



(51) 국제특허분류:

G01N 33/50 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01) A61P 9/00 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01) A61P 15/02 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2015/001250

(22) 국제출원일: 2015년 2월 6일 (06.02.2015)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(71) 출원인: 경북대학교 산학협력단 (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 702-701 대구광역시 북구 대학로 80 (산격동, 경북대학교), Daegu (KR). 경북대학교 병원 (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL) [KR/KR]; 700-721 대구시 중구 동덕로 130, Daegu (KR).

(72) 발명자: 이인규 (LEE, In-Kyu); 706-771 대구광역시 수성구 청호로 365, 305-301(범어동, 가든하이츠 3 차아파트), Daegu (KR). 이선주 (LEE, Sun Joo); 702-905 대구광역시 북구 칠곡중앙대로 598, 107-502 (읍내동, 칠곡 e 편한세상아파트), Daegu (KR).

(74) 대리인: 이희숙 (LEE, Hee Sook) 등; 135-915 서울특별시 강남구 테헤란로 33길 11, 9층 (역삼동, JS 빌딩) 시원국제특허법률사무소, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

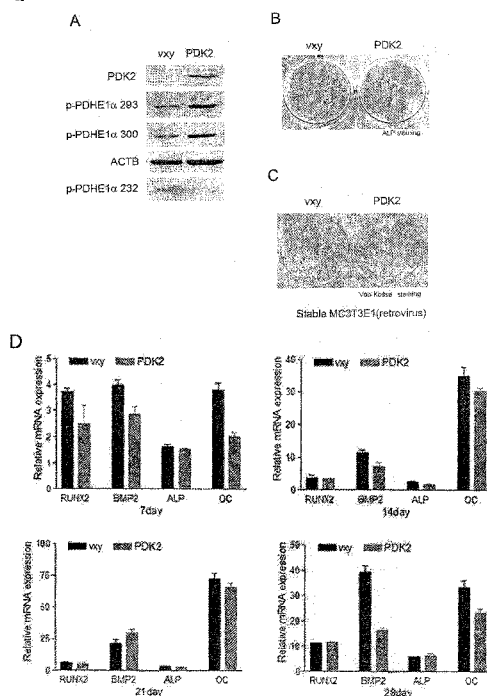
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,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

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR SCREENING FOR THERAPEUTIC AGENT FOR PREVENTING OR TREATING FEMALE MENOPAUSAL DISORDERS BY USING PDK2, AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING FEMALE MENOPAUSAL DISORDERS, CONTAINING THERAPEUTIC AGENT SCREENED FOR BY METHOD AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭 : PDK2를 이용한 여성 갱년기 질환 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법 및 상기 방법으로 스크리닝된 치료제를 유효성분으로 포함하는 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

[도 1]



(57) Abstract: The present invention relates to: a method for screening for a material, which can be used as a therapeutic agent for preventing or treating female menopausal disorders by inhibiting the expression or activation of PDK2; and a pharmaceutical composition for preventing or treating female menopausal disorders, containing a PDK2 inhibitor as an active ingredient.

(57) 요약서: 본 발명은 PDK2의 발현 또는 활성을 억제하여 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료제로 사용될 수 있는 물질의 스크리닝 방법 및 PDK2 저해제를 유효성분으로 포함하는 여성 갱년기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

【명세서】**【발명의 명칭】**

PDK2를 이용한 여성 갱년기 질환 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법 및 상기 방법으로 스크리닝 된 치료제를 유효성분으로 포함하는 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

【기술분야】

본 발명은 PDK2를 이용한 여성 갱년기 질환 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법 및 상기 방법으로 스크리닝 된 치료제를 유효성분으로 포함하는 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

【배경기술】

과학과 문명의 발달로 점차 인간의 평균 수명이 연장되어 노년층 인구의 증가와 함께 중년이후의 삶이 길어지고 있고 실질적으로 현대 여성의 삶 중에서 1/3을 폐경전후로 오는 갱년기로 보내게 되므로 이 시기의 삶의 질을 향상시키기 위한 노력들이 이루어지고 있다.

갱년기는 난소기능의 전반적이고 점진적인 감소가 일어나 생리적 기능 및 성기능이 감소 내지 소실되는 과도기를 말하며, 갱년기의 한 과정으로 난소기능이 정지된 후에 일어나는 생리의 영구적인 정지인 폐경(menopause)이 오게 된다. 폐경이 오게 되면 에스트로젠 생성의 감소, 난포자극호르몬(follicular stimulating hormone, FSH) 및 황체호르몬(luteinizing hormone, LH)의 상승 등 호르몬의 변화에 따른 여러 질환이 발생하게 된다.

상기 호르몬 변화에 따른 질환을 갱년기 질환(climacteric disorder), 폐경기 질환(postmenopausal syndrome) 또는 폐경기 증후군이라고도 불리며, 40대 내지 50대 여성에서 주로 나타난다. 즉, 갱년기 질환은 난소의 노화로 인한 에스트로젠(여성호르몬)의 분비 감소에 기인하며 폐경을 전후로 약 2년 내지 10년에 걸쳐 나타난다.

갱년기는 내분비 증후군의 일종으로 분리되며 난소기능의 전반적이고 점진적인 감소가 일어나 생리적 기능 및 성기능이 감소 내지 소실되는 과도기를 말하며,

갱년기질환의 경우 주로 다섯가지 증상이 나타난다: i) 혈관성 변화에 의한 증상, ii) 근골격계 변화에 의한 증상, iii) 비뇨생식기 변화에 의한 증상, iv) 뇌신경계 변화에 의한 증상 및 v) 일반적 변화에 의한 증상으로 나뉘어진다. 상기 혈관성 변화에 의한 증상은 주로 안면홍조, 빈맥, 발한 또는 두통 등이 있으며, 상기 근골격계 변화에 의한 증상은 근육통, 관절통 또는 요통 등이 있고, 상기 비뇨생식기 변화에 의한 증상은 빈뇨 또는 요실금 등이 있으며, 상기 뇌신경계 변화에 의한 증상은 기억력 감퇴, 우울증, 집중력 감퇴 및 현기증 등이 있으며, 상기 일반적 변화에 의한 증상은 시력감퇴 또는 는 피부 및 모발의 변화 등이 있다.

상기 증상들은 정도의 차이가 있으나 폐경 전후 여성의 약 80%가 경험하고 있다고 보고되고 있다. 무엇보다도 주목할 만한 사실은 상기 갱년기 질환은 여성의 생명 및 건강에 영향을 미치는 중요한 변화가 장기간 걸쳐 진행됨으로써 여성의 건강에 치명적인 질환 즉, 골다공증이나 심혈관계질환 등의 발생 위험성이 증가된다는 것이다.

따라서, 중년 여성들의 신체적, 정신적 건강 증진 및 삶의 질의 개선을 위하여 상기 갱년기 질환의 치료제의 개발이 요구되고 있다.

종래 이러한 갱년기 장애 치료를 위하여, 호르몬 대체요법, 비스테로이드제제 등의 약물치료법이 개발되었고, 지금까지 가장 효과적으로 알려진 방법은 호르몬 대체요법이다. 그러나, 끊임없이 제기되는 암 발생에 관한 논쟁, 두통, 체중증가 등의 부작용과 월경 재개 등의 부작용으로 인하여 호르몬 대체요법에 대한 거부감이 증대되면서 이를 대체할 수 있는 치료법의 개발이 요구되고 있다.

한편, PDK(Pyruvate dehydrogenase kinase)는 ATP를 이용하여 피루빈산 탈수소효소를 인산화 시킴으로써 그 기능을 불활성화 시키는 효소이며, 진핵생물의 미토콘드리아에 분포되어 있다. 인간의 PDK 패밀리는 PDK1, PKD2, PDK3 및 PDK4 네 종류의 동종효소로 구성되어 있으며, 이들은 종양, 제2형 당뇨병, 지방간 등의 치료에 있어서 중요한 타겟이 될 수 있음이 밝혀진 바 있다. 그러나, 아직까지 PDK2가 갱년기 여성 질환의 예방 또는 치료에 효과가 있음에 대하여는 당업계에서 알려진 바가 없다.

【발명의 상세한 설명】**【기술적 과제】**

본 발명의 발명자들은 PDK2가 과발현되어 있는 조골세포에서 그렇지 않은 세포에 비해 조골세포의 분화가 저하되어 있으며, 난소절제술에 의한 갱년기 동물모델에서 PDK2가 결손되었을 때 골 손실이 방어가 되어 갱년기 여성 질환 중 하나인 골다공증의 예방 또는 치료가 가능함을 발견하였다. 이에, PDK2의 발현 또는 활성을 감소시키는 물질이 갱년기 여성 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있음에 착안하여 본 발명을 완성하였다.

따라서 본 발명의 목적은 PDK2의 발현 또는 활성을 억제하는 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료제를 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 PKD2를 발현하는 세포 또는 PDK2 발현이 증가된 세포를 이용하여 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료제를 스크리닝 하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 여성 갱년기 질환은 골다공증, 고열, 다한증, 우울증, 불면증, 요실금, 부종, 안면홍조, 기억력 감퇴, 두통, 신경과민증, 현기증, 심계항진, 빈맥, 메스꺼움, 관절통, 근육통, 수족냉증 및 체중 증가로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 PDK2 저해제를 유효성분으로 포함하는 조골세포(osteoblast) 분화 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 PDK2의 발현 또는 활성을 억제하여 조골세포의 분화를 촉진하는 물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 PDK2 저해제를 유효성분으로 포함하는 여성 갱년기 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 PDK2 저해제는 PDK2에 대한 siRNA 또는 antisense RNA인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 PDK2는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 여성 갱년기 질환은 골다공증, 고열, 다한증, 우울증, 불면증, 요실금, 부종, 안면홍조, 기억력 감퇴, 두통, 신경과민증, 현기증, 심계항진, 빈맥, 메스꺼움, 관절통, 근육통, 수족냉증 및 체중 증가로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공하는 것이다.

【기술적 해결방법】

상기의 목적을 달성하기 위해 본 발명은 (a) 세포에 시험물질을 접촉시키는 단계 및 (b) 시험물질을 접촉시키지 않은 대조군과 비교하여 PDK2 단백질의 발현 또는 활성을 감소시키는 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 여성 갱년기 질환 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 상기 (a)단계의 세포는 PDK2를 발현하는 세포 또는 PDK2 발현이 증가된 세포인 것을 특징으로 하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 상기 여성 갱년기 질환은 골다공증, 고열, 다한증, 우울증, 불면증, 요실금, 부종, 안면홍조, 기억력 감퇴, 두통, 신경과민증, 현기증, 심계항진, 빈맥, 메스꺼움, 관절통, 근육통, 수족냉증 및 체중 증가로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 PDK2 저해제를 유효성분으로 포함하는 조골세포(osteoblast) 분화 촉진용 조성물을 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 (a) 세포에 시험물질을 접촉시키는 단계, (b) 시험물질을 접촉시키지 않은 대조군과 비교하여 PDK2 단백질의 발현 또는 활성을 감소시키는 시험물질을 선별하는 단계 및 (c) 상기 (b) 단계에서 선별된 시험물질을 조골세포와 접촉시켜 분화가 촉진되는 시험물질을 선별하는 단계를 포함

하는 조골세포 분화 촉진용 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 PDK2 저해제를 유효성분으로 포함하는 여성 갱년기 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 상기 PDK2 저해제는 PDK2에 대한 siRNA 또는 antisense RNA인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 상기 PDK2는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 상기 여성 갱년기 질환은 골다공증, 고열, 다한증, 우울증, 불면증, 요실금, 부종, 안면홍조, 기억력 감퇴, 두통, 신경과민증, 현기증, 심계항진, 빈맥, 메스꺼움, 관절통, 근육통, 수족냉증 및 체중 증가로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명에서는 PDK2와 여성 갱년기 질환과의 연관성을 확인하기 위해 마우스 조골세포주인 MC3T3E1에 PDK2를 레트로바이러스로 감염시켜 조골세포의 분화정도를 관찰하였다. 그 결과 PDK2가 과발현된 조골세포에서 그렇지 않은 세포에 비해 세포의 분화가 저하되어 있음을 확인하였다(실시예 1 참조).

또한 본 발명에서는 PDK2가 결손되어 있는 마우스의 골수줄기세포(bone marrow stromal cell)를 일차배양(primary culture)하여 그 분화정도를 관찰하였다. 그 결과 PDK2가 결손되어 있는 마우스에서 일차배양(primary culture)한 골수줄기세포가 PDK2가 정상적으로 발현되고 있는 마우스에서 일차배양한 골수줄기세포에 비해 세포의 분화가 증가되어 있고, 조골세포의 전구체(progenitor) 또한 증가되어 있음을 확인하였다(실시예 2 및 3 참조).

또한 본 발명에서는 PDK2가 결손되어 있는 마우스와 PDK2가 정상적으로 발현

되고 있는 마우스에 난소절제술을 시행하여 갱년기 동물모델을 확립한 후, 체중 증가, 골밀도 등을 관찰하였다. 그 결과 PDK2가 결손되어 있는 갱년기 동물 모델이 PDK2가 정상적으로 발현하고 있는 갱년기 동물 모델에 비해 체중 증가가 억제되어 있었으며, 골 손실도 적은 것을 확인하였다(실시에 4 내지 7 참조).

상기한 실시예의 결과를 토대로 PDK2가 갱년기 여성 질환과 밀접한 연관성이 있다는 것을 알 수 있었고, 결국 PDK2를 저해하는 물질이 갱년기 여성 질환의 예방 또는 치료에 효과가 있을 것임에 착안하여 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명은 (a) 세포에 시험물질을 접촉시키는 단계 및 (b) 시험물질을 접촉시키지 않은 대조군과 비교하여 PDK2 단백질의 발현 또는 활성을 감소시키는 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 여성 갱년기 질환 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

상기 세포는 PDK2를 발현하는 세포 또는 PDK2의 발현이 증가된 세포이며, 이는 본래 PDK2를 코딩하는 유전자를 포함하는 세포이거나 의도적으로 PDK2를 코딩하는 유전자를 도입한 세포일 수 있다. PDK2를 코딩하는 유전자를 세포에 도입하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 제한 없이 사용할 수 있다. 예컨대, PDK2 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터로 세포를 형질감염시키거나, PDK2를 retrovirus로 감염시킬 수 있다.

바람직한 하나의 구현예에 따르면, 상기 세포는 조골세포일 수 있으며, 바람직하게는 마우스 조골세포주인 MC3T3E1 세포일 수 있다.

또한, 상기 세포는 인간 또는 소, 염소, 돼지, 생쥐, 토끼, 햄스터, 기니 피그 등의 동물 기원의 모든 세포를 포함하며, 일차세포, 이차세포, 불멸화된 세포, 동물로부터 일차배양(primary culture)된 세포 등을 이용할 수 있다.

상기 시험물질은 PDK2 단백질의 발현 또는 활성을 감소시키는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시험물질은 화학 물질, PDK2 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNA(short interfering RNA), shRNA(short hairpin RNA), RNAi 및 천연물 추출물

로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이거나, PDK2 단백질에 상보적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스 및 항체로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나를 이용할 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다.

상기 시험물질을 세포에 접촉시킨 이후, 시험물질을 접촉시키지 않은 대조군과 비교하여 시험물질이 접촉된 세포에서 PDK2 단백질의 발현량 또는 PDK2 단백질의 활성이 감소되는 것으로 측정되면 상기 시험물질은 여성 갱년기 질환 예방 또는 치료제로 판정될 수 있다.

상기에서 PDK2의 발현 또는 활성을 확인하는 방법은 당 분야에서 단백질의 발현 확인을 위해 사용되는 일반적인 기술들을 이용할 수 있다. 예를 들어, PDK2에 대한 항체를 이용한 효소결합 면역흡착 분석법(ELISA), 방사선 면역측정법(radioimmunoassay), 샌드위치 측정법(sandwich assay), 폴리아크릴아미드 겔 상의 웨스턴 블롯, 면역침전 분석, 보체 고정분석, 유세포 분석법(FACS), 단백질 칩 및 이들의 조합이 이용될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

선택적으로는, 상기 (a), (b) 단계를 거쳐 선별된 시험물질을 개체에 투여하여 골밀도 감소가 저해되는 시험물질을 선별하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다. 이 경우, 상기 개체는 랫드 또는 마우스일 수 있으며, 당업계에서 공지된 방법에 따라 난소절제술이 수행되어 여성 갱년기 질환이 유도된 동물 모델일 수 있다. 개체에 상기 시험물질을 투여하는 방법은 경구투여, 경피투여, 정맥투여 또는 복강투여 등이 이용될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

본 발명은 또한 상기 (a) 단계의 세포가 PDK2를 발현하는 세포 또는 PDK2의 발현이 증가된 세포인 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다.

이는 본래 PDK2를 코딩하는 유전자를 포함하는 세포이거나 의도적으로 PDK2를 코딩하는 유전자를 도입한 세포일 수 있다. PDK2를 코딩하는 유전자를 세포에 도입하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 제한 없이 사용할 수 있다. 예컨대, PDK2 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터로 세포를 형질감염시키거나, PDK2를 retrovirus로 감염시킬 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

본 발명에서 상기 여성 갱년기 질환은, 이에 제한되는 것은 아니지만 골다공증, 고열, 다한증, 우울증, 불면증, 요실금, 부종, 안면홍조, 기억력 감퇴, 두통, 신경과민증, 현기증, 심계항진, 빈맥, 메스꺼움, 관절통, 근육통, 수족냉증 및 체중 증가로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상이나, 바람직하게는 골다공증인 것을 특징으로 한다.

상기 여성 갱년기 질환이란, 난소의 노화 또는 기능상실로 인한 에스트로겐(여성호르몬)의 분비 감소에 따라 나타나는 하기와 같은 증상, 또는 이로부터 유발되는 질환을 의미한다: i) 혈관성 변화에 의한 증상, ii) 근골격계 변화에 의한 증상, iii) 비뇨생식기 변화에 의한 증상, iv) 뇌신경계 변화에 의한 증상 및 v) 일반적 변화에 의한 증상.

상기 혈관성 변화에 의한 증상은 주로 안면 홍조, 고열, 빈맥, 다한증, 수족냉증 또는 두통 등이 있으며, 상기 근골격계 변화에 의한 증상은 근육통, 관절통 또는 요통 등이 있고, 상기 비뇨생식기 변화에 의한 증상은 빈뇨 또는 요실금 등이 있으며, 상기 뇌신경계 변화에 의한 증상은 기억력 감퇴, 우울증, 집중력 감퇴, 불면증, 신경과민증, 메스꺼움 및 현기증 등이 있으며, 상기 일반적 변화에 의한 증상은 시력감퇴, 체중 증가, 피부 및 모발의 변화 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

상기 골다공증은 폐경 후 여성 호르몬 감소에 의해 촉발되는 갱년기성 골다공증, 나이가 들에 따라 발생하는 원발성 골다공증 또는 난소적출술에 따른 골다공증 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

본 발명은 또한 PDK2 저해제를 유효성분으로 포함하는 조골세포(osteoblast) 분화 촉진용 조성물을 제공한다.

상기 PDK2 저해제는 화학물질, PDK2 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA(short interfering RNA), shRNA(short hairpin RNA), RNAi 및 천연물 추출물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이거나, PDK2 단백질에 상보적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스 및 항체로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나를 이용할 수 있지만, 이에 제한되지는

않는다.

상기 조성물은 조골세포 분화 촉진용 건강기능성 식품 조성물 또는 약학적 조성물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

상기 조성물이 건강기능성 식품 조성물일 경우, 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food) 및 식품 첨가제(food additives) 등의 모든 형태를 포함한다. 상기 유형의 식품 조성물은 당 업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다. 예를 들면, 건강식품으로는 본 발명의 PDK2 자체를 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용하도록 하거나, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있다. 또한, 본 발명의 PDK2와 조골세포 분화 촉진 효과가 있다고 알려진 공지의 물질 또는 활성 성분과 함께 혼합하여 조성물의 형태로 제조할 수 있다.

본 발명의 조성물은 골 손실로 인한 질환의 예방 및 개선에 효과가 있으며, 상기 골 손실로 인한 질환으로는 골다공증, 류마티스 관절염, 치주염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 본 발명의 조성물은 부갑상선항진증, 쿠싱병, 만성신장질환, 골수종 또는 항간질제 약물 복용 등 다른 질병으로 인한 골 손실에도 유효하게 작용할 수 있으며, 당업자에 알려진 골 손실로 인한 질환은 모두 본 발명에 포함된다.

본 발명은 또한 (a) 세포에 시험물질을 접촉시키는 단계, (b) 시험물질을 접촉시키지 않은 대조군과 비교하여 PDK2 단백질의 발현 또는 활성을 감소시키는 시험물질을 선별하는 단계 및 (c) 상기 (b) 단계에서 선별된 시험물질을 조골세포와 접촉시켜 분화가 촉진되는 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 조골세포 분화 촉진용 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

상기 (a) 단계의 세포는 PDK2를 발현하는 세포 또는 PDK2의 발현이 증가된 세포이며, 이는 본래 PDK2를 코딩하는 유전자를 포함하는 세포이거나 의도적으로 PDK2를 코딩하는 유전자를 도입한 세포일 수 있다. PDK2를 코딩하는 유전자를 세포에 도입하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 제한 없이 사용할 수 있다. 예컨대, PDK2 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터로 세포를 형질감염

시키거나, PDK2를 retrovirus로 감염시킬 수 있다.

바람직한 하나의 구현예에 따르면, 상기 세포는 조골세포일 수 있으며, 바람직하게는 마우스 조골세포주인 MC3T3E1 세포일 수 있다.

또한, 상기 세포는 인간 또는 소, 염소, 돼지, 생쥐, 토끼, 햄스터, 기니 피그 등의 동물 기원의 모든 세포를 포함하며, 일차세포, 이차세포, 불멸화된 세포, 동물로부터 일차배양(primary culture)된 세포 등을 이용할 수 있다.

상기 시험물질은 조골세포의 분화를 촉진하는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시험물질은 화학물질, PDK2 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNA(short interfering RNA), shRNA(short hairpin RNA), RNAi 및 천연물 추출물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이거나, PDK2 단백질에 상보적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스 및 항체로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나를 이용할 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다.

상기에서 (b) 단계에서 PDK2의 발현 또는 활성을 확인하는 방법은 당 분야에서 단백질의 발현 확인을 위해 사용되는 일반적인 기술들을 이용할 수 있다. 예를 들어, PDK2에 대한 항체를 이용한 효소결합 면역흡착 분석법(ELISA), 방사선 면역측정법(radioimmunoassay), 샌드위치 측정법(sandwich assay), 폴리아크릴아미드 겔 상의 웨스턴 블롯, 면역침전 분석, 보체 고정분석, 유세포 분석법(FACS), 단백질 칩 및 이들의 조합이 이용될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

이후 상기 시험물질을 조골세포에 접촉시킨 이후, 시험물질을 접촉시키지 않은 대조군과 비교하여 시험물질이 접촉된 세포에서 조골세포의 분화가 촉진되는 것으로 확인되면 상기 시험물질은 조골세포 분화 촉진용 물질로 판정될 수 있다.

상기 조골세포의 분화 촉진을 확인하는 방법은 당 분야에서 조골세포의 분화를 확인하기 위해 사용되는 일반적인 기술들을 이용할 수 있다. 예를 들면, ALP 염색법, vonKossa 염색법 또는 골 형성 유전자의 발현 측정 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

본 발명은 또한 PDK2 저해제를 유효성분으로 포함하는 여성 갱년기 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

상기 PDK2 저해제는 화학물질, PDK2 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNA(short interfering RNA), shRNA(short hairpin RNA), RNAi 및 천연물 추출물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이거나, PDK2 단백질에 상보적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스 및 항체로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나를 이용할 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다.

본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 조성물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 단독으로 함유하거나 또는 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 함유할 수 있다.

약학적으로 허용되는 담체로는 예컨대, 경구 투여용 담체 또는 비경구 투여용 담체를 추가로 포함할 수 있다. 경구 투여용 담체는 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등을 포함할 수 있다. 또한, 비경구 투여용 담체는 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등을 포함할 수 있으며, 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로 부탄올이 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).

본 발명의 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 어떠한 방법으로도 투여할 수 있다. 예를 들면, 경구 또는 비경구적으로 투여할 수 있다. 비경구적인 투여방법으로는 이에 한정되지는 않으나, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여될 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 약학적 조성물은 경피 투여될 수 있다. 상기에서 경피 투여란 본 발명의 약학적 조성물을 세포 또는

피부에 투여하여 본 발명 조성물에 함유된 활성성분이 피부 내로 전달되도록 하는 것을 말한다. 예컨대, 본 발명의 약학적 조성물을 주사형 제형으로 제조하여 이를 30 게이지의 가는 주사 바늘로 피부를 가볍게 단자(prick)하는 방법, 또는 피부에 직접적으로 도포하는 방법으로 투여될 수 있다.

본 발명의 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 투여 경로에 따라 경구 투여용 또는 비경구 투여용 제제로 제형화할 수 있다.

경구 투여용 제제의 경우에 본 발명의 조성물은 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 슬러리제, 현탁액 등으로 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제형화될 수 있다. 예를 들어, 경구용 제제는 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다. 적합한 부형제의 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 및 말티톨 등을 포함하는 당류와 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분 및 감자 전분 등을 포함하는 전분류, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오즈 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로오즈 등을 포함하는 셀룰로오즈류, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 충전제가 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 붕해제로 첨가할 수 있다. 나아가, 본 발명의 약학적 조성물은 항응집제, 운환제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 비경구 투여용 제제의 경우에는 주사제, 크림제, 로션제, 외용연고제, 오일제, 보습제, 겔제, 에어로졸 및 비강 흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법으로 제형화할 수 있다. 이들 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975. Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 18042, Chapter 87: Blaug, Seymour)에 기재되어 있다.

본 발명의 PDK2 저해제를 포함하는 약학적 조성물 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. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리 할 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 전체 용량은 1일당

환자 체중 1 kg 당 약 0.01ug 내지 1,000 mg, 가장 바람직하게는 0.1 ug 내지 100 mg일 수 있다. 그러나 상기 본 발명의 약학적 조성물의 용량은 약학적 조성물의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설을 등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 상기 본 발명의 약학적 조성물을 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료제로서의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.

본 발명은 또한 상기 PDK2 저해제는 PDK2에 대한 siRNA 또는 antisense RNA인 것을 특징으로 하는 여성 갱년기 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

상기 antisense RNA는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다. 본 발명의 안티센스 서열은 PDK2 mRNA에 상보적이고 PDK2 mRNA에 결합할 수 있는 RNA 서열을 의미하며, PDK2 mRNA의 번역, 세포질내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다.

antisense RNA의 길이는 6 내지 100 염기, 바람직하게는 8 내지 60 염기, 보다 바람직하게는 10 내지 40 염기일 수 있다. 상기 antisense RNA는 통상의 방법으로 시험관 내에서 합성되어 생체 내로 투여하거나 생체 내에서 antisense RNA가 합성되도록 할 수 있다. 시험관 내에서 antisense RNA를 합성하는 한가지 예는 RNA 중합효소 I를 이용하는 것이다. 생체 내에서 antisense RNA가 합성되도록 하는 한가지 예는 다중클로닝부위(MCS)의 기원이 반대 방향에 있는 벡터를 사용하여 antisense RNA가 전사되도록 하는 것이다. 상기 antisense RNA는 서열 내에 번역 중지 코돈이 존재하도록 하여 펩타이드 서열로 번역되지 않도록 하는 것이 바람직하다. 본 발명에서 이용될 수 있는 antisense RNA의 디자인은 PDK2 유전자의 염기 서열을 참조하여 당업계에 공지된 방법에 따라 쉽게 제작할 수 있다.

상기 siRNA는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱을 매개할 수 있는 핵산 분자를

의미한다(국제공개 특허번호 00/44895, 01/36646, 99/32619, 01/29058, 99/07409 및 00/44914 참조). siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운(knock-down) 방법으로서 또는 유전자치료 방법으로 제공된다. 이와 같은 PDK2 대한 siRNA는 공지의 데이터베이스의 유전자 서열로부터 당업자가 공지의 방법에 의해 쉽게 제조할 수 있다.

본 발명은 또한 상기 여성 갱년기 질환은 골다공증, 고열, 다한증, 우울증, 불면증, 요실금, 부종, 안면홍조, 기억력 감퇴, 두통, 신경과민증, 현기증, 심계항진, 빈맥, 메스꺼움, 관절통, 근육통, 수족냉증 및 체중 증가로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 여성 갱년기 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

본 발명은 또한 상기 골다공증은 난소절제술에 의해 촉발되는 골다공증인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

【유리한 효과】

이상 살펴본 바와 같이, 본 발명은 여성 갱년기 질환 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법, PDK2 저해제를 유효성분으로 포함하는 조골세포 분화 촉진용 조성물, 조골세포 분화 촉진용 물질의 스크리닝 방법, PDK2 저해제를 유효성분으로 포함하는 여성 갱년기 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 여성 갱년기 질환 예방 또는 치료제는 PDK2의 발현 또는 활성을 감소시킴으로써 골다공증 등 여성 갱년기 질환이 예방 또는 치료에 효과적일 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도1은 PDK2가 과발현되어 있는 세포에서 조골세포의 분화가 저해되어 있음을 확인한 실험 결과이다(A: PDK2의 발현여부를 웨스턴 블롯으로 확인, B: ALP staining, C: vonKossa staining, D: 골형성 유전자의 발현).

도2는 마우스의 골수줄기세포를 일차배양하여 PDK2 발현 여부에 따른 세포의 분화정도를 확인한 실험 결과이다(WT: PDK2가 정상 발현되어 있는 야생형 마우스의 골수줄기세포, PDK2 KO: PDK2가 결손되어 있는 마우스의 골수줄기세포, A: ALP

staining, B: vonKossa staining, C: 골형성 유전자의 발현).

도3은 마우스 골수줄기세포와 이의 전구체인 fibroblast의 PDK2 발현 여부에 따른 세포의 분화정도를 ALP staining으로 확인한 실험 결과이다(WT: PDK2가 정상 발현되어 있는 야생형 마우스의 세포, PDK2 KO: PDK2가 결손되어 있는 마우스의 세포, con: 분화를 유도하지 않은 대조군, differ: 세포의 분화를 유도한 군, CFU-O: colony forming unit osteoblast, CFU-F: colony forming unit fibroblast).

도4는 난소절제술이 시행된 마우스에서 PDK2의 발현여부에 따른 체중변화 및 골 손실 정도를 비교한 실험 결과이다(WT: PDK2가 정상 발현되어 있는 야생형 마우스, 2KO: PDK2가 결손되어 있는 마우스, sham: 난소절제술이 시행되지 않은 마우스, OVX: 난소절제술이 시행된 마우스, A: 체중변화, B: 요추(척추)의 골 손실 비교, C: 대퇴골의 골 손실 비교).

도5는 난소절제술이 시행된 마우스에서 PDK2의 발현여부에 따른 트라베큘라의 손실을 micro CT를 이용해 비교한 실험 결과이다(WT: PDK2가 정상 발현되어 있는 야생형 마우스, 2KO: PDK2가 결손되어 있는 마우스, sham: 난소절제술이 시행되지 않은 마우스, OVX: 난소절제술이 시행된 마우스, BMD: bone mineral density).

도6은 난소절제술이 시행된 마우스에서 PDK2의 발현여부에 따른 골 형성 및 골 손실 정도를 비교한 실험 결과이다(OC assay: osteocalcin assay, CTX assay: c-terminal telopeptide assay).

도7은 난소절제술에 의해 유도된 파골세포의 활성정도를 PDK2의 발현여부에 따라 비교한 실험 결과이다(WT: PDK2가 정상 발현되어 있는 야생형 마우스, 2KO: PDK2가 결손되어 있는 마우스, sham: 난소절제술이 시행되지 않은 마우스, OVX: 난소절제술이 시행된 마우스).

【발명의 실시를 위한 형태】

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1>

PDK2 발현여부에 따른 조골세포의 분화정도 평가<1-1> MC3T3E1 세포배양 및 분화유도

MC3T3E1 세포(MC3T3E1 Subclone 4, ATCC, CRL-2593TM)를 10% FBS 및 항생제가 추가된 α -MEM(Gibco, A1049001)에서 배양하였다. 조골세포의 분화를 위해 3×10^5 의 세포를 35mm의 세포배양 멀티 플레이트에 분주한 후 7일 ~ 35일간 10mM b-glycerol phosphate 및 50 μ g/ml의 ascorbic acid를 첨가한 α -MEM 배지에서 배양하였다. 골형성 유전자는 7일, 14일, 21일 및 28일째에 각각 측정하였고, ALP stainin은 7일~10일째 사이에 시행하였으며, von Kossa staining은 30일 ~ 35일째 사이에 시행하였다. 배지는 매 3일마다 교환하였다. Retrovirus를 이용하여 MC3T3E1 세포에 PDK2를 감염시켰다. ALP 염색과 von Kossa 염색법은 당업계에서 공지된 방법에 따라 시행하였다.

<1-2> RNA 추출 및 RT-PCR (Real-time PCR)

RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN, 74804)를 이용하여 제조자의 지시에 따라 세포에서 총 RNA를 추출하였다. QuantiTect Reverse Transcription Kits(QIAGEN, Cat.205310)을 이용하여 제조자의 지시에 따라 5ug의 총 RNA를 사용하여 cDNA를 합성하였고, SYBR® Green (Applied Biosystem, Rf.4367659) 시약을 이용하여 25~50ng의 cDNA로 Real-time-PCR을 수행하였다. 좀 더 자세하게는 25~50ng의 cDNA 및 2 pmol의 forward 및 reverse 프라이머를 5 μ l SYBR® Green Master mix와 혼합하여 총 10 μ l의 Rx. vol.으로 하였다. ViiA™ 7 Real-Time PCR System(Life Technologies) 시스템에서 95℃에서 2 분 동안 initial denaturation 후 95℃에서 15초 동안 denaturation 및 60℃에서 1 분 동안 annealing 과정을 40 cycle 반복하였다. Cycle이 반복되는 동안 방출된 형광이 시스템에서 그려지는 DNA 증폭곡선을 이용하여 상대적인 mRAN양을 비교하였으며, 실험에 이용한 primer는 하기 표 1에 제시하였다.

표 1. RT-PCR, real time PCR 에 사용된 primer

Gene	Sequence	
	Forward	Reverse
Real time PCR primer for mouse		
<i>Alp</i>	acc gct gcc cga atc c	tct cct cgc ccg tgt tgt
<i>Osteoclc</i>	gtg agc tta acc ctg ctt gtg	gcg ttt gta ggc ggt ctt ca
<i>in</i>	a	
<i>Opg</i>	aca gag aag cca cgc aaa	tcc gtt tta tcc tct cta ca
<i>Osterix</i>	ggg aaa gga ggc aca aag aag	tag gcg tcc ccc atg gt
<i>Rankl</i>	tgt cgt taa aac cag cat caa	ttt cgt gct ccc tcc ttt ca
	aat	
<i>Bmp2</i>	tgc agc agc caa ctt gaa at	tct ccc act gac ttg tgt tct
		ga
<i>Runx2</i>	gtt atg aaa aac caa gta gcc	gta atc tga ctc tgt cct tgt
	agg t	gga t
<i>Bsp</i>	ggc aga gaa cgc cac act tt	tgt ggt ctc tgc tcc gta gct
		a
<i>36b4</i>	acc tcc ttc ttc cag gct tt	ctc cag tct tta tca gct gc

Retrovirus를 이용하여 MC3T3E1 세포에 PDK2를 감염시킨 후 PDK2가 발현되는 것을 웨스턴 블롯을 통해 확인하였다(도1, A). PDK2의 발현여부에 따른 조골세포의 분화정도를 비교하기 위해, 조골세포 분화유도 후 8일째에 ALP 염색을 수행하였고, 35일째에 von Kossa 염색을 수행하여 관찰한 결과, PDK2가 발현되어 있지 않은 세포와 비교해 PDK2가 과발현되어 있는 세포에서 조골세포의 분화가 현저히 억제되어 있는 것을 확인하였다(도1, B,C). 골 형성과 관련이 있는 유전자와 PDK2의 연관성을 확인하기 위해 조골세포 분화 유도 후 7일, 14일, 21일 및 28일째에 RT-PCR을 수행한 결과, 시간이 경과할수록 BMP2 (bone morphogenetic protein 2)와 OC (osteocalcin)의 발현량이 PDK2가 과발현되어 있는 세포에서 억제되어 있는 것을 확인하였다(도1, D). 상기 결과를 토대로, PDK2가 조골세포의 분화를 억제하는 기능을 갖고 있다는 것을 확인할 수 있다.

<실시예 2>

PDK2 발현여부에 따른 일차배양한 마우스 골수줄기세포의 분화정도 평가

PDK2가 정상적으로 발현되어 있는 야생형의 C57BL6/J 암컷 마우스와 PDK2가 결손되어 있는 C57BL6/J 암컷 마우스의 적혈구를 제거한 후 70 μ m의 나일론 mash (BD Falcon, 352350)으로 필터링하여 10% FBS가 첨가된 α -MEM배지에서 3일간 배양

하였다. 배지의 절반을 7일 동안 3회 교체하였다. 골수줄기세포를 10% FBS, b-gp 8 mM 및 ascorbic acid 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 포함된 α -MEM 배지에서 배양하면서 배지를 매 3일마다 교환하였다. 3일째에 4% 파라포름알데히드로 세포를 고정한 후 ALP 용액(SIGMA, No.86)을 이용해 ALP 염색을 시행하였다. 14일째에 4% 파라포름알데히드로 세포를 고정한 후 5% silver nitrate 용액으로 von Kossa 염색을 시행하였다. 골형성과 관련된 유전자의 발현정도를 RT-PCR을 통해 확인하였다.

골수줄기세포의 분화를 확인할 수 있는 ALP 염색과 von Kossa 염색 결과 PDK2가 정상적으로 발현되어 있는 마우스의 골수줄기세포와 비교해 PDK2가 결손된 마우스의 골수줄기세포에서 세포의 분화가 현저히 증가되어 있음을 확인하였다(도2 A,B). 골형성과 관련된 유전자의 발현량을 RT-PCR을 통해 확인한 결과, 골수줄기세포의 배양 시간이 경과할수록 PDK2가 결손된 마우스에서 골형성 관련 유전자들의 발현이 야생형과 비교해 현저히 증가되어 있음을 확인하였다(도2, C). 상기 결과를 토대로, PDK2가 결손되면 동물의 골수줄기세포의 분화가 증가되어 여성 갱년기 질환 중 하나인 골다공증의 증상이 완화될 수 있음을 알 수 있었다.

<실시예 3>

PDK2 발현여부에 따른 조골세포 전구체의 분화정도 비교

PDK2가 정상적으로 발현되어 있는 야생형의 C57BL6/J 암컷 마우스와 PDK2가 결손되어 있는 C57BL6/J 암컷 마우스의 적혈구를 제거한 후 70 μm 의 나일론 mash(BD Falcon, 352350)으로 필터링하여 10% FBS가 첨가된 α -MEM배지에서 3일간 배양하였다. 배지의 절반을 7일 동안 3회 교체하였다. 골수줄기세포를 10% FBS, b-gp 8 mM 및 ascorbic acid 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 포함된 α -MEM 배지에서 배양하면서 배지를 매 3일마다 교환하였다. 콜로니 형성 유닛(colony formation units, CFUs)의 형성을 관찰하기 위해, 세포 배양 3일째 및 7일째에 세포를 고정하고 ALP 염색을 하여 CFU-조골세포(CFU-OB)를 검출하였다. 콜로니의 크기가 직경 1mm 이상인 것만을 카운팅하였다. 동일한 플레이트를 2% 에탄올에 용해된 0.2% 크리스탈 바이올렛용액으로 1시간동안 염색하여 CFU-섬유아세포(CFU-fibroblast, CFU-F)를 검출하였다. 플레이트를 세척한 후 자연 건조하였다. 콜로니의 직경이 1mm 이상인 것만 카운팅하였다.

조골세포의 전구체라고 할 수 있는 섬유아세포의 분화정도를 평가한 결과,

PDK2가 결손되어 있는 마우스에서 일차배양된 섬유아세포의 분화가 PDK2가 정상적으로 발현되어 있는 야생형 마우스와 비교해 현저히 증가되어 있음을 확인하였다(도3).

<실시예 4>

난소절제술이 시행된 마우스에서 PDK2 발현여부에 따른 체중변화 및 골 흡수 평가

PDK2가 정상적으로 발현되어 있는 야생형의 C57BL6/J 암컷 마우스와 PDK2가 결손되어 있는 C57BL6/J 암컷 마우스를 사육하며 당업계에서 통상적인 방법으로 난소절제술을 시행하여 여성 갱년기 동물 모델을 유도하였다. 난소절제술을 시행한 후 5주간 동물을 사육하며 체중변화를 관찰하였고, 매주 1회 동물을 avertin으로 마취한 후 Piximus instrument 및 소프트웨어 버전 1.4 (GE. Lunar, Madison, WI)를 이용하여 골 미네랄 밀도 (bone mineral density, BMD)를 측정하였다.

(i) PDK2가 정상적으로 발현되어 있는 야생형 마우스의 경우 난소절제술을 시행한 군에서 정상군과 비교해 체중이 증가하는 경향을 나타내어, 난소절제술로 유도된 여성 갱년기 질환 중 하나인 체중 증가현상을 확인하였다. 이에 반해, PDK2가 결손된 마우스의 경우, 난소절제술을 시행한 후에도 정상군과 체중이 동일하게 유지되는 것을 확인할 수 있었다(도4, A). (ii) PDK2가 정상적으로 발현되어 있는 야생형 마우스의 경우 난소절제술을 시행한 군에서 정상군과 비교해 요추와 대퇴골의 BMD가 감소하는 경향을 나타내어, 난소절제술로 유도된 여성 갱년기 질환 중 하나인 골다공증 현상을 확인하였다. 이에 반해, PDK2가 결손되어 있는 마우스의 경우, 난소절제술을 시행한 후에도 정상군과 비교해 요추와 대퇴골의 BMD가 동일한 수준으로 유지되는 것을 확인할 수 있었다(도4, B,C). 상기한 결과를 토대로, PDK2의 발현을 억제하여 체중 증가, 골다공증 등 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료가 가능함을 알 수 있다.

<실시예 5>

난소절제술이 시행된 마우스에서 PDK2 발현여부에 따른 트라베큘라 손실 경향 평가

마우스를 해부하여 왼쪽 대퇴골을 분리하고 4% 포르말린으로 24시간 고정한 후 80% 에탄올로 고정액을 교환하여 MicroCT 분석을 하였다. 동물 뼈의 삼차원적 구조를 분석하기 위해 Micro-CT 시스템 (eXplore Locus SP scanner, GE Healthcare)을 이용해 조직형태계측 분석 (histomorphometric analysis)을 수행하였다. 모든 형태계측 파라미터들은 eXplore MicroView, 버전 2.2(GE Healthcare)를 이용해 측정하였다.

PDK2가 정상적으로 발현되어 있는 야생형 마우스의 경우, 난소절제술을 시행한 마우스군에서 정상군과 비교해 트라베큘라가 현격하게 감소되어 있는 것을 볼 수 있는 반면, PDK2가 결손되어 있는 마우스의 경우 난소절제술을 시행한 마우스군과 정상군이 동등한 정도의 트라베큘라 수준을 유지하고 있음을 확인할 수 있었다(도5). 이를 토대로, PDK2를 억제하여 여성 갱년기 질환 중 하나인 골다공증의 예방 또는 치료가 가능함을 알 수 있었다.

<실시에 6>

난소절제술이 시행된 마우스에서 PDK2 발현여부에 따른 골 형성 및 골 흡수 지표의 평가

골 형성의 지표인 osteocalcin(OC)과 골 흡수의 지표인 C-terminal telopeptide(CTX)의 측정을 통해 PDK2 발현여부에 따른 골 형성 및 골 흡수의 정도를 평가하였다.

난소절제술이 시행된 마우스에서 골 형성의 지표인 OC의 혈중 함량을 측정한 결과, PDK2가 정상적으로 발현되어 있는 야생형 마우스군에 비해 PDK2가 결손되어 있는 마우스군에서 OC의 혈중함량이 더 많이 증가되어 있는 것을 확인하였다(도6, A), 또한, 골 흡수의 지표인 CTX의 혈중 함량을 측정한 결과, PDK2가 정상적으로 발현되어 있는 야생형 마우스군에 비해 PDK2가 결손되어 있는 마우스군에서 CTX의 혈중함량이 감소되어 있는 것을 확인하였다(도6, B), 상기 결과는 PDK2의 발현이 억제되면, 골 형성은 증가되고 골 흡수는 감소된다는 것을 보여주는 것으로, PDK2를 억제하면 여성 갱년기 질환 중 하나인 골다공증의 예방 또는 치료가 가능할 수 있음을 알 수 있다.

<실시예 7>

난소절제술이 시행된 마우스에서 PDK2 발현여부에 따른 파골세포의 활성화 정도 평가

TUNEL 염색을 통해 파골세포의 활성화 정도를 평가하였다. TUNEL 염색은 상업적으로 구매할 수 있는 키트 (Roche 11 684 795 910)로 제조자의 지시에 따라 진행하였다. 형광 현미경을 통해 녹색구로 보이는 것을 양성반응으로 판정하였다.

PDK2가 정상적으로 발현되어 있는 야생형 마우스의 경우, 난소절제술을 시행한 마우스군에서 정상군과 비교해 파골세포의 활성화가 증가된 것을 볼 수 있으나, PDK2가 결손되어 있는 마우스의 경우, 난소절제술을 시행한 마우스군에서 정상군과 비교해 파골세포의 활성화가 동등한 정도로 낮게 유지됨을 확인할 수 있었다(도7).

상기 결과를 종합적으로 평가해 보았을 때, PDK2의 발현 또는 활성을 억제하면 여성 갱년기 질환이 완화됨을 알 수 있다.

【산업상 이용가능성】

이상 살펴본 바와 같이, PDK2가 여성 갱년기 질환과 밀접한 관련이 있으며, PDK2의 발현 또는 활성을 억제하면 여성 갱년기 질환이 완화될 수 있는 바, PDK2의 발현 또는 활성을 억제할 수 있는 물질을 스크리닝 함으로써 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료제를 탐색할 수 있으며, PDK2 저해제를 유효성분으로 포함하는 조성물이 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료제로 사용될 수 있다는 점에서 본 발명은 산업상 이용가능성이 높다.

【서열목록 프리텍스트】

【청구의 범위】**【청구항 1】**

하기 단계를 포함하는 여성 갱년기 질환 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법:

- (a) 세포에 시험물질을 접촉시키는 단계;
- (b) 시험물질을 접촉시키지 않은 대조군과 비교하여 PDK2 단백질의 발현 또는 활성을 감소시키는 시험물질을 선별하는 단계

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 세포는 PDK2를 발현하는 세포 또는 PDK2 발현이 증가된 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 3】

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 여성 갱년기 질환은 골다공증, 고열, 다한증, 우울증, 불면증, 요실금, 부종, 안면홍조, 기억력 감퇴, 두통, 신경과민증, 현기증, 심계항진, 빈맥, 메스꺼움, 관절통, 근육통, 수족냉증 및 체중 증가로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 4】

PDK2 저해제를 유효성분으로 포함하는 조골세포(osteoblast) 분화 촉진용 조성물.

【청구항 5】

하기 단계를 포함하는 조골세포 분화 촉진용 물질의 스크리닝 방법:

- (a) 세포에 시험물질을 접촉시키는 단계;
- (b) 시험물질을 접촉시키지 않은 대조군과 비교하여 PDK2 단백질의 발현 또는 활성을 감소시키는 시험물질을 선별하는 단계; 및
- (c) 상기 (b) 단계에서 선별된 시험물질을 조골세포와 접촉시켜 분화가 촉진되는 시험물질을 선별하는 단계.

【청구항 6】

PDK2 저해제를 유효성분으로 포함하는 여성 갱년기 질환 예방 또는 치료용 조성물.

【청구항 7】

제6항에 있어서, 상기 PDK2 저해제는 PDK2에 대한 siRNA 또는 antisense RNA인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 8】

제6항에 있어서, 상기 PDK2는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 9】

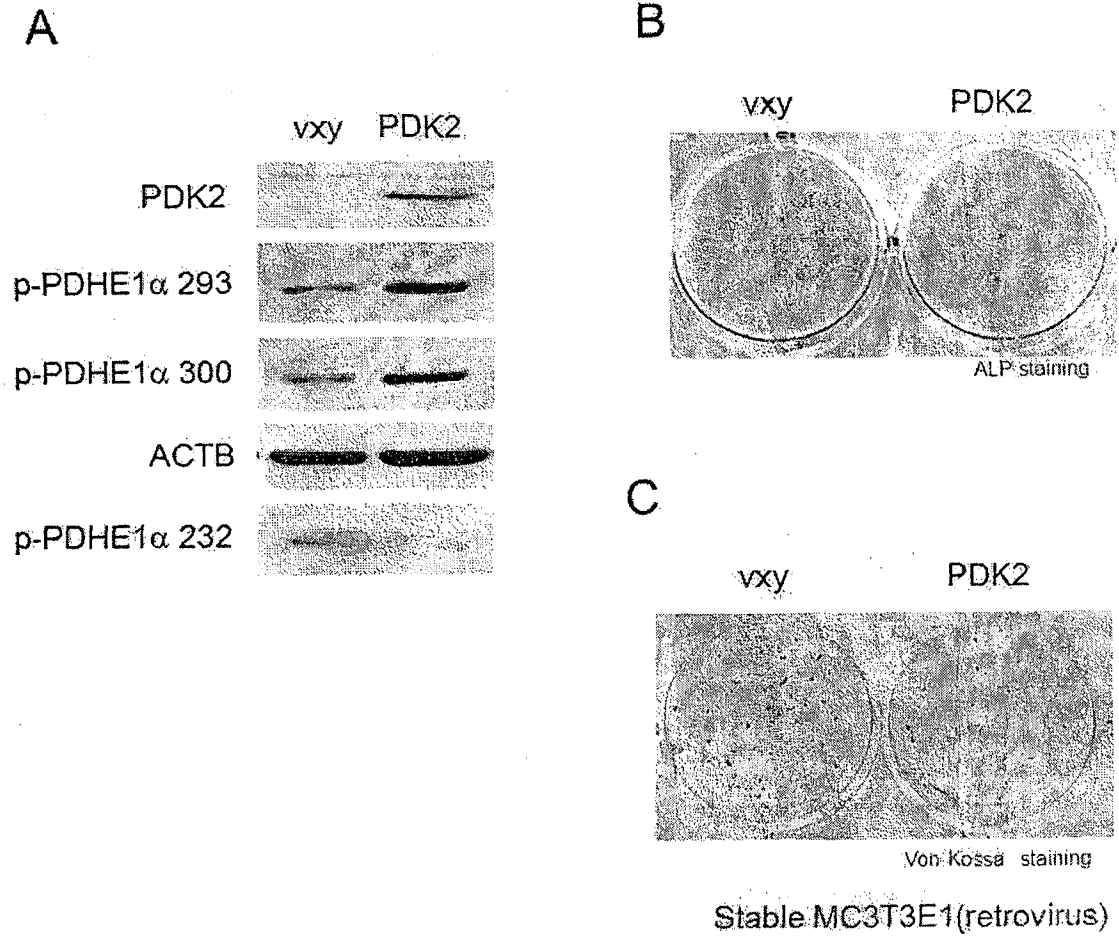
제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 여성 갱년기 질환은 골다공증, 고열, 다한증, 우울증, 불면증, 요실금, 부종, 안면홍조, 기억력 감퇴, 두통, 신경과민증, 현기증, 심계항진, 빈맥, 메스꺼움, 관절통, 근육통, 수족냉증 및 체중 증가로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 10】

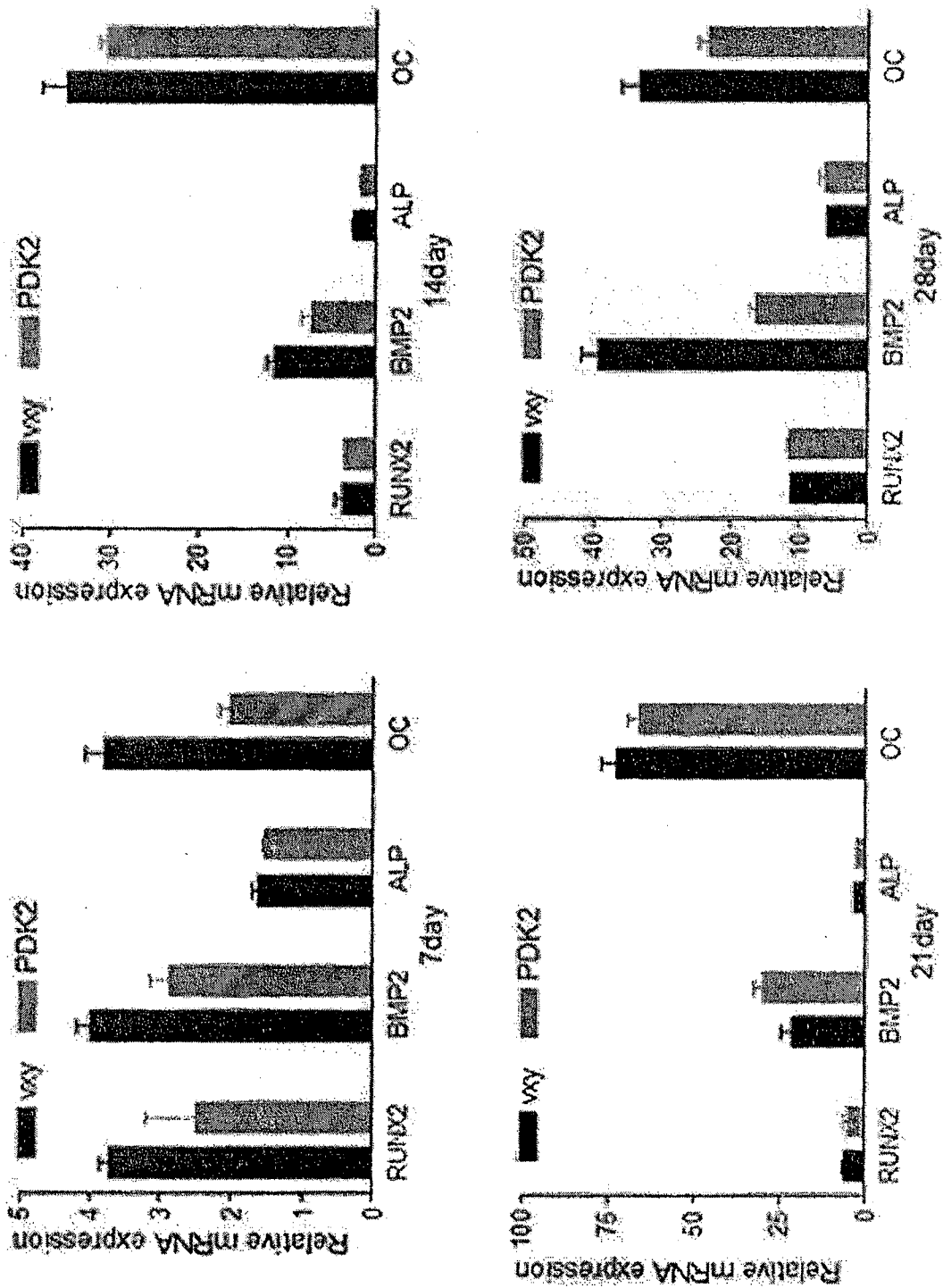
제9항에 있어서, 상기 골다공증은 난소절제술에 의해 촉발되는 골다공증인 것을 특징으로 하는 조성물.

【도면】

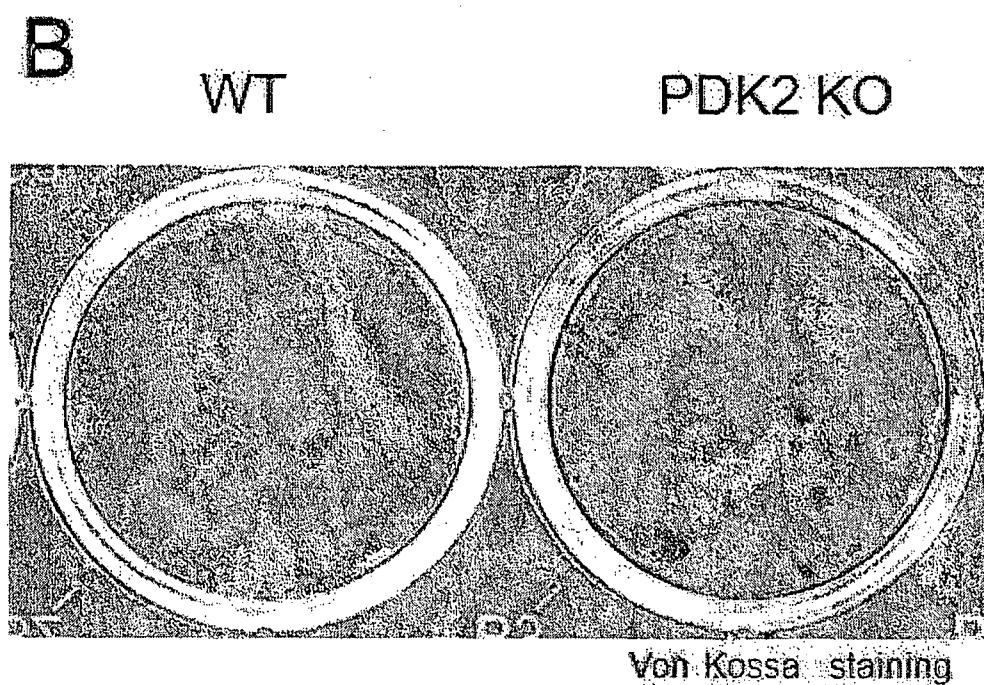
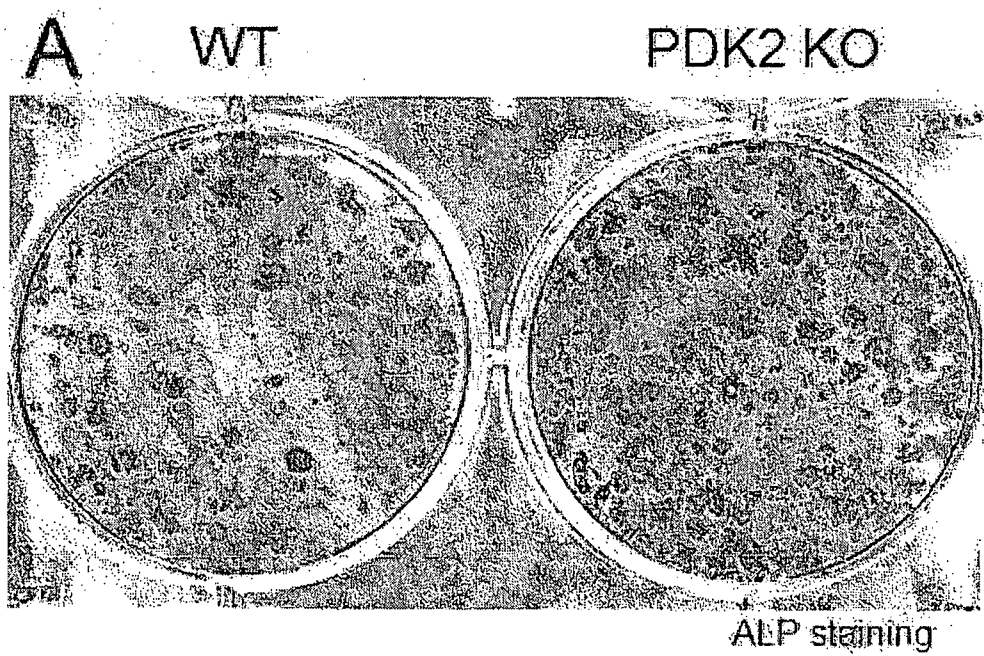
【도 1】



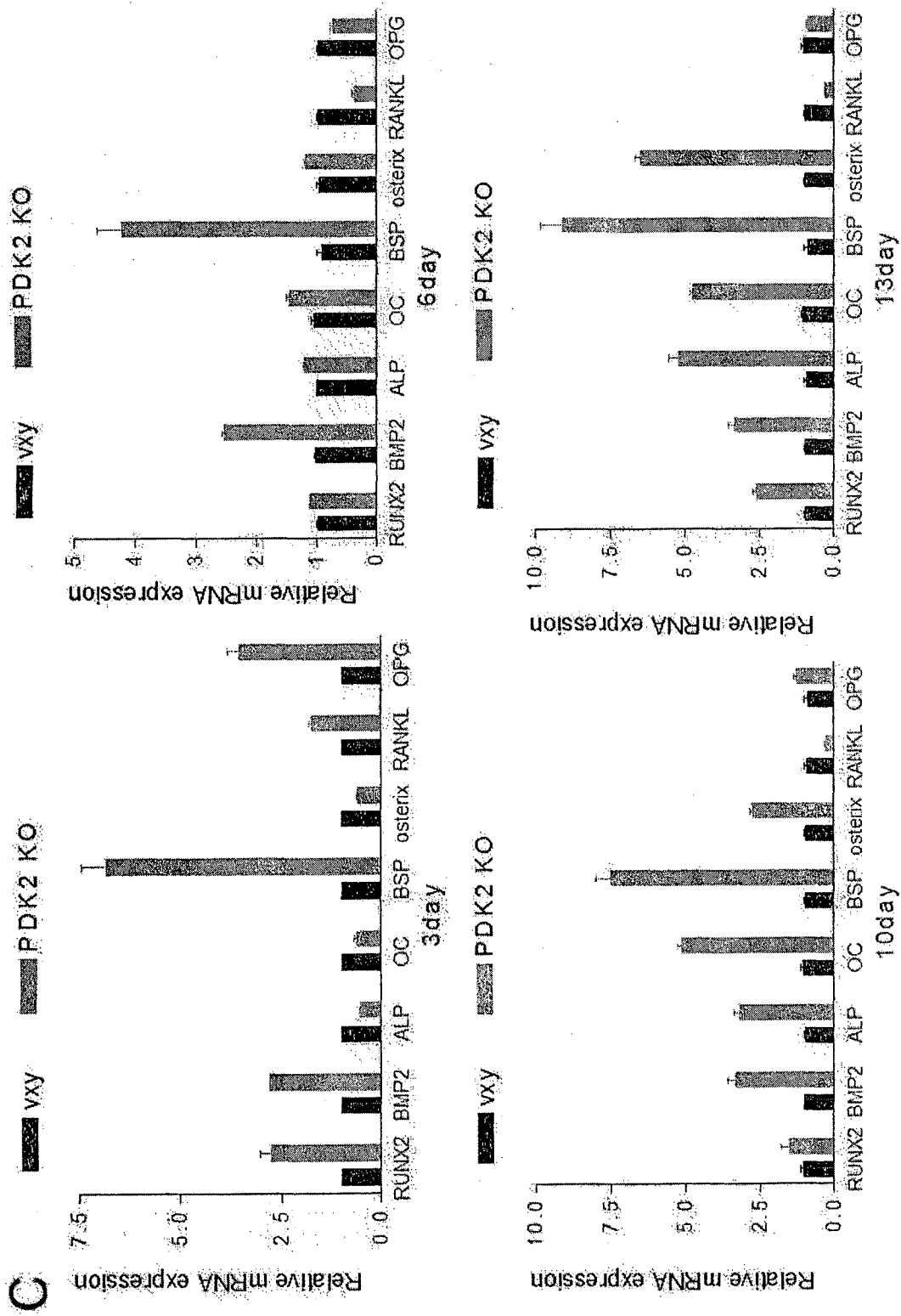
D



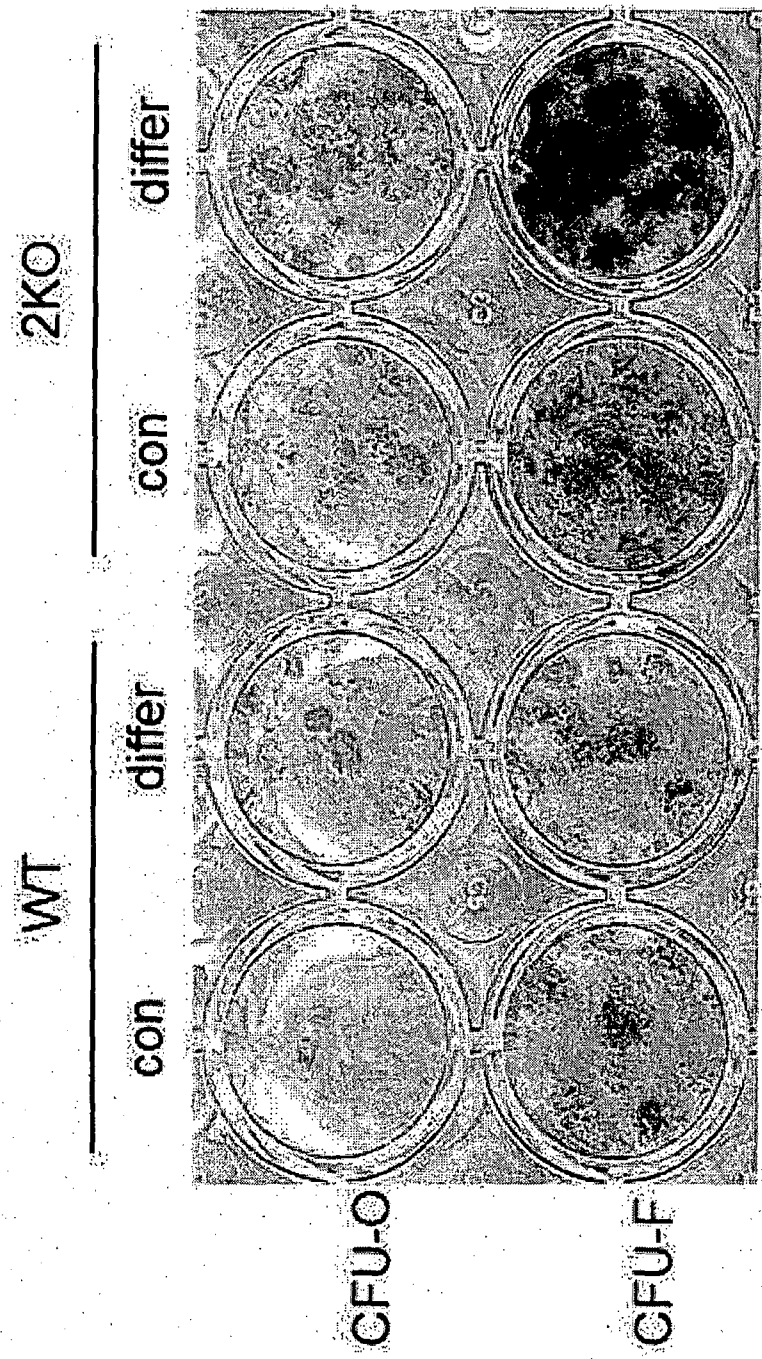
【도 2】



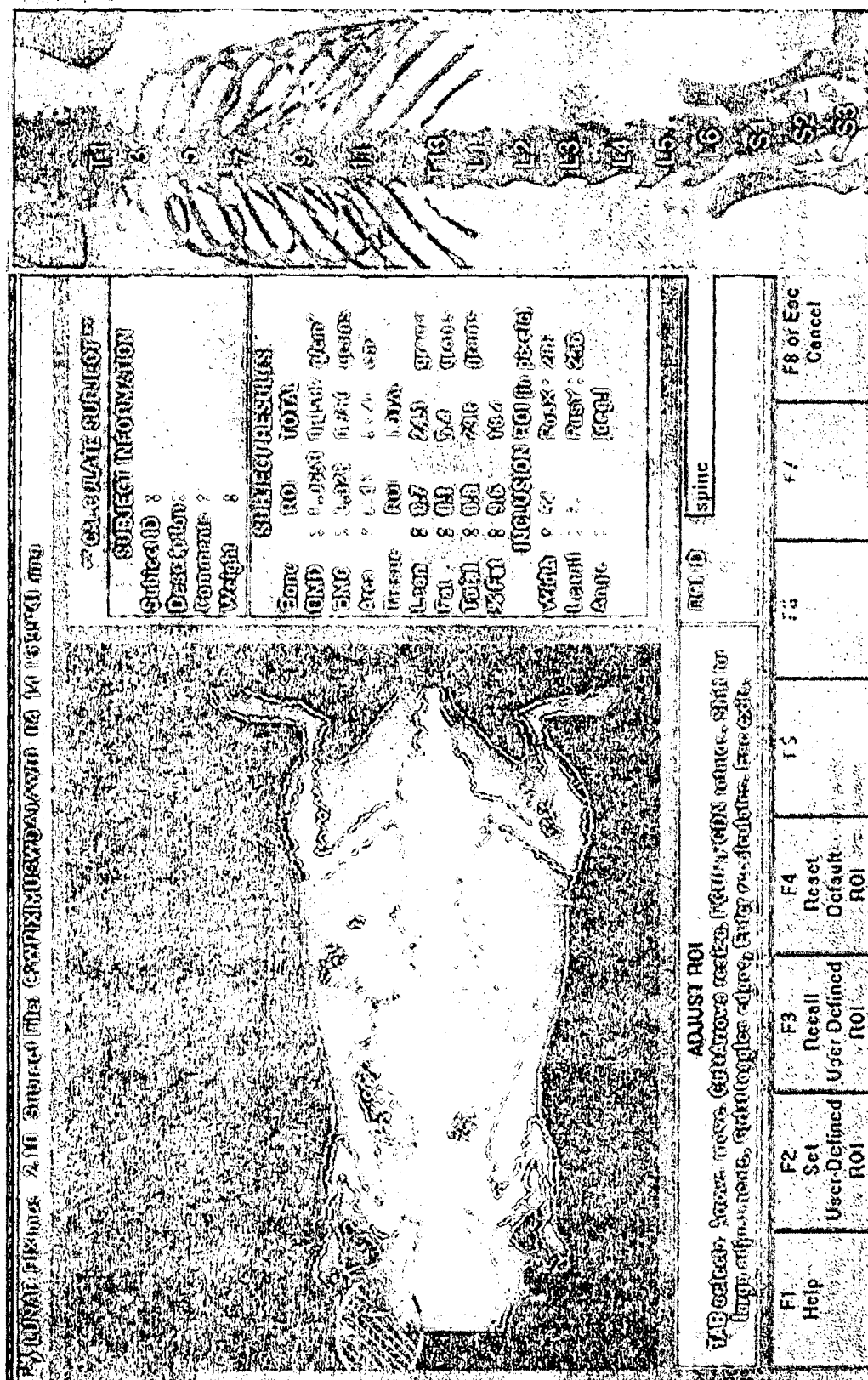
BMSC culture



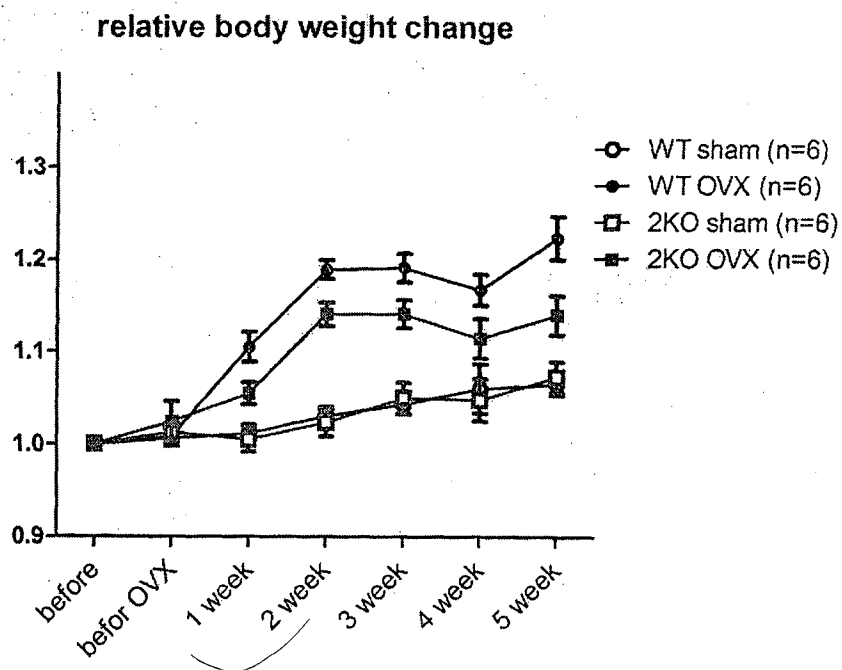
【도 3】



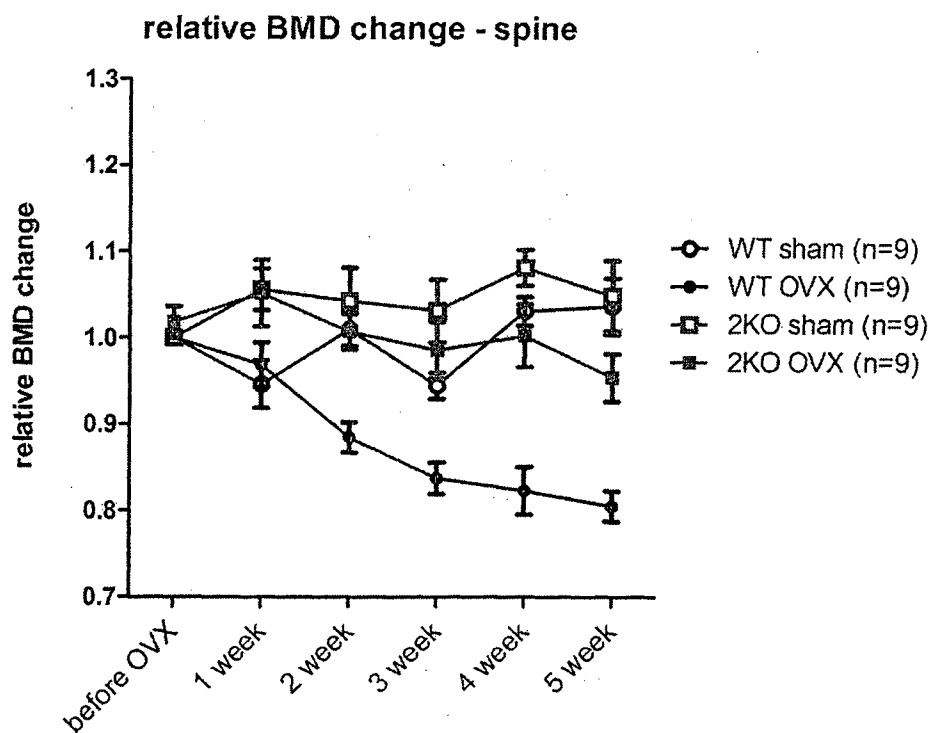
【도 4】



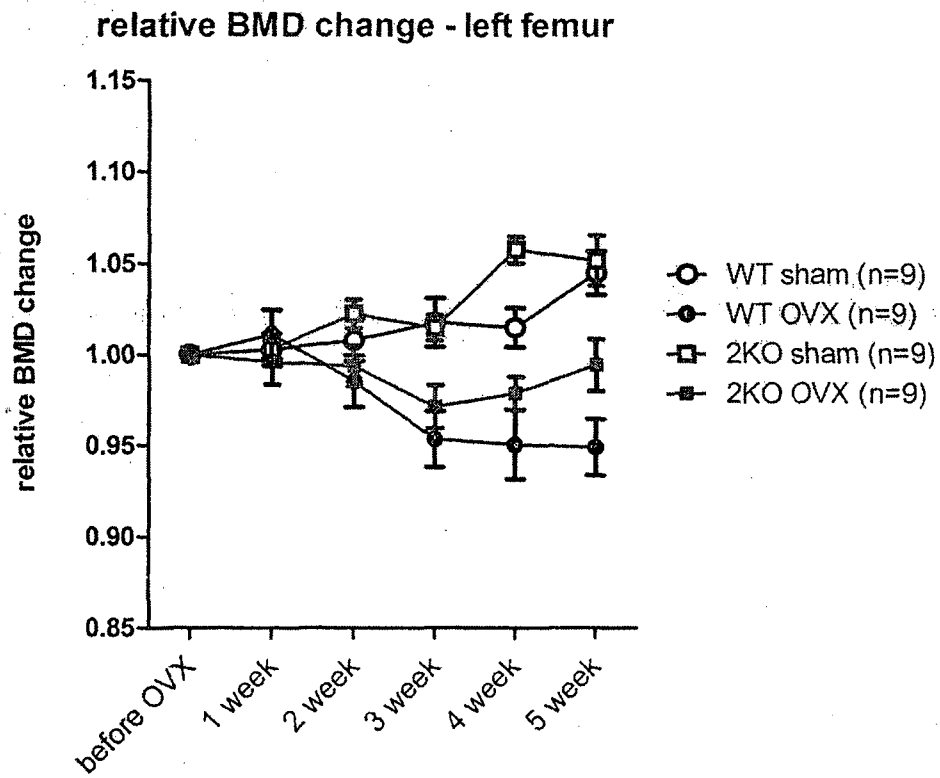
A.



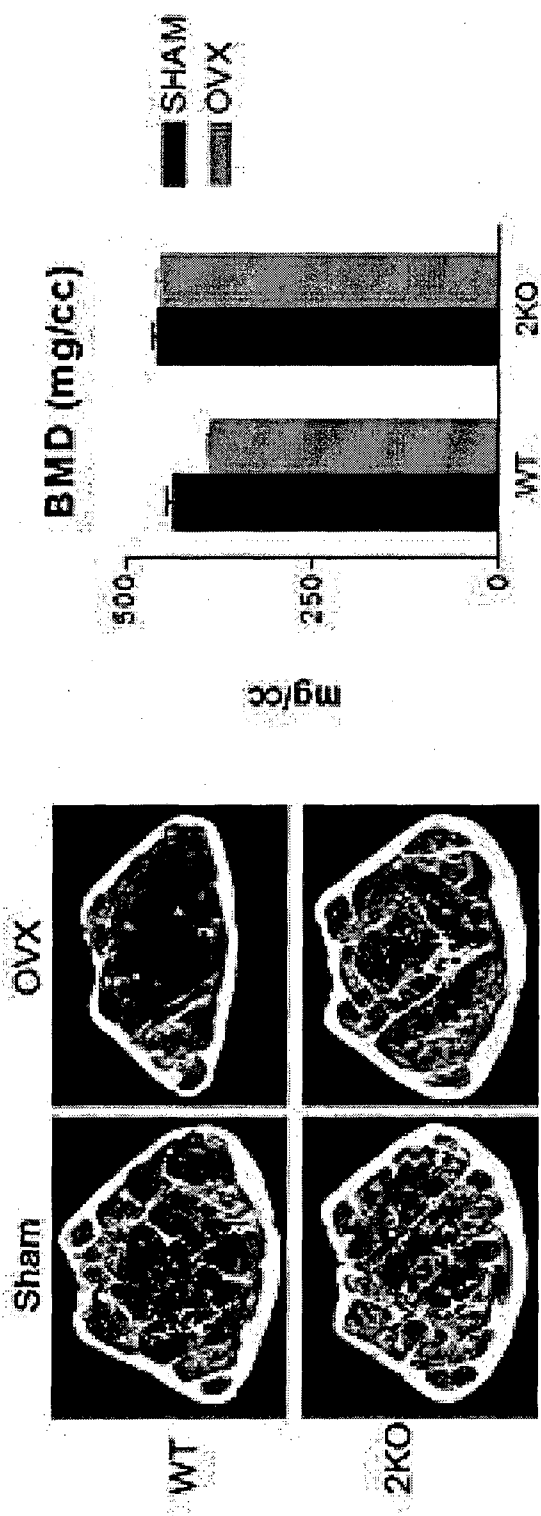
B.



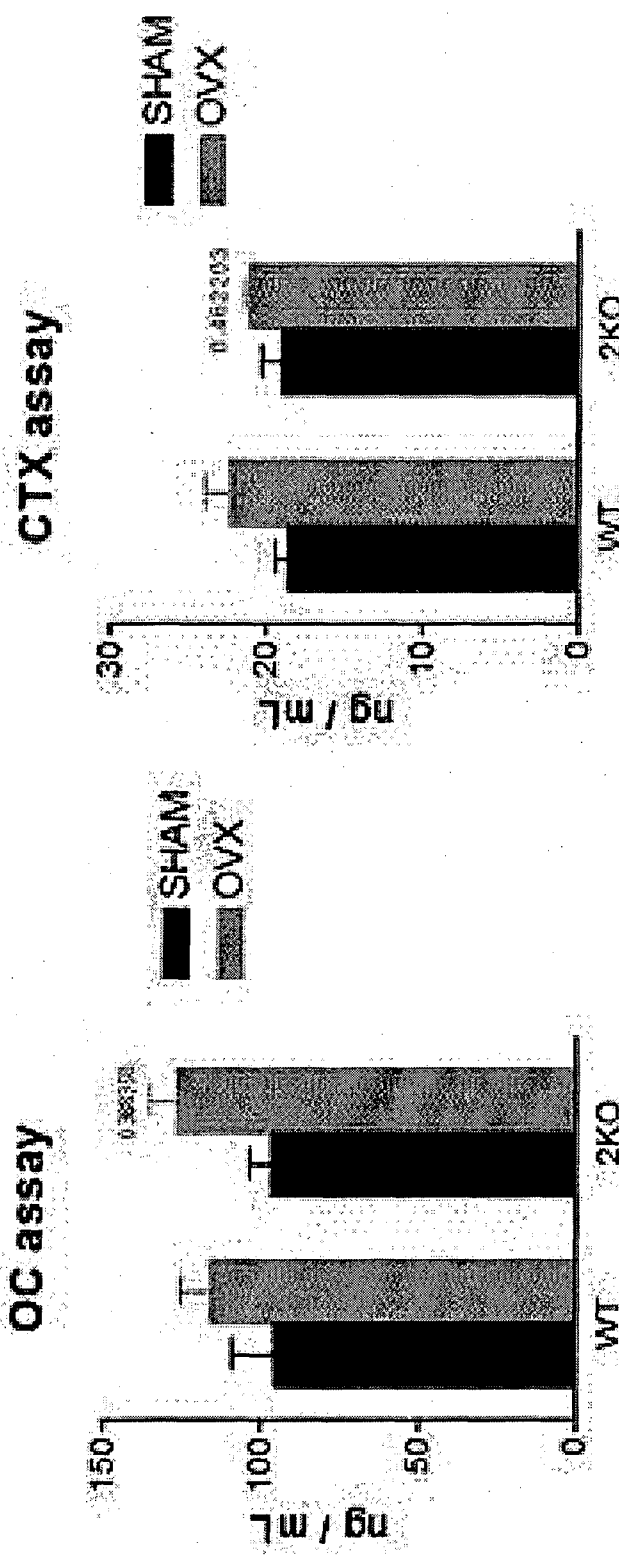
C.



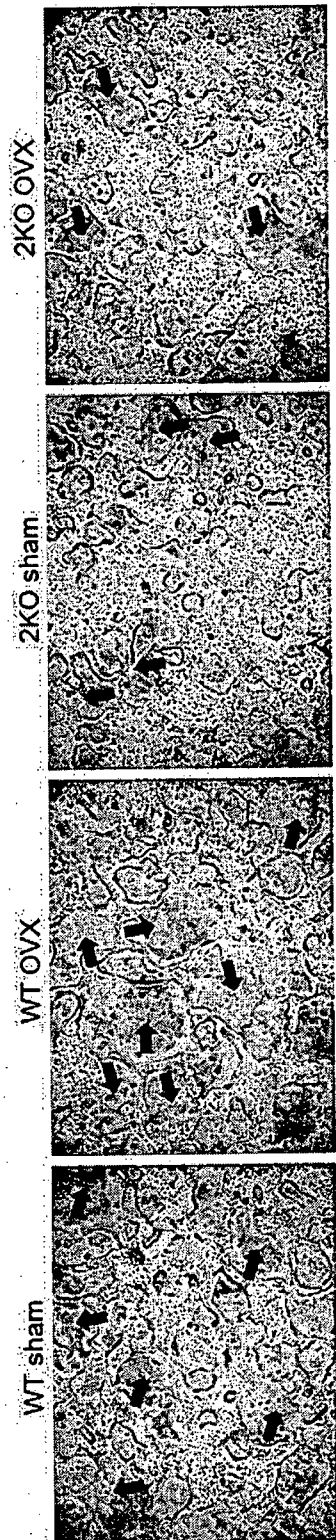
【도 5】



【도 6】



【도 7】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/001250**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****G01N 33/50(2006.01)i, C12N 5/071(2010.01)i, C12Q 1/02(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61P 9/00(2006.01)i, A61P 15/02(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/50; C12Q 1/02; A61K 39/395; A61P 3/10; A61K 45/00; A61K 31/41; C12N 15/113; A61K 31/7088; A61K 31/565; C12N 5/071; A61K 48/00; A61P 9/00; A61P 15/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: PDK2, screening, inhibitor, over-expression, osteoblast, differentiation, osteoporosis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2013-006783 A (NAGASAKI UNIV.) 10 January 2013 See all claims; paragraphs [0027]-[0048], [0069]-[0072].	1-10
A	WO 2006-042062 A2 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 20 April 2006 See claims 30, 57, 71.	1-10
A	US 2012-0004284 A1 (OSTROV, David A. et al.) 05 January 2012 See claims 14, 21.	1-10
A	KR 10-2013-0118658 A (EULJI UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION) 30 October 2013 See claims 1-3.	1-10
A	KR 10-2013-0077843 A (GENENTECH, INC.) 09 July 2013 See claims 1-11.	1-10
A	NCBI, Genbank Accession No. NP_002602.2 (05 May 2014) See sequence.	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 OCTOBER 2015 (27.10.2015)

Date of mailing of the international search report

27 OCTOBER 2015 (27.10.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/001250

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
JP 2013-006783 A	10/01/2013	NONE	
WO 2006-042062 A2	20/04/2006	US 2009-0209618 A1 US 2015-0133524 A1	20/08/2009 14/05/2015
US 2012-0004284 A1	05/01/2012	US 8492344 B2 WO 2010-027458 A2 WO 2010-027458 A3	23/07/2013 11/03/2010 17/06/2010
KR 10-2013-0118658 A	30/10/2013	NONE	
KR 10-2013-0077843 A	09/07/2013	CN 102985437 A EP 2576580 A2 JP 2013-531978 A WO 2011-150241 A2 WO 2011-150241 A3 WO 2011-150241 A8	20/03/2013 10/04/2013 15/08/2013 01/12/2011 08/03/2012 06/12/2012

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/50(2006.01)i, C12N 5/071(2010.01)i, C12Q 1/02(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61P 9/00(2006.01)i, A61P 15/02(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 33/50; C12Q 1/02; A61K 39/395; A61P 3/10; A61K 45/00; A61K 31/41; C12N 15/113; A61K 31/7088; A61K 31/565; C12N 5/071; A61K 48/00; A61P 9/00; A61P 15/02

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: PDK2, 스크리닝, 저해제, 과발현, 조골세포, 분화, 골다공증

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	JP 2013-006783 A (NAGASAKI UNIV.) 2013.01.10. 청구항 전항; 문단 [0027]-[0048], [0069]-[0072] 참조.	1-10
A	WO 2006-042062 A2 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 2006.04.20. 청구항 제30, 57, 71항 참조.	1-10
A	US 2012-0004284 A1 (OSTROV, DAVID A. 등) 2012.01.05. 청구항 제14, 21항 참조.	1-10
A	KR 10-2013-0118658 A (울지대학교 산학협력단) 2013.10.30. 청구항 제1-3항 참조.	1-10
A	KR 10-2013-0077843 A (제넨테크, 인크.) 2013.07.09. 청구항 제1-11항 참조.	1-10
A	NCBI, Genbank Accession No. NP_002602.2 (2014.05.05.) 서열 참조.	1-10

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 10월 27일 (27.10.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 10월 27일 (27.10.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



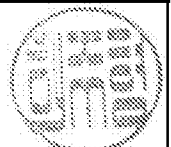
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2013-006783 A	2013/01/10	없음	
WO 2006-042062 A2	2006/04/20	US 2009-0209618 A1 US 2015-0133524 A1	2009/08/20 2015/05/14
US 2012-0004284 A1	2012/01/05	US 8492344 B2 WO 2010-027458 A2 WO 2010-027458 A3	2013/07/23 2010/03/11 2010/06/17
KR 10-2013-0118658 A	2013/10/30	없음	
KR 10-2013-0077843 A	2013/07/09	CN 102985437 A EP 2576580 A2 JP 2013-531978 A WO 2011-150241 A2 WO 2011-150241 A3 WO 2011-150241 A8	2013/03/20 2013/04/10 2013/08/15 2011/12/01 2012/03/08 2012/12/06