



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0102599
(43) 공개일자 2015년09월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61P 3/00 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0024668

(22) 출원일자 2014년02월28일

심사청구일자 2014년02월28일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

박윤정

경기도 성남시 분당구 내정로 185, 207동 502호 (수내동, 양지마을청구아파트)

유영란

서울특별시 서대문구 연대동문길 117, 한지원룸 302호 (대신동)

(74) 대리인

유미특허법인

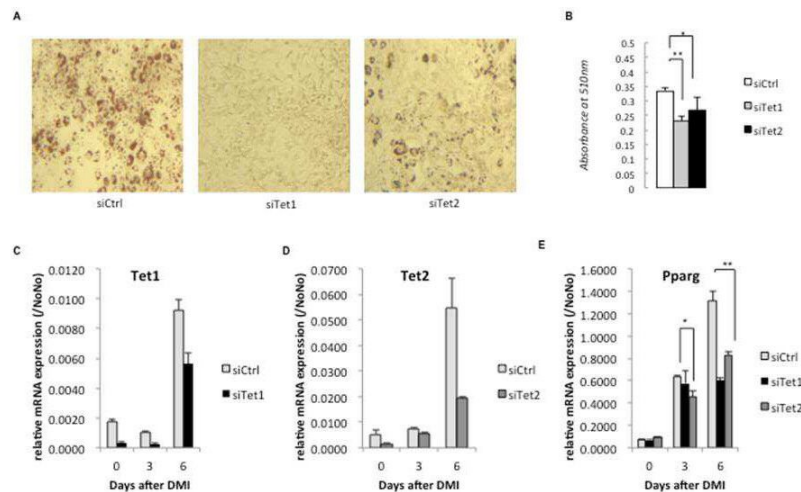
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 TET1의 억제를 이용한 지방세포 분화 억제용 조성물 및 이의 이용

(57) 요약

본 발명은 TET1 (Tet Methylcytosine Dioxygenase 1)의 발현 또는 활성을 억제함으로써 지방세포로의 분화를 효과적으로 저해할 수 있는 조성물 및 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 TET1의 발현 또는 활성을 억제함으로써 비만을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 약학 조성물 및 식품 조성물에 관한 것이다.

대표도



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A1A1018819

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업-일반연구자지원사업-신진연구지원사업

연구과제명 분지 아미노산 보충이 뇌세포주의 후생유전학적 유전인자 발현 조절에 미치는 영향

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2012.05.01 ~ 2015.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

TET1 (Tet Methylcytosine Dioxygenase 1) 의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 지방세포 분화 억제용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 TET1 의 발현을 억제하는 물질은 siRNA, shRNA 또는 안티센스 핵산을 포함하는 것인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 TET1 의 활성을 억제하는 물질은 TET1 단백질에 특이적인 항체를 포함하는 것인 조성물.

청구항 4

TET1 의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 전지방세포, 지방전구세포 또는 줄기세포에 도입하는 단계를 포함하는, 지방세포 분화 억제 방법.

청구항 5

TET1 의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 비만의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 TET1 의 발현을 억제하는 물질은 siRNA, shRNA 또는 안티센스 핵산을 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 TET1 의 활성을 억제하는 물질은 TET1 단백질에 특이적인 항체를 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 8

TET1 의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 비만 개선용 식품 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 TET1 의 발현을 억제하는 물질은 siRNA, shRNA 또는 안티센스 핵산을 포함하는 것인 식품 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 TET1 의 활성을 억제하는 물질은 TET1 단백질에 특이적인 항체를 포함하는 것인 식품 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 TET1 (Tet Methylcytosine Dioxygenase 1)의 발현 또는 활성을 억제함으로써 지방세포로의 분화를 효과적으로 저해할 수 있는 조성물 및 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 TET1 의 발현 또는 활성을 억제함으로써 비만을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 약학 조성물 및 식품 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 현대사회 의료기술의 진보에도 불구하고 비만, 당뇨, 이상지질혈증 및 심혈관계 질환 등의 만성 질환들이 꾸준히 증가하고 있다. 이러한 만성 질환들은 유전적 요인 뿐만 아니라 불규칙한 식사 습관, 에너지섭취와 사용의 불균형, 그리고 스트레스 등 만성적인 생활 습관들도 원인이 될 수 있는 것으로 알려져 있다.

[0003] 이러한 만성 질환에 따른 경제적 손실 및 의료 비용 지출이 상당함에도 불구하고, 빠른 시간 안에 사망에까지 이르는 치명적인 질병은 아니기 때문에 다른 치명적인 질병들에 비해 임상 실험 통과된 신약 개발의 성과가 미진하다.

[0004] 한편, 지방 세포는 기존에 에너지 저장소로서의 수동적인 역할에서 벗어나, 여러 가지 대사 호르몬 분비를 관장하는 내분비 기관으로서 인체대사에서 능동적 역할을 수행한다. 최근, 지방세포의 분화를 저해 할 수 있다면 생성되는 지방세포의 수를 조절할 수 있으며 그에 따라 축적되는 여분의 에너지를 배출할 수 있다는 아이디어를 바탕으로 지방세포 분화를 저해하는 물질들을 탐색하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0005] 현재 지방세포 분화 연구에 있어 가장 일반적으로 널리 쓰이는 모델은 Green 박사가 1974년에 발표한 생쥐 유래의 3T3-L1 세포 모델이다 (Green, H. and Meuth, M. (1974) An Established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. Cell 3, 127-133). 3T3-L1 세포에 인슐린과 같은 호르몬을 처리하면 지방 합성 신호 경로가 활성화되면서 세포 내 지방량이 증가하고 세포의 모양이 원형으로 변한다. 이처럼 세포 내 신호경로와 세포의 모양이 변하는 과정을 분화(differentiation)라고 하고, 분화가 진행되기 전 또는 분화가 진행 중인 3T3-L1 세포를 3T3-L1 전지방세포(maturing 3T3-L1 preadipocyte)라고 하고, 분화가 완료된 3T3-L1 세포를 3T3-L1 지방세포(mature 3T3-L1 adipocyte)라고 한다. 이러한 3T3-L1 세포의 지방분화를 억제하는 물질을 탐색하는 연구가 각국에서 진행되고 있다. 예를 들어, 녹차 폴리페놀 성분인 에피갈로카테킨 갈레이트 (Obesity res. 2005;13:982-90), 적포도주 성분인 레스베라트롤(Phytother Res. 2008;22:1367-71), 마늘 성분인 아존 (Phytother Res. 2009;23:513-8) 등이 3T3-L1 세포의 지방분화 억제 효능을 가지고 있다는 연구결과가 보고된 바 있다. 3T3-L1 세포의 지방분화를 억제하는 물질은 항비만 효능을 가진다고 볼 수 있기 때문에 식품, 의약 등의 분야에서 활용도가 매우 크다.

[0006] 지방세포 분화에 관련된 인자 중 최근 후생유전적인 기전들이 주목을 받고 있다. 분화과정 중 염기서열의 변화가 아닌 다른 환경적인 변화에 따라 유전자의 발현에 영향을 분화 과정이 시작되고 획득하게 됨으로 후생유전학 요인들이 주요하게 작용할 가능성이 있다. 특히, 히스톤 변형에 역가를 가진 효소들과 지방세포 분화와의 관련성이 알려지면서 후생유전적 변형에 의한 지방세포 분화 억제 및 촉진의 방법 개발이 주목을 받고 있다.

[0007] 지금까지 알려진 바에 따르면 히스톤의 탈메틸화를 조절하는 JmJ 효소들의 관련성이 중요한 기전을 차지하나, 후생유전적 기전 중 DNA 메틸화에 관련된 부분은 연구가 미진한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 TET1(Tet Methylcytosine Dioxygenase 1)과 TET2(Tet Methylcytosine Dioxygenase 2)의 발현이 지방세포 분화과정에서 어떻게 변화하는지, 그리고 TET1과 TET2의 발현 변화가 지방세포 분화에 직접적으로 영향을 미치는지 확인하여 본 발명을 완성하였다.

- [0009] 따라서, 본 발명의 하나의 목적은 TET1 및 TET2 중 하나 이상의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 지방세포 분화 억제용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 하나의 목적은 TET1 및 TET2 중 하나 이상의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 전지방세포, 지방전구세포 또는 줄기세포에 도입하는 단계를 포함하는, 지방세포 분화 억제 방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 하나의 목적은 TET1 및 TET2 중 하나 이상의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 비만 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 하나의 목적은 TET1 및 TET2 중 하나 이상의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 비만 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- 과제의 해결 수단**
- [0013] 본 발명에서는 지방세포 분화 기전 연구를 위해 가장 잘 알려지고 널리 쓰이고 있는 생쥐 유래 3T3-L1 세포 모델을 이용하여, 후생유전적 변형을 통한 분화억제 기전을 연구하였다. 현재까지는 히스톤의 변형에 의한 분화 기전은 알려진 바 있으나, DNA 메틸화(methylation)의 전장적 변화에 의한 지방세포 분화 기전은 거의 알려진 바가 없다. 본 발명에서는 TET1 및/또는 TET2의 발현이 지방세포 분화에 필수적이며 이 발현을 억제하면 지방세포 분화가 저해된다는 것이 처음으로 규명하였다.
- [0014] 본 발명에 따르면, 지방세포 분화에 따라 TET1 및 TET2의 발현이 유의적으로 증가하였다. 또한, 지방세포 분화 정도를 Oil Red-O 라는 지방입자(fat droplet)의 직접적 측정 방법이나 지방분화의 전사인자로 알려진 PPAR γ 와 같은 분자적 생지표를 정량적으로 qRT-PCR 측정하였을 경우, siRNA에 의한 TET1 및/또는 TET2의 발현 억제가 지방세포 분화를 유의적으로 저해한다는 것이 확인되었다.
- [0015] 따라서, TET1 및/또는 TET2는 지방세포 분화를 억제하기 위한 신규 표적이 될 수 있으며, TET1 및/또는 TET2의 유전자 발현 또는 단백질의 활성을 억제함으로써 지방세포 분화를 효과적으로 저해할 수 있다.
- [0016] 또한, 비만 환자의 증가된 지방세포의 유래와 관련하여 체내의 전지방세포(pre-adipocytes)와 지방전구세포(precursor cell)들로부터 분화된다는 것이 가장 주된 기전으로 받아들여지고 있다. 따라서, TET1 및/또는 TET2는 지방세포 분해를 억제하여 지방의 축적을 저해하므로, 비만 치료의 신규 표적이 될 수 있다. 구체적으로, TET1 및/또는 TET2의 유전자 발현 또는 단백질의 활성을 억제함으로써 비만을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.
- [0017] 이에, 하나의 양태로서, 본 발명은 TET1 및 TET2 중 하나 이상의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 지방세포 분화 억제용 조성물에 관한 것이다.
- [0018] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 TET1 및 TET2 중 하나 이상의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 전지방세포, 지방전구세포 또는 줄기세포에 도입하는 단계를 포함하는, 지방세포 분화 억제 방법에 관한 것이다.
- [0019] 본 발명에서, TET1 및 TET2 유전자의 mRNA 및 이에 의해 코딩되는 단백질은 공지된 유전자 데이터베이스에서 그 서열 정보를 확인할 수 있다. 예를 들어, 세포모델에서 사용된 생쥐의 TET1 유전자의 핵산 서열은 Genbank 등록번호 NM_001253857.1, NM_027384.1 에서, 이에 의해 코딩되는 단백질의 아미노산 서열은 Genbank 등록번호 NP_001240786.1, NP_081660.1 에서 확인할 수 있다. 또한 인간 TET1 유전자의 핵산 서열은 Genbank 등록번호 NM_030625.2 에서, 이에 의해 코딩되는 단백질의 아미노산 서열은 Genbank 등록번호 NP_085128.2 에서 확인할 수 있다. 세포모델에서 사용된 생쥐의 TET2 유전자의 핵산 서열은 Genbank 등록번호 NM_001040400.2 에서, 이에 의해 코딩되는 단백질의 아미노산 서열은 Genbank 등록번호 NP_001035490.2 에서 확인할 수 있다. 인간 TET2 유전자의 핵산 서열은 Genbank 등록번호 NM_001127208.2 에서, 이에 의해 코딩되는 단백질의 아미노산 서열은 Genbank 등록번호 NP_001120680.1 확인할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 지방 억제용 조성물은 전지방세포, 지방전구세포, 또는 줄기세포로부터 지방세포로의 분화를 유도할 때 TET1 및/또는 TET2를 억제하여 그 발현량을 감소시키거나 그 활성을 감소시키므로 결과적으로 지방세포의 분화를 억제시켜 성숙한 지방세포의 수의 증가를 둔화시키거나 차단시킬 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 사용되는 용어, "지방세포 분화 억제"란 전지방세포, 지방전구세포, 또는 줄기세포로부터 지방세포로의 분화를 억제, 지연 또는 감소시키는 것, 또는 전지방세포, 지방전구세포, 또는 줄기세포로부터 지방세포로의 분화를 조절하여 지방 축적을 억제, 지연, 또는 감소시키는 것을 의미한다.

- [0022] 본 발명에서, TET1 및/또는 TET2 의 발현을 억제하는 물질은, TET1 및/또는 TET2의 mRNA 에 특이적으로 결합할 수 있는 siRNA, shRNA, 또는 안티센스 핵산을 포함한다.
- [0023] 본 발명에서 사용되는 용어, "siRNA"는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 표적 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 방법으로서 또는 유전자 치료의 방법으로 제공될 수 있다.
- [0024] siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 짝을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 짝을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 더욱 바람직하게는 20 내지 70염기이다. siRNA 말단 구조는 표적 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의해 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 또는 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3' 말단 돌출한 구조와 5' 말단 쪽이 돌출한 구조 모두 가능하다. 돌출하는 염기 수는 한정되지 않는다. 또한 siRNA는 표적 유전자의 발현 억제 효과를 유지할 수 있는 범위에서 예를 들어, 한쪽 말단의 돌출 부분에 저분자 RNA(예를 들어, tRNA, rRNA, 바이러스 RNA와 같은 천연의 RNA 분자 또는 인공의 RNA 분자)를 포함할 수 있다. siRNA 말단 구조는 양측 모두 절단 구조를 가질 필요는 없고, 이중 사슬 RNA 일반의 말단 부위가 링커 RNA에 의하여 접속된 스텝 루프형 구조일 수도 있다.
- [0025] 본 발명에서 사용되는 siRNA는 그 자체로 폴리뉴클레오타이드 페어링을 갖는 완전한 형태, 즉 시험관에서 siRNA를 직접 합성한 두 형질전환 과정을 거쳐 세포 안으로 도입되는 형태이거나, 생체 내에 투여된 후 이러한 형태를 갖도록 하나의 단일쇄 올리고뉴클레오타이드 단편과 이의 역방향(reverse) 상보물이 스페이서에 의해 분리된 단일쇄 폴리뉴클레오타이드로부터 유도될 수 있는 형태, 예를 들어 siRNA가 세포 안에서 발현되도록 제조된 siRNA 발현 벡터 또는 PCR-유도된 siRNA 발현 카세트를 형질전환 또는 감염(infection) 과정을 거쳐 세포 안으로 도입되는 형태일 수 있다. siRNA를 제조하고 세포 또는 동물로 도입하는 방법의 결정은 목적 및 표적 유전자 산물의 세포 생물학적 기능에 따라 달라질 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 사용되는 용어, "shRNA"는 siRNA의 고가의 생합성 비용, 낮은 세포 형질감염 효율로 인한 RNA 간섭 효과의 단시간 유지 등의 단점을 극복하기 위한 것으로 RNA 중합효소 III의 프로모터로부터 아데노 바이러스, 렌티 바이러스 및 플라스미드 발현 벡터 시스템을 이용하여 이를 세포 내로 도입하여 발현시킬 수 있으며, 이러한 shRNA는 세포 내에 존재하는 siRNA 프로세싱 효소(Dicer or Rnase III)에 의해 정확한 구조를 갖는 siRNA로 전환되어 목적 유전자의 사일런싱을 유도함에 널리 알려져 있다.
- [0027] 본 발명에서 사용되는 용어, "안티센스 핵산"이란 특정 mRNA 의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 특징이 있다. 본 발명의 안티센스 서열은 TET1 및/또는 TET2의 mRNA에 상보적이고 이의 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하고, TET1 및/또는 TET2의 mRNA의 번역, 세포질 내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 핵산의 길이는 6 내지 100 염기이고, 바람직하게는 8 내지 60 염기이고, 보다 바람직하게는 10 내지 40 염기이다.
- [0028] 안티센스 RNA의 경우 통상의 방법으로 시험관에서 합성되어 생체 내로 투여하거나, 생체 내에서 안티센스 RNA가 합성되도록 할 수 있다. 시험관에서 안티센스 RNA를 합성하는 한 예는 RNA 폴리머라제 I를 이용하는 것이다. 생체 내에서 안티센스 RNA가 합성되도록 하는 한가지 예는 인식부위(MCS)의 기원이 반대 방향에 있는 벡터를 사용하여 안티센스 RNA가 전사되도록 하는 것이다. 이런 안티센스 RNA는 서열 내에 번역 중지 코돈이 존재하도록 하여 펩타이드 서열로 번역되지 않도록 하는 것이 바람직하다.
- [0029] 본 발명의 지방세포 분화 억제용 조성물은 TET1 및/또는 TET2의 siRNA, shRNA 또는 안티센스 핵산 중 1종 이상을 포함하는 외에, siRNA, shRNA 또는 안티센스 핵산 분자의 유입을 촉진시키는 제제, 예를 들어 리포솜을 이용하거나 콜레스테롤, 콜레이트 및 데옥시콜산을 비롯한 다수의 스테롤류 중 1종의 친유성 담체와 함께 배합할 수도 있다. 또한 안티센스 핵산은 세포에 의해 흡수되는 펩티드에 결합시킬 수도 있다. 유용한 펩타이드의 예로는 펩타이드 호르몬, 항원 또는 항체 및 펩타이드 독소 등이 있다.
- [0030] 본 발명에서, TET1 및/또는 TET2 의 활성을 억제하는 물질은, TET1 및/또는 TET2 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 포함한다.
- [0031] 이러한 항체는 단일클론항체 및 이에 대한 키메라 항체, 인간화 항체 및 인간 항체를 모두 포함하는 것이고, 신

규한 항체 외에 이미 당해 기술분야에서 공지된 항체들도 포함될 수 있다. 상기 항체는 TET1 및/또는 TET2 에 특이적으로 결합하는 한, 2개의 중쇄와 2개의 경쇄의 전체 길이를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체의 분자의 기능적인 단편이란, 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.

[0032] TET1 및 TET2 중 하나 이상의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 세포에 주입하는 방법으로는 리포솜이나 유전 공학적 기술인 벡터 시스템을 이용하는 방법 등 다양한 형태로 구현될 수 있다. 또는, 약제의 제제 형태로 제조하여 통상적인 방식으로 체내에 투여하는 방법이 사용될 수 있다.

[0033] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 TET1 및 TET2 중 하나 이상의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 비만 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0034] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 TET1 및 TET2 중 하나 이상의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 비만 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

[0035] 비만이 진행됨에 따라 지방세포의 크기증가를 포함한 형태적 변화가 일어날 뿐만 아니라 과다한 지방세포의 분화에 의한 지방세포는 수적 증가가 일어난다. 지방세포의 크기 증가는 잉여 에너지를 중성지방의 형태로 합성 및 저장함으로써 유도된다. 이러한 지방세포의 크기는 일반적으로 식사 조절로 가능하지만 새로운 지방전구세포가 지방세포로 분화되는 과정은 식사조절로는 효과가 없기 때문에 비만의 근본적 치료 또는 억제를 제어하기 위해서는 지방세포의 분화과정을 조절하는 것이 중요하다.

[0036] 비만 환자의 증가된 지방세포의 유래와 관련하여 체내의 전지방세포(pre-adipocytes)와 지방전구세포(precursor cell)들로부터 분화된다는 것이 가장 주된 기전으로 받아들여지고 있다. 따라서, TET1 및/또는 TET2는 지방세포 분해를 억제하여 지방의 축적을 저해하므로, 비만 치료의 신규 표적이 될 수 있다. 구체적으로, TET1 및/또는 TET2의 유전자 또는 단백질의 발현을 억제함으로써 비만을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

[0037] 본 발명의 조성물은 전지방세포, 지방전구세포, 또는 줄기세포로부터 지방세포로의 분화를 유도할 때 TET1 및/또는 TET2를 억제하여 그 발현량을 감소시키므로 결과적으로 지방세포의 분화를 억제시켜 성숙한 지방세포의 수의 증가를 둔화시키거나 차단시킬 수 있다.

[0038] 본 발명의 조성물이 약학 조성물로 사용될 경우, 상기 조성물 내의 유효성분의 함량은 질환의 증상, 증상의 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 내지 99.9중량%, 바람직하게는 0.001 내지 50중량%인 것이 좋으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 함량비는 용매를 제거한 건조량을 기준으로 한 값이다.

[0039] 상기 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있으며, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0040] 상기 약학 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 적어도 한 가지 이상의 부형제 및/또는 운할제 등을 포함할 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함될 수 있다.

[0041] 상기 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 보다 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 조성물의 투여량은 유효성분을 기준으로 1일 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg으로 하는 것이 좋으나 이에 제한되는 것은 아니다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 본 발명의 조성물은 동물, 바람직하게는 인간을 포함하는 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 정맥, 근육, 피하주사 등에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물의 약학적 투여 형태는 유효성분의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[0042] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 사용될 경우, 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식

품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0043]

본 발명에서 식품은 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 각종 식품, 건강기능 식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제를 모두 포함하는 의미로 사용된다. 상기 식품의 예로서 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본 발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 목류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스낵류), 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과일, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류, 아이스크림류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등), 비타민 복합제, 알코올 음료, 주류 및 그 밖의 건강보조식품류를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 건강기능식품, 음료, 식품첨가제 또는 음료첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

[0044]

또한, 상기 식품에 있어서, 유효성분의 양은 전체 식품 중량의 0.00001 중량% 내지 50 중량%로 포함될 수 있으며, 상기 식품이 음료인 경우에는 식품 전체의 부피 100 ml 를 기준으로 0.001 g 내지 50 g, 바람직하게는 0.01 g 내지 10 g의 비율로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0045]

본 발명에 따라, TET1 및 TET2의 발현변화를 유도할 수 있는 siRNA 및 TET1 및 TET2 단백질 억제제(inhibitor)를 이용하여 지방세포 분화를 효과적으로 차단하거나, TET1 및 TET2 발현유도 및 역가 활성을 이용한 지방세포 분화 촉진을 위한 도구 개발에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0046]

도 1의 (A)는 3T3-L1 전지방세포가 지방세포로 분화되는 과정에서 지방입자 축적량을 Oil Red-O 염색을 사용하여 흡광도 520 nm 에서 측정한 결과를 나타낸다. pre 는 3T3-L1 전지방세포 (preadipocyte)를, d9 는 분화 유도를 시작한지 9일째의 세포를 의미한다.

(B)~(F)는 3T3-L1 전지방세포가 지방세포로 분화되는 과정에서 Ebf1, PPAR- γ , Glut, TET1 및 TET2 각각의 mRNA의 상대적인 발현 정도를 나타낸 것이다. pre 는 3T3-L1 전지방세포를, d0 는 분화 유도 시작일, d3은 분화 유도를 시작한지 3일째, d6은 분화 유도를 시작한지 6일째, d9는 분화 유도를 시작한지 9일째, 및 d12는 분화 유도를 시작한지 12일째의 세포를 의미한다.

도 2의 (A)는 3T3-L1 전지방세포를 지방세포로 분화시키기 전에 대조군 siRNA, TET1에 특이적인 siRNA, 및 TET2에 특이적인 siRNA 를 각각 3T3-L1 전지방세포에 도입하고, 2일 후부터 6일간 지방세포로의 분화를 유도한 후, Oil Red-O 염색을 수행한 결과를 나타내며, (B)는 흡광도 520 nm 에서 정량화하여 측정한 결과를 나타낸다. (C)~(D)는 TET1에 특이적인 siRNA, 및 TET2 에 특이적인 siRNA 를 각각 3T3-L1 전지방세포에 도입한 후 실시간 PCR 을 통해 TET1 및 TET2 를 정량화한 결과를 나타낸다. DMI 는 지방세포 분화 유도인자를 처리한 것을 의미한다. (E)는 TET1 및 TET2 의 siRNA 처리에 의하여 지방세포 분화 억제이 이루어졌는지 확인한 실시간 PCR 결과를 나타낸다. NONO 가 실시간 PCR 에서 reference gene 으로 사용되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047]

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0048]

실시예 1. 세포 모델 및 지방세포로의 분화

[0049]

마우스 유래 3T3-L1 세포주는 ATCC(American Type Culture Collection; CL-173, Manassas, VA, USA)로부터 분양 받아 사용하였다. 3T3-L1 전지방세포는 실험목적에 따라 100mm, 60mm 플레이트나 24-웰 및 96-웰 플레이트에 각각 씨딩(seeding)한 후, BS (bovine serum; 10%) 및 P/S (페니실린/스트렙토마이신; 1%)를 함유한 고농도 포도당 DMEM(Dubelcco's Modified Eagles' Medium; 89%)에서 100% confluence 될 때까지 배양하였다. 이로부터 2일 후에, 지방세포 분화유도 물질[10 μ g/mL 인슐린, 1 μ M 덱사메타손(DEX, dexamethasone), 0.5mM 아이소부틸 메틸헥틴 (IBMX, isobutylmethylxanthin)] 과 FBS (fetal bovine serum; 10%) 및 P/S (10%)를 함유한 DMEM으

로 전지방세포를 지방세포로 분화유도 하였다.

[0050] **실시예 2. Oil red O 염색에 의한 지방분화 측정**

[0051] Oil red O 염색을 이용하여 분화 과정에 따른 3T3-L1 세포 내 지방축적량을 측정하고자 각각의 시료를 처리하여 96-웰에서 총 6일이나 12일 동안 분화된 3T3-L1 세포의 배양액을 제거한 후, 10% 포르말린 용액 500 μ l를 첨가하여 5분간 실온에서 방치한 뒤 제거하였다. 그 후 동량의 포르말린 용액으로 분화된 3T3-L1 세포 1시간 이상 실온에서 방치한 후, 포르말린을 제거하고 60% 이소프로판올 용액 500 μ l로 세척하여 세포를 완전히 건조시켰다. 완전히 건조된 세포들은 미리 제조해 둔 Oil red O working solution (Oil red O : DDW = 6 : 4)으로 세포 내 축적된 지방성분들을 충분히 염색 한 후, 증류수를 이용하여 세포를 3~4회 세척하고 완전히 건조시켰다. 세포 내 축적된 지방 성분과 결합한 Oil red O는 100% 이소프로판올을 이용하여 모두 용출 시킨 후, ELISA를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0052] **실시예 3. 총 RNA 추출**

[0053] 각 세포주에서 총 RNA는 Qiagen RNeasy kit를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 추출하였고, 추출된 total RNA는 1.5%의 아가로스 겔에서 전기영동하여 분해되는 정도를 확인 후 Nanodrop Lite(Thermo)를 이용하여 정량하였다.

[0054] **실시예 4. 정량적 실시간(Quantitative real-time) PCR (qRT-PCR)**

[0055] RNA를 cDNA(complement DNA)로 합성하기 위해 Reverse transcriptase(Thermo)를 사용하였다. 1 μ g의 RNA에 2 μ l의 DNaseI buffer(Thermo)를 넣어주고 1 μ l의 DNase I(Thermo) 효소를 넣어 DNA를 제거한 후에, 효소가 작용할 수 있도록 37℃에서 30분간 반응 한 후에 50mM의 EDTA(fermentas)를 1 μ l 넣어준 후 65℃에서 10분간 반응시켜 효소를 변성시켰다. 그 후에 10mM의 dNTP를 2 μ l, 50uM의 oligodT를 1 μ l를 넣어 65℃에서 5분 동안 반응시켰다. 그 후에 5X RT buffer 4 μ l, Reverse Transcriptase 0.5 μ l(100U)을 포함한 반응액 20 μ l을 42℃에서 60분, 70℃에서 10분 동안 반응하여 cDNA를 합성한 후 이것을 1:4로 희석하여 그 중 2 μ l을 이용하여 qRT-PCR의 주형으로 사용하였다. qRT-PCR은 cDNA 2 μ l, SYBER green master mix(Qiagen) 5 μ l, 각 유전자의 상보적인 primer 10pmole을 포함한 10 μ l을 95℃에서 5분 동안 반응한 후, 40 cycle(95℃에서 5초, 60℃에서 10초) 반복하여 증폭하였다. 지방세포 분화시 가장 안정적인 NONO mRNA 발현을 내부 대조군(internal control)으로 사용하였으며 각 유전자의 발현은 내부 대조군의 발현 수준으로 $\Delta Ct = 2^{-(interesting\ gene\ ct - internal\ gene\ ct)}$ 방법으로 보정하였다.

[0056] qRT-PCR에 사용한 프라이머 정보는 다음과 같다.

표 1

프라이머	타겟유전자	서열	서열번호
Tet1m_rtF2	mouse TET1	5'- ggctccagttgcttatcaaaa -3'	1
Tet1m_rtR2	mouse TET1	5'- ccctcttcatttccaagtcg -3'	2
Tet2m_rtF2	mouse TET2	5'- gccagaagcaagaaccaag -3'	3
Tet2m_rtR2	mouse TET2	5'- ccttccttcagacccaaaca -3'	4
Ppargm_rtF1	mouse PPAGg	5'- ccctggcaaagcatttgtat -3'	5
Ppargm_rtR1	mouse PPAGg	5'- gaaactggcacccttgaaaa -3'	6
mHif1a_RT_F1	mouse Hif1a	5'- tcaagtcagcaacgtggaag -3'	7
mHif1a_RT_R1	mouse Hif1a	5'- ttcacaaatcagcaccaagc -3'	8
mEBf1_RT_F1	mouse Ebf1	5'- ctttcgcaccagttgtcaga -3'	9
mEBf1_RT_R1	mouse Ebf1	5'- tttcacatgggagggacaat -3'	10

[0058]

[0059] **실시예 5. siRNA를 이용한 Tet1/Tet2의 발현 억제**

[0060] 본 실험에서 Tet1과 Tet2의 발현이 지방세포 분화에 직접적인 역할을 가지고 있는지 확인하기 위하여, 3T3-L1 세포주를 100% confluence 될 때까지 배양한 후 siRNA를 처리하고, 이로부터 2일 후에, 지방세포 분화유도 물질 [10 µg/mL 인슐린, 1 µM 텍사메타손(DEX, dexamethasone), 0.5mM 아이소부틸메틸젠티 (IBMX, isobutylmethylxanthin)] 과 FBS (fetal bovine serum; 10%) 및 P/S (10%)를 함유한 DMEM으로 전지방세포를 지방세포로 분화유도를 시작하면서 다시 한 번 siRNA를 처리하였다. 여기에서 사용된 siRNA는 모두 미국의 Dharmacon사 제품으로 siControl (ON-TARGETplus Non-targeting Pool, #D-001810-10-05), siTet1 (siGENOME Mouse Tet1(52463) siRNA - SMARTpool, #M-062861-01-0005), siTet2(siGENOME Mouse Tet2(214133) siRNA - SMARTpool, #M-058965-01-0005) 를 구매하여 사용하였다.

[0061] **실험 결과**

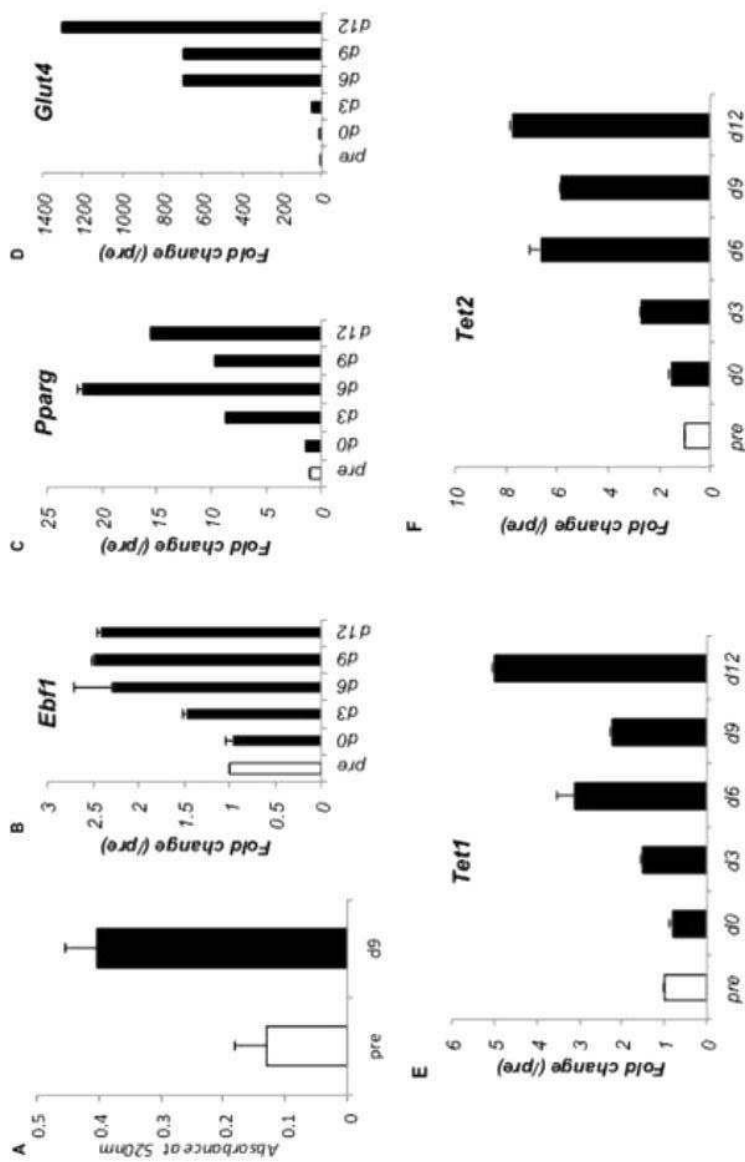
[0062] 지방세포 분화 기전 연구를 위해 가장 잘 알려지고 널리 쓰이고 있는 생쥐 3T3-L1 세포모델을 이용하여 후생유전적 변형을 통한 분화억제 기전을 연구하였다. 실험 결과, TET1 및 TET2은 지방세포 분화 중 발현이 유의적으로 증가하였으며, 이는 기존에 알려진 Ebf1, PPAR-gamma 및 GLUT4와 같은 지방분화의 분자적 생지표들의 발현 증가와 일치하였다 (도 1).

[0063] 또한, TET1과 TET2의 발현을 siRNA를 이용하여 억제한 경우, 지방세포 분화가 저해되었다. 나아가, 지방세포 분화 정도를 Oil Red-O 라는 지방입자(fat droplet)의 직접적 측정 방법이나 지방분화의 전사인자로 알려진 PPAR γ 와 같은 분자적 생지표를 정량적으로 qRT-PCR 측정하였을 경우, 모두, siRNA에 의하여 TET1및 TET2의 발현이 억제될 경우 지방세포 분화가 유의적으로 저해된다는 것이 확인되었다 (도 2).

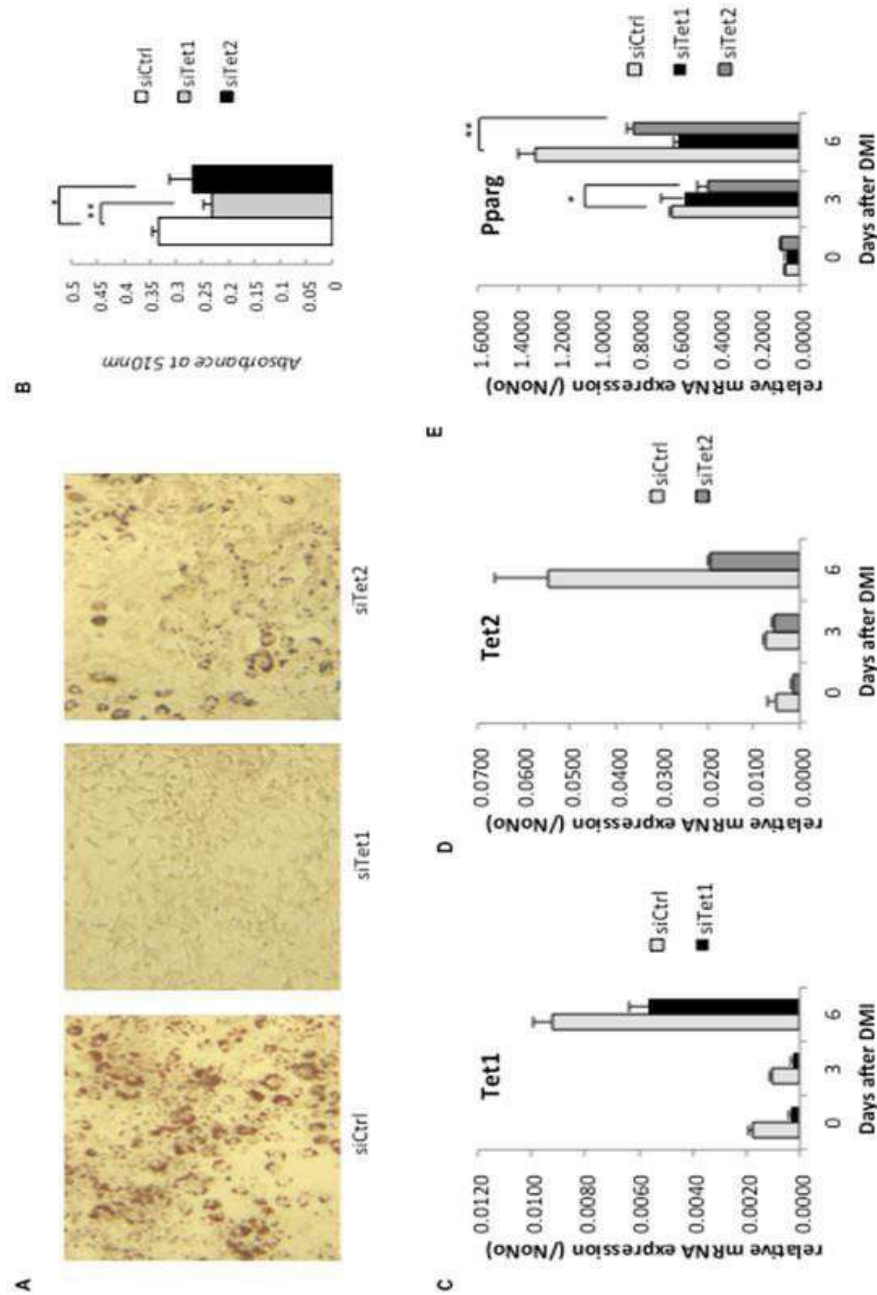
[0064] 따라서, TET1 및/또는 TET2는 지방세포 분화를 억제하기 위한 신규 표적이 될 수 있으며, TET1 및/또는 TET2의 유전자의 발현 또는 단백질의 활성을 억제함으로써 지방세포 분화를 효과적으로 저해할 수 있고, 나아가 비만의 예방, 개선 및 치료에 활용할 수 있다.

도면

도면1



도면2



서열목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> Composition for inhibiting differentiation into adipocyte using repression of TET1 and uses thereof
- <130> DPP20140609KR
- <160> 10
- <170> KopatentIn 1.71

<210>	1	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Tet1m_rtF2 primer	
<400>	1	
	ggctccagtt gcttatcaaa a	21
<210>	2	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Tet1m_rtR2 primer	
<400>	2	
	ccctcttcat ttccaagtcg	20
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Tet2m_rtF2 primer	
<400>	3	
	gccagaagca agaaaccaag	20
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Tet2m_rtR2 primer	
<400>	4	
	ccttccttca gacccaaca	20
<210>	5	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Ppargm_rtF1 primer	

<400> 5
ccctggcaaa gcatttgat 20
<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Ppargm_rtR1 primer
<400> 6
gaaactggca cccttgaaaa 20
<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> mHif1a_RT_F1 primer
<400>
> 7
tcaagtcagc aacgtggaag 20
<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> mHif1a_RT_R1 primer
<400> 8
ttcacaaatc agcaccaagc 20
<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> mEBf1_RT_F1 primer
<400> 9
ctttgcgacc agttgtcaga 20
<210> 10
<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mEBf1_RT_R1 primer

<400> 10

tttcacatgg gagggacaat

20