] 실시예 18: 파골세포 분화에 의해 유도된 암세포 이동억제 효과
- [531] (1) TM4SF19-Fc
- [532] 파골세포 분화에 의해 유도된 암세포의 이동이 mTM4SF19-Fc 또는 hTM4SF19-Fc(120-169)에 의해 억제되는 것에 대해 크리스탈 바이올렛 솔루션 0.05%로 염색하여 확인하였다. 골수 유래 대식세포를 12 well에 플레이트한 후 MCSF와 RANKL로 분화 유도하면서 mTM4SF19-Fc 또는 hTM4SF19-Fc 10 μ g/ml를 처리하거나, RANKL를 넣지 않아 분화를 시키지 않고, 이동 챔버 위에 암세포 MDA-MB231 또는 PC3M을 넣고 이동을 진행시켰다. 이동된 암세포를 크리스탈 바이올렛으로 염색하였다.
- [533] 그 결과 도 49에 나타낸 바와 같이, 파골세포 분화에 의해 유도된 암세포의 이동이 TM4SF19-Fc에 의해 억제되었음을 확인하였다.
- [534]
- [535] (2) TM4SF19KO
- [536] TM4SF19KO에서 파골세포 분화에 의한 암세포 이동 억제를 확인한 것으로 wt과 TM4SF19KO에서 뽑은 골수 유래 대식세포에 MCSF를 넣고 RANKL을 넣어서 분화시키거나 넣지 않아 분화를 시키지 않고, 이동 챔버를 위에 암세포 MDA-MB231 또는 PC3M을 넣고 이동을 진행시켰다. 이동된 암세포를 크리스탈 바이올렛으로 염색하였다.
- [537] 그 결과는 도 50a에 TM4SF19KO에서 파골세포 분화에 의한 암세포 이동 억제를 나타내었다.
- [538]
- [539] (3) TM4SF19EC2 Δ
- [540] TM4SF19EC2 Δ 에서 파골세포 분화에 의한 암세포 이동 억제를 확인한 것으로 wt과 TM4SF19EC2 Δ 에서 뽑은 골수 유래 대식세포에 MCSF를 넣고 RANKL을 넣어서 분화시키거나 넣지 않아 분화를 시키지 않고, 이동 챔버를 위에 암세포 MDA-MB231 또는 PC3M을 넣고 이동을 진행시켰다. 이동된 암세포를 크리스탈

바이올렛으로 염색하였다.

[541] 그 결과는 도 50b에 TM4SF19EC2Δ에서 파골세포 분화에 의한 암세포 이동 억제제를 나타내었다.

[542]

[543] 실시예 19: 골육종 세포 증식, 이동 및 콜로니 형성 확인

[544] (1) TM4SF19 과발현

[545] 3Flag-hTM4SF19를 MG63, HOS 골육종 세포주에 안정적으로 과발현시킨 후 세포의 성장을 MTT 분석하였고, 콜로니 형성과 이동을 확인하였다. 그 결과, TM4SF19 과발현에 의해 골육종 세포의 증식, 이동, 콜로니 형성이 증가됨을 확인하였다(도 51, 도 52)

[546] 또한, 143b 골육종 세포주에 TM4SF19를 CRISPR로 녹아웃시킨 후 각각 다른 클론 (#4와 #6)으로 세포의 성장을 MTT 분석으로 확인하고, 콜로니 형성을 확인하였다.

[547] 그 결과, TM4SF19 발현 억제에 의해 골육종 세포 (143b)의 증식 콜로니 형성이 억제됨 확인하였다(도 53).

[548] TM4SF19 과발현은 골육종 세포 증식 및 이동을 증가시킨다. TM4SF19 발현 억제는 골육종 세포의 증식 및 콜로니 형성을 억제시킨다.

[549]

[550] (2) TM4SF19-Fc 처리

[551] 143b 골육종 세포주 hTM4SF19-Fc(120-169)를 처리하면서 세포의 성장을 MTT 분석과 세포 계수로 확인하고, 군집능력을 콜로니 형성으로 확인하고, 세포의 이동을 확인하였다.

[552] TM4SF19-Fc 처리에 의해 143b 골육종 세포의 성장이 억제됨을 MTT 분석(도 54a)과 세포 계수로 확인(도 54c)하고, 군집 능력을 콜로니 형성(도 54b)고 세포이동(도 54d)을 확인하였다.

[553]

[554] 인간 TM4SF19-Fc(120-169 aa) (10 µg/ml) 처리에 의해 U2OS, MG63 골육종 세포 콜로니 형성이 억제됨을 확인하였다(도 55).

[555] HOS 골육종 세포의 세포 이동 능력이 10µg/ml hTM4SF19-Fc (120-169 aa)와 hTM4SF19-Fc (145~169 aa) 처리에 의해 억제됨을 확인하였다(도 56).

[556] 이는 적어도 145~169 aa를 포함하는 hTM4SF19-Fc가 활성을 보이는 것으로 판단할 수 있다.

[557]

[558] 실시예 20: 췌장암 세포 성장, 콜로니 형성 억제 확인

[559] 췌장암 세포주 Panc-1 및 MIA-PaCa2에 100 µg/ml의 hTM4SF19-Fc(120-169)를 처리하여 세포의 군집 능력을 콜로니 형성 에세이로 확인하였다. 그 결과, 도 57a에서 볼 수 있는 바와 같이, hTM4SF19-Fc(120-169)에 의해 췌장암 세포주의 군집능력이 억제됨을 확인하였다. 추가로, 췌장암 세포주 Panc-1, MIA-PaCa2,

AsPC-1에 62.5 $\mu\text{g/ml}$ 또는 125 $\mu\text{g/ml}$ 의 hTM4SF19-Fc(120-169)를 처리하고 세포 계수를 통해 세포 성장 억제를 확인하였다(도 57b). 그 결과, TM4SF19-Fc 처리에 의해 췌장암 세포의 성장, 군집 능력이 억제됨을 확인하였다.

청구범위

- [청구항 1] TM4SF19(transmembrane 4 L six family member 19) 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 골 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 TM4SF19(transmembrane 4 L six family member 19) 발현 또는 활성 억제제는 TM4SF19 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 짧은 헤어핀 RNA(small hairpin RNA, shRNA), 작은 간섭 RNA(small interfering RNA, siRNA), 마이크로 RNA(microRNA, miRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서,
상기 TM4SF19(transmembrane 4 L six family member 19) 발현 또는 활성 억제제는 TM4SF19 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 모방체, 앵타머, 융합단백질 및 항체로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제 3 항에 있어서,
상기 TM4SF19 단백질에 특이적으로 결합하는 융합단백질은 TM4SF19의 단편 및 면역글로불린 Fc 영역이 포함된 것인 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제 4 항에 있어서,
상기 TM4SF19의 단편은 TM4SF19의 세포외 루프 2(extracellular loop 2) 전체 또는 일부 부위를 포함하는 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제 1 항에 있어서,
상기 골 질환은 대사성 골 질환, 정형외과적 골 질환, 무형성 골 질환, 퇴행성 골 질환, 퇴행성 관절염, 류마티스성 관절염, 건선성 관절염, 건선성 척추염, 노화성 골감소증(age-related bone loss), 골다공증, 골 형성 부전증, 골연화증, 골량 감소증, 골절, 골 결손 및 고관절 감소증, 구루병, 파제트 골 질환, 치주질환, 암세포의 골전이에 의해 초래되는 골 손상으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 약학적 조성물.
- [청구항 7] 골 질환 의심 검체에 골 질환 치료용 후보물질을 처리하는 단계; 및 대조군과 TM4SF19 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준을 비교하는 단계를 포함하는, 골 질환 치료 약물의 스크리닝 방법.
- [청구항 8] TM4SF19 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 비만 또는 비만 매개 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 9] 제 8 항에 있어서,
상기 TM4SF19(transmembrane 4 L six family member 19) 발현 또는 활성

억제제는 TM4SF19 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 짧은 헤어핀 RNA(small hairpin RNA, shRNA), 작은 간섭 RNA(small interfering RNA, siRNA), 마이크로 RNA(microRNA, miRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 약학적 조성물.

- [청구항 10] 제 8 항에 있어서,
상기 TM4SF19(transmembrane 4 L six family member 19) 발현 또는 활성 억제제는 TM4SF19 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 모방체, 앵타머, 융합단백질 및 항체로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 약학적 조성물.
- [청구항 11] 제 10 항에 있어서,
상기 TM4SF19 단백질에 특이적으로 결합하는 융합단백질은 TM4SF19의 단편 및 면역글로불린 Fc 영역이 포함된 것인 약학적 조성물.
- [청구항 12] 제 11 항에 있어서,
상기 TM4SF19 단편은 TM4SF19의 세포외 루프 2(extracellular loop 2) 전체 또는 일부 부위를 포함하는 약학적 조성물.
- [청구항 13] 제 8 항에 있어서,
상기 비만 매개 대사성 질환은 고혈압, 당뇨, 인슐린 내성 증후군, 대사 증후군, 비만관련 위식도 역류성 질환, 동맥경화증, 고지혈증, 과중성지방혈증, 과콜레스테롤혈증, 지방이영양증, 비알콜성 지방간염, 심혈관 질환 및 다낭성 난소 증후군으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 약학적 조성물.
- [청구항 14] 비만 또는 비만 매개 대사성 질환 의심 검체에 비만 또는 비만 매개 대사성 질환 치료용 후보물질들을 처리하는 단계; 및
대조군과 TM4SF19 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현수준을 비교하는 단계를 포함하는, 비만 또는 비만 매개 대사성 질환 치료 약물의 스크리닝 방법.
- [청구항 15] TM4SF19 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 암 예방, 치료 또는 암 전이 억제용 약학적 조성물.
- [청구항 16] 제 15 항에 있어서,
상기 TM4SF19(transmembrane 4 L six family member 19) 발현 또는 활성 억제제는 TM4SF19 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 짧은 헤어핀 RNA(small hairpin RNA, shRNA), 작은 간섭 RNA(small interfering RNA, siRNA), 마이크로 RNA(microRNA, miRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 약학적 조성물.
- [청구항 17] 제 15 항에 있어서,

- 상기 TM4SF19(transmembrane 4 L six family member 19) 발현 또는 활성 억제제는 TM4SF19 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 모방체, 앵타머, 융합단백질 및 항체로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 약학적 조성물.
- [청구항 18] 제 17 항에 있어서,
상기 TM4SF19 단백질에 특이적으로 결합하는 융합단백질은 TM4SF19의 단편 및 면역글로불린 Fc 영역이 포함된 것인 약학적 조성물.
- [청구항 19] 제 18 항에 있어서,
상기 TM4SF19의 단편은 TM4SF19의 세포외 루프 2(extracellular loop 2) 전체 또는 일부 부위를 포함하는 약학적 조성물.
- [청구항 20] 제 15 항에 있어서,
상기 암은 대장암, 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 비소세포성폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 흑색종, 자궁암, 난소암, 소장암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관 암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 척수 종양, 뇌간 신경교종, 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 약학적 조성물.
- [청구항 21] 암 예방, 치료 또는 암 전이 의심 검체에 암 예방, 치료 또는 암 전이 억제용 후보물질을 처리하는 단계; 및
대조군과 TM4SF19 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준을 비교하는 단계
를 포함하는, 암 또는 암 전이 치료 약물의 스크리닝 방법.
- [청구항 22] TM4SF19 단백질의 세포외 루프 2(extracellular loop 2) 유래 단편 및 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 TM4SF19 발현 또는 활성 억제용 융합 단백질.
- [청구항 23] 제 22 항에 있어서,
상기 TM4SF19 단백질의 세포외 루프 2(extracellular loop 2, EC2) 유래 단편은 EC2 전체 또는 일부에 해당하는 아미노산 서열 부위인 융합 단백질.
- [청구항 24] 제 22 항에 있어서,
상기 EC2 전체에 해당하는 아미노산 서열 부위는 인간 TM4SF19 단백질의 120-169번째 아미노산 부위 또는 마우스 TM4SF19 단백질의 116-165 번째 아미노산 부위인 융합 단백질.
- [청구항 25] 제 22 항에 있어서,
상기 EC2 일부에 해당하는 아미노산 서열 부위는 인간 TM4SF19

- 단백질의 145-169번째 아미노산 부위를 포함하는 융합 단백질.
- [청구항 26] 제 22 항에 있어서,
SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16 또는 SEQ ID NO: 19로
표시되는 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질.
- [청구항 27] 치료학적으로 유효한 양의 TM4SF19 발현 또는 활성 억제제를 포함하는
골 질환 예방 또는 치료용 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는
골 질환을 예방 또는 치료하는 방법.
- [청구항 28] 치료학적으로 유효한 양의 TM4SF19 발현 또는 활성 억제제를 포함하는
비만 또는 비만 매개 대사성 질환 예방 또는 치료용 조성물을 대상체에
투여하는 단계를 포함하는 비만 또는 비만 매개 대사성 질환을 예방 또는
치료하는 방법.
- [청구항 29] 치료학적으로 유효한 양의 TM4SF19 발현 또는 활성 억제제를 포함하는
암 예방, 치료 또는 암 전이 억제용 조성물을 대상체에 투여하는 단계를
포함하는 암 예방, 치료 또는 암 전이를 예방 또는 치료하는 방법.