



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0005120
(43) 공개일자 2010년01월13일

(51) Int. Cl.
A61K 38/14 (2006.01) *A61P 3/04* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-7023494
(22) 출원일자 2007년05월07일
심사청구일자 2009년11월12일
(85) 번역문제출일자 2009년11월10일
(86) 국제출원번호 PCT/KR2007/002232
(87) 국제공개번호 WO 2008/136547
국제공개일자 2008년11월13일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산 남구 무거2동 산29
(72) 발명자
김민선
서울특별시 송파구 오륜동 올림픽선수촌아파트
301동 1502호
남궁철
서울특별시 광진구 자양동 639-36
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 41 항

(54) 클러스터린을 이용한 체중 조절 장애 관련 질환의 진단, 예방 또는 치료 방법

(57) 요약

클러스터린은 탁월한 식욕억제 효과를 나타내므로, 비만 또는 비만 관련 질환을 치료하거나 방지하는 데에 유용하게 사용될 수 있고, 임상수준 이하 용량의 클러스터린을 렙틴과 함께 투여함으로써 렙틴의 식욕억제 효과를 증강시킬 수 있다.

(72) 발명자

장필금

경기도 광주시 쌍령동 현대2차아파트 202동 504호

윤병수

서울특별시 노원구 공릉2동 108 우방아파트 403동
906호

특허청구의 범위

청구항 1

개체에 치료적 유효량의 클러스터린을 투여하는 단계를 포함하는, 비만 또는 비만 관련 질환을 예방하거나 치료하는 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 비만 관련 질환이 과식증, 비만증을 수반한 내분비계 이상, 고지혈증, 심장병, 고혈압, 뇌졸중, 제2형 당뇨병, 내당능장애, 다낭성 난소증후군, 관절염, 인슐린저항성, 죽상동맥경화증, 관상동맥질환, 고지혈증, 담낭질환, 골관절염, 수면 무호흡증, 비알코올성 지방간염 및 암으로 이루어지는 군에서 선택된 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 개체가 포유류인 방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 포유류가 설치류, 돼지, 반추동물 및 영장류로 이루어진 군으로부터 선택된 방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 영장류가 인간인 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 클러스터린이 약제학적 제형인 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 약제학적 제형이 정제, 캡슐제, 주사액, 주사용 현탁제, 비강내 스프레이, 또는 경피용 패치인 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 클러스터린이 체중 kg 당 0.001 내지 1000 mg의 일일 투여량으로 투여된 방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 클러스터린이 시상하부내, 뇌실내, 정맥내, 복막내, 경구, 경피 또는 비강내로 투여된 방법.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 클러스터린이 렙틴과 복합형태로 투여된 방법.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 상기 클러스터린과 렙틴이 0.01:1 내지 1: 0.01의 중량비로 투여된 방법.

청구항 12

개체의 비만 또는 비만 관련 질환의 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 클러스터린의 용도.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 비만 관련 질환이 과식증, 내분비 이상, 트리글리세라이드 축적증, 심장병, 고혈압, 뇌졸중, 제2형 당뇨병, 당부하손상, 다낭 난소 증후군, 관절염, 인슐린 내성증, 죽상동맥경화증, 관상동맥질환, 고지혈증, 담낭질환, 골관절염, 수면 무호흡증, 비알코올성 지방간염 및 암으로 이루어지는 군에서 선택된

용도.

청구항 14

청구항 12에 있어서, 상기 개체가 포유류인 용도.

청구항 15

청구항 13에 있어서, 상기 포유류가 설치류, 돼지, 반추동물 및 영장류로 이루어진 군으로부터 선택된 용도.

청구항 16

청구항 14에 있어서, 상기 영장류가 인간인 용도.

청구항 17

청구항 12에 있어서, 상기 약제가 정제, 캡슐제, 주사액, 주사용 현탁제, 비강내 스프레이, 또는 경피용 패치인 용도.

청구항 18

청구항 12에 있어서, 상기 약제가 0.1 내지 99.5 중량%의 클러스터린을 포함한 용도.

청구항 19

청구항 12에 있어서, 상기 약제가 항비만제를 추가로 포함한 용도.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 상기 항비만제가 렙틴을 포함한 용도.

청구항 21

청구항 20에 있어서, 상기 약제가 클러스터린과 렙틴을 0.01:1 내지 1:0.01의 중량비로 포함한 용도.

청구항 22

클러스터린과 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 개체의 비만 또는 비만 관련 질환 치료 또는 예방용 약학조성물.

청구항 23

청구항 22에 있어서, 상기 비만 관련 질환이 과식증, 비만증을 수반한 내분비계 이상, 고지혈증, 심장병, 고혈압, 뇌졸중, 제2형 당뇨병, 내당능장애, 다낭성 난소증후군, 관절염, 인슐린저항성, 죽상동맥경화증, 관상동맥 질환, 고지혈증, 당뇨병, 골관절염, 수면 무호흡증, 비알코올성 지방간염 및 암으로 이루어지는 군에서 선택된 약학조성물.

청구항 24

청구항 22에 있어서, 상기 개체가 포유류인 약학조성물.

청구항 25

청구항 24에 있어서, 상기 포유류가 설치류, 돼지, 반추동물 및 영장류로 이루어진 군으로부터 선택된 약학조성물.

청구항 26

청구항 25에 있어서, 상기 영장류가 인간인 약학조성물.

청구항 27

청구항 22에 있어서, 상기 약학조성물이 약제학적 제형인 약학조성물.

청구항 28

청구항 27에 있어서, 상기 약제학적 제형이 정제, 캡슐제, 주사액, 주사용 현탁제, 비강내 스프레이, 또는 경피용 패치인 약학조성물.

청구항 29

청구항 22에 있어서, 상기 약학조성물이 0.1 내지 99.5 중량%의 클러스터린을 포함한 약학조성물.

청구항 30

청구항 22에 있어서, 상기 약제가 항비만제를 추가로 포함한 약학조성물.

청구항 31

청구항 30에 있어서, 상기 항비만제가 렙틴을 포함한 약학조성물.

청구항 32

청구항 31에 있어서, 상기 약학조성물이 클러스터린과 렙틴을 0.01:1 내지 1:0.01의 중량비로 포함한 약학조성물.

청구항 33

개체에 치료적 유효량의 클러스터린-인코딩 유전자를 투여하는 단계를 포함하는 비만 또는 비만 관련 질환을 예방 또는 치료하는 방법.

청구항 34

청구항 33에 있어서, 상기 유전자가 바이러스성 또는 비-바이러스성 벡터를 사용한 방법.

청구항 35

청구항 34에 있어서, 상기 바이러스성 벡터가 아데노바이러스, 아데노-부속 바이러스, 헬퍼-의존형 아데노바이러스 및 레트로바이러스 벡터로 이루어진 군에서 선택된 방법.

청구항 36

청구항 33에 있어서, 클러스터린-인코딩 유전자가 개체의 시상하부내, 뇌실내 또는 경막내 주입에 의해 투여된 방법.

청구항 37

클러스터린 발현을 하향조절하는 조절제를 치료적 유효량으로 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 식욕 부진증 및 악액질을 동반한 개체의 식욕감퇴를 예방 또는 치료하는 방법.

청구항 38

청구항 37에 있어서, 상기 식욕감퇴가 암-관련 식욕감퇴, 신경성 식욕감퇴 또는 가성 식욕감퇴인 방법.

청구항 39

청구항 37에 있어서, 상기 조절제가 클러스터린 유전자 발현에 대한 RNA 간섭을 중개하는 RNA, 클러스터린 전사 억제제, 전사된 클러스터린 mRNA의 번역억제제 및 클러스터린 국제화 억제제로 이루어지는 군에서 선택된 방법.

청구항 40

청구항 39에 있어서, 상기 RNA 간섭을 중개하는 RNA가 안티센스 RNA, 간섭 RNA, 짧은 헤어핀 RNA(shRNA) 또는 짧은 간섭 RNA(siRNA)인 방법.

청구항 41

청구항 40에 있어서, 상기 짧은 헤어핀 RNA가 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열을 지닌 cDNA에 상보적인 방법.

명세서

기술분야

- <1> 본 발명은 개체에 치료적 유효량의 클러스터린을 투여하는 단계를 포함하는 비만 또는 비만 관련 질환을 예방하거나 치료하는 방법; 비만 또는 비만 관련 질환의 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 진단적 목적으로 클러스터린을 이용하는 용도; 및 클러스터린 발현을 하향 조절하는 조절제를 치료적 유효량으로 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 식욕부전증 및 악액질을 예방하거나 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- <2> 비만은 장기간에 걸쳐 에너지 섭취량이 에너지 소비량을 초과하여 잉여 에너지는 지방에 저장될 때 발생한다.
- <3> 정상 상태에서 식욕은 말초에서 유래한 인자들에 의하여 조절을 받는데, 그 중 대표적인 것이 렙틴과 인슐린이다 (Schwartz 등, Nature, 404:661-671, 2000). 체중이 증가하면 혈중의 렙틴과 인슐린 농도가 증가하며, 섭식 중추인 시상하부에 작용하여 식욕을 억제하고, 에너지 소모를 촉진함으로써 증가한 체중을 원상 복귀하도록 한다.
- <4> 에너지 균형을 조절하는 이러한 정상적인 피드백 시스템은 체중 증가를 예방하는 일종의 보호 기전이나, 비만증에서는 피드백 시스템이 적절하게 작용하지 않기 때문에 비만증이 악화되고 동반 질환을 야기하게 된다 (Kopelman 등, Nature, 404:635-643, 2000).
- <5> 렙틴은 지방세포에 의해 분비되며, 시상하부에 작용하여 음식 섭취를 줄이고, 에너지 소비를 자극함으로써 체지방량을 감소시키는 작용을 가지는 가장 대표적인 호르몬이다 (Halaas 등, Science, 269:543-546, 1995). 렙틴 또는 렙틴 수용체의 결핍이 결핍된 인간과 동물에서 심한 비만증과 과식증이 발생함이 보고되어 렙틴이 정상적인 식욕 및 체중 유지에 중요한 인자임이 입증되었다 (Montague 등, Nature, 387:903-908, 1997; Clement 등, Nature, 392:398-401, 1998).
- <6> 그러나, 대부분 비만증을 가진 사람의 혈액에서 렙틴 농도가 증가되어 있어 렙틴의 부족 보다는 렙틴에 대한 저항성이 비만을 야기하는 원인 기전으로 제시되었다 (Maffei 등, Nat., Med., 1:1155-1161, 1995; Fredrich 등, Nat., Med., 1:1311-1314, 1995). 비만증에서 렙틴 감수성이 저하되는 기전으로, 섭식 중추인 시상하부 신경세포에서 렙틴의 신호 전달이 약해지거나, 중추신경계 내로 렙틴 수송의 감소가 제안되었으나, 자세한 분자생물학적 기전은 아직 잘 밝혀져 있지 않다 (Halaas 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:8878-8883, 1997; Banks, Curr. Pharm. Des., 7:125-133, 2001).
- <7> 클러스터린(또한 아포리포단백질 J로도 명명됨)은 다양한 조직과 체액에 광범위하게 분포된 70~80 kilo Dalton 질량의 이형이합체 단백질이다. 클러스터린은 단일 유전자에 의해 인코딩되고, 그 단백질 산물은 α -사슬 및 β -사슬을 분해된 후 5개의 이황화결합으로 연결되어 있으며, 당질이 최종 질량의 30%를 차지할 정도로 광범위하게 당화된 상태로 존재 한다 (Jones 등, Int. J. Biochem. Cell Biol., 34:427-431, 2002).
- <8> 클러스터린은 1983년에 다양한 세포들의 응집(클러스터링)을 증강시키는 작용을 가지는 정액에서 분리된 당단백질로 처음으로 보고되었다 (Fritz 등, Biol. Reprod., 28:1173-1188, 1983). 그 후 클러스터린은 세포의 분화, 증식 및 세포사 (apoptosis), 지질 수송, 체장 베타-세포의 재생 및 신경세포 퇴화 과정 등 다양한 생물학적 조절 작용에 관여함이 보고되었다 (Trogakos 등, Exp. Gerontol., 37:1175-1187, 2002; Choi-Miura 등, Neurobiol. Aging, 17:717-722, 1996; Jenne 등, J. Biol. Chem., 266:11030-11036, 1991; Shannan 등, J. Mol. Histol., 37:183-188, 2006; Kim 등, Diabetologia, 49:311-320, 2006; Matsubara 등, Biochem. J., 316:671-679, 1996). 또한 클러스터린은 세포로부터 분비되어 다양한 단백질의 구조를 안정화시키는 샤페론(chaperon)으로서 역할을 수행하기도 한다(Humpleys 등, J. Biol. Chem., 274:6875-6881, 1999).
- <9> 최근 클러스터린은 렙틴과 결합하여 렙틴 작용을 조정하는 혈장에 존재하는 단백질을 동정하는 과정에서 렙틴 결합 단백질로 분리되었다 (Bajari 등, FASEB J., 17:1505-1507, 2003). 또한, 클러스터린은 섭식 및 에너지 항상성 조절중추인 시상하부에서 풍부하게 발현 된다 (Danik 등, J. Comp. Neurol., 334: 209-227, 1993).
- <10> 본 발명자들은 일련의 연구를 통하여 클러스터린이 강력한 식욕 및 체중 감소 작용을 생리 활성 물질임을 알게

되었고, 따라서 클로스터린을 체중 조절 장애 질환의 예방 및 치료에 이용하고자 한다.

발명의 상세한 설명

- <11> 따라서, 본 발명의 목적은 개체에서 체중 관련 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.
- <12> 본 발명의 다른 목적은 개체에서 체중 관련 질환을 예방 또는 치료하는 작용제를 제공하는 것이다.
- <13> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 작용제를 함유하는, 개체에서 체중 관련 질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공하는 것이다.
- <14> 본 발명의 일 측면에 따르면, 치료적 유효량의 클러스터린을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 비만 또는 비만 관련 질환을 예방 또는 치료하는 방법이 제공된다.
- <15> 본 발명의 다른 측면에 따르면, 개체에서 비만 또는 비만 관련 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약제의 제조에 클러스터린을 사용하는 용도가 제공된다.
- <16> 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 클러스터린 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 개체에서 비만 또는 비만 관련 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학조성물이 제공된다.
- <17> 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 클러스터린 발현을 하향 조절하는 조절제를 치료적 유효량으로 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 식욕 부진증 및 악액질을 동반한 개체의 식욕부진을 예방하거나 치료하는 방법이 제공된다.
- <18> 본 발명에서는, 클러스터린이 설치류에서 현저한 식욕 및 체중 감소를 유발한다는 사실을 최초로 증명하였다. 이러한 효과는 가장 잘 알려진 렙틴의 식욕 감소 효과에 필적하였다. 클러스터린은 섭식을 억제할 뿐 아니라 에너지 소비를 증가시킴으로써 체중 감소를 유발하였다. 클러스터린 단백을 투여하는 것과 유사하게, 중추신경계로 클러스터린 유전자를 투입하는 클러스터린 유전자 치료도 섭식량과 체중의 지속적 감소를 유발하였다. 뇌실을 통해 클러스터린 유전자를 투여하는 치료법이 시상하부 내 유전자 치료법보다 효과적인 것은 주목할 만하였다. 그러므로, 클러스터린 유전자를 뇌실 시스템 내로 전달하는 것은 비만 개체에 있어서 또 다른 치료법이 될 수 있다.
- <19> 섭식 중추인 시상하부에서 클러스터린 발현은 음식 섭식과 렙틴 투여 후 증가되었는데, 이는 클러스터린이 생리적 포만 신호임을 의미한다. 그러나 고지방식으로 사육하여 비만을 유발시킨 동물에서 음식 섭식과 렙틴 투여 후 시상하부의 클러스터린 발현 증가가 현저하게 둔화되었는데, 이는 시상하부에서 클러스터린의 조절 이상이 비만증에서 포만 신호 장애를 유발함으로써 과식증과 체중 증가에 기여할 수 있음을 시사한다. 한편 7 주 동안 고지방식을 투여한 비만 마우스에서 렙틴의 식욕 억제 작용이 현저하게 둔화되었으나 클러스터린은 식욕 억제 작용을 유지되었다. 이러한 사실로 부터 중추성 렙틴저항성을 가진 비만증에서도 클러스터린을 비만억제제로 사용할 수 있다는 결론을 내릴 수 있다.
- <20> 렙틴을 처음 발견할 당시 비만치료제로서의 렙틴에 대한 기대가 높았으나, 비만인에 동반된 렙틴저항성으로 인하여 렙틴을 이용한 비만 치료는 그다지 효과적이지 못하였다 (Proietto 등, Expert Opin. Investig. Drugs, 12:373-378, 2003). 그러나 본 발명에서는, 단독으로는 효과를 보이지 않을 정도의 낮은 양의 클러스터린을 렙틴과 함께 투여함으로써 렙틴 감수성을 유의하게 증가시킴을 증명하였다. 따라서 클러스터린과 렙틴의 병용 투여가 렙틴의 작용을 강화시킬 목적으로 사용될 수 있다.
- <21> 클러스터린은 맥락총, 뇌실의 상피와 혈관-뇌 관문(BBB)에서 고도로 발현되는 것으로 나타났다(Danik M. 등, J.Comp.Neurol., 334: 209-227, 1993). 클러스터린은 BBB를 통과하는 아밀로이드- β 수송에 관련되는 것으로 밝혀졌다 (Zlocovic B.V. 등, Biochem.Biophys.Res.Comm., 205: 1431-1437, 2005). 그러므로, 클러스터린을 사용하여 BBB를 통한 렙틴 수송을 조절하는 것이 가능하다.
- <22> 이하에서는 본 발명의 다양한 구현 예를 설명하기로 한다. 본 발명의 다른 목적, 특징 및 장점들은 하기의 상세한 설명, 도면 및 특허청구범위에 명료하게 제시된다. 본 명세서에 거론되는 모든 공보, 특허출원, 특허 및 기타 참조문헌은 본 발명에 전적으로 편입된다.
- <23> 하기에 별도의 정의가 없는 한, 본 명세서에 사용되는 모든 과학기술적 용어들은 통상의 당업자에게 자명한 것과 동일한 의미로 이해하기로 하며, 본 발명에 사용되는 기술들의 참조는 당업자에게 자명한 기술 또는 균등 기술의 치환에 관한 다양한 변형을 포함하는 것으로 이해하기로 한다. 다음 용어들이 통상의 당업자에게 이해될

수 있다면, 하기의 정의들을 사용하여 본 발명의 이해를 돕도록 사용하기로 한다.

- <24> 본 발명은 비만과 식욕감소를 포함하는 체중 관련 질환을 치료 또는 예방하기 위한 새로운 작용제인 클러스터린에 관한 것이다.
- <25> 본 발명에서 사용된 “비만(obesity)”은 골격 및 신체적인 요구 조건을 뛰어넘는 체중 증가를 의미하며, 이는 신체에서 지방 조직의 과도한 축적의 결과이다. “비만(obesity)” 또는 “살찐(obese)”의 정량적 정의는 이상적인 체중보다 적어도 약 5% 초과한 개체이며, 이는 이상적인 체중의 적어도 약 10%, 15%, 20%, 30% 또는 그 이상 초과한 개체도 포함하는 것으로 이에 한정되지 않는다. 이때, 초과 체중의 적어도 일부는 과도한 지방조직이다. 비만(obesity)” 또는 “살찐(obese)”의 또 다른 정량적 정의는 25 kg/m^2 또는 그 이상의 체질량지수(BMI) (National Institutes of Health, Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults, 1998)를 나타낸 개체로 정의될 수 있으며, 비만은 다양한 다른 질환들과 발병과 관련이 있다 (Nishina, PM et al., Metab., 43:554-558, 1994; Grundy, SM & Barnett, JP, Dis. Mon., 36:641-731, 1990).
- <26> 여기서 “비만 관련 질환”은 개체의 과도한 지방조직과 관련된 질환을 의미한다. 비만 관련 질환은 당업자에게 잘 알려져 있고, 예를 들어 과식증, 내분비이상, 내당능장애, 제2형 당뇨병, 고혈압, 관상동맥질환, 고지혈증, 뇌졸중, 다낭성난소증후군, 관절염, 담낭질환, 골관절염, 수면무호흡증, 비알코올성 지방간 및 일부 암(대장암, 유방암 등)일 수 있지만, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다. 개체가 비만 관련 질환으로 고통을 받으면 비만 관련 질환”이라는 용어의 범주에 포함하고자 한다.
- <27> 여기서, “치료”는 질환, 상태 또는 이상에 대처할 목적으로 환자를 처치하고 돌보는 것을 의미한다. 치료는 활성약물을 투여하여 증상 또는 합병증 발생을 예방하거나, 증상 또는 합병증을 약화시키거나, 질환, 상태 또는 이상을 없애는 것을 포함한다.
- <28> 여기서, “예방”은 치료약이 비만 상태 발생 이전에 투여되어 비만 또는 비만 관련 질환 발생을 예방하는 것을 의미한다. 비만 또는 비만 관련 질환을 겪고 있거나 증상을 나타낸 환자에게 투여된다면, 그러한 치료는 비만 또는 비만 관련 질환의 진행을 예방하는 효과가 있을 것으로 기대된다.
- <29> 본 발명에서 “약제학적으로 허용 가능한 담체”는 사용한 용량 및 농도에서 세포 또는 포유동물에게 무독한 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 안정화제를 포함한다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 흔히 수용성 pH 완충액일 수 있으며, 담체의 예로는 인산, 구연산 및 다른 유기산; 아스코르빈산을 포함한 항산화제; 저분자량(약 10 잔기 이하) 폴리펩타이드; 혈장 알부민, 젤라틴 또는 면역글로블린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 폴리머; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 라이신과 같은 아미노산; 글루코스, 만노스 또는 텍스트란을 포함한 단당류, 다당류 및 다른 탄화수소; EDTA와 같은 킬레이트화제; 만니톨 또는 솔비톨과 같은 당알코올류; 소듐과 같은 염 형성 반대이온; 및/또는 TWEEN, 폴리에틸렌글리콜(PEG), 소듐 타우로디하이드로푸시데이트(STDHF) 및 PLURONICS 과 같은 비이온성 계면활성제를 들 수 있다.
- <30> 본 발명은 클러스터린이 비만 및 비만 관련 질환을 개선시키는 효과가 있음을 최초로 제시하였다.
- <31> 따라서, 본 발명은 클러스터린을 이용하여 개체에서 비만을 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다. 일 구현 예로서, 본 발명에 따른 방법은 개체에 클러스터린을 투여함으로써 개체의 비만을 치료하거나 예방할 수 있다. 또한, 그러한 치료를 필요로 하는 개체에서 비만 관련 질환을 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다. 또, 일 구현예로서, 본 발명의 방법은 개체에게 클러스터린을 투여함으로써 비만 관련 질환을 치료하거나 예방할 수 있다. 상기 구현 예에서, 클러스터린은 약제학적으로 허용가능한 염으로 투여될 수 있다. 그러한 약제학적으로 허용 가능한 염은 글루콘산염, 유산염, 초산염, 주석산염, 구연산염, 인산염, 말레인산염, 붕산염, 질산염, 황산염 및 염산염을 포함한다.
- <32> 일 구현예로서, 비만 관련 질환은 과식증, 비만증을 수반한 내분비계 이상, 고지혈증, 심장병, 고혈압, 뇌졸중, 제2형 당뇨병, 내당능장애, 다낭성 난소증후군, 관절염, 인슐린저항성, 죽상동맥경화증, 관상동맥질환, 고지혈증, 담낭질환, 골관절염, 수면 무호흡증, 비알코올성 지방간염 및 암으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- <33> 또한, 본 발명은 하나 이상의 추가적인 활성 작용제와 함께 클러스터린을 적절한 비율로 투여함으로써 포유동물에서 비만 또는 비만 관련 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 한 개 이상의 추가적인 활성 작용제와 함께 사용될 경우, 이러한 조합은 상승적인 조합이 바람직하다. 하나의 약물로서 투여될 경우 각 화합물들의 효과를 합한 효과보다 이들을 조합으로 투여한 경우 화합물들의 효과가 더 좋을 경우에 상승효과가 발생한다. 일반적으로

로, 상승 효과는 화합물들의 최적 이하 농도에서 거의 명확하게 증명된다. 이러한 추가적인 활성 작용제는 항비만제, 항당뇨제, 항고지혈증제, 항고혈압제와 비만에서 유발되거나 비만과 관련된 합병증 치료용 약으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, 이러한 추가적인 활성약은 렙틴을 포함할 수 있다. 또, 일 구현예에서, 클러스터린 및 렙틴을 0.01:1 내지 1:0.01의 중량비로, 바람직하게는 0.05:1 내지 1:0.05의 중량비로 투여할 수 있다.

- <34> 치료방법과 관련하여, 개체는 비만 및/또는 비만 관련 질환을 예방하거나 치료할 필요가 있는 개체이면 누구나 가능하다. 예를 들어, 비만한 개체에서 과도한 지방양을 감소시켜 체중을 감소시키거나, 혹은 향후 비만증 발생이 기대되는 상황에서 지방조직 축적을 예방하기 위해 사용될 수 있다. 또, 예를 들어 환자가 비만에 걸리기 쉬운 유전적 소인을 가지고 있거나, 과거에 비만으로 고통을 받은 적이 있어 향후 비만증 발생 위험이 높은 경우에, 비만 또는 비만 관련 질환에 걸리기 쉬운 개체로 인식될 수 있다.
- <35> 환자는 척추동물 중일 수 있다. 본 발명의 방법은 주로 온혈 척추동물의 치료에 유용하게 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 포유동물에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 인간을 포함한 영장류를 포함하여, 위험도로 인해 중요한 포유동물(예를 들어, 시베리아 호랑이), 경제적 중요도가 높은 포유동물(인간에 의해 소비되는 농장에서 길러지는 동물), 예를 들어 인간 이외의 육식동물(예를 들어, 고양이 및 개), 돼지류(돼지, 사육돼지, 스테이지), 반추동물(예를 들어, 소, 황소, 양, 기린, 사슴, 양, 들소 및 낙타) 및 말을 포함한 포유동물의 치료 방법을 제공한다.
- <36> 또한, 본 발명은 돼지, 반추동물, 말, 가금류 등과 같은 가축의 질병 치료방법을 제공하지만, 이러한 가축에 한정되는 것은 아니다.
- <37> 본 발명은 또한 클러스터린과 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 비만 또는 비만 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다. 약학조성물 중 클러스터린 함량은 0.1~99.5 (중량%) 일 수 있고, 0.5~90 (중량%)가 바람직하다. 추가적인 제형 및 투여 제법 기술은 당해 기술 분야에 개시되어 있다 (미국 특허 제 5,326,902호, 미국 특허 제 5,234,933호, 및 PCT 공개 WO 1993/25521호 참조).
- <38> 치료를 위해서, 본 발명에 따른 치료적 유효량의 약학조성물을 개체에 투여한다. 치료적 유효량 또는 유효량은 예컨대 체중 또는 음식섭취량의 감소, 또는 에너지 소비의 증가와 같이 측정 가능한 생물학적 반응을 나타내기 위해 충분한 치료용 조성물의 양을 의미한다.
- <39> 나아가, 본 발명에 따른 약학조성물은 단독으로 또는 다른 처방(예를 들면, 식이요법 및 운동) 및/또는 치료법과 조합하여 투여될 수 있다.
- <40> 예를 들어, 본 발명에 따른 약학조성물은 클러스터린을 1종 이상의 추가적인 활성 작용제와 적합한 비율로 조합하여 포함한다. 이러한 추가적인 활성작용제는 항비만제, 항당뇨제, 고지혈증치료제, 고혈압치료제, 및 비만으로부터 유래되거나 비만과 관련된 합병증의 치료제로부터 선택될 수 있다. 이러한 추가의 활성작용제로는 렙틴이 포함될 수 있다. 일부 구현 예에 있어서, 클러스터린과 렙틴은 중량비 0.01:1 ~1:0.01, 바람직하게는 0.05:1~1:0.05 범위로 투여할 수 있다.
- <41> 전술한 바와 같은 목적으로, 클러스터린 또는 이를 포함하는 약학조성물은 일반적으로 비강 내 또는 비경구 투여에 의해 전신적으로 또는 국소적으로 투여될 수 있다. 투여 경로는 경구, 경피, 정맥내, 구강내, 비강내, 시상하부내(intrahypothalamic), 뇌실내(intracerebroventricular), 경막내(intrathecal), 소장내, 직장내, 결장내, 혹은 안구내(intraocular) 투여가 가능하지만, 이에 국한되지는 않는다. 본 발명에 따른 약학조성물은 허용되는 약전을 기초로 투여경로에 따라 제형화될 수 있다(Fingi 등, The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ch.1, p.1, 1975; Lemington's Pharmaceutical Sciences, 18 ed., Mack Publishing Co, Easton, PA, 1990). 따라서, 제형은 정제, 환약, 분말, 향낭, 엘릭실제, 현탁제, 유화제, 용액, 시럽, 에어로졸, 연질 및 경질 젤라틴 캡슐, 멸균 주사용액, 멸균 포장 분말 등의 형태가 가능하다. 본 발명에 따른 약학조성물은 환자에게 투여된 후에 활성 성분의 즉효성, 지속성 및 서방성을 달성할 수 있도록 당해 기술 분야에 널리 공지된 방법들을 사용하여 제형화될 수 있다.
- <42> 바람직하게는, 본 발명의 조성물은 비강 점막으로 흡수가 용이한 적절한 담체(예를 들어, 비강내 분무)를 이용하여 통하여 중추신경계로 투여할 수 있다. 또한 경피전달계의 형태로 투여될 경우, 물론 약물 투여가 연속적으로 이루어질 수 있다.
- <43> 다양한 조성물 및 투여 형태를 이용할 수 있으며, 이는 당업계에 널리 알려진 것이다. 투여를 위한 다른 조성물로는 활성성분을 하나 이상 포함하는 내용제용 액제 및 피부내 리니먼트(연고 등), 좌제 및 질좌제를 포함하

며, 이는 널리 알려진 방법에 의해 제조될 수 있다.

- <44> 본 발명의 약학조성물은 표준적으로 잘 알려진 무독성 생리학적으로 허용가능한 담체, 보조제 및 비히클을 함유한 용량 단위 제형으로, 일반적으로 비경구로 투여된다. 본 발명에서 사용한 “비경구”는 정맥내, 근육내, 동맥내 주사 또는 주입 기술을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 주사 가능한 제제, 예를 들어 멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁제는 적절한 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제를 이용하여 당업계에 알려진 방법에 따라 제형화할 수 있다. 멸균 주사용 제제는 또한 무독성 비경구적으로 허용 가능한 희석제 또는 용매, 예를 들어 1,3-부탄디올 중 멸균 주사용 용제 또는 현탁제일 수 있다.
- <45> 사용가능한 허용 가능한 담체 및 용매는 물, 링거액 및 등장 염화나트륨 용액일 수 있다. 게다가, 멸균, 고정유은 용매 또는 현탁매로서 일반적으로 사용된다. 이러한 목적으로, 합성 모노 또는 디글리세라이드를 포함한 자극이 적은 어떤 고정유를 사용할 수 있다. 게다가, 올레산과 같은 지방산을 주사용 용제 또는 현탁제의 제제에서 사용할 수 있다.
- <46> 대표적인 담체로는 인산염, 유산염, 트리스 등으로 완충된 중성 생리식염수를 포함할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 물론, 담체 및 치료적 조성물을 공급받는 개체에서 어떠한 부적절한 반응을 유발하지 않도록 바람직하지 않은 오염원을 필수적으로 제거할 수 있을 만큼 담체를 충분히 정제한다.
- <47> 클러스터린의 약학조성물에 있어서 실제 투여 수준은 특정 개체에 대한 바람직한 치료반응을 얻기에 효과적인 활성 화합물의 양을 투여하도록 다양화될 수 있다. 선택된 투여 수준은 다양한 인자, 예를 들어 약학조성물의 활성, 제형, 투여경로, 다른 약 또는 치료와의 병용 및 치료받는 환자의 신체적 조건 및 이전 의학적 이력을 근거로 하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 일 구현예에서, 최소 복용량이 투여되며, 이러한 복용량은 용량 제한 독성이 없을 시에는 단계적으로 증가된다. 치료적으로 유효한 투여량의 결정 및 조정과 이러한 조정을 언제 어떻게 할지에 관한 평가는 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 널리 알려져 있다.
- <48> 일반적인 지침에 따라, 지시된 효과를 얻기 위해 사용될 활성성분의 일일 경구투여량은 체중 1 kg 당 대략 0.001~1,000 mg, 바람직하게는 대략 0.01~100 mg이다.
- <49> 정맥내 투여시 일일 투여량은 일정한 속도로 주입시 체중 1kg 당 0.001 내지 100.0 ng일 수 있다. 이렇게 일정한 정맥내 주입은 바람직하게는 체중 1kg 당 0.01~50 ng, 보다 바람직하게는 0.1~10.0 ng으로 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물은 단회 일일 투여량으로 투여되거나, 또는 총 일일 투여량을 하루 2회, 3회 또는 4회의 분량으로 나누어 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물은 또한 원하는 몇일, 몇주, 몇 개월의 시간 동안 약물을 서서히 방출할 수 있는 데포(depot) 제형으로 투여될 수 있다.
- <50> 본 발명의 한 측면은 개체에 클러스터린을 인코딩하는 유전자를 포함한 바이러스 벡터를 전달하는 단계를 포함하는, 개체에서 비만 또는 비만 관련 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다.
- <51> 이중 클러스터린 유전자는 벡터 또는 다른 전달 비히클을 이용하여 개체에 전달될 수 있다. DNA 전달 비히클로는 아데노바이러스, 아데노-부속 바이러스, 헬퍼-의존형 아데노바이러스 및 레트로바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함할 수 있다(Chu 등., Gene Ther., 1:292-299, 1994; Couture 등, Hum. Gene Ther., 5:667-277, 1994; Eiverhand 등, Gene Ther., 2:36-343, 1995). 또한 적절한 비바이러스성 벡터로는 DNA-지질 복합체 예를 들어, 아시아로글리코-단백질-매개 전달 시스템과 같은 리포좀-매개 또는 리간드/폴리-L-라이신 접합체를 포함한다(Felgner 등, J. Biol. Chem. 269:2550-2561, 1994; Derossi 등, Restor. Neurol. Neuros., 8:7-10, 1995; Abcallah 등, Biol. Cell 85:1-7, 1995).
- <52> 전달 비히클로 바이러스성 벡터가 선정되면, 유전자가 영구적으로 발현될 수 있도록 숙주 게놈으로 삽입될 수 있는 벡터일 수 있지만, 이는 필수 요건은 아니다. 벡터가 숙주 게놈으로 삽입되지 않는 경우라면 유전자 발현은 영구적이기 보다는 일시적일 것이다.
- <53> 벡터는 일반적으로 시상하부내, 뇌실내 또는 척수강내 주입에 의해 숙주에 투여될 수 있지만, 이외에도 정맥내, 근육내, 복강내, 경구, 피하 또는 다른 전달 경로로도 투여될 수 있다. 적절한 역가는 선정된 특정 벡터, 숙주, 사용된 프로모터의 강도 및 치료받는 질환의 중증도와 같은 수많은 요인들에 따라 달라질 것이다. 마우스의 경우, 아데노바이러스 벡터는 바람직하게 체중 g 당 대략 1.0×10^6 내지 1.0×10^{10} 용균 형성 단위(plaque forming unit, p.f.u.)의 용량으로 투여될 수 있다. 또한, 더 많은 양이 사용될 수 있고, 10^{12} 입자가까지 사용될 수 있다.

- <54> 원하는 효과가 일시적인 것이 아닌 영속적인 것이라면, 헬퍼 의존성 바이러스 벡터가 사용되는 것이 바람직하다. 이러한 벡터를 이용하기에 적절한 프로모터로는 Moloney 레트로바이러스 LTR, CMV 프로모터 및 생쥐 알부민 프로모터를 포함한다. 복제 효능 없는 바이러스가 생산되고 ex vivo로 자가 유래 세포의 형질도입 후 in vivo 주입에 의해 동물 또는 인간에게 직접 투입될 수 있다 (Zatloukal 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:5148-5152, 1994).
- <55> 클러스터린 코딩 서열은 또한 in vivo 또는 ex vivo로 클러스터린 발현용 플라스미드에 삽입될 수 있다. in vivo 치료를 위해, 코딩 서열을 조직에 직접 주입하거나 정맥내 주입하여 전달할 수 있다. 이러한 방법에 사용할 수 있는 프로모터로는 CMV와 같은 내인성 및 이종 프로모터를 포함한다. 코딩 서열은 코딩 서열을 안정화하고 세포에 코딩 서열을 형질전환하는 것을 촉진하고/하거나 표적을 제공할 수 있는 완충액을 포함한 제형으로 주입될 수 있다(Zhu et al., Science, 261: 209-211, 1993).
- <56> 유전자 치료 목적으로 바이러스 또는 비바이러스 벡터 중 어느 하나에 의한 전달을 위한 클러스터린 코딩 서열의 in vivo 발현은 이미 알려진 조절된 유전자 발현 프로모터를 이용함으로써 최대 효능 및 안정성을 조절할 수 있다(Gossen 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551, 1992). 예를 들어, 클러스터린 코딩 서열은 테트라사이클린 반응성 프로모터에 의해 조절될 수 있다. 이러한 프로모터는 조절분자와 처리함으로써 양 또는 음의 방향으로 조절될 수 있다.
- <57> 클러스터린 코딩 서열의 비바이러스성 전달을 위하여, 고발현용 일반적인 대조군 서열을 포함한 일반적인 벡터에 이러한 서열을 삽입한 후, 폴리라이신, 프로타민 및 알부민과 같은 폴리머 DNA-결합 양이온과 같은 합성 유전자 전달 분자와 반응시킬 수 있다. 이러한 합성 유전자 전달 분자는 아시알로로소퓨코이드(Wu & Wu, J. Biol. Chem., 262: 4429-4432, 1987), 인슐린(Hucked 등, Biochem.Pharmacol., 40: 253-263, 1990), 갈락토오스(Plank 등., Bioconjugate Chem., 3: 533-539, 1992), 락토오스(Midoux 등., Nucleic Acids Res., 21: 871-878, 1993) 또는 트랜스페린(Wagner 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 3410-3414, 1990)과 같은 세포 표적 리간드와 연결될 수 있다.
- <58> 다른 전달 시스템은 다양한 조직-특이적 또는 보편적인 활성 프로모터의 조절 하에서 클러스터린 유전자를 포함한 DNA를 캡슐화하는 리포좀의 사용을 포함한다 (Nabel 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:11307-11311, 1993; Philip 등, Mol. Cell Biol., 14:2411-2418, 1994). 또한, 사용가능한 비바이러스성 전달로는 유전자 주입 접근과 같은 기계적 전달시스템을 포함한다 (Woffendin 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 11581-11585, 1994). 또한 클러스터린 코딩 서열은 광중합 하이드로겔 재료의 침착을 통해 전달될 수도 있다. 클러스터린 유전자의 전달을 위해서 유전자 전달에 위한 사용되는 일반적인 방법, 예를 들면 휴대용 유전자 전달 입자 총의 사용(USP No. 5,149,655)과 전달된 유전자 활성화용 이온화 방사선의 사용(USP No.5,206,152, PCT 공개 WO 92/11033)을 포함한다.
- <59> 본 발명은 또한 클러스터린 발현을 효과적으로 하향조절할 수 있는 조절제를 치료적 유효량으로 개체에게 투여하는 단계를 포함한, 식욕부전증을 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다.
- <60> 식욕부전증은 암 관련 식욕부전, 신경성 식욕부전, 가성 식욕부전 등을 포함할 수 있다.
- <61> 대표적인 조절제의 예로는 클러스터린 유전자 발현을 매개할 수 있는 안티센스 RNA, 간섭 RNA, 짧은 헤어핀 RNA(shRNA) 또는 짧은 간섭 RNA(siRNA)과 mRNA 수준에서 클러스터린 발현을 하향 조절할 수 있는 이의 발현벡터; 클러스터린 전사 억제제; 전사된 클러스터린 mRNA의 번역 억제제; 및 클러스터린 국제화 억제제를 포함한다. 이들 중에서, siRNA 또는 shRNA와 이의 발현벡터는 적은 양으로 적용될지라도 특이적이면서 유효하게 클러스터린 유전자 발현을 하향 조절할 수 있기 때문에 바람직하게 사용될 수 있다. 보다 바람직하게는, 이러한 조절제는 shRNA 및 이의 발현벡터, 서열번호 1의 핵산서열을 지닌 상기 shRNA의 cDNA이다.
- <62> siRNA 또는 shRNA는 앞서 기술된 개체에 이종 클러스터린 유전자 전달방법과 같이 바이러스 또는 비바이러스 벡터 또는 다른 전달 비히클을 이용하여 개체에게 전달될 수 있다.
- <63> 게다가, 클러스터린 발현의 조절제는 약학조성물 또는 제법으로 제형화될 수 있다. 또한, 클러스터린과 관련하여 앞서 기술한 바와 같이 다양한 경로를 통해 개체에 투여될 수 있다.

실시예

- <71> 다음 실시예들은 본 발명을 보다 상세하게 설명하고자 하는 것이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은

아니다.

<72> 또한, 고체 혼합물에서 고체, 액체 중에서 액체 및 액체 중에서 고체에 관하여 하기 주어진 %는 각각 중량/중량, 부피/부피 및 중량/부피를 근거로 한 것이고, 모든 반응은 다른 특별한 기술이 없는 한, 실온에서 수행되었다.

<73> 참고예

<74> <동물>

<75> 6-8주령의 수컷 C57BL/6J 마우스와 Sprague-Dawley 랫트는 대한실험동물사 (서울, 한국)에서 구입하였고, Lep^{-/-} 생쥐는 일본 SLC사(Shizuoka Ken, 일본)로부터 구입하였다. 특별한 언급이 없는 한, 동물들은 표준식이(삼양사, 서울, 한국)를 자유롭게 섭취하였으며, 일정한 온도(24℃)와 12시간 명암 주기(오전 6시부터 오후 6시까지 명조건) 하에서 사육되었다. 모든 실험은 아산생명과학연구소동물실험윤리위원회에 승인을 받아 진행되었다.

<76> <통계 분석>

<77> 데이터는 평균 ± 표준오차평균으로 표시하였다. 통계 분석은 SPSS-PC12(시카고, 일리노이즈)를 사용하여 수행하였다. 그룹 간의 통계적 유의성은 일원배치 분산분석(ANOVA) 후 사후검정(Post-hoc test) 혹은 독립 표본 t-검정(unpaired Student's t test)을 사용하여 분석하였다. CLU-Ad 또는 CLU-shRNA 실험 결과는 반복 일원배치 분산분석을 사용하여 분석하였다. 유의성은 P값이 0.05 이하 일때로 정의하였다.

<78> 실시예 1: 뇌실 내 클러스터린 투여가 먹이섭취 및 체중에 미치는 효과

<79> 클러스터린은 두 개의 아형, 세포 밖으로 분비되는 장형(70-80 kD)과 핵으로 이동하는 단형(~45 kD)이 있다. 본 연구에는 사람의 혈장에 존재하는 클러스터린과 유사한 재조합 분비성 사람 클러스터린(아디포젠, 서울, 한국)을 사용하였다. 클러스터린 투여가 섭식 및 체중에 미치는 효과를 연구하기 위하여 C57BL/6J 마우스의 제3 뇌실(캐놀라의 삽입 좌표: 브레그마 후방 1.8 mm 및 깊이 5.0 mm, 정중선 상)에 26 게이지 영구캐놀라(Plastics One Inc., Roanoke, VA)를 정위적 수술법을 이용하여 삽입하였다. 1주일 간 회복기를 가진 뒤 하룻 밤 절식 후, 영구적인 캐놀라를 통하여 생리식염수, 클러스터린(0.3-3 µg) 또는 랩틴(1 µg, R&D system, Minneapolis, MN)을 주사하였다 (n=6). 투여한 펩타이드는 투여 직전 0.9 % 생리식염수에 용해하여 동물 당 2 µl씩 투여하였다. 투여 후 24시간 동안 먹이섭취 및 체중 변화를 측정하였다.

<80> 도 1a와 같이, 분비성 클러스터린의 ICV 투여(1µg)는 C57BL/6J 마우스에서 60%까지 절식 유도 섭식을 감소시켰다. 클러스터린의 식욕감소 효과는 동일량의 랩틴(R&D system, Minneapolis, MN)과 필적할 만 하였다. 클러스터린과 랩틴은 24 h 후처리에 의해 체중 증가를 유의하게 감소시켰다(도 1, b). 클러스터린(1µg)을 ICV로 함께 투여하면, 신경펩타이드 Y(NPY, 2µg) 및 아구티 관련 단백질(AGRP, 3µg)의 투여로 유도된 과식증을 감소시켰다(도 1, c 및 d). 용량 반응성 연구를 통해, 1µg의 투여량의 클러스터린이 가장 좋은 섭식 감소를 유도하는 것을 확인하였다(도 1, e). 고농도 클러스터린은 섭식의 추가적인 감소를 유발하지 못하였다. 반복된 클러스터린의 ICV 주입(1µg/day)은 3일 처리 후 섭식을 감소시키고 체중증가를 방지하였다.

<81> 실시예 2: 클러스터린 유전자 치료가 섭식 및 체중에 미치는 효과

<82> 섭식 및 체중에 대한 클러스터린 유전자의 효과를 조사하기 위하여, 본 발명자들은 분비성 클러스터린을 인코딩하는 아데노바이러스를 제조하였다. 전장 랫트 클러스터린을 인코딩하는 cDNA(고려대학교 민본홍 박사로부터 제공받음, GenBank Accession No.: BC061534)를 pAdTrack-CMV 셔플벡터(Stratagene, La Jolla, CA)의 EcoRI/XhoI 부위에 삽입하였다. 이렇게 얻어진 벡터는 재조합 아데노바이러스 플라스미드를 생산하기 위하여 Adeasy 아데노바이러스 벡터를 함유한 BJ5138 세포(경북대학 이인규 박사로부터 제공 받음)에 전기천공법으로 주입하였다. 재조합체는 HEK-293 세포에서 증폭되고, CsCl(Sigma) 구배 원심분리기를 사용하여 분리하여 정제하였다. 제조물을 모아 탈염한 뒤 Adeno-X Rapid titer(BD Bioscience, San Jose, CA)를 사용하여 아데노바이러스의 역가를 측정하였다.

<83> 시상하부에 클러스터린 발현을 증가시키기 위하여, 클러스터린 발현 아데노바이러스(CLU-Ad) 1 x 10¹⁰ p.f.u를 C57BL/6J 마우스의 양측 기저시상하부(주입 좌표: 브레그마에서 후방 1.8 mm, 깊이 5.8 mm 및 정중선에서 측방 0.2 mm)에 주입펌프(Harvard Apparatus)를 사용하여 1µl/5분의 속도로 미세 주사하였다 (n=5). 대조군에게는 녹색형광 단백질(GFP)을 발현하는 아데노바이러스(GFP-Ad) 1 x 10¹⁰ p.f.u를 주사하였다. 아데노바이러스 투여

가 적절한 위치에 투여되었는지 확인하기 위하여 실험이 종료된 후 뇌를 채취하여 GFP 발현을 공초점현미경(confocal microscope)을 사용하여 확인하였다. 시상하부 기저부에 GFP 발현을 보이는 동물만을 데이터 분석에 포함시켰다. 아데노바이러스 투여 후 4일 동안 매일 오전 9-10시에 먹이섭취량과 체중은 모니터링하였다. 아데노바이러스 투여 후 5일째 마우스를 희생시켜 고환 주위 복강내 지방량을 측정하였다.

<84> 시상하부에서 클러스터린 유전자 치료는 체중의 유의적인 감소(도 2,a)와 주사 4일 후 복부 지방량의 유의적인 감소(도 2,c)를 유발하였다. CLU-Ad를 제공받은 마우스에서는, 섭식이 3일 동안 감소되었다(도 2, b).

<85> 시상하부 클러스터린 발현 증가가 에너지대사에 미치는 효과를 연구하기 위하여 CLU-Ad를 상기 방법으로 투여한 뒤 2일 제 5시간 절식 상태에서 간접열량측정기(Oxymax, Columbus Instruments, Columbus, OH)를 사용하여 산소소비율(VO_2), 에너지소비율(EE) 및 호흡지수(RQ)을 측정하였다. 도 2, d 및 e와 같이, 산소 및 에너지 소비는 GFP-Ad를 주사한 대조군과 비교하여 CLU-Ad를 주사한 마우스에서 증가하였다. 에너지 대사에 있어서 이러한 변화는 이들 마우스에서 감소된 체지방량을 초래할 것이다.

<86> 한편, GFP-Ad 또는 CLU-Ad를 C57BL/6J 마우스의 양측 측뇌실 (주입 좌표: 브레그마에서 후방 0.28 mm, 깊이 2 mm 및 정중선에서 측방 1 mm)에 2.5×10^8 의 p.f.u ($2.5 \mu\text{l}$)를 투여한 뒤 ($n = 6$), 섭식, 체중 및 복부지방량의 변화를 위해서 기술한 바와 같이 조사하였다. 이때, 뇌실로 주사된 클러스터린 유전자 치료는 시상하부 투여에 사용된 아데노바이러스의 투여량의 1/4만을 사용한 것이었다. 유전자 치료 후 6일 동안 매일 먹이섭취 및 체중을 측정하였고, 6일째 동물을 희생시켜 복강내 지방량을 측정하였다.

<87> 도 2, f, g 및 h와 같이, 뇌실로 주사된 클러스터린 유전자 치료는 시상하부로 주입된 클러스터린 유전자 치료와 비교하여 섭식 및 체중을 현저하게 감소시켰다.

<88> 실시예 3: 클러스터린 유전자 치료가 섭식 및 체중에 미치는 효과

<89> 시상하부에서 클러스터린 발현 감소 효과를 조사하기 위하여, 마우스 클러스터린 발현을 억제하는 shRNA을 인코딩하는 아데노바이러스(CLU-shRNA-Ad)를 실시예 2와 동일한 방법으로 생산하였다. shRNA은 RNA 간섭을 통해 유전자 발현을 억제할 수 헤어핀 구조를 가진 짧은 RNA 서열 (McIntyre 등, BMC Biotechnol. 6:1, 2006)로 마우스 클러스터린 염기 서열(GenBank Accession No.: NM_013492)의 444~462를 표적으로 설계되었으며, 구성은 5'-CATAGAACTTCATGCAGGTAT(안티센스), TTCAAGAGA(헤어핀), ATACCTGCATGAAGTTCTA(센스), 그리고 TTTTTCCTCA-3'(서열번호 1)로 이루어져 있다. 동물 실험에 앞서 TM3-Leydig 세포에 CLU-shRNA-Ad 처리 후 클러스터린 발현이 억제됨을 확인하였다.

<90> C57BL/6J 마우스의 양측 시상하부 내로 CLU-shRNA-Ad(1×10^{10} p.f.u)를 실시예 2와 동일한 방법으로 투여하였다 ($n=10$). CLU-shRNA-Ad의 주사는 유의적으로 섭식, 체중 및 EFW(epididymal fat weight)를 감소시켰다(도 3; a, b 및 c).

<91> CLU-shRNA-Ad의 주사가 시상하부의 클러스터린 발현을 감소시킬 수 있는지를 확인하기 위하여, 아데노바이러스를 주사 후 3일째 마우스를 희생시켜 시상하부를 이전에 알려진 방법(Namkoong 등. Diabetes, 54:63-8, 2005)에 따라 채취하여 분석할 때까지 -80°C 에서 저장하였다. 시상하부를 $200 \mu\text{l}$ 의 단백질추출용액[20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 140 mM NaCl, 1% NP40, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM PMSF, 50 mM NaF, 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin]에 반응시켜 단백질을 추출한 뒤에 클러스터린 β -사슬에 대한 항체를 사용하여 면역블로팅으로 클러스터린 발현을 조사하였다. 도 3d와 같이, CLU-shRNA-Ad의 시상하부 내 주사는 시상하부성 클러스터린 발현을 유의적으로 감소시켰다.

<92> 따라서, 클러스터린 발현의 억제는 섭식 및 체중을 증가시킬 것으로 확인되었다.

<93> 실시예 4: 시상하부 클러스터린 발현 조절 인자

<94> 식이 상태에 따른 시상하부의 클러스터린 발현의 변화를 조사하기 위해, Sprague-Dawley 랫트를 24시간 절식 상태, 24시간 절식 후 1시간 재식이 상태, 24시간 절식 후 2시간 재식이 상태에서 희생하여 시상하부를 채취하였다 ($n=5$). 시상하부에서 단백질을 추출하여 클러스터린 β -사슬에 대한 항체(Santa Cruz #SC-6419)를 사용하여 면역블로팅을 시행하였다. 도 4a와 같이, 24시간 절식 후 식이를 회복한 경우 시상하부에서 클러스터린 수준이 증가되었다.

<95> 강력한 식욕억제 호르몬인 렙틴 투여 후 시상하부 클러스터린의 발현 변화를 보기 위하여 C57BL/6J 마우스에 생

리식염수 혹은 렙틴 ($1\mu\text{g}$)를 상기 기술한 바와 같이 제3 뇌실에 삽입한 캐놀라를 통하여 주입한 뒤 1시간 후 시상하부를 채취하여 클러스터린 면역블로팅을 수행하였다($n = 5$). 도 4b와 같이, 렙틴 투여가 시상하부에서의 클러스터린 발현을 유의적으로 증가시켰다.

<96> 실시예 5: 비만 동물에서 시상하부 클러스터린의 발현 및 섭식 조절 작용의 장애

<97> 식이-유도성 비만 (DIO) 동물 모델을 만들기 위하여 7주령의 C57BL/6J 마우스를 두 그룹으로 나누어서 고지방식이(HFD, 지방질 60%, Research Diet, Inc., New Brunswick, NJ) 또는 저지방식이(LFD, 지방질 10%) 어느 하나를 8주 동안 공급하였다 ($n=6$). 각 군의 마우스를 24 시간 절식 혹은 절식 후 1 시간 재식이한 상태에서 희생시켜 시상하부를 채취하여 클러스터린 면역블로팅을 이용하여 시상하부의 클러스터린 발현을 조사하였다.

<98> 절식 상태에서, HFD-식이 비만 마우스에서의 시상하부성 클러스터린 발현은 LFD-식이 마우스와 유의적으로 차이 나지 않았다(도 5, a). 그러나, 시상하부성 클러스터린의 식이 유도성 변화는 HFD-식이 마우스에서 유의적으로 둔화되었다(도 5, a). 유사하게, 렙틴은 HFD-식이 마우스에서 시상하부성 클러스터린 발현 변화를 유도하지 않았다(도 5, b). 이러한 요인들에 의한 시상하부성 클러스터린 발현 증가의 실패는 비만 발전에 기여할 수 있는 비만 마우스에서의 포만을 야기할 수 있다.

<99> DIO 마우스에서 렙틴 및 클러스터린의 효과를 조사하기 위하여, 고지방식이 시작 후 4주와 7주에 생리식염수, 렙틴($1\mu\text{g}$) 및 클러스터린($1\mu\text{g}$)을 마우스의 제3 뇌실 내에 삽입한 캐놀라를 통하여 상기 기술한 방법으로 투여하였다 ($n=6$). 투여 후 24시간 동안 먹이섭취량과 체중을 측정하였다.

<100> 렙틴 및 클러스터린의 ICV 투여는 HFD의 초기 4주 기간 동안 HFD로 식이한 마우스에서 식욕감퇴를 유발하였다 (도 5, c). 그러나, 이러한 렙틴의 식욕감퇴 효과는 7주 HFD 처리 마우스에서 무의미해졌고, 이는 DIO 마우스가 중추성 렙틴 저항성을 나타냄을 암시하였다. 반대로, 클러스터린의 ICV 투여는 7주 동안 HFD로 식이한 마우스에서 조차 식욕 억제를 유발하였다(도 5, d).

<101> 실시예 6: 클러스터린이 렙틴의 식욕 조절 작용 및 신호전달계의 미치는 효과

<102> 렙틴 및 클러스터린 간의 상호 작용을 조사하기 위하여, 24시간 절식 상태의 C57BL/6J 마우스의 제3 뇌실 내로 렙틴과 클러스터린을 단독 또는 혼합으로 투여하였다 ($n=5$). 대조군에게는 생리식염수를 투여하였다. 투여 후 24시간 동안 먹이섭취량과 체중을 측정하였다. 렙틴 및 클러스터린 각각 $0.1\mu\text{g}$ 을 단독 투여한 경우 식욕감퇴 및 체중 감소를 유발하지 못하였다.

<103> 도 6, a 및 b와 같이, 클러스터린 및 렙틴의 효과적인 용량 이하의 용량으로 함께 투여하는 경우 섭식 및 체중 증가에 있어서 유의성있는 감소를 유발하였다(도 6, a 및 b). 이러한 결과로부터 클러스터린 치료는 렙틴과 함께 투여될 경우 렙틴 감수성을 증가시킬 수 있음을 나타내었다.

<104> 다음으로, 렙틴 및 클러스터린 투여가 STAT3 신호전달계를 미치는 영향을 조사하기 위하여 마우스 제3 뇌실 내로 렙틴($1\mu\text{g}$)과 클러스터린($1\mu\text{g}$)을 각각 투여한 뒤 30분 뒤에 마취 하에서 심장을 통해 10% 포르말린으로 15분 동안 관류하였다. 전뇌를 채취하여 2시간 동안 10% 포르말린에 다시 처리한 뒤 20% 수크로스 용액에 밤 사이 담뿍 두었다. 전뇌를 -20°C 에서 30분간 얼린 뒤 크라이오스타트를 이용하여 $25\mu\text{m}$ 두께의 뇌 절편을 얻은 다음 Y^{705} 위치에 인산화된-STAT3 (Cell Signaling, Beverly, MA) 항체를 이용하여 이전에 보고된 방법(Hou 등, Endocrinology, 145:2516-2523, 2004)에 따라 면역조직염색을 시행하였다.

<105> 종래 보고와 동일하게, 렙틴은 궁상핵(arcuate nucleus, ARC) 및 복내측핵(ventromedial nucleus, VMN)을 포함한 시상하부 핵에서 인산화된-STAT3의 발현을 증가시켰다(도 6c). 클러스터린은 또한 ARC, 뒤쪽교차핵 및 전유두핵에서 STAT3 활성을 유도하고(도 6c), VMH, 등쪽내측핵 및 뇌실주위핵에서는 유도하지 않았다.

<106> 또, 배발생 19-20일에 태아의 시상하부를 채취하여 이전에 알려진 방법(Canick 등. Brain Res., 372:277-282, 1986)에 따라 일차 배양을 시행하였다. 신경세포를 $5\mu\text{g/ml}$ 인슐린, $100\mu\text{g/ml}$ 트랜스페린, $100\mu\text{M}$ 푸트레신, 30 nM 소듐 셀레나이트 및 20 nM 프로게스테론을 함유한 배양액(neurobasal medium, Invitrogen, Carlsbad, CA)에서 7-8일 동안 배양하여 분화를 유도하였다. 실험 전 2시간 동안 혈청을 함유하지 않은 배지에서 배양한 뒤 클러스터린을 단독 ($0.01\sim 1\text{nM}$) 혹은 및/또는 렙틴(10 nM)으로 표시한 시간 (도 6, d) 혹은 30분간 처리(도 6, e)한 뒤 세포를 채취하여 단백질을 추출하였다. Y^{705} 위치에 인산화된-STAT3, STAT3, SOCS3에 대한 항체 (Cell Signaling, Beverly, MA)를 이용하여 면역블로팅을 시행하였다.

<107> 배양된 시상하부 신경에서, 클러스터린(10nM)은 인산화된-STAT3 및 사이토카인 신호전달-3 억제제(도 6, d)의

발현을 처리 15분, 30분 및 60분에서 증가시켰다. in vivo 검증(도 6, a, b)과 동일하게, 각각 단독으로 투여 시에는 STAT3을 유발하지 못할지라도, 낮은 농도의 클러스터린(0.01 및 0.1nM) 및 렙틴(10nM)을 함께 투여 시에는 STAT3의 의미있는 활성화를 유발하였다(도 6e). 이러한 결과로부터 클러스터린은 렙틴-신호전달경로를 증가시켰다.

<108> 본 발명은 상기 특정 구현예에 관해서 기술할지라도, 첨부된 청구항에 의해 정의된 범위 내에서 본 발명의 다양한 변형은 당해 기술 분야에서 숙련된 자들에 의해 얼마든지 가능하다.

도면의 간단한 설명

<64> 진술한 바와 같은 본 발명의 제반 목적 및 특징들은 이하에서 첨부된 도면과 관련하여 보다 상세하게 설명하기로 한다.:

<65> 도 1: 클러스터린의 식욕억제 효과를 나타낸 그래프로서, (a, b) C57BL/6J 마우스에서 하룻밤 절식 후 클러스터린(1 μ g) 및 렙틴(1 μ g)을 뇌실내로 투여하였을 때 섭식 및 체중 증가를 유의하게 감소시켰다 (n=6-7). * P <0.01 (생리식염수를 투여한 대조군과 비교함). (c, d) 클러스터린(1 μ g)의 뇌실 내 투여가 식욕항진 신경 펩타이드인 neuropeptide Y(NPY, 2 μ g) 및 Agouti-related protein(AGRP, 3 μ g)-유도성 과식증을 차단하였다 (n=6). * P <0.05 (생리식염수를 투여한 대조군과 비교함). † P <0.05 (NPY 또는 AGRP 단독 투여군과 각각 비교함). (e) 섭식 효과에 관한 클러스터린의 용량반응성 연구. * P <0.05 (생리식염수를 투여한 대조군과 비교함). 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차평균으로 표시함.

<66> 도 2: 시상하부 및 뇌실내 클러스터린 유전자 치료의 섭식 및 체중 감소 효과를 나타낸 그래프로서, (a, b) 클러스터린 인코딩 아데노바이러스 (10^{11} p.f.u., 1 μ l) 양측 시상하부로 직접 주사하였을 때, 4일 동안 유의하게 섭식 및 체중을 감소시켰다 (n=5). 오픈 원(○), 녹색형광단백(GFP)을 인코딩하는 아데노바이러스 (GFP-Ad) 투여군; 채워진 원(●), 클러스터린 인코딩 아데노바이러스 (CLU-Ad) 투여군; * P <0.05 (GFP-Ad 투여군과 비교함.) (c) CLU-Ad를 투여한 군에서 4일 후 고환 주위 복부 지방 양이 감소되었다 (n=5). * P <0.05. (d, e) CLU-Ad 시상하부 내 주사 후 2일째에 측정된 에너지 소비 및 산소 소비가 증가하였다 (n=5). * P <0.05. (f, g, h) CLU-Ad (10^8 p.f.u., 5 μ l)를 좌우측 뇌실 내로 주사 후 현저한 체중, 섭식 및 복강내 지방량 감소를 유발하였다. 오픈 원(○), GFP-Ad; 채워진 원(●), CLU-Ad; * P <0.01.

<67> 도 3: 시상하부 클러스터린 발현을 하향 조정할 때 섭식 및 체중이 증가함을 나타내는 그래프. (a,b) 마우스 클러스터린 shRNA를 인코딩하는 아데노바이러스(CLU-shRNA-Ad, 10^{10} p.f.u., 1 μ l)의 양측 시상하부 내 투여는 섭식 및 체중을 증가시켰다 (n=5). 오픈 원(○), GFP-Ad; 채워진 원(●), CLU-shRNA-Ad; * P <0.05 (GFP-Ad 투여한 대조군과 비교함). (c) CLU-shRNA-Ad를 투여 받은 마우스에서 복강내 지방량이 증가하였다 (n=5). ** P <0.05 (GFP-Ad 투여한 대조군과 비교함). 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차평균. (d) CLU-shRNA-Ad으로 투여 받은 마우스 시상하부에서 클러스터린 발현이 감소하였다.

<68> 도 4: 정상 마우스의 시상하부에서 먹이섭취 상태에 따른 클러스터린 발현의 변화를 보여 주는 실험 결과로서, (a) 시상하부에서 클러스터린 단백질은 절식 상태보다 식이 재개 후에 증가하였다 (n=5). * P <0.05, ** P <0.01 (24시간 절식군과 비교함). (b) 뇌실 내 렙틴(1 μ g)을 투여는 시상하부 클러스터린 발현을 증가시켰다 (n=5-6). * P <0.01 (생리식염수 투여군과 비교함).

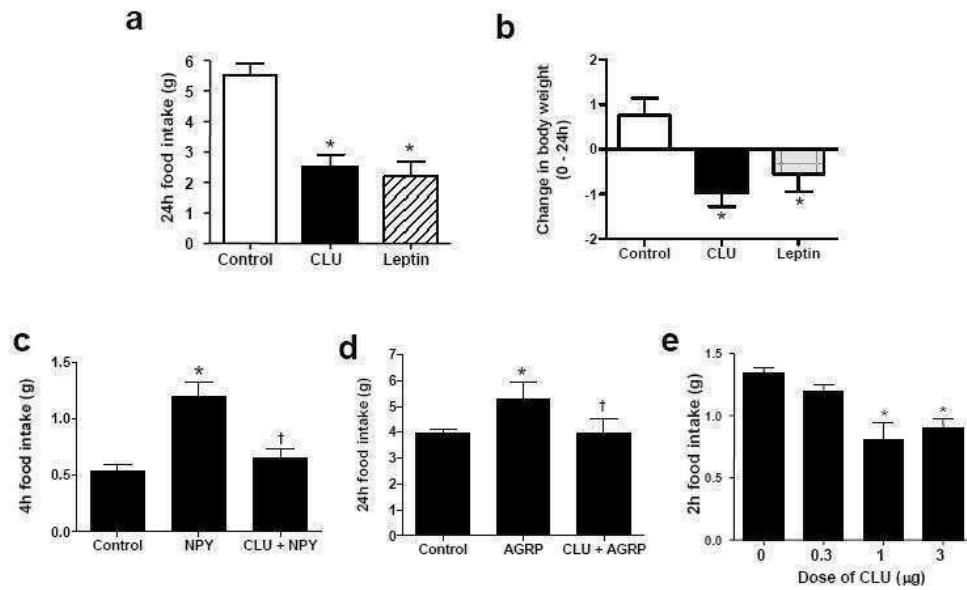
<69> 도 5: 고지방식이로 비만증을 유도한 마우스에서 시상하부의 클러스터린 발현 및 섭식 조절 작용을 보여 주는 실험 결과로서, (a, b) 고지방식으로 사육한 마우스에서는 섭식 후 시상하부 클러스터린 증가 현상이 소실되었다 (n=6). * P <0.05 (저지방식이군, 절식상태와 비교함). (c, d) 고지방식이 사육 후 4주에 클러스터린 및 렙틴을 뇌실 내로 투여시 유의한 섭식 억제 효과가 관찰되었으나, 7주 후에는 렙틴의 섭식 억제 효과는 사라지나, 클러스터린의 섭식 억제 효과는 유지되었다 (n=6). * P <0.01 (생리식염수 투여군과 각각 비교함).

<70> 도 6: 클러스터린의 병용 투여가 렙틴의 섭식 억제 작용 및 STAT3 신호전달계 활성화를 강화시킨다는 것을 보여주는 실험 결과로서, (a, b) 단독 투여시 섭식 억제 작용을 나타내지 않는 낮은 용량의 클러스터린과 렙틴을 뇌

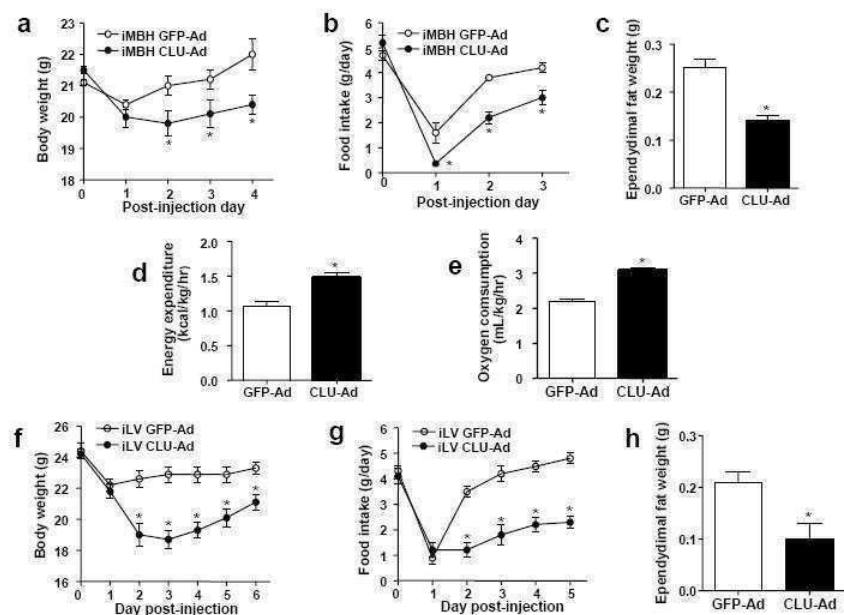
실 내로 함께 투여하였을 때 섭식 및 체중의 유의한 감소가 관찰되었다 ($n=5-6$). $^*P<0.05$ (생리식염수 투여군과 각각 비교함). (c) 렙틴과 클러스터린을 뇌실 내로 투여후 STAT3 신호전달계 활성화의 지표인 STAT3 인산화를 보여 주는 면역 염색 자료로 렙틴($1 \mu\text{g}$)과 클러스터린($1 \mu\text{g}$)을 뇌실 내로 투여 하면, 시상하부와 뇌실 주변 세포에 인산화된 STAT3 발현이 증가하였다. (d) 일차 배양한 시상하부 신경세포에 클러스터린 (1 nM)을 처리하면 STAT3 인산화와 SOCS3(suppressor of cytokine signaling-3)의 발현이 증가하였다. (e) 일차 배양한 시상하부 신경세포에 단독으로 효과가 없는 소량의 렙틴(10 nM)과 클러스터린(0.01 혹은 0.1 nM)을 함께 처리하면 유의한 STAT3 활성화를 유도하였다. 이러한 연구 결과는 클러스터린이 렙틴에 의한 STAT3 신호전달계 활성화를 강화시키는 작용을 가지고 있음을 시사한다.

도면

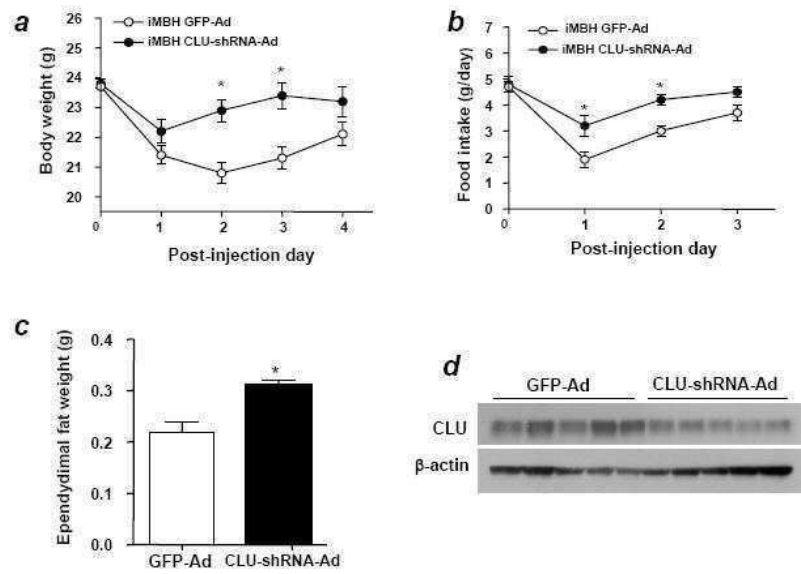
도면1



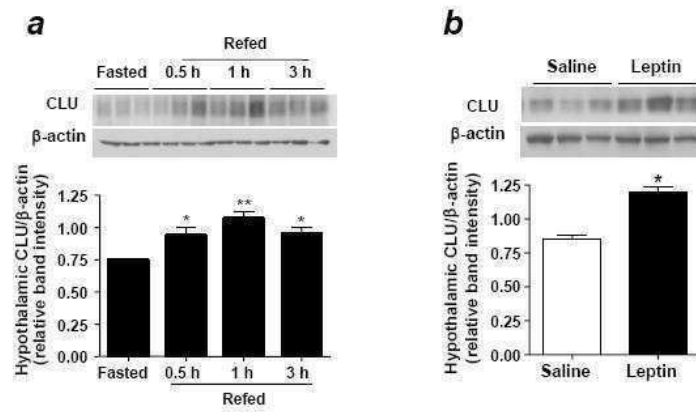
도면2



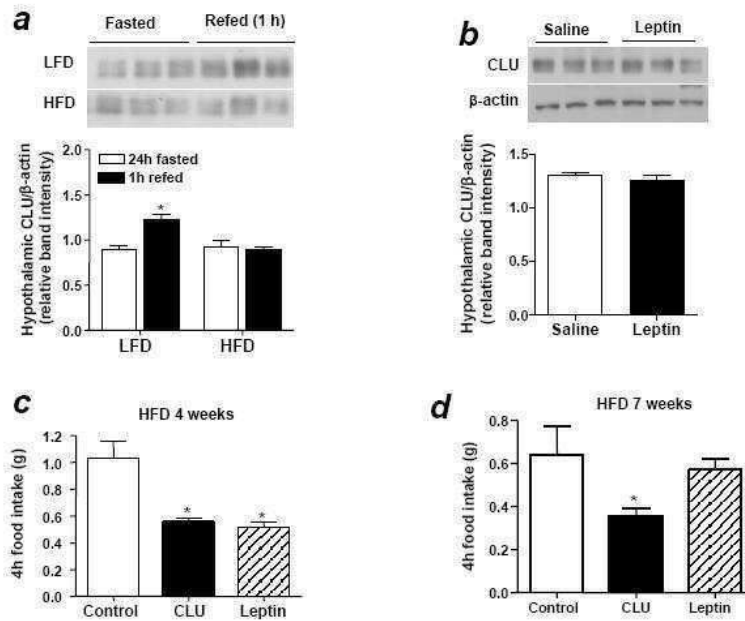
도면3



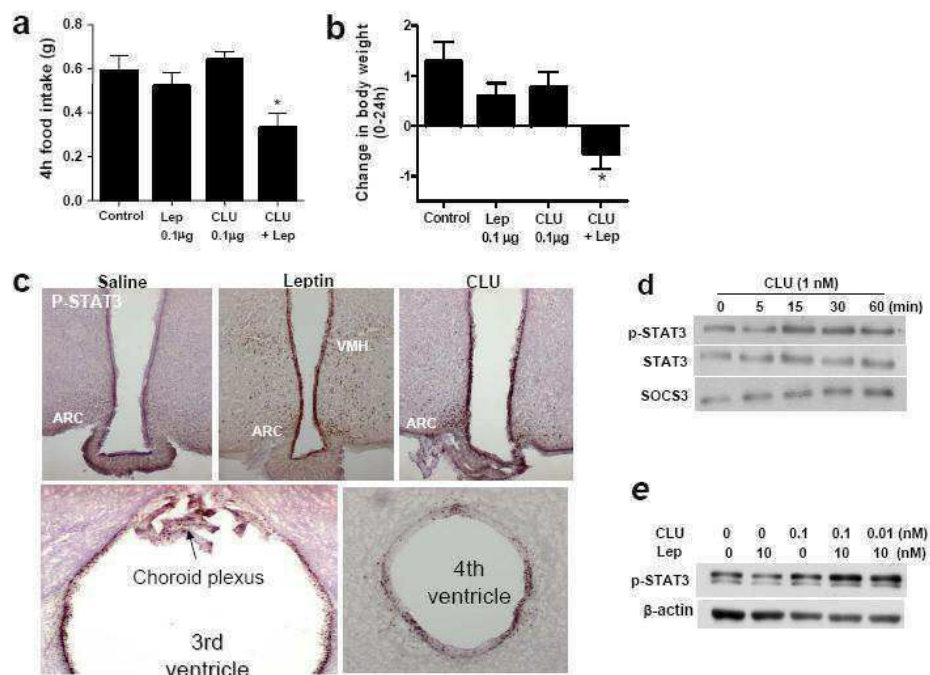
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION et al.
- <120> METHOD OF PREVENTING OR TREATING BODY WEIGHT DISORDERS BY EMPLOYING CLUSTERIN
- <130> DP-2009-0488
- <160> 1

<170> Kopatent In 1.71
 <210> 1
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> cDNA for shRNA targeting nucleotides 444-462 of murine clusterin
 sequence
 <220>

 <221> stem_loop
 <222> (1)..(59)
 <220>

 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> antisense sequence
 <220>

 <221> misc_feature
 <222> (22)..(30)
 <223> hairpin sequence
 <220>

 <221> misc_feature
 <222> (31)..(49)
 <223> sense sequence
 <400> 1
 catagaactt catgcaggta ttccaagaga atacctgcat gaagttctat tttttccaa

59