



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0051383
(43) 공개일자 2019년05월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A23L 33/13 (2016.01)
A61K 39/395 (2006.01) C12Q 1/68 (2018.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)
A23L 33/13 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2017-0146944

(22) 출원일자 2017년11월06일

심사청구일자 2017년11월06일

(71) 출원인

한국과학기술연구원

서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

노주원

서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)

김명석

서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

리엔특허법인

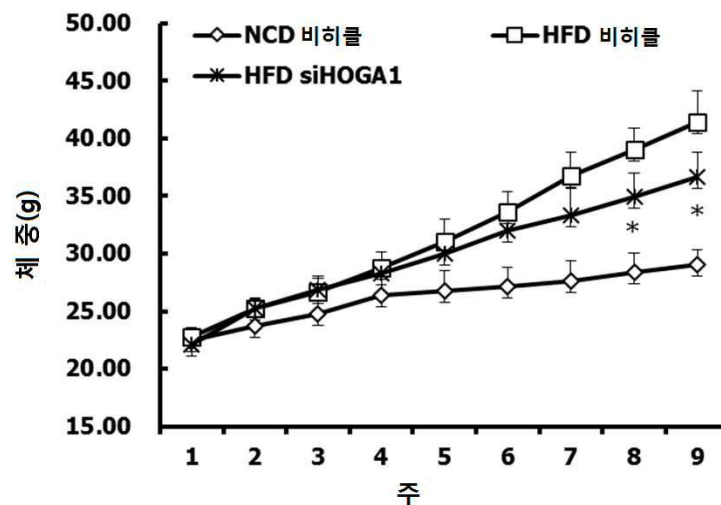
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 H o g a 1을 억제하는 물질을 포함하는 비만의 예방 또는 치료용 조성물 및 이를 스크리닝하는 방법

(57) 요약

Hoga1 유전자의 발현 억제제 또는 Hoga1 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 비만의 예방, 개선 또는 치료용 조성물 및 이를 스크리닝하는 방법에 따르면, 신규한 비만 예방 또는 치료제 및, 비만 개선용 식품을 제공한다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 39/395 (2013.01)

C12Q 1/6883 (2018.05)

G01N 33/6893 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/332 (2013.01)

C12Q 2600/136 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2500/00 (2013.01)

Y10S 514/909 (2013.01)

(72) 발명자

진창호

서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)

조윤신

강원도 춘천시 한림대학길 1(옥천동)

최혁순

강원도 춘천시 한림대학길 1(옥천동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 CRC-15-01-KIST

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 국가과학기술연구회

연구사업명 실용화형 융합연구단 사업

연구과제명 스마트팜 상용화 통합 솔루션 기술개발

기 여 율 2/4

주관기관 한국과학기술연구원

연구기간 2016.10.16 ~ 2017.10.15

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2012M3A9D1054534

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업

연구과제명 질환 관련 miRNA 발굴을 위한 miRNAseq 데이터 분석

기 여 율 1/4

주관기관 한림대학교

연구기간 2012.11.30 ~ 2017.11.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017R1A2B4006508

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업

연구과제명 대사성질환에 영향을 미치는 신규 유전요인 발굴을 통한 질환 발생 기전 규명

기 여 율 1/4

주관기관 한림대학교

연구기간 2017.03.01 ~ 2020.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

Hoga1 유전자의 발현 억제제 또는 Hoga1 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 비만의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 발현 억제제는 Hoga1 유전자에 특이적으로 결합하는 핵산, 폴리펩티드, 단백질, 또는 이들의 조합인 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 발현 억제제는 Hoga1 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA: siRNA), 짧은 헤어핀 RNA (short hairpin RNA: shRNA), 압타머, 리보자임(ribozyme), 저분자 화합물, 또는 이들의 조합인 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 발현 억제제는 Hoga1 유전자에 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, 압타머, 또는 이들의 조합인 것인 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 활성 억제제는 Hoga1 단백질에 특이적으로 결합하는 펩티드, 펩티드모방체, 기질유사체, 항체 또는 이들의 조합인 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 활성 억제제는 Hoga1 단백질에 결합하는 항체인 것인 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 약학적으로 허용가능한 담체를 더 포함하는 것인 조성물.

청구항 8

Hoga1 유전자의 발현 억제제 또는 Hoga1 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 비만의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 식품학적으로 허용가능한 담체를 더 포함하는 것인 조성물.

청구항 10

세포 또는 Hoga1 단백질을 시험 물질과 접촉시켜 접촉된 혼합물(contacted mixture)을 얻는 단계;

상기 접촉된 혼합물 중 Hoga1 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Hoga1 단백질의 발현 수준 또는 활성 수준을 측정하는 단계; 및

측정된 발현 수준 또는 활성 수준을 대조군으로부터 측정된 발현 수준 또는 활성 수준과 비교하는 단계; 를 포함하는, 비만 예방 또는 치료제를 스크리닝하는 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 세포는 개체 중에 포함되어 있고, 상기 접촉시키는 단계는 상기 시험 물질을 개체에

투여하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 12

청구항 10에 있어서, 측정된 발현 수준 또는 활성 수준이 대조군으로부터 측정된 발현 수준 또는 활성 수준보다 낮은 경우, 상기 시험 물질을 비만 예방 또는 치료제로서 선택하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] Hoga1 유전자의 발현을 억제하는 물질을 포함하는 약학 또는 식품 조성물 및 비만 예방 또는 치료제를 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 경제성장과 서구적인 생활방식의 변화에 따라 식습관에도 많은 변화가 있다. 특히, 바쁜 현대인들은 패스트푸드 등의 고열량 식이와 적은 운동량으로 인하여 과체중 및 비만이 증가하고 있다. 비만은 에너지 발란스 조절기능의 이상 혹은 과영양(hypernutrition)으로 지방조직이 과다하게 축적되어 각종 질병의 이환율과 사망률을 높이는 만성 질환이다. 비만 및 이와 관련된 질병은 미국 및 전세계적으로 공통적이고 매우 심각한 공중 보건 문제이며 국제보건기구(World Health Organisation, WHO)에 따르면, 전세계적으로 10억 이상의 성인이 과체중이고, 그 중 적어도 300만 이상이 임상적으로 비만으로 보고 있다. 또한 이는 미국과 유럽에서 두드러지게 증가하고 있으며, 특히 유럽에서 매년 250,000명, 전세계에서 2만 오천명 이상이 과체중과 관련되어 사망하였다고 평가한다(World Health Organisation, Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health, 2004).

[0003] 과체중 및 비만은 혈압과 콜레스테롤 수치를 높여 심장 질환, 당뇨, 관절염 등 각종 질환의 원인이 되기도 하고, 각종 성인병의 발병률을 증가시키고 있다. 뿐만 아니라, 과체중 및 비만은 성인뿐만 아니라 어린이나 청소년들에서도 동맥경화, 고혈압, 고지혈증 또는 심장질환 등의 각종 성인병의 발병률을 증가시키는 한 요인이 되고 있다.

[0004] 이와 같이, 비만은 전세계적인 질병으로서 각종 질환의 원인이 되기도 하는 심각한 질병이지만 쉽게 치료할 수 없는 질병이다. 의학 전문가들 사이에서는 비만의 원인은 복잡하며 다양한 요소에 기인하며, 비만은 단순한 자제력의 문제가 아니라 식욕의 조절과 에너지 대사가 관련된 복잡한 질환이라는 인식 또한 확산되고 있다. 그러나 비만의 일반적인 원인으로는 섭취 에너지가 소비 에너지에 비해 지속적으로 과다하게 되는 것 이므로, 비만을 예방 또는 치료하기 위한 장기적 관점에서 식이요법, 운동과 병행하여 사용될 수 있는 효과적이고 안전한 의약품이 요구되고 있다.

[0005] 본 발명자들은 비만의 예방 또는 치료제로서 신체에 영향이 없는 안전한 물질을 찾기 위해 예의 노력한 결과, Hoga1 유전자와 비만과의 연관성을 최초로 규명하고, 신규한 비만 치료 타겟을 제시하며, 이에 따른 Hoga1 유전자의 발현 억제제 또는 Hoga1 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 조성물 및, 이를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2012-0067190호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 일 양상은 Hoga1 유전자의 발현 억제제 또는 Hoga1 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 비만의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0008] 일 양상은 Hoga1 유전자의 발현 억제제 또는 Hoga1 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 비만의 예방

또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0009] 일 양상은 세포 또는 Hoga1 단백질을 시험 물질과 접촉시켜 접촉된 혼합물(contacted mixture)을 얻는 단계;

[0010] 상기 접촉된 혼합물 중 Hoga1 유전자 mRNA의 발현 수준 또는 Hoga1 단백질의 발현 수준 또는 활성 수준을 측정하는 단계; 및

[0011] 측정된 발현 수준 또는 활성 수준을 대조군으로부터 측정된 발현 수준 또는 활성 수준과 비교하는 단계; 를 포함하는, 비만 예방 또는 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0012] 일 양상은 Hoga1 유전자의 발현 억제제 또는 Hoga1 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 비만의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0013] 용어 "Hoga1 유전자"[NCBI ID: 67432 (Mus musculus), ID: 112817 (Homo sapiens)]는 Hoga1 단백질을 코딩하는 유전자를 말한다. Hoga1 유전자는 주로 간 및 신장에서 발현되며, Hoga1 단백질은 35kDa의 크기를 가진 단백질로서, 콜라겐의 전구체인 히드록시프롤린(hydroxyproline)의 생합성 마지막 단계에 관여하는 효소(Biochim Biophys Acta. 2015, 1852(12), 2700-2705)이며, 이러한 효소작용을 통하여 글리옥시레이트(glyoxylate)와 피루빈산(pyruvate)이 생성될 수 있다. 또한, Hoga1 유전자의 돌연변이는 3형 원발성 옥산산뇨증(Primary hyperoxaluria)을 유발할 수 있으며(Clin J Am Soc Nephrol. 2011, 6(9), 2289-2295), Hoga1 유전자와 상호작용하는 유전자는 GOT1, GOT2, HA01, HA02, GRHPR 등을 포함할 수 있다.

[0014] 용어 "Hoga1 유전자의 발현 억제제"는 세포 내에서 Hoga1 유전자의 발현 또는 활성을 감소시키는 물질을 말하며, Hoga1 유전자에 특이적으로 결합하는 핵산, 폴리펩티드, 단백질, 또는 이들의 조합일 수 있으며, 구체적으로는 Hoga1 유전자에 직접적으로 작용하거나 또는 Hoga1 유전자의 상위 조절자에 간접적으로 작용하여 Hoga1 유전자의 발현을 전사 수준에서 감소시키거나, 발현된 Hoga1 유전자의 분해를 증가시키거나, 그 활성을 방해함으로써, Hoga1 유전자의 발현 수준 또는 그 활성을 감소시키는 물질을 지칭한다. 이는 상기 유전자를 억제할 수 있는 당업계에 공지된 표준 기법을 통해 세포에 처리될 수 있는 핵산 또는 폴리펩티드 같은 생물학적 분자, 화합물, 세균이나 식물 또는 동물로부터 분리된 추출물 등을 제한 없이 포함하나, 그 예로 Hoga1 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA: siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA: shRNA), 압타머, 리보자임(ribozyme), 또는 저분자 화합물일 수 있다. 예를 들어, 상기 발현 억제제는 Hoga1 유전자에 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNA, 압타머, 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0015] 용어 "안티센스 올리고뉴클레오티드(antisense oligonucleotide)"는 자연 발생적인 염기, 당 및 당간(intersugar) 연결로 이루어진 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드 단량체의 올리고머 또는 중합체를 지칭한다. 또한, 이 용어는 유사하게 기능하는 비-자연 발생적인 단량체 또는 그의 부분을 포함하는 변형된 또는 치환된 올리고머를 포함한다. 치환된 올리고머의 혼입은 세포 흡수 증대 또는 뉴클레아제 내성 증가를 비롯한 인자에 기초하며, 당업계에 공지된 바와 같이 선택될 수 있다. 전체 올리고뉴클레오티드 또는 그의 일부분이 치환된 올리고머를 함유할 수 있다. 또한, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드는 이들의 표적에 대한 친화성을 증가시키고 표적 서열의 미스매치(mismatch)에 대한 내성을 제공하도록 당업계에 공지된 방법으로 변형된 올리고머 모방체, 예를 들어 펩티드 핵산(PNA) 및 고정(locked) 핵산(LNA)을 포함할 수 있다. 또한, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드는 천연형 올리고뉴클레오티드, 포스포로티오에이트형 올리고데옥시리보뉴클레오티드, 포스포로디티오에이트형 올리고데옥시리보뉴클레오티드, 메틸포스포네이트형 올리고데옥시리보뉴클레오티드, 포스포로아미데이트형 올리고데옥시리보뉴클레오티드, H-포스포네이트형 올리고데옥시리보뉴클레오티드, 트리에스테르형 올리고데옥시리보뉴클레오티드, 알파-아노머형 올리고데옥시리보뉴클레오티드, 펩티드 핵산, 그외 인조 핵산 및 핵산-변형된 화합물을 포함한, 변형된 올리고뉴클레오티드 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. Hoga1 염기서열에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고 뉴클레오티드 분자는 표준 분자 생물학 기술, 예를 들어 화학적 합성 방법 또는 재조합 방법을 이용하여 분리 또는 제조하거나, 시판되는 것을 사용할 수 있다.

[0016] 용어 "작은 간섭 RNA(short interfering RNA: siRNA)"는 Hoga1 유전자에 특이적으로 작용하여 Hoga1 RNA를 절단(cleavage)하여 RNA 간섭(RNAi: RNA interference)현상을 유도할 수 있는 이중사슬 RNA를 말한다. siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운(knockdown) 방법으로서 또는 유전자치료 방법으로 제공될 수 있다. siRNA는 식물, 벌레, 조파리 및 기생충에서 처음으로 발견되었으나, 최근에 siRNA를 개발/이용하여 포유류 세포 연구에 응용되었다. Hoga1 유전자에 대한 siRNA는 Hoga1 유전자 핵산 서열의 일부

또는 전부와 상동인 서열을 포함하는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 RNA 가닥으로 구성되어 세포 내에서 Hoga1 RNA에 혼성화될 수 있는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 상기 siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 짝을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치 즉 대응하는 염기가 상보적이지 않음, 벌지 즉 일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음 등에 의하여 짝을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기일 수 있고, 구체적으로는 20 내지 70 염기, 보다 구체적으로는 20 내지 30 염기일 수 있다. 상기 siRNA 분자는 자기-상보성 센스 및 안티센스 가닥 사이에 짧은 뉴클레오티드 서열 예컨대, 약 5- 15 nt이 삽입된 형태를 가질 수 있으며, 이 경우 뉴클레오티드 서열의 발현에 의해 형성된 siRNA 분자는 분자내 혼성화에 의하여 헤어핀 구조를 형성하게 되며, 전체적으로는 스템-앤드-루프(stem and loop) 구조를 형성하게 될 수 있다. 이 스템-앤드-루프 구조는 인 비트로 또는 인 비보에서 프로세싱되어 RNAi를 매개할 수 있는 활성의 siRNA 분자를 생성한다.

[0017] 용어 "짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA: shRNA)"는 RNA 간섭을 통해 유전자 발현을 침묵시키는데 사용될 수 있는 단단한 헤어핀 턴을 만드는 RNA 서열을 갖는 RNA 분자를 말한다. shRNA 헤어핀 구조는 세포 기작에 의해 siRNA로 절단되고, 이는 이어서 RNA-유도 침묵 복합체 (RISC)에 결합될 수 있다. 이 복합체는 그에 결합되는 siRNA에 매치되는 mRNA에 결합하여 절단될 수 있다. siRNA의 서열은 전장 표적 유전자 또는 그의 하위서열에 상응할 수 있다. siRNA는 유전자에 "표적화"되며, 여기서 siRNA의 듀플렉스 부분의 뉴클레오티드 서열이 표적화된 유전자의 뉴클레오티드 서열에 실질적으로 상보적일 수 있다. siRNA 서열 듀플렉스는 상보적 염기-쌍형성 상호작용을 통해 함께 siRNA를 가져와 RNA를 표적화하기에 충분한 길이일 필요가 있으며, 다양한 길이일 수 있다. siRNA의 길이는 바람직하게는 10개 이상의 뉴클레오티드고, 표적 RNA와 안정하게 상호작용하기에 충분한 길이; 구체적으로 10-30개 뉴클레오티드; 보다 구체적으로 10 내지 30개 사이의 임의의 정수, 예컨대 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 및 30개의 뉴클레오티드일 수 있다. 상기 "충분한 길이"는 예상된 조건하에 목적하는 기능을 제공하기에 충분히 큰 길이인 10개 이상의 뉴클레오티드의 뉴클레오티드를 의미한다. shRNA는 재조합 DNA 기술을 이용하여 벡터에 클로닝될 수 있다.

[0018] 용어 "압타머(aptamer)는 특정의 3차원 입체형태를 채택하는 능력에 의해 Hoga1 유전자와 결합하여 이에 대해 길항 효과를 갖는 핵산 리간드 분자를 말한다. 전형적으로 압타머는 규정된 이차 및 삼차 구조, 예컨대 스템-루프구조로 접혀지는 15-50 염기 길이의 작은 핵산일 수 있다. 압타머는 10 6, 10-8, 10-10, 또는 10 -12 보다 적은 kd로 표적 분자와 결합하는 것이 바람직할 수 있다. 압타머는 매우 고도의 특이성을 가지는 표적 분자와 결합할 수 있다. 또한, 압타머는 다수의 리보뉴클레오티드 단위, 테옥시리보뉴클레오티드 단위, 또는 두 가지 유형의 뉴클레오티드 잔기의 혼합물로 구성될 수 있다. 압타머는 하나 이상의 변형된 염기, 당 또는 포스페이트 주쇄 단위를 추가로 포함할 수 있다.

[0019] 용어 "리보자임(ribozyme)"은 촉매 활성을 갖는 RNA 분자를 말한다. 다양한 활성을 갖는 리보자임이 공지되어 있으며, Hoga1 유전자의 유전자의 리보자임은 공지된 또는 인공적으로 생성된 리보자임을 포함하며, 선택적으로 표적 특이적 RNA 절단 활성을 갖는 리보자임이 공지의 표준 기법에 의해 제조될 수 있다.

[0020] 용어 "저분자 화합물"은 생체에 존재하는 생체 고분자 이외의 천연 유래의 화합물질 또는 비천연 유래의 화합물질을 말하며, 표적 조직 특이적인 화합물 또는 비천연 화합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0021] 용어 "Hoga1 단백질의 활성 억제제"는 Hoga1 유전자가 코딩하는 Hoga1 단백질의 활성 또는 작용을 감소시키는 물질을 말하며, Hoga1 단백질에 특이적으로 결합하는 펩티드, 펩티드모방체, 기질유사체, 화합물, 항체 또는 이들의 조합일 수 있으며, 예를 들어, Hoga1 단백질에 결합하는 다클론 항체, 단클론 항체, 또는 재조합 항체 등을 포함하는 항체일 수 있다. 또한, 상기 펩티드모방체는 치료제로서 특정 폴리펩티드의 구조 및 바람직한 특징을 모방하는 화합물을 지칭한다.

[0022] 상기 Hoga1 유전자의 서열은 공지된 데이터 베이스인 GenBank 등에서 당업자가 손쉽게 얻을 수 있으므로 이를 이용하여 상기 유전자의 발현을 억제할 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNA, 압타머, 항체 등은 공지의 표준 기법에 의해 제조될 수 있다.

[0023] 상기 "항체"는 Hoga1 단백질에 결합하여 Hoga1의 활성을 억제할 수 있는 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 말한다. 상기 항체는 Hoga1 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 상기 Hoga1 단백질이 규명되었으므로 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 Hoga1 단백질에 대한 항체를 용이하게 제조할 수 있다. 상기 다클론 항체는 상기한 Hoga1 단백질 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소 개 등의 임의의 동물 종

숙주로부터 제조 가능할 수 있다. 상기 단클론 항체는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method), 또는 파지 항체 라이브러리 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정제할 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함할 수 있다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, 예를 들어 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함할 수 있다.

[0024] 일반적으로 체중이 많이 나가지만 비만이 아니더라도 근육이 많은 사람은 체중이 많이 나갈 수 있기 때문에 체내에 지방조직이 과다한 상태를 "비만(overweight)"으로 지칭한다. 용어 "비만"은 체지방이 과다한 상태를 말하며, 임상적으로 체질량지수가 한국의 경우 25, 세계보건기구(WHO)에 의하면 30 이상인 경우를 말한다. 일반적으로 체중이 정상치보다 높은 경우를 의미하지만 체중이 많이 나가지 않더라도 몸의 구성성분 중 체지방의 비율이 높은 경우 비만이라고 진단하며, 성인과 어린이 모두에서 발병하는 질환을 말한다. 이와 같은 비만은 체중의 증가뿐만 아니라 과식, 과음 및 과식증, 고혈압, 당뇨, 증가된 혈장 인슐린 농도, 인슐린 내성, 고지혈증, 대사 증후군, 인슐린 내성 증후군, 비만관련 위식도 역류, 동맥경화증, 과콜레스테롤혈증, 요산과다혈증, 하부등 통증, 심장비대 및 좌심실 비대, 지방이영양증, 비알콜성 지방간염, 심혈관 질환 또는 다낭성 난소 증후군과 같은 비만 관련 질환을 유발할 수 있으므로 있다. 따라서, 본 발명에 따른 조성물을 이용할 경우 비만 뿐만 아니라 상기 비만 관련 질환의 예방 또는 치료도 동시에 이루어질 수 있으며, 이러한 비만 관련 질환의 치료 대상은 체중을 줄이려는 욕구가 있는 대상도 포함된다.

[0025] 용어 "치료(treatment)"는 질환, 장애, 또는 그의 부수적 증상이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 말한다. 상기 치료는 증상의 완화, 질환 정도의 감소, 악화되지 않는 질환의 유지, 질환진행의 지연, 질환 상태의 개선 또는 완화, (일부 또는 완전한) 완화를 포함할 수 있다. 또한, 치료를 받지 않은 경우 예상되는 질환의 상태와 비교하여 호전된 상태를 지칭할 수 있고, 치료적 수단 이외에 예방적 수단을 동시에 포함할 수 있다. 치료가 필요한 경우는 질환을 이미 가지고 있는 경우와 질환이 예방되어야 하는 경우를 포함할 수 있다. 질병의 완화는 치료받지 않는 상황과 비교하여 원하지 않는 질병의 임상양상의 호전이나 질병의 추이가 지연되거나 연장되는 경우를 의미할 수 있다. 예를 들어, 상기 치료는 본 발명에 따른 조성물의 투여로 비만 또는 비만 관련 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 말한다.

[0026] 용어 "예방(prevention)"은 질환, 장애, 또는 그의 부수적 증상의 발병 또는 재발을 부분적으로 또는 완전히 지연시키거나 방지하거나, 질환 또는 장애의 획득 또는 재획득을 막거나, 질환 또는 장애의 획득의 위험을 감소시키는 방법을 말한다. 예를 들어, 상기 예방은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 비만, 또는 비만 관련 질환, 장애, 또는 증상의 발생을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.

[0027] 일 구현예에 따르면 siRNA를 이용하여 Hoga1 유전자를 녹다운(knockdown)시킨 마우스는 고지방 식이에 의해 유도된 비만에 의한 체중의 증가가 억제되며, 지방조직의 크기가 감소하고, 지방세포의 크기가 줄어드는 것이 확인되었고, 상기 유전자의 발현을 억제하는 물질을 포함하는 조성물이 비만을 예방 또는 치료할 수 있음이 규명되었다.

[0028] 일 구현예에 따르면 본 발명에 따른 조성물은 Hoga1 유전자의 발현 억제제 및 Hoga1 단백질의 활성 억제제 중 1종 이상을 유효성분으로 포함할 수 있고, 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있으며, 담체와 함께 제제화 될 수 있다.

[0029] 용어 "약학적으로 허용가능한 담체"는 생물체를 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용되는 약학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로스 용액, 말토 텍스트린 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.

[0030] 일 구현예에 따르면 본 발명에 따른 약학 조성물은 Hoga1 유전자의 발현 억제제 및 Hoga1 단백질의 활성 억제제 중 1종 이상과 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물은 이를 유효성분으로 포함하는 어떠한 약학적 제형으로도 적용가능하며, 경구용 또는 비경구용 제형으로 제조할 수 있으며, 투여의 용이성과 투여량의 균일화를 위해 단위 투여 형태로 제형화할 수 있다.

- [0031] 상기 약학적 제형은 구강(oral), 직장(rectal), 비강(nasal), 국소(topical; 볼 및 혀 밑을 포함), 피하, 질(vaginal) 또는 비경구(parenteral; 근육내, 피하 및 정맥 내를 포함) 투여에 적당한 것 또는 흡입(inhalation) 또는 주입(insufflation)에 의한 투여에 적당한 형태를 포함할 수 있다.
- [0032] 본 발명에 따른 약학 조성물을 유효성분으로 포함하는 경구 투여용 제형으로는, 예를 들어 정제, 트로키제, 로렌지, 수 용성 또는 유성현탁액, 조제분말 또는 과립, 에멀전, 하드 또는 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제로 제제화 할 수 있다. 정제 및 캡슐 등의 제형으로 제제화하기 위해, 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제, 디칼슘 포스페이트와 같은 부형제, 옥수수 전분 또는 고 구마 전분과 같은 붕괴제, 스테아르산 마스네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아릴푸마르산 나트륨 또는 폴리 에틸렌 글리콜 왁스와 같은 윤활유를 포함할 수 있으며, 캡슐제형의 경우 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체를 더 함유할 수 있다.
- [0033] 본 발명에 따른 약학 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 제제화할 수 있다. 주사용 제형으로 제제화하기 위해서는 본 발명의 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여용으로 제제화할 수 있다. 좌제로 주입하기 위해서는, 코코아버터 또는 다른 글리세라이드 등 통상의 좌약 베이스를 포함하는 좌약 또는 관장제와 같은 직장투여용 조성물로 제제화할 수 있다. 에어로졸제 등의 스프레이용으로 제제화하는 경우, 수분산된 농축물 또는 습윤 분말이 분산되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합될 수 있다.
- [0034] 다른 양상은 Hoga1 유전자의 발현 억제제 또는 Hoga1 단백질의 활성 억제제를 포함하는 비만의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 비만을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0035] 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명에 따른 약학 조성물을 도입하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물이 개체 내로 도입되면, 체중 감소, 지방조직의 크기 감소, 지방 세포 크기 감소에 의해 비만을 예방 또는 치료할 수 있다. 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다. 구체적으로, 구강, 직장, 국소, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 경피, 비측내, 흡입, 안 구 내 또는 피내경로를 통해 통상적인 방식으로 투여될 수 있다.
- [0036] 상기 비만의 예방 또는 치료 방법은 본 발명에 따른 약학 조성물을 치료적 유효량으로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 상기 치료적 유효량은 체중 감소 또는 지방세포의 크기 감소 효과를 증진시키는 양을 지칭할 수 있다. 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 사용 되는지의 여부를 비롯한 구체적 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 비만의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 유효량은 전술한 사항을 고려하여 결정하는 것이 바람직하다. 또한, 경우에 따라, 본 발명의 조성물과 함께 공지의 비만 관련 질환 치료제를 병용 투여하여 비만 억제 효과를 포함한 비만 관련 질환의 치료 효과를 증대시킬 수 있다.
- [0037] 또한, 본 발명의 치료 방법은 비만을 예방 또는 억제할 수 있는 임의의 동물에 적용가능하며, 동물은 인간 및 영장류뿐만 아니라, 소, 돼지, 양, 말, 개 및 고양이 등의 가축을 포함할 수 있다.
- [0038] 다른 양상은 Hoga1 유전자의 발현 억제제 또는 Hoga1 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 비만의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다. Hoga1 유전자의 발현 억제제 또는 Hoga1 단백질의 활성 억제제는 전술한 바와 동일하다. 일 구현예에 따르면 본 발명에 따른 식품 조성물은 Hoga1 유전자의 발현 억제제 및 Hoga1 단백질의 활성 억제제 중 1종 이상과, 식품학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있으며, 담체와 함께 제제화 될 수 있다. 상기 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등일 수 있다. 본 발명에 따른 조성물은 식욕 또는 활동량의 감소 등의 부작용이 적어 식품첨가물로 이용될 수 있다. 상기 비만 개선용 식품 조성물에서 포함할 수 있는 필수 성분으로 상기 Hoga1 유전자의 발현을 억제하는 물질을 포함하는 조성물을 포함하는 외에는 다른 성분에는 특별히 제한이 없으며 통상의 식품과 같이 여러가지 생약추출물, 식품보조첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 또한, 상기 언급한 바와 같이 식품보조첨가제를 추가로 첨가할 수도 있는바 식품보조첨가제는 당업계에 통상적인 식품보조첨가제, 예를 들어 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 향미제, 풍미제, 착색제, 충전제, 안정화제 등을 포함할 수 있다.

상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제 (타우 마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 그밖에 천연 과일쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육 을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 상기 비만 개선용 식품 조성 물은 건강기능식품의 형태로 제공될 수 있다.

- [0039] 상기 "건강기능식품"은 건강보조의 목적으로 특정성분을 원료로 하거나 식품 원료에 들어있는 특정성분을 추출, 농축, 정제, 혼합 등의 방법으로 제조, 가공한 식품을 말하며, 상기 성분에 의해 생체방어, 생체리듬의 조절, 질병의 방지와 회복 등 생체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발휘할 수 있도록 설계되고 가공된 식품을 말하는 것으로서, 상기 건강식품용 조성물은 비만의 예방 및 비만 관련 질환의 회복 등과 관련된 기능을 수행할 수 있다.
- [0040] 또 다른 양상은 세포 또는 Hoga1 단백질을 시험 물질과 접촉시켜 접촉된 혼합물(contacted mixture)을 얻는 단계;
- [0041] 상기 접촉된 혼합물 중 Hoga1 유전자 mRNA의 발현 수준 또는 Hoga1 단백질의 발현 수준 또는 활성 수준을 측정하는 단계; 및
- [0042] 측정된 발현 수준 또는 활성 수준을 대조군으로부터 측정된 발현 수준 또는 활성 수준과 비교하는 단계; 를 포함하는, 비만 예방 또는 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- [0043] 상기 세포는 Hoga1 유전자를 발현하는 세포를 말한다. 상기 세포는 개체 중에 포함될 수 있다. 용어 "개체"는 비만 예방 또는 치료제를 스크리닝하기 위해 시험 물질을 처리하는 대상 또는 시료를 말하며, 예를 들어, 말, 개, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 토끼, 닭, 마우스, 래트, 기니아 피그, 인간을 포함한 포유동물을 제한 없이 포함하며, 상기 개체로부터 분리된 전혈, 혈청, 혈액, 혈장, 타액, 뇨, 객담, 림프액, 세포와 같은 시료 등을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 개체는 비만이 의심되는 개체일 수 있다.
- [0044] 상기 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 방법은 시료에 포함된 표적 유전자의 발현여부를 확인하기 위하여, 상기 표적 유전자로부터 전사된 mRNA의 수준을 측정하는 방법을 말하며, 예를 들어, RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯팅(Northern blotting), DNA 칩 분석법 등의 방법을 제한 없이 포함한다.
- [0045] 상기 단백질의 발현 수준 또는 활성 수준을 측정하는 방법은 시료에 포함된 표적 단백질의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 방법을 말하며, 예를 들어, 웨스턴 블랏(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS 및 단백질 칩 분석법(protein chip assay) 등의 방법을 제한 없이 포함한다.
- [0046] 용어 “접촉(contact)”은 처리 또는 투여와 치환될 수 있고, 상기 접촉시키는 단계는 상기 시험 물질을 개체에 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 투여는 Hoga1 유전자를 발현하는 세포를 포함하는 개체 또는 Hoga1 단백질을 발현하는 개체에 시험 물질을 처리하는 단계를 지칭할 수 있다. 상기 투여는 개체에 시험물질이 전달될 수 있는 다양한 경로를 포함하며, 예를 들어, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌 혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0047] 용어 “측정”은 특정 데이터를 활용하여 미지의 값을 도출하는 일련의 연역적 및 귀납적 과정을 포괄하는 의미이며, 계산, 예측, 규명, 또는 결정과 치환될 수 있다.
- [0048] 일 구현예에 따르면, 상기 세포는 개체 중에 포함되어 있고, 상기 접촉시키는 단계는 상기 시험 물질을 개체에 투여하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0049] 상기 접촉된 혼합물은 시험 물질과 접촉하여 형성되고, Hoga1 유전자 또는 Hoga1 단백질과 관련된 하나 이상의 발현 수준 또는 활성 수준의 검출이 가능한 혼합물을 말한다.
- [0050] 용어 "시험 물질"은 Hoga1 유전자 또는 Hoga1 단백질의 변화 활성을 테스트할 약제를 말하며, “후보 물질”과

치환하여 사용될 수 있다.

- [0051] Hoga1의 발현 수준을 직접 또는 간접적으로 변화시킴으로써 비만을 예방 또는 치료할 수 있는 능력을 측정하는 대상으로서, 시험 조성물 또는 시험 화합물이라는 용어로 치환될 수 있고, 예컨대 단백질, 올리고펩티드, 소형 유기 분자, 다당류, 폴리뉴클레오타이드 및 광범위한 화합물 등 임의의 분자를 포함할 수 있다. 상기 시험 물질은 천연 물질뿐 아니라 합성 물질을 모두 포함하며, 비만 치료 약제로 사용될 수 있는 후보 물질을 포함할 수 있다. 예를 들어, 시험 물질은 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA: siRNA), 짧은 헤어핀 RNA (short hairpin RNA: shRNA), 압타머, 리보자임(ribozyme), 저분자 화합물, 항체, 펩티드, 펩티드모방체, 기질유사체, 또는 단백질을 제한 없이 포함할 수 있다.
- [0052] 용어 "대조군"은 시험 물질을 접촉, 투여 또는 처리하지 않은 개체를 말한다.
- [0053] 일 구현예에 따른 스크리닝 방법은, 측정된 발현 수준 또는 활성 수준이 대조군으로부터 측정된 발현 수준 또는 활성 수준보다 낮은 경우, 상기 시험 물질을 비만 예방 또는 치료제로서 선택하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0054] 용어 "비만 치료제"는 체중 감소, 지방조직 크기 감소, 지방세포 크기를 감소시키는 기능 등을 통해 비만을 예방 또는 치료하는 물질을 말한다.
- [0055] 일 구현예에 따른 스크리닝 방법은 개체 또는 비만 의심 개체에 시험 물질 또는 비만 치료용 후보물질을 처리한 후 시험 물질 또는 후보 물질을 처리하지 않은 대조군과 Hoga1 유전자 mRNA의 발현 수준 또는 Hoga1 단백질의 발현 수준 또는 활성 수준을 비교하여, 대조군에 비해 Hoga1 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Hoga1 단백질의 발현 수준 또는 활성 수준을 감소시키는 물질을 비만 예방 또는 치료제라고 판단하는 방법에 의해 수행될 수 있다. 상기 mRNA 수준을 측정하는 분석은 역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅, 또는 DNA 칩을 사용한 방법을 포함하며, 이에 제한되지 않는다. 상기 Hoga1 단백질의 수준을 분석은 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS, 또는 단백질 칩을 사용한 방법을 포함하며, 이에 제한되지 않는다.
- [0056] 본 발명에 따른 조성물은 에너지 소모 및 활동량에는 이상이 없는 동시에 체중의 증가를 막으면서 지방세포의 크기를 감소시킬 수 있는 비만의 예방 또는 치료제로 사용할 수 있다.

발명의 효과

- [0057] 일 양상에 따른 Hoga1 유전자의 발현 억제제 또는 Hoga1 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 비만의 예방, 개선 또는 치료용 조성물 및 이를 스크리닝하는 방법에 따르면, 신규한 비만 예방 또는 치료제 및, 비만 개선용 식품을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0058] 도 1은 Hoga1의 mRNA 발현을 RT-PCR로 정량화한 그래프이다.
- 도 2(A)는 Hoga1 siRNA를 첨가하여 1주간 분화를 유도한 지방전구세포를 오일레드 0로 염색한 사진이다. 도 2(B)는 지방세포분화 마커인 PPAR γ , aP2, CD36 및 C/EBP α 의 발현을 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 야생형, 고지방식이, 고지방식이 및 Hoga1 siRNA를 처리한 마우스(이하, '각 시험군'이라고 한다)의 음식섭취량을 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 각 시험군의 체중 변화를 시간에 따라 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 각 시험군의 지방조직에서 Hoga1의 단백질 발현을 웨스턴 블랏으로 확인한 사진이다.
- 도 6은 각 시험군의 혈액 내 혈당 및 인슐린의 함량을 나타낸 그래프이다.
- 도 7은 각 시험군의 혈액 내 중성지방 및 렙틴의 함량을 나타낸 그래프이다.
- 도 8은 각 시험군의 혈액 내 염증성 사이토카인 및 케모카인(MCP-1, IL-6, 및 TNF- α)의 함량을 ELISA로 정량화한 그래프이다.
- 도 9는 각 시험군의 간 무게(A) 및 H&E 염색을 통해 측정된 간 내 지질축적(B)을 나타낸 그래프이다.
- 도 10(A)는 각 시험군 지방조직의 신장지방 및 부고환 지방의 무게를 나타낸 그래프이다. 도 10(B)는 지방조직

의 H&E 염색을 통한 측정된 지방세포 크기를 나타낸 그래프이다. 도 10(C)는 지방조직 내 지방산합성인자들의 발현을 RT-PCR로 정량화한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. 지방전구세포의 분화 및 Hoga1 발현 확인

3T3-L1 지방전구세포를 10% 소 혈청(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 함유한 DMEM(Dulbecco modified Eagle medium)에서 유지하였다. 5 mg/ml 인슐린, 0.25 mmol/l 텍사메타손 및 0.5 nmol/l 3-이소부틸- α -메틸잔틴(3-isobutyl- α -methylxanthine: IBMX)을 포함하고, 10% 소 혈청을 함유한 DMEM을 첨가하여 지방세포로의 분화를 유도하였다. 2일 후에 격일로 10% 소 혈청 및 1 mg/ml 농도의 인슐린을 포함한 DMEM으로 배지를 바꿔주며 분화 시작 후 6일까지 세포를 유지하였다.

2일, 4일, 및 6일의 분화시점에서 RNA를 수득하여 Hoga1의 발현을 확인하였다. 구체적으로 24시간이 지난 다음 세포로부터 TRIzol시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 총 RNA를 수확하여 역전사시킨 후, RT-PCR을 다음과 같이 수행하였다. 먼저 cDNA 합성을 위해 상기 RNA를 역전사 효소(reverse transcriptase)를 사용하여 역전사시켰다. 표 1의 특정 프라이머를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. Hoga1 유전자의 상대적인 mRNA 발현량을 β -액틴 값으로 표준화하였다.

표 1

마우스	β -액틴	Hoga1
정방향 프라이머(F)	서열번호 1	서열번호 3
역방향 프라이머(R)	서열번호 2	서열번호 4

도 1은 Hoga1의 mRNA 발현을 RT-PCR로 정량화한 그래프이다. 도 1에 나타난 바와 같이, 3T3-L1 지방전구세포 분화 시 Hoga1의 mRNA 발현이 증가한다.

실시예 2. siRNA 처리를 통한 Hoga1 발현억제 및 지방세포분화 억제효능 확인

3T3-L1 지방전구세포는 10% 소 혈청(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 함유한 DMEM(Dulbecco modified Eagle medium)에서 유지(maintain)시켰다. 지방세포로의 분화는 5 mg/ml 인슐린, 0.25 mmol/l 텍사메타손 및 0.5 nmol/l 3-이소부틸- α -메틸잔틴(3-isobutyl- α -methylxanthine, IBMX)을 포함하고, 10% 소 혈청을 함유한 DMEM을 첨가하여 유도시켰다. 2일 후, 세포는 10% 소 혈청 및 1 mg/ml 농도의 인슐린을 포함한 DMEM으로 격일로 배지를 바꿔주며 6일까지 유지시켰다. 이와 동시에 Hoga1 siRNA(Genolution, 서울, 대한민국)를 10 μ M 농도로 3일에 한 번씩 배지에 첨가하였다. 지방전구세포의 분화 정도는 Oil Red O staining(Sigma-Aldrich, Louis, MO, USA) 방법으로 측정하였다. 6일 후 RT-PCR 어레이를 통해 지방세포 분화 마커 유전자 발현을 확인하였다. 구체적으로, 24시간 경과한 다음 세포로부터 TRIzol시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 총 RNA를 수확하여 역전사시킨 후, RT-PCR을 수행하였다. 먼저, cDNA 합성을 위해 상기 RNA를 역전사 효소(reverse transcriptase)를 사용하여 역 전사시켰다. Hoga1 siRNA의 서열은 표 2와 같으며, RT-PCR은 표 3의 특정 프라이머를 사용하여 수행하였다. 각 유전자의 상대적인 mRNA 발현량 값은 β -액틴 값으로 표준화하였다.

표 2

마우스	대조군 siRNA	마우스 Hoga1 siRNA
센스	서열번호 5	서열번호 7
안티센스	서열번호 6	서열번호 8

표 3

마우스	β -액틴	PPAR γ	aP2	CD36	C/EBP α
정방향 프라이머(F)	서열번호 1	서열번호 9	서열번호 11	서열번호 13	서열번호 15

역방향 프라이머(R)	서열번호 2	서열번호 10	서열번호 12	서열번호 14	서열번호 16
----------------	--------	---------	---------	---------	---------

[0069] 도 2는 Hoga1 siRNA가 지방세포 분화에 미치는 영향을 나타낸 결과이다. 도 2(A)는 1주간 분화 유도 후, 세포를 오일레드 0로 염색한 사진이다. 도 2(B)는 세포의 RNA를 수득하여 RT-PCR로 지방세포분화 마커인 PPAR γ , aP2, CD36 및 C/EBP α 의 발현을 나타낸 그래프이다.

[0070] 도 2에 나타난 바와 같이, 분화된 지방전구세포에서 Hoga1 siRNA 처리시 지질축적 억제 및 지방세포 분화마커의 발현이 억제된다.

[0071] 실시예 3. Hoga1 siRNA 처리 고지방식이 비만 유도 마우스를 이용한 체중 변화 분석

[0072] C57BL/6 마우스(male, 4주령)를 (주중앙동물실험에서 입수하여 8주간 고지방 식이(high fat diet, 60% fat calorie, Diet Research #D12492)를 제공하여 비만을 유도하였고(DIO mice, diet induced obese mice), 정상 대조군은 일반 식이(Standard chow, 13.5% fat calorie, Lab diet #5001)를 제공하였다.

[0073] 체중에 따라 5개 시험군(군당 n=8)으로 나누고, 8주간 정상 대조군 마우스(시험군 1)에는 일반 식이를 공급하고 비만 유도 마우스(시험군 2 내지 5)에는 고지방 식이를 공급하였으며, 암(dark) : 명(light) 주기는 12시간 : 12시간 간격으로 유지해 주었고, 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다. 시험군에 투여한 식이와 투여 용량 및 투여 방법을 하기 표 4에 나타내었다. 시험물질을 3% CMC를 이용하여 현탁제인 액상제제 형태로 제조하여 8주간 투여 하며 체중을 측정하였다. 또한, 3% CMC의 플라시보(placebo) 효과와 투여 스트레스로 인한 체중 감소 효과를 보정하기 위해 비히클(vehicle) 대조군에 3% CMC를 매일 경구투여하였다.

표 4

시험군	사료	시험물질	투여 용량 및 방법
1	일반 식이	비히클	-
2	고지방 식이	비히클	-
3		Hoga1 siRNA	20 mg/kg, 주당 2회

[0075] 8주간의 Hoga1 siRNA 복강투여 종료 후, 모든 투여군의 혈청, 간조직 및 지방조직을 적출하여 무게를 측정하고, 혈청 및 조직 내 비만 관련 지표를 확인하였다. 각기 다른 일반 식이와 고지방 식이를 8주간 제공한 마우스는 일주일에 한번씩 몸무게를 측정하였으며 실질적으로 측정되는 몸무게와 처음 시작할 때 측정한 몸무게를 기준으로 이후에 증가되는 몸무게를 상대적으로 비교한 수치를 모두 기록하였다. 그 후, 12주 동안 일반 식이와 고지방 식이를 진행한 마우스를 부검하여 간조직 및 백색 지방조직의 관찰 및 무게를 측정하였다.

[0076] 8주간 동안 일반 식이와 고지방 식이에 따른 야생형 및 Hoga1 siRNA 처리 마우스에 대한 음식섭취량 및 체중 변화를 도 3 및 4에 나타냈다.

[0077] 도 3은 야생형, 고지방식이, 고지방식이 및 Hoga1 siRNA를 처리한 마우스의 음식섭취량을 나타낸 그래프이다.

[0078] 도 4는 야생형, 고지방식이, 고지방식이 및 Hoga1 siRNA를 처리한 마우스의 체중 변화를 시간에 따라 나타낸 그래프이다.

[0079] 도 3에 나타난 바와 같이, 고지방식이군과 Hoga1 siRNA 처리군 간에 음식섭취량의 유의적 변화가 없었다. 도 4에 나타난 바와 같이, Hoga1 siRNA 처리 마우스에서 고지방식으로 유발시킨 비만에 따른 체중 증가가 없었다.

[0080] 이러한 결과는 Hoga1 유전자의 발현을 억제하여도 개체의 건강에 영향을 주지 않는다는 것을 나타내며, 본 발명의 조성물의 안전성을 나타낸다.

[0081]

[0082] 실시예 4: Hoga1 siRNA 처리 고지방식이 비만 유도 마우스의 지방조직 내 Hoga1 유전자 발현 분석

[0083] 상기 실시예 3의 실험동물에서 얻은 부고환 지방 조직의 단백질을 추출하여 Hoga1의 발현을 웨스턴 블랏(Western blot)으로 측정하였다. 그 결과를 도 5에 나타냈다. 도 5는 야생형, 고지방식이, 고지방식이 및 Hoga1 siRNA를 처리한 마우스의 지방조직에서의 Hoga1의 단백질 발현을 웨스턴 블랏으로 확인한 결과이다.

[0084] 도 5에 나타난 바와 같이, 일반식이에 비하여 고지방식이를 투여한 군의 부고환 지방조직에서 Hoga1의 발현이

증가하였다. 또한, 고지방식이 유도군에 비하여 Hoga1 siRNA 처리군에서 Hoga1의 발현은 현저하게 감소하였다.

- [0085] 이러한 결과는 비만이 Hoga1 유전자의 발현을 증가시키며 이를 억제할 경우 효과적인 비만 치료가 크다는 것을 나타낸다.
- [0086] **실시예 5: Hoga1 siRNA 처리 고지방식이 비만 유도 마우스의 혈청 내 혈당 및 인슐린 함량 분석**
- [0087] 상기 실시예 3의 실험동물에서 얻은 혈청을 분리하여 제2형 당뇨 관련 지표인 혈당 및 인슐린의 함량을 측정하였다. 그 결과를 도 6에 나타냈다.
- [0088] 도 6은 야생형, 고지방식이, 고지방식이 및 Hoga1 siRNA를 처리한 마우스의 혈액 내 혈당 및 인슐린의 함량을 나타낸 그래프이다.
- [0089] 도 6에 나타낸 바와 같이, 일반식이에 비하여 고지방식이를 투여한 군의 혈청에서 혈당 및 인슐린의 함량이 증가하였다. 또한, 고지방식이 유도군에 비하여 Hoga1 siRNA 처리군에서 혈당 및 인슐린의 함량이 감소하였다. 이러한 결과는 Hoga1 유전자의 발현 억제가 고지방식으로 유도된 당뇨 치료에 효과가 크다는 것을 나타낸다.
- [0090] **실시예 6: Hoga1 siRNA 처리 고지방식이 비만 유도 마우스의 혈청 내 중성지방 및 렙틴의 함량 분석**
- [0091] 상기 실시예 3의 실험동물에서 얻은 혈청을 분리하여 중성지방 및 렙틴의 함량을 측정하였다. 그 결과를 도 7에 나타냈다.
- [0092] 도 7은 야생형, 고지방식이, 고지방식이 및 Hoga1 siRNA를 처리한 마우스의 혈액 내 중성지방 및 렙틴의 함량을 나타낸 그래프이다.
- [0093] 도 7에 나타낸 바와 같이, 일반식이에 비하여 고지방식이를 투여한 군의 혈청에서 중성지방 및 렙틴의 함량이 증가하였다. 또한, 고지방식이 유도군에 비하여 Hoga1 siRNA 처리군에서 중성지방 및 렙틴의 함량이 감소하였다. 이러한 결과는 Hoga1 유전자의 발현 억제가 고지방식으로 유도된 지질축적을 억제하는 효과가 크다는 것을 나타낸다.
- [0094] **실시예 7: Hoga1 siRNA 처리 고지방식이 비만 유도 마우스의 혈청 내 염증성 사이토카인 및 케모카인의 함량 분석**
- [0095] 상기 실시예 3의 실험동물에서 얻은 혈청을 분리하여 중성지방 및 렙틴의 함량을 측정하였다. 그 결과를 도 8에 나타냈다.
- [0096] 도 8은 야생형, 고지방식이, 고지방식이 및 Hoga1 siRNA를 처리한 마우스의 혈액 내 염증성 사이토카인 및 케모카인(MCP-1, IL-6, TNF- α)의 함량을 ELISA로 정량화한 그래프이다.
- [0097] 도 8에 나타낸 바와 같이, 일반식이에 비하여 고지방식이를 투여한 군의 혈청에서 염증성 인자인 MCP-1, IL-6, TNF- α 의 함량이 증가하였다. 또한, 고지방식이 유도군에 비하여 Hoga1 siRNA 처리군에서 MCP-1, IL-6, TNF- α 의 함량이 감소하였다. 이러한 결과는 Hoga1 유전자의 발현 억제가 고지방식으로 유도된 염증성 매개인자의 생성을 억제하는 효과가 크다는 것을 나타낸다.
- [0098] **실시예 8: Hoga1 siRNA 처리 고지방식이 비만 유도 마우스의 간 조직 내 지질축적 분석**
- [0099] 상기 실시예 3의 실험동물에서 얻은 간 조직을 분리하여 무게를 측정하고, 헤마톡실린(haematoxylin) 및 에오신(eosin)(H&E) 염색을 통한 조직학적 분석을 실시하였다. 먼저 간 조직을 10% 중성 완충 포르말린(neutral buffered formalin)에 고정시켰다. 연속적인 알콜 농도 구배(Graded alcohol series)와 세척을 통한 탈수화(dehydration)를 수회 진행한 후에 조직을 파라핀에 포매(embedding)시켰다. 조직 절편을 두께 4 μ m로 잘랐고, 헤마톡실린과 에오신으로 염색을 진행하였다. 그 결과를 도 9에 나타냈다.
- [0100] 도 9는 야생형, 고지방식이, 고지방식이 및 Hoga1 siRNA를 처리한 마우스의 간 무게(A) 및 H&E 염색을 통한 간 내 지질축적(B)을 나타낸 그래프이다.
- [0101] 도 9에 나타낸 바와 같이, 일반식이에 비하여 고지방식이를 투여한 군의 간 조직 무게 및 지질축적 함량이 증가하였다. 또한, 고지방식이 유도군에 비하여 Hoga1 siRNA 처리군에서 간조직 무게 및 지질축적 함량이 감소하였다. 이러한 결과는 Hoga1 유전자의 발현 억제가 고지방식으로 유도된 비알콜성 지방간의 생성을 억제하는 효과가 크다는 것을 나타낸다.

[0102] 실시예 9: Hoga1 siRNA 처리 고지방식이 비만 유도 마우스의 지방조직 내 지질축적 분석

[0103] 상기 실시예 3의 실험동물에서 얻은 신장 및 부고환 지방조직을 분리하여 무게를 측정하고, H&E 염색을 통한 조직학적 분석, 지방산합성 관련인자 발현을 분석하였다. 조직학적 분석을 위하여 부고환 지방 조직을 10% 중성 완충 포르말린 (neutral buffered formalin)에 고정시켰다. 연속적인 알콜 농도 구배(Graded alcohol series)와 세척을 통한 탈수화(dehydration)를 수회 진행한 후에 조직을 파라핀에 포매시켰다. 조직 절편을 두께 4 μ m로 잘랐고, 헤마톡실린(haematoxylin)과 에오신 (eosin)으로 염색을 진행하였다. 백색 지방세포(White adipocyte)의 크기를 확인하기 위해 각 지방세포의 영역을 Opti Pro software(Olympus Co., USA)로 각 절편을 측정하였다.

[0104] 지방산합성 관련인자 발현을 분석하기 위하여 RT-PCR 어세이를 수행하였다. 구체적으로, 부고환 지방조직으로부터 TRIzol시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 총 RNA를 수확하여 역전사시킨 후, RT-PCR을 다음과 같이 수행하였다. 먼저 cDNA 합성을 위해 상기 RNA를 역전사 효소(reverse transcriptase)를 사용하여 역전사시켰다. RT-PCR은 표 4의 특정 프라이머를 사용하여 수행하였다. 각 유전자의 상대적인 mRNA 발현량 값은 β -액틴 값으로 표준화하였다. 그 결과를 도 10에 나타냈다.

표 5

[0105]

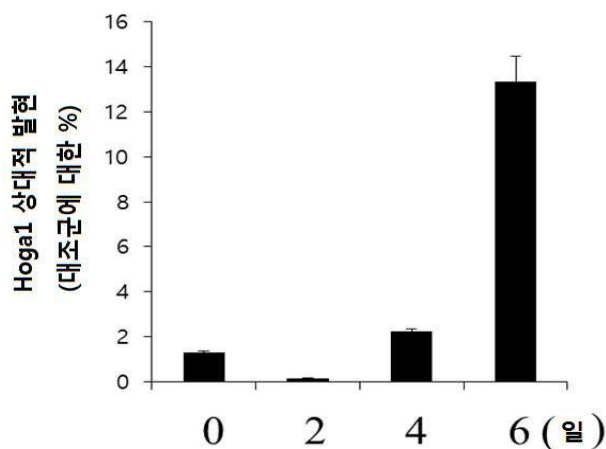
마우스	β -액틴	Acaca	Fasn	Lpl	Scd1	Srebf1
정방향 프라이머(F)	서열번호 1	서열번호 17	서열번호 19	서열번호 21	서열번호 23	서열번호 25
역방향 프라이머(R)	서열번호 2	서열번호 18	서열번호 20	서열번호 22	서열번호 24	서열번호 26

[0106] 도 10은 야생형, 고지방식이, 고지방식이 및 Hoga1 siRNA를 처리한 마우스 지방조직의 항비만 효과를 나타낸 그래프이다. 도 10(A)는 신장지방 및 부고환 지방의 무게를 나타낸 그래프이다. 도 10(B)는 지방조직 H&E 염색을 통한 지방세포 크기를 나타낸 그래프이다. 도 10(C)는 지방조직 내 Acaca, Fasn, Lpl, Scd1, 및 Srebf1과 같은 지방산합성인자의 발현을 RT-PCR로 정량화한 그래프이다.

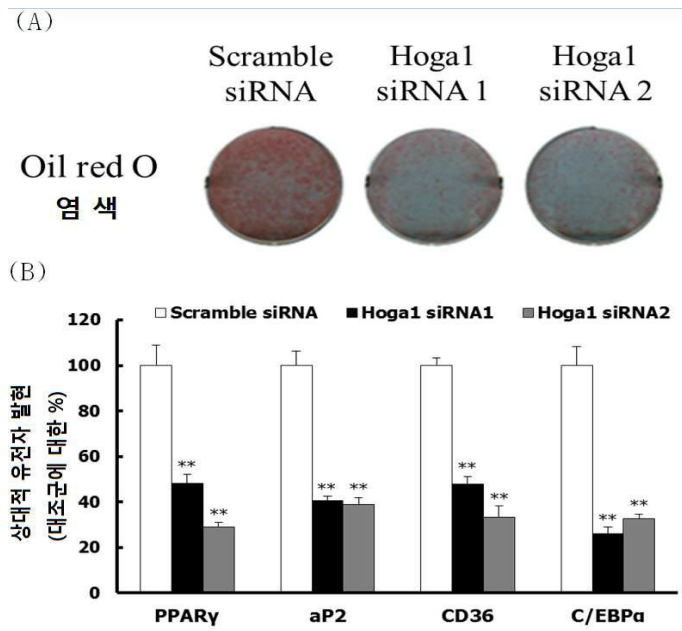
[0107] 도 10에 나타낸 바와 같이, 일반식이에 비하여 고지방식이를 투여한 군의 지방조직 무게, 지방세포크기, 지방산합성 인자의 발현이 증가하였다. 또한, 고지방식이 유도군에 비하여 Hoga1 siRNA 처리군에서 지방조직 무게, 지방세포크기, 및 지방산합성 인자의 발현이 감소하였다. 이러한 결과는 Hoga1 유전자의 발현 억제는 고지방식이에 유도된 비만의 생성을 억제하는 효과가 크다는 것을 나타낸다.

도면

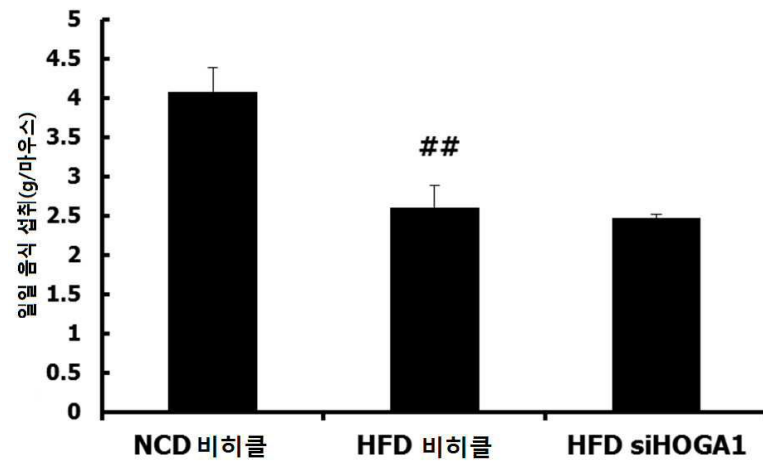
도면1



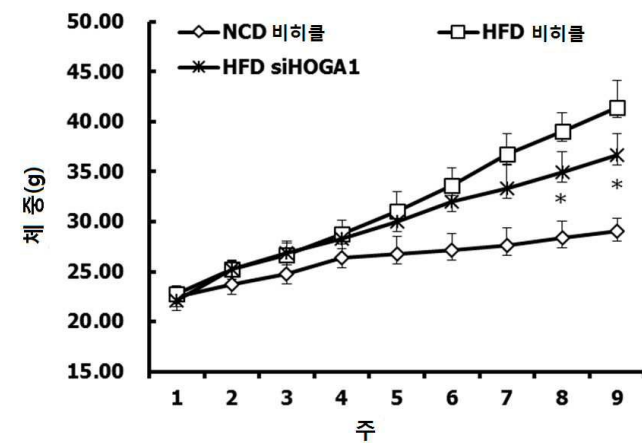
도면2



도면3



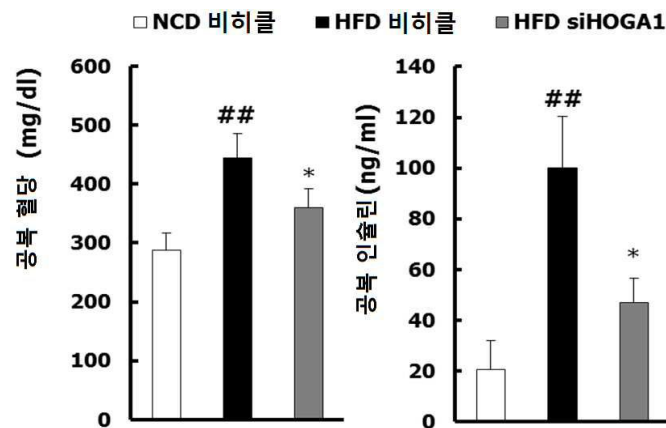
도면4



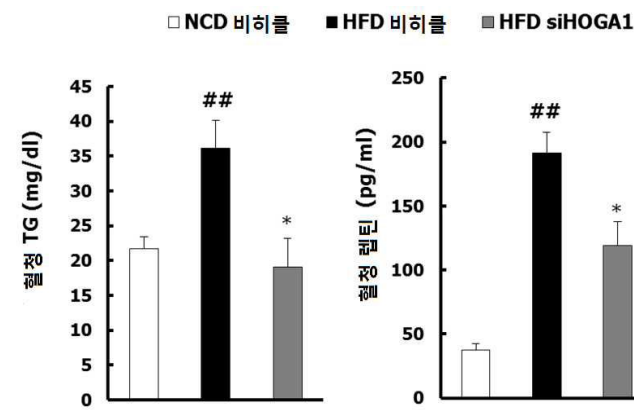
도면5



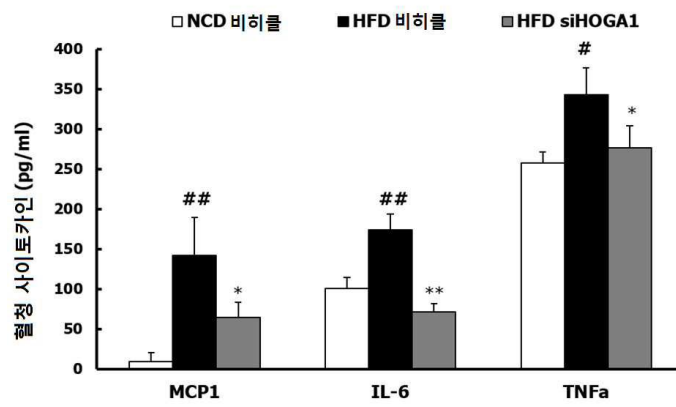
도면6



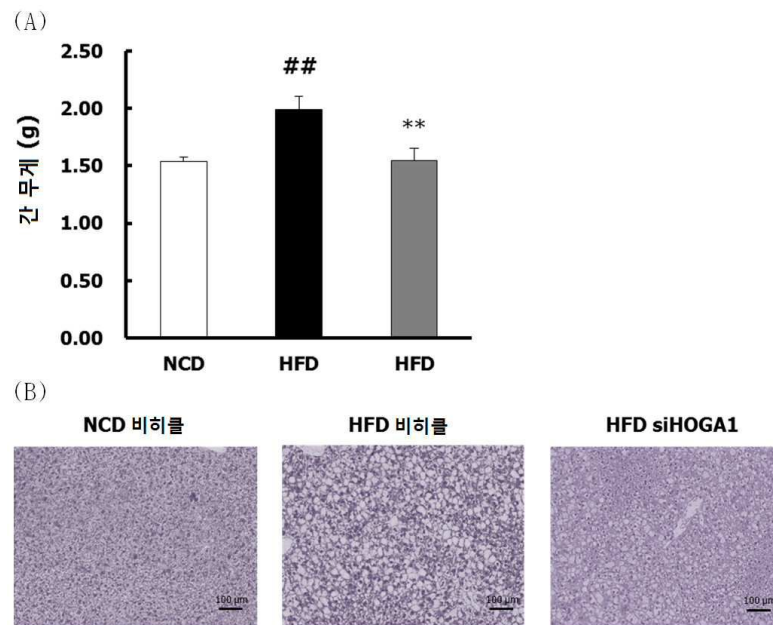
도면7



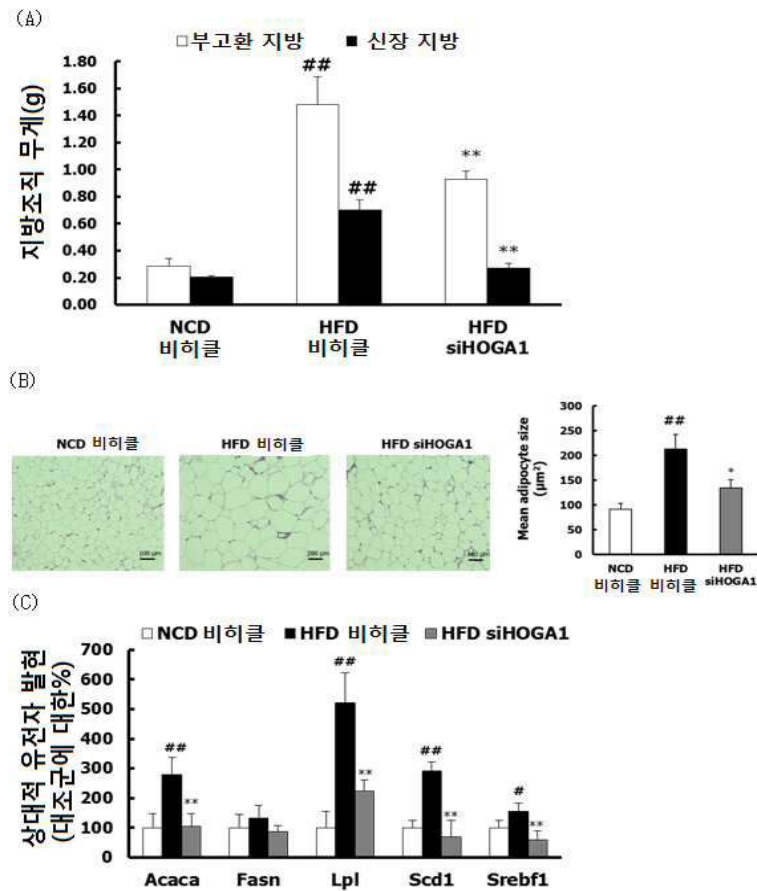
도면8



도면9



도면10



서열 목록

<110> KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY AND INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, HALLYM UNIVERSITY

<120> Composition including materials of inhibiting Hoga1 for preventing and treating obesity and method of screening thereof

<130> PN117737

<160> 26

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 1

agccatgtac gtagccatcc

20

<210> 2

<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer	
<400>	2	
ctctcagctg tgggtggtgaa		20
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer	
<400>	3	
tgttgtacag tgtcccagcc		20
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer	
<400>	4	
caagacattg gccaagccac		20
<210>	5	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	sense	
<400>	5	
ccuacgccac cauuuucg		18
<210>	6	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	antisense	
<400>	6	
acgaaaugg uggcguag		18

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sense
 <400> 7
 cuucuaaucc uuucuuuuu u 21

<210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antisense
 <400> 8
 uaagcauuu uauauguuu u 21

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer
 <400> 9
 gggctgagga gaagtcacac 20

<210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 10
 ggaatgagag tggtcttcca 20

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer

<400>	11	
tggaagacag ctctcctcg		20
<210>	12	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer	
<400>	12	
ccgccatcta gggttatgat g		21
<210>	13	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer	
<400>	13	
tgaatggttg agaccccg		20
<210>	14	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer	
<400>	14	
tacgtggccc ggttctacta		20
<210>	15	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer	
<400>	15	
ctgcccctca gtcctgtc		19
<210>	16	
<211>	19	
<212>	DNA	

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer	
<400>	16	
	gttccttcag caacagcgg	19
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer	
<400>	17	
	cgagtcctct cctcagctcc	20
<210>	18	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer	
<400>	18	
	atcgggagtg ctggtttagc	20
<210>	19	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer	
<400>	19	
	caagtgcca ccaacaagcg	20
<210>	20	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer	
<400>	20	
	ggagcgcagg atagactcac	20
<210>	21	
<211>	20	

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer	
<400>	21	
aagccccaca agttagtcg		20
<210>	22	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer	
<400>	22	
ataatgggga tgccgtgac		20
<210>	23	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer	
<400>	23	
tgagctttgg gcttctgagt t		21
<210>	24	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer	
<400>	24	
caaacaggga ctgagcacca		20
<210>	25	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer	
<400>	25	
cagactcact gctgctgaca		20

<210> 26
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> reverse primer
<400> 26
cctccactca ccaggtct

19