(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0110419
(43) 공개일자 2018년10월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2017.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/5008 (2013.01)
G01N 33/5044 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0039931
(22) 출원일자 2017년03월29일
심사청구일자 2018년06월14일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
백자현
서울특별시 강남구 선릉로 221, 204동 1201호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)
윤예란
경기도 남양주시 진접읍 해밀예당3로 104, 2004동 304호 (금곡리, 신영지웰아파트)
(74) 대리인
이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 2 항

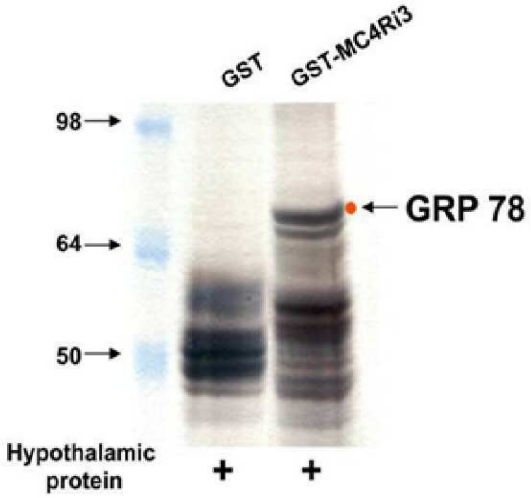
(54) 발명의 명칭 **비만 억제제의 스크리닝 방법**

(57) 요 약

본 발명은 비만 억제제제를 스크리닝 하는 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 (a) 후보물질을 GRP78 및 MC4R 발현능을 가지는 세포에 접촉시키는 단계; (b) GRP78과 MC4R의 결합수준을 측정하는 단계; 및 (c) GRP78과 MC4R의 결합수준을 증가시키는 물질을 비만 억제제로 선택하는 단계를 포함하는 비만 억제제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 비만 억제제의 스크리닝 방법은 GRP78과 MC4R의 결합을 촉진할 수 있는 물질을 효과적으로 스크리닝 할 수 있으며, 본 발명의 방법에 의해 스크리닝 된 물질은 비만을 효과적으로 억제하여, 비만 치료에 유용하다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016952412
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 (원천)국가마우스표현형분석사업
연구과제명 [이지바로]식욕조절 질환의 마우스표현형 분석기반 구축
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교
연구기간 2016.11.20 ~ 2017.11.19

명 세 서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 비만 억제제의 스크리닝 방법:

(a) 후보물질을 GRP78 및 MC4R 발현능을 가지는 세포에 접촉시키는 단계;

(b) GRP78과 MC4R의 결합 수준을 측정하는 단계; 및

(c) GRP78과 MC4R의 결합 수준을 증가시키는 후보 물질을 비만 억제제로 선택하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 후보 물질은 천연 화합물, 합성 화합물, DNA, RNA, 펩티드, 효소, 리간드 세포 추출물 및 포유동물의 분비물로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 비만 억제제를 스크리닝 하는 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 (a)후보물질을 GRP78 및 MC4R 발현능을 가지는 세포에 접촉시키는 단계; (b) GRP78과 MC4R의 결합수준을 측정하는 단계; 및 (c) GRP78과 MC4R의 결합수준을 증가시키는 물질을 비만 억제제로 선택하는 단계를 포함하는 비만 억제제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 시상하부 내 방실 핵(paraventricular nucleus, PVN) 부위에 존재하는 멜라노코틴 4 수용체 (MC4R)는 체중 및 섭식 감소, 에너지 대사 증가를 통한 비만신호조절에 관여한다. MC4R 유전자가 결여된 마우스는 과식증, 고인슐린혈증, 고혈당증 등을 동반한 체지방의 증가현상을 나타내며, 사람에 있어서도 MC4R 변이 유전자를 보유한 경우는 어려서부터 섭식량 및 체중 증가에 따른 비만 형질이 빠르게 유도되는 것으로 알려져 있다.

[0004] 비만형질과 관련된 MC4R 변이체는 상당량이 세포 내 소포체에 머물면서 소포체 스트레스 (ER stress)를 유발시키고, 동시에 MC4R의 세포막 발현을 저해시킨다. 이와 관련하여, heat shock chaperone 70 (Hsc70), Hsc90과 같은 내인성 채프론 등의 처리는 MC4R의 구조 안정화 및 세포막 발현 증가에 관여하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 이러한 채프론의 작용을 활용하여 ER stress를 감소시키고 MC4R의 기능을 향상시키는 것이 비만관련 질환에 중요한 치료방법이 될 수 있으며, MC4R의 활성을 증가시키는 방법과, MC4R의 단백질 접힘 및 프로세싱에 작용하는 돌연변이가 있는 MC4R의 활성을 증가시키는 방법으로 약리학적 샤페론 활용하는 방법 등이 알려져 있다..

[0006] 한편, Glucose regulated protein 78(GRP78)은 ER stress에 반응하는 대표적인 내인성 채프론으로서 소포체 내 단백질 구조의 안정화 및 단백질의 정상적인 이동에 관여한다고 알려져 있으며, 이러한 GRP78은 ER stress 증가와 관련된 비만 형질 및 렙틴/인슐린 저항성 조절을 통해 에너지 대사 항상성 유지에 중요하게 작용하는 것으로 알려져 있다. 또한, 에너지 대사 조절의 중추인 시상하부 특이적으로 GRP78을 과발현 시킬 경우, 고지방 식이로 인한 ER stress의 증가 및 비만형질에 대한 개선 효과가 확인된 바 있다.

[0007] 이와 같이, 채프론 단백질 GRP78이 ER stress와 관련된 비만 형질 개선에 관여함은 밝혀졌으나, GRP78을 통한 비만신호조절 기전에 대하여는 명확히 알려진 바가 없는 실정이다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 비만 억제제를 개발하기 위해 예의 노력한 결과, GRP78과 MC4R 사이의 결합을 증가시킬 경우, 비만을 억제할 수 있다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[0011] 본 배경기술 부분에 기재된 상기 정보는 오직 본 발명의 배경에 대한 이해를 향상시키기 위한 것이며, 이에 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 있어 이미 알려진 선행기술을 형성하는 정보를 포함하지 않을 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) KR 10-2008-7000146

(특허문헌 0002) US 9,381,194

비특허문헌

[0013] (비특허문헌 0001) Balthasar N, et al., Cell, 123 493?505, 2005

(비특허문헌 0002) Cone RD, Trends Endocrinol Metab.10, 211-216, 1999

(비특허문헌 0003) Contreras C, et al., Diabetes. 2016

(비특허문헌 0004) Huszar, D. et al., Cell. 88, 131-141, 1997

(비특허문헌 0005) Jacob C Garza, et al., Journal of Endocrinology. 197, 471-482, 2008

(비특허문헌 0006) Kim, D. H., et al., Biochem Biophys Res Commun.365, 439-445, 2008

(비특허문헌 0007) Lee J, et al., J Biol Chem. 289(3):1203-11, 2014

(비특허문헌 0008) Ozcan L, et al., Cell Metab. 9(1):35-51, 2009

(비특허문헌 0009) Seeley, R. J., et al., Annu Rev Nutr. 24, 133-149, 2004

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 목적은 비만 억제제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 후보물질을 GRP78 및 MC4R 발현능을 가지는 세포에 접촉시키는 단계; (b) GRP78과 MC4R의 결합 수준을 측정하는 단계; 및 (c) GRP78과 MC4R의 결합 수준을 증가시키는 물질을 비만 억제제로 선택하는 단계를 포함하는 비만 억제제의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따른 비만 억제제의 스크리닝 방법은 GRP78과 MC4R의 결합을 촉진하여, 비만을 억제할 수 있는 억제제를 효과적으로 스크리닝 할 수 있으며, 본 발명의 방법에 의해 스크리닝 된 물질은 비만을 효과적으로 억제하여, 비만 치료에 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 MC4R의 세포 내 세 번째 고리와 결합하는 시상하부 단백질이 결합함을 pull-down assay, silver staining 및 MALDI-TOF로 확인한 결과이다.

도 2의 (A)는 GRP78의 4가지 도메인 (a.a. 1-252(D1), 253-502(D2,3), 0-385(D1,2), 386-502(D3), 503-654(D4))을 도식화한 개략도이고, B는 MC4R 세포 내 세 번째 고리와 GRP78 간의 직접적인 결합을 확인한 결과이며, (C)는 결합 도메인(386-502(D3))을 확인한 결과이다

도 3는 ER stress 환경 하에서 GRP78 발현 억제로 인해 MC4R의 세포 내 이동 및 MC4R의 전사 활성도 저해가 유도됨을 확인한 결과로서, (A) 및 (B)는 MC4R 작용제 처리에 따른 MC4R의 세포 내 이동 관찰한 결과이고, (C) 및 (D)는 각 조건 별 MC4R의 기저수준 활성화 및 작용제 처리에 따른 전사 활성도를 확인한 결과이며, *는 p<0.05; **는 p<0.01; ***는 p<0.001; +는 p<0.05 대조군 vs ER stress 및 GRP78 knockdown 처리 비교군 값을 의미한다.

도 4는 12-16주령된 마우스 뇌의 시상하부 PVN 부위를 선별하여 GRP78에 대한 DAB-staining을 통해 부위 특이적으로 GRP78의 발현을 확인한 결과이며, 오른쪽 하단은 PVN 부위의 확대 이미지 이다.

도 5는 12-16주령된 마우스 뇌에서 GRP78과 MC4R의 전반적인 발현 양상을 비교한 결과로서, 도면에 표기된 약어의 전체 명칭은 다음과 같다:AD, anterodors thalamic nucleus; Arc, arcuate nucleus; CPu, caudate-putamen IAD, interanteromedial thalamic nucleus; MH, medial habenular nucleus; PAG, periaqueductal gray; PVA, paraventricular thalamic nucleus(ant.); PVH, paraventricular hypothalamic nucleus; Rt, reticular thalamic nucleus; SFi, septofimbrial nucleus; SN, substantianigra VL, ventlateral thalamic nucleus; VMH, ventromedial hypothalamic nucleus; VP, ventral pallidum VPM, ventral posteromedial thalamic nucleus; ZI, zonaincerta; n=3.

도 6은 비만모델마우스(ob/ob)와 정상 마우스 PVN부위에서 GRP78 발현변화를 확인한 결과로서, 왼쪽 패널은 12~16주령 된 ob/ob와 정상 마우스의 PVN 부위를 선별하여 GRP78에 대한 면역염색(DAB-staining) 진행하여 관찰한 결과이며, 오른쪽 패널은 ob/ob와 정상 마우스 PVN 부위에서의 GRP78 발현 세포 수 (Stereological analysis, t-test, *, p<0.05 대조군 vs ob/ob 비교군; n=4)를 측정한 결과이다.

도 7은 장기적 또는 단기적 ER stress 유발이 GRP78과 MC4R의 발현 및 상호작용에 미치는 영향을 확인한 결과로서, 장기적(HFD) 또는 단기적(tunicamycin) ER stress를 유도시킨 마우스 뇌의 시상하부 단백질을 추출하여 GRP78과 MC4R의 발현 및 이들 간의 결합 정도를 Western-blotting과 co-immunoprecipitation 방법으로 확인한 것이며 (A) 및 (B)는 장기적 (정상 사료 vs 고지방 사료, 40일간) 스트레스를 유도한 마우스이고, (C) 및 (D)는 단기적 (DMSO vs tunicamycin, 160ug i.c.v. (80ug x2, every 6 hours)) ER stress를 유도한 마우스로, 각각 XBP-1, GRP78, MC4R 각각의 발현변화 및 MC4R과 GRP78 간의 결합 정도 확인 (t-test, *, p<0.05; **, p<0.01 대조군 vs ER stress 처리 비교군; n=3~4)한 결과이다.

도 8의 (A)는 shGRP78 유전자를 포함하는 LentiloxRNAi vector, pLL3.7 construct와 마우스 뇌의 PVN injection 부위를 나타낸 것이고, (B)는 PVN 부위와 ARC(as a negative-control) 부위에서의 GRP78 mRNA 발현에 대한 real-time PCR 결과 (t-test, **, p<0.01 대조군 vs shGRP78 처리 비교군; n=6)이며, (C)는 Lenti-shGRP78 virus의 PVN 부위 주입을 통한 GRP78 발현 억제를 확인한 결과이다.

도 9는 PVN 부위 특이적인 GRP78 knockdown 효과에 따른 생리적인 변화를 확인한 결과로서, (A)는 Lenti-shGRP78 virus injection에 따른 실험 스케쥴을 나타낸 것이고, PVN 부위 특이적인 GRP78 발현 감소에 따른 각 그룹별로 (B)는 체중변화를 측정한 것(5Wk Lenti-control 127.95+3.00% versus Lenti-shGRP78 138.33+2.04%, shGRP78 x HFD interaction F1,11=6.61, P=0.0260; 6Wk Lenti-control 132.87+3.81% versus Lenti-shGRP78 144.29+2.91%, shGRP78 x HFD interaction F1,11=5.92, P=0.0333); (C)는 먹이 섭취량 변화를 측정한 것, (D)는 산소소비량 (VO2) 변화를 측정한 것이며, (E)는 locomotor activity 변화를 측정한 것으로, two-way ANOVA bonferroni posttests 시, †는 P <0.05 대조군 vs shGRP 처리 비교군을 의미하고, unpaired t-test 시, *는 p<0.05; **는 p<0.01 대조군 vs shGRP 처리 비교군을 의미하며 both unilateral and bilateral; n=3~4이다.

도 10은 5일 동안 4-phenylbutyric acid(4-PBA, 200mg/kg, ip) 전처리에 이어서 MC4R의 작용제인 MTII (3nmol, icv)와 MC4R의 길항제인 AgRP(2nmol, icv)를 처리하여 각 시간대 별로 체중과 먹이 섭취량을 측정한 결과로서, (A)는4-PBA, MTII, AgRP 처리와 관련된 실험 스케쥴을 나타낸 것이고, (B)는 각 시간대 별 체중을 측정한 결과

이며 (C)는 먹이 섭취량 (n=9/group, Two-way ANOVA with Bonferroni post-tests, *p <0.05, **p <0.01, ***p <0.001 versus vehicle, #p <0.05, ##p <0.01, ###p <0.001 versus AgRP+MTII, †p <0.05, ††p <0.01 versus 4-PBA-treated group)를 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0022] 본 발명에서 용어 '샤프론 단백질'은 일반적인 관점에서 소포체 내에서 미성숙한 단백질에 결합하여 그들의 고차구조형성, 세포 내 수송, 세포 소기관의 막투과 등에 관여하는 열충격 단백질을 의미하며, 본 발명의 관점에서는 비만 관련 질환의 병인이 되는 소포체 스트레스(ER stress) 환경의 조절 인자로서의 단백질을 의미한다.

[0023] 본 발명에서 용어 '비만 관련 질환'은 비만 포함, 이로 인한 합병증인 당뇨병, 고지혈증, 심혈관계질환 등을 포함한다.

[0024] 본 발명에서는 MC4R의 세포 내 세 번째 고리에 결합하는 시상하부 단백질이 GRP78임을 확인하고, 이 두 단백질의 발현 양상을 비교하였으며, 이들의 결합을억제함에 따라, 비만 마우스에서 체중 증가가 일어나며, 이들의 결합을 촉진할 경우, 체중 감소가 가능한지 확인하고자 하였다.

[0025] 본 발명에서는 MC4R과 결합하는 마우스 시상하부 내 단백질을 확인하고, 이 단백질과 MC4R의 상호작용이 비만 신호전달에 어떤 영향을 주는 지 확인하였다.

[0026] 즉, 본 발명의 일 실시예에서는 GST-MC4R 재조합 단백질과 마우스의 시상하부 단백질의 pull-down assay를 통해 GRP78 샤프론이 서로 결합하는 것을 확인하였고(도 1), GRP78의 발현을 억제할 경우, MC4R의 기저수준 활성화 및 전사활성도가 감소되는 것을 확인하였으며(도 3), 마우스 뇌의 PVN 부위에서 GRP78과 MC4R이 서로 비슷한 양상으로 발현되고(도 5), ER stress 조건 하에서는 MC4R과 GRP78 사이의 결합이 약해지는 것을 확인하였으며(도 7), 결과적으로 비만 마우스에서 GRP78의 발현을 억제하였을 경우, 체중 증가가 발생한다는 것을 확인할 수 있었다(도 9).

[0027] 또한, MC4R의 활성을 증가시킬 때, 화학적 샤프론의 일종인 4-PBA를 함께 처리할 경우, 효과적으로 체중을 감량할 수 있음을 확인하였으며, 이때 GRP78과 MC4R의 결합수준이 증가하는 것을 확인하였다.

[0029] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, (a) 후보물질을 GRP78 및 MC4R 발현능을 가지는 세포에 접촉시키는 단계; (b) GRP78과 MC4R의 결합 수준을 측정하는 단계; 및 (c) GRP78과 MC4R의 결합 수준을 증가시키는 물질을 비만 억제제로 선택하는 단계를 포함하는 비만 억제제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[0030] 본 발명 방법의 '물질'은 GRP78과 MC4R의 결합을 촉진하는 특성을 가지는 것은 어떠한 것도 가능하나, 바람직하게는 생체에 적용이 가능한 것으로, 이에 한정되지 아니하나, 예를 들어 천연 화합물, 합성 화합물, DNA, RNA, 펩티드, 효소, 리간드, 세포 추출물 및 포유동물의 분비물 중에서 선택될 수 있다.

[0031] 바람직하게는 GRP78 또는 MC4R의 발현을 증가시키는 핵산; GRP78 또는 MC4R의 발현을 증가시키는 천연 화함물 또는 합성 화합물 중에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 GRP78이 도입된 세포는 GRP78 유전자가 도입되어 발현될 수 있는 세포이면 어떤 것이든 가능하나, 바람직하게는 HEK283T 세포일 수 있으며, HEK293T 세포는 인간 태아 신장 세포를 의미한다.

[0033] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계의 결합 수준의 측정은 단백질-단백질 상호작용을 측정할 수 있는 정량적 또는 정성적 방법이면 모두 이용가능하나, 바람직하게는 면역침강법, ELISA 또는 면역분석 법으로 측정할 수 있다.

[0034] 본 발명에 있어서, 상기 결합 수준의 증가는 대조군에 비하여 결합 수준이 증가하는 것을 의미하며, 대조군은 후보 물질을 처리하지 않은 세포, 기존의 공지된 비만 억제제를 처리한 세포 또는 GRP78 및 MC4R의 결합을 방해한다고 알려진 물질을 처리한 세포 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 본 발명은 다른 관점에서, GRP78과 MC4R의 결합 수준을 증가시키는 물질을 유효성분으로 포함하는 비만 억제용 조성물에 관한 것이다.

[0037] 본 발명에 있어서, 상기 물질은 GRP78 또는 MC4R의 발현을 증가시키는 핵산; GRP78 또는 MC4R의 발현을 증가시키는 천연 화합물 또는 합성 화합물 중에서 선택된 하나 이상임을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 본 발명의 일 실시예에서는 영양과잉을 통한 장기적 ER stress가 유발된 마우스 및 단기적 ER stress가 유발된 마우스의 시상하부 단백질을 사용하여 GRP78과 MC4R의 발현 및 이들 간의 결합 정도를 western blotting 및 면역침전법 (co-immunoprecipitation)을 통해 확인한 결과, 각 실험 군의 경우, ER stress 표지 단백질로 알려진 X-box binding protein-1(XBP-1)의 발현이 대조군 대비 약 2배정도 증가됨을 통해 ER stress의 유발여부를 우선적으로 확인할 수 있었으며, 장기적 ER stress를 유발한 경우, GRP78과 MC4R의 발현이 각각 정상 대비 137%, 133%, 증가되어 있는 반면, 두 단백질 간의 결합 정도는 정상 대비 약 60%로 감소되는 결과를 확인하였고(도 7의 A 및 B), 단기적 ER stress 유발 시에도, GRP78와 MC4R의 발현이 각각 정상 대비 154%, 165%, 증가 되었으나, 이들 간의 결합 정도는 정상 대비 약 38%로 감소되는 결과를 확인하였다 (도 7의 C 및 D).

[0040] 본 발명의 일 실시예에서는 Lenti-control 또는 Lenti-shGRP78을 PVN 부위 특이적으로 주입시키고, 한 그룹은 정상 사료(normal diet, ND)를, 다른 한 그룹은 고지방 사료 (high-fat diet, HFD)를 40일 동안 제공하면서 체중과 섭취량을 매일 정해진 시각 (오후 5시)에 측정한 다음(도 9의 A) 분석하였다. 그 결과, 고지방 식이 그룹의 경우, control 대비 shGRP78에 의해 체중 변화율이 유의하게 증가됨을 확인하였으며, 섭취량에 있어서도 증가 경향은 나타내었으나 유의성은 확인하지 못하였다. 반면, 정상 식이 그룹의 경우는 체중 및 먹이 섭취량에 있어서 shGRP78에 의한 특이적인 변화를 보이지 않음을 확인하였다(도 9의 B-C).

[0042] 따라서, GRP78과 MC4R의 결합이 약화될 경우, 체중 증가가 발생하는 것을 확인할 수 있으며, GRP78과 MC4R의 결합을 촉진할 수 있는 활성화제의 경우, 체중 감소가 발생하는 것을 확인할 수 있었다.

[0044] 본 발명의 상기 비만 억제제를 유효성분으로 포함하는 비만 억제용 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가적으로 포함할 수 있으며, 담체와 함께 제제화 될 수 있다.

[0045] 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용 가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용되는 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 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 있으며, 바람직하게는 락토오스(μαγυοτε), 덱스트로즈, 수크로스(τφγσοτε), 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있다..

[0046] 본 발명의 상기 억제제 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 비만 억제용 조성물은 이를 유효성분으로 포함하는 어떠한 제형으로도 적용가능하며, 경구용 또는 비경구용 제형으로 제조할 수 있다. 본 발명의 약학적 제형은 구강(oral), 직장(rectal), 비강(nasal), 국소(topical; 볼 및 혀 밑을 포함), 피하, 질(vaginal) 또는 비경구(parenteral; 근육내, 피하 및 정맥내를 포함) 투여에 적당한 것 또는 흡입 (inhalation) 또는 주입 (insufflation)에 의한 투여에 적당한 형태를 포함한다.

[0047] 본 발명의 조성물을 유효성분으로 포함하는 경구 투여용 제형으로는, 예를 들어 정제, 트로키제, 로렌지, 수용성 또는 유성현탁액, 조제분말 또는 과립, 에멀젼, 하드 또는 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제로 제제화할 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 고구마 전분과 같은 붕괴제, 스테아르산 마스네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아릴푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌글리콜 왁

스와 같은 윤활유를 포함할 수 있으며, 캡슐제형의 경우 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체를 더 함유할 수 있다.

[0048] 상기 조성물은 지시된 비율의 필수 성분으로서 상기 조성물을 함유하는 것 외에는 다른 성분에는 제한이 없으며 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연미제(타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 리피바디 유도체-약물 복합체 100 mg당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다. 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 제한되지는 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 바람직하다.

[0049] 본 발명의 조성물을 유효성분으로 포함하는 비경구 투여용 제형으로는, 피하주사, 정맥주사 또는 근육 내 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 제형화하는 경우, 수분산된 농축물 또는 습윤 분말이 분산되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합될 수 있다.

[0050] 본 발명의 비만 억제용 조성물은 임의의 생리학적으로 허용가능 한 담체, 부형제 또는 안정화제 (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Alfonso, R., ed, Mack Publishing Co. (Easton, PA: 1995))와 바람직한 순도를 갖는 본 발명의 물질을 혼합하여 저장하기 위해 동결건조된 케이크 또는 수용액의 형태로 제조할 수 있다. 허용가능 한 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 완충용액, 예를 들어 인산, 시트르산 및 다른 유기산; 아스코르브산을 비롯한 항산화제; 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어 글라이신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 라이신; 단당류, 이당류, 및 글루코스, 만노스 또는 덱스트린을 비롯한 다른 탄수화물; 킬레이트제, 예를 들어 EDTA; 당 알콜, 예를 들어 만니톨 또는 소르비톨; 염-형성 반대이온, 예를 들어 나트륨; 및 (또는) 비이온성 계면활성제, 예를 들어 트윈, 플루로닉스 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이 포함된다.

[0052] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 억제제를 포함하는 비만 억제용 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 비만을 억제하는 방법에 관한 것이다.

[0053] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 약제학적 조성물을 도입하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 구체적으로, 구강, 직장, 국소, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 경피, 비측내, 흡입, 안구 내 또는 피내경로를 통해 통상적인 방식으로 투여될 수 있다.

[0054] 본 발명의 치료방법은 본 발명의 비만 억제용 조성물을 약학적 유효량으로 투여하는 것을 포함한다. 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 일이다. 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다. 따라서 본 발명의 목적에 적합한 암의 예방 또는 치료용 조성물의 유효량은 전술한 사항을 고려하여 결정하는 것이 바람직하다.

[0055] 또한, 본 발명의 비만 억제 방법은 MC4R과 GRP78의 결합이 촉진되어 비만 관련 신호전달 경로가 조절될 수 있는 임의의 동물에 적용가능하며, 동물은 인간 및 영장류뿐만 아니라, 소, 돼지, 양, 말, 개 및 고양이 등의 가축을

포함한다.

[0057] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0059] **실시예 1. MC4R의 세포 내 세 번째 고리와 결합하는 시상하부 단백질 확인**

[0060] MC4R의 세포 내 세 번째 고리를 포함하는 glutathione-S-transferase (GST)의 혼합 단백질을 마우스의 시상하부 단백질과 pull-down assay로 반응시킨 후, silver staining을 통해 확인된 밴드의 단백질 서열을 matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF)를 통해 분석해 본 결과, 본 단백질은 GRP78 채프론임을 확인하였다(도 1).

[0061]

[0062] **실시예 2. MC4R의 세포 내 세 번째 고리와 결합하는 GRP78의 도메인 확인**

[0063] MC4R과의 결합하는 GRP78의 도메인 확인을 위하여, GlobPlot 알고리즘을 이용하여 GRP78의 functional 도메인을 스크리닝한 결과, GRP78 단백질은 ATPase 기능 도메인 (D1, D2), 펩타이드 결합 도메인 (D3), C-termial tail 도메인 (D4)을 포함하는 것을 확인하였다(도 2의 A).

[0064] 각 도메인 별로 MC4R과의 결합여부를 확인하기 위하여, 세포 및 박테리아 수준에서 MC4R과 GRP78 각각의 도메인들을 과발현 시킨 후, 이들 간의 결합여부를 면역침전법을 통해 관찰한 결과, GRP78의 펩타이드 결합 도메인 (D3)이 MC4R의 세포 내 세 번째 고리와 직접적으로 결합함을 확인하였다(도 2의 B 및 C).

[0066] **실시예 3. GRP78 발현 억제가 MC4R trafficking 및 MC4R 신호전달에 미치는 영향 확인**

[0067] ER stress 환경 하에서 GRP78 발현 억제가 MC4R의 기저수준 활성화 및 전사 활성도에 미치는 영향을 확인하기 위해, 세포 내에 siGRP78과 MC4R을 발현시킨 뒤, ER stressor tunicamycin (TM) 처리 여부에 따라 MC4R의 세포 내 이동 및 CRE-mediated luciferase reporter gene assay를 통한 전사 활성도를 비교하였다.

[0068] 그 결과, ER stress 환경 하에서 GRP78의 발현 억제 시, MC4R의 세포 내 이동 정도, 기저 수준의 전사 활성도 및 작용제 처리에 따른 전사 활성도가 정상 대비 감소됨을 확인하였다(도 3).T

[0069] Tunicamycin은 streptomyces lysosuperificus가 생산하는 뉴클레오티드계 항생물질로서, 당단백질의 N-글리코시드당사슬의 합성을 저해한다고 알려져 있다.

[0071] **실시예 4. 마우스 뇌에서 GRP78과 MC4R의 발현양상 비교**

[0072] 마우스의 뇌 조직을 준비하여 GRP78과 MC4R에 대한 항체로 면역 염색한 후 각 단백질의 발현 양상을 관찰하였다.

[0073] 그 결과, MC4R의 기능 수행에 있어서 중요한 시상하부 PVN 부위에서 GRP78이 특이적으로 강하게 발현됨을 확인하였다 (도 4). 발현 정도가 약하기는 하지만, 이 외에 시상하부 내 arcuate nucleus, ventromedial hypothalamus, lateral hypothalamus 부위에 걸쳐 MC4R과 GRP78이 비슷한 양상으로 발현됨을 확인하였다 (도 5).

[0075] **실시예 5. 비만동물모델의 PVN 부위에서 GRP78의 발현 변화 관찰**

[0076] 비만동물모델(*ob/ob*)의 PVN 부위에서 GRP78에 대한 항체로 면역염색을 진행하여 관찰해 본 결과, 정상 마우스 대비 *ob/ob* 마우스의 PVN 부위에서 GRP78의 발현이 약 1.7배 증가됨을 확인하였다(도 6).

[0078] **실시예 6. ER stress 조건 하에서 GRP78과 MC4R 간의 상호작용 확인**

[0079] 영양과잉을 통한 장기적 ER stress 유발을 위해 고지방 사료(high-fat diet, HFD)를 40일간 제공하였으며, 단기적 ER stress 유발을 위해 ER 내에서 단백질의 *N*-glycosylation을 억제하는 tunicamycin (TM)을 160ug /DMSO 6.4ul (3.2ul x2, 6시간마다) 농도로 뇌실 (intracerebroventricle)을 통해 주입하였다. 각각의 ER stress가 유도된 마우스의 시상하부 단백질을 사용하여 GRP78과 MC4R의 발현 및 이들 간의 결합 정도를 western blotting 및 면역침전법 (co-immunoprecipitation)을 통해 확인하였다.

[0080] 그 결과, 각 실험 군의 경우, ER stress 표지 단백질로 알려진 X-box binding protein-1(XBP-1)의 발현이 대조군 대비 증가됨을 통해 ER stress의 유발여부를 우선적으로 확인하였다. 고지방식이를 통해 장기적 ER stress를 유발한 경우, GRP78과 MC4R의 발현이 각각 정상 대비 137%, 133%, 증가되어 있는 반면, 두 단백질 간의 결합 정도는 정상 대비 약 60%로 감소되는 결과를 확인하였다(도 7의 A 및 B). 또한, 단기적 ER stress 유발 시에도, GRP78와 MC4R의 발현이 각각 정상 대비 154%, 165%, 증가 되었으나, 이들 간의 결합 정도는 정상 대비 약 38%로 감소되는 결과를 확인하였다 (도 7의 C 및 D).

[0082] **실시예 7. Lenti-shGRP78에 의한 PVN 부위 특이적인 GRP78 발현 감소 확인**

[0083] Lentilox RNAi vector, pLL3.7의 multi-cloning site (MCS) 부위에 GRP78에 특이적인 shRNA(5′-AATCAAGGTCTATGAAGGTGA-3′)를 삽입시켜 원하는 shRNA construct를 제작하였다. 이 construct와 함께 VSVG, △8.9와 같은 viral DNA를 HEK293T 세포에 transfection시켜서 Lenti-shGRP78 virus를 제작하였다. 제작된 Lenti-shGRP78 virus가 마우스 뇌의 PVN 부위 특이적으로 GRP78의 발현을 억제시키는지 확인하고자, 마우스 PVN 부위에 Lenti-shGRP78 (또는 Lenti-control) virus를 주입시킨 후 약 3~4주의 발현 기간을 거친 후 PVN 부위 조직으로부터mRNA를 추출하여 GRP78에 대한 발현 양을 비교하였다.

[0084] 그 결과, 정상 대비 shGRP78에 의해 GRP78의 발현이 약40% 감소됨을 확인하였으며, pLL3.7 vector내 reporter gene, GFP의 발현을 통해 PVN 부위 특이적으로 virus가 주입됨을 확인하였다, 이에 비해 negative control 부위로 확인한 ARC 부위에서는 shGRP78에 의한 감소경향이 나타나지 않는 것을 확인하였다(도 8의 A 및B). 또한, 시상하부 PVN 부위에서 GRP78에 대한 조직면역염색을 통해 확인해 본 결과에서도 정상 대비 shGRP78에 의해 GRP78 발현이 감소되는 경향을 확인하였다(도 8의 C).

[0086] **실시예 8. ER stress 조건 하에서 PVN 부위 특이적인 GRP78 발현 감소에 따른 생리적인 변화 확인**

[0087] 실시예 7에서 제작한 Lenti-shGRP78 또는 Lenti-control을 PVN 부위 특이적으로 주입시키고, 한 그룹은 정상 사료(normal diet, ND)를, 다른 한 그룹은 고지방 사료 (high-fat diet, HFD)를 40일 동안 제공하면서 체중과 섭취량을 매일 정해진 시각 (오후 5시)에 측정하였다(도 9의 A).

[0088] 그 결과, 고지방 식이 그룹의 경우, control 대비 shGRP78에 의해 체중 변화율이 유의하게 증가됨을 확인하였으며, 섭취량에 있어서도 증가 경향은 나타내었으나 유의성은 확인하지 못하였다. 반면, 정상 식이 그룹의 경우는 체중 및 먹이 섭취량에 있어서 shGRP78에 의한 특이적인 변화를 보이지 않음을 확인하였다(도 9의 B-C).

[0089] 또한, 고지방 식이 그룹의 경우 shGRP78에 의해 산소소비량이 감소되는 경향을 나타내었으나 유의성은 확인되지 않았으며, 기본 locomotor activity에 있어서는 특이적인 변화를 나타내지 않았다(도 9의 D 및 E).

[0091] **실시예 9. 화학적 채프론의 MC4R 신호전달체계 조절을 통한 체중 및 먹이 섭취량 조절 확인**

[0092] 8~9 주령 수컷 마우스에 intracerebroventricular (ICV) cannulation 수술 진행 후, 7일간 회복시킨 다음, 화학적 채프론인 4-phenylbutyric acid (4-PBA, 200mg/kg)를 복강 내 주사로 5일 동안 전처리한 후, 채프론 처리 5일째 되는 날에 MC4R의 작용제인 MTII (3 nmol)와 길항제인 AgRP (2 nmol)를 뇌실로 처리하였다. 이때, 리간드 처리 전에 16시간 금식시킨 후 진행하였다(도 10 A).

[0093] 이후, 시간대 별로 체중 및 먹이 섭취량의 변화를 측정한 결과, 리간드 처리 후 1, 2시간대에는, 채프론 4-PBA 처리 여부와 관계없이 MTII만 또는 MTII와 AgRP를 함께 처리해 준 모든 경우에 대하여 체중 및 섭취량이 유의하게 감소되는 결과를 확인하였으며(도 10 B, C), 리간드 처리 후 6, 10시간대에는, 4-PBA를 처리하지 않은 그룹

의 경우는, MTII 처리에 따른 체중 및 섭취량 감소 경향이 유지되었으나 MTII와 함께 AgRP를 처리하였을 때에는 체중 및 섭취량이 정상군만큼 회복되는 결과를 확인하였다.

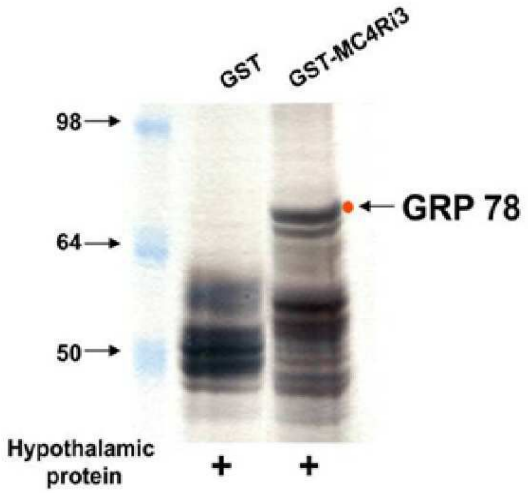
[0094] 한편, 같은 시간대에서 4-PBA를 전 처리한 그룹의 경우는, MTII 처리에 따른 체중 및 섭취량 감소 경향은 유지되었으나, AgRP 처리에 의한 체중 및 섭취량의 회복 현상은 여전히 관찰되지 않는 것을 확인하였다(도 10 B, C).

[0095] 즉, 4-PBA와 같은 화학적 채프론은 MC4R의 길항제인 AgRP의 효과를 약화시킴으로써 작용제인 MTII의 효과를 지속시키는 데에 기여할 수 있으므로, 화학적 채프론에 의해서 MC4R 신호전달에 따른 체중 및 섭식량이 조절될 수 있는 것을 확인한 것이다.

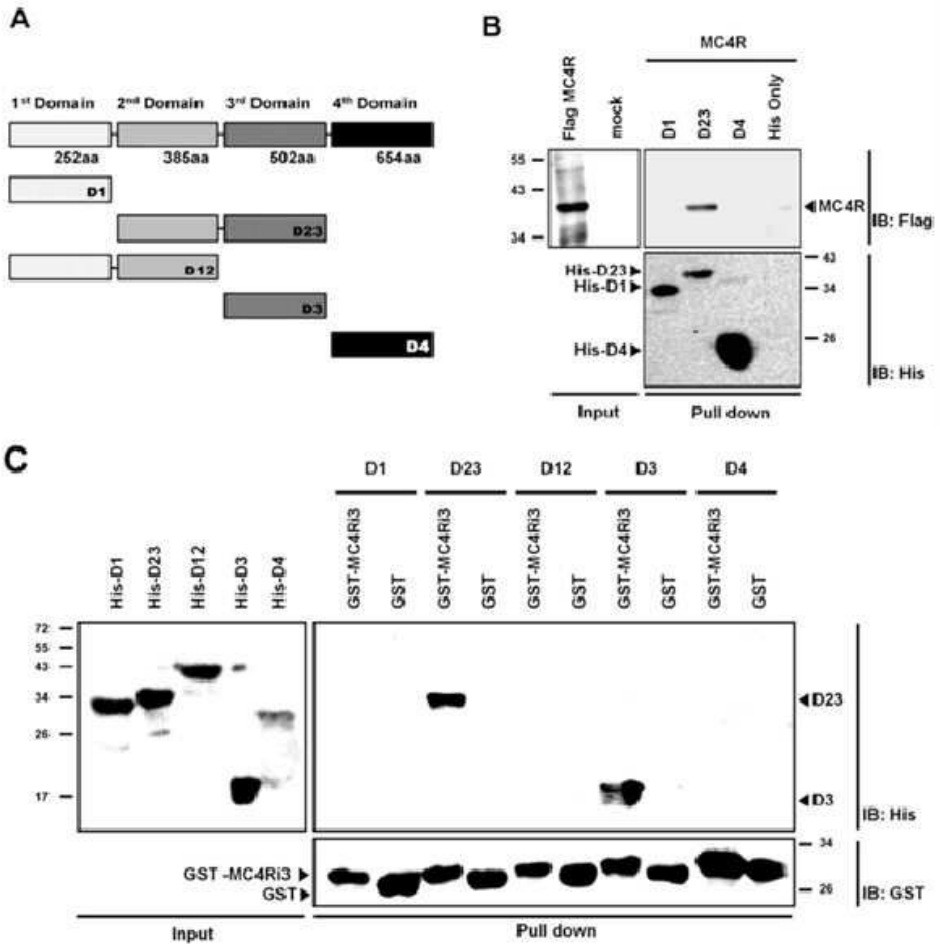
[0097] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

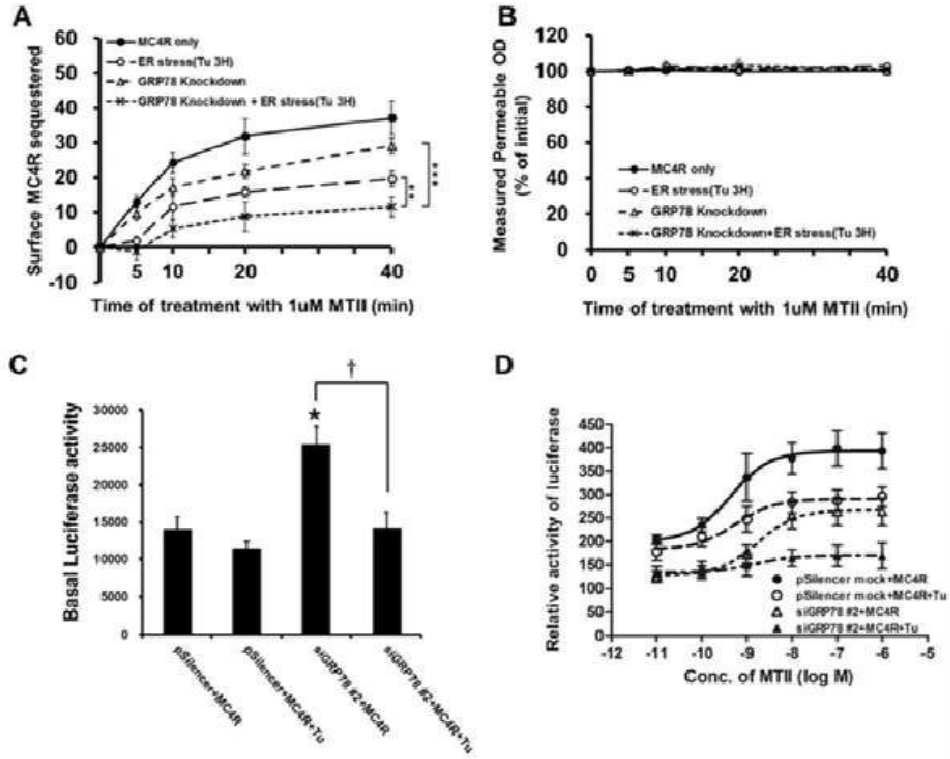
도면1



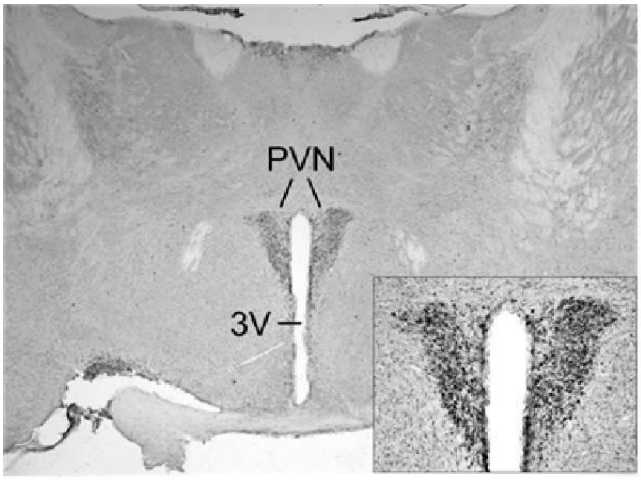
도면2


A
1st Domain
2nd Domain
3rd Domain
4th Domain
252aa
385aa
502aa
654aa
D1
D23
D12
D3
D4
B
MC4R
Flag MC4R
mock
D1
D23
D4
His Only
55
43
34
MC4R
IB: Flag
His-D23
His-D1
His-D4
43
34
26
IB: His
Input
Pull down
C
D1
D23
D12
D3
D4
His-D1
His-D23
His-D12
His-D3
His-D4
GST-MC4Ri3
GST
72
55
43
34
26
17
D23
D3
IB: His
GST-MC4Ri3
GST
34
26
IB: GST
Input
Pull down

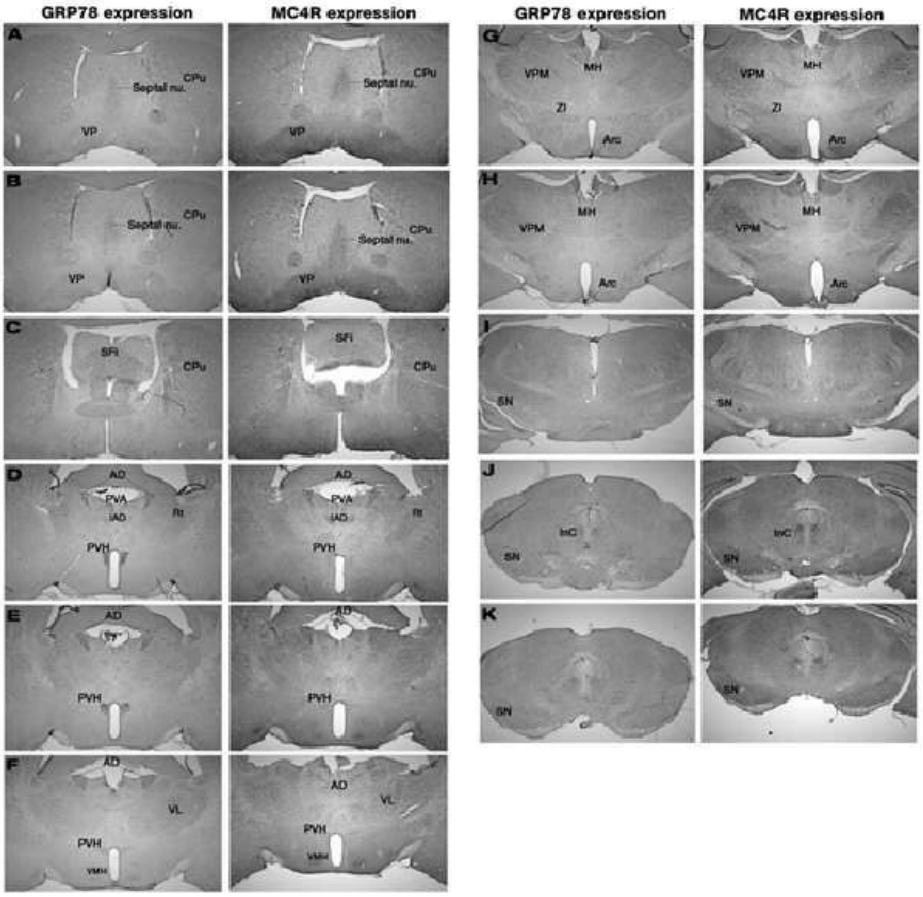
도면3


A
Surface MC4R sequestered
MC4R only
ER stress(Tu 3H)
GRP78 Knockdown
GRP78 Knockdown + ER stress(Tu 3H)
Time of treatment with 1uM MTII (min)
B
Measured Permeable OD (% of initial)
MC4R only
ER stress(Tu 3H)
GRP78 Knockdown
GRP78 Knockdown+ER stress(Tu 3H)
Time of treatment with 1uM MTII (min)
C
Basal Luciferase activity
pSilencer+MC4R
pSilencer+MC4R+Tu
siGRP78 #2+MC4R
siGRP78 #2+MC4R+Tu
D
Relative activity of luciferase
pSilencer mock+MC4R
pSilencer mock+MC4R+Tu
siGRP78 #2+MC4R
siGRP78 #2+MC4R+Tu
Conc. of MTII (log M)

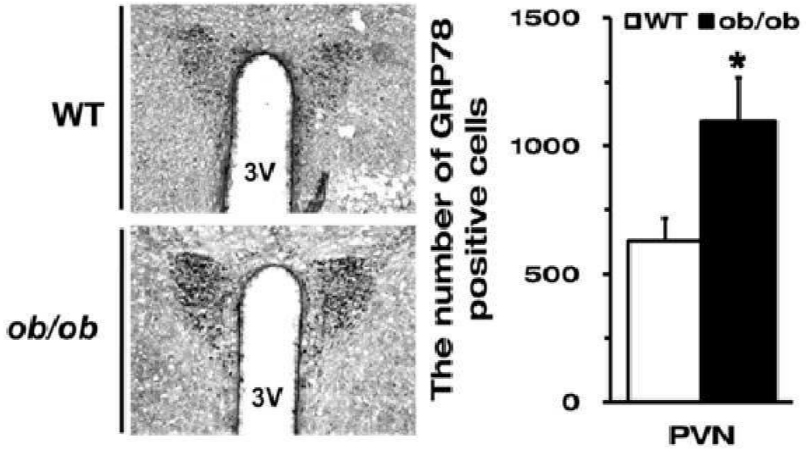
도면4


PVN
3V

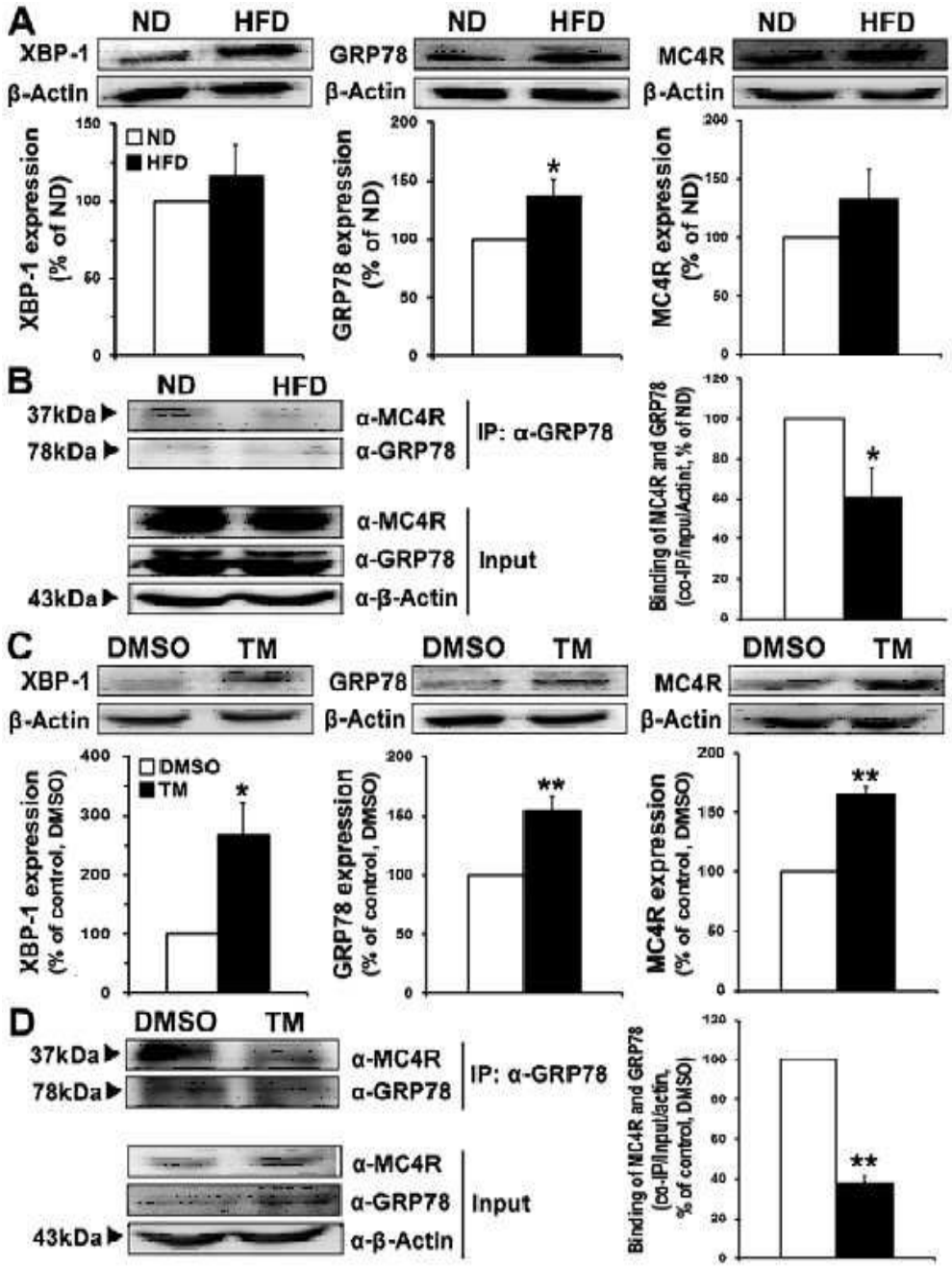
도면5


GRP78 expression
MC4R expression
GRP78 expression
MC4R expression
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
Septal nu.
CPu
VP
SFi
AD
PVA
fx
PVH
VL
VPM
MH
ZI
Arc
SN
lnC

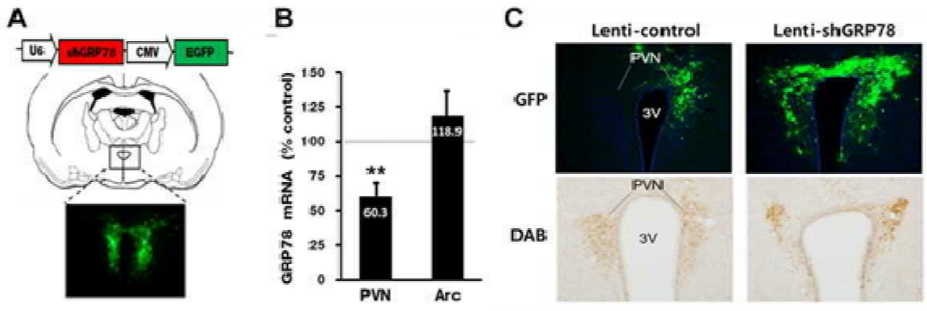
도면6


WT
ob/ob
3V
3V
The number of GRP78 positive cells
1500
1000
500
0
WT
ob/ob
*
PVN

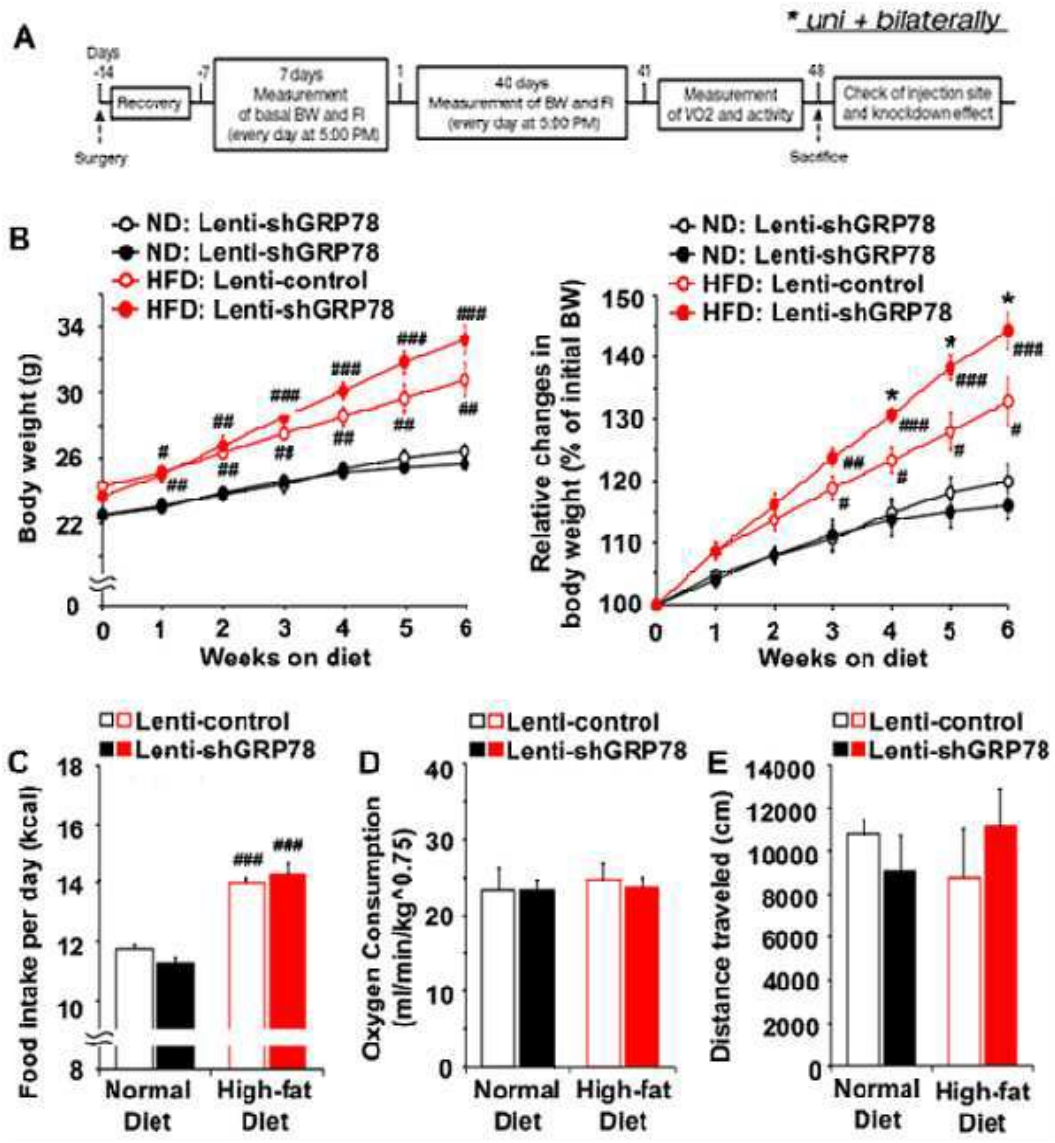
도면7


A
ND
HFD
XBP-1
β-Actin
GRP78
MC4R
XBP-1 expression (% of ND)
GRP78 expression (% of ND)
MC4R expression (% of ND)
B
37kDa
78kDa
43kDa
α-MC4R
α-GRP78
α-β-Actin
IP: α-GRP78
Input
Binding of MC4R and GRP78 (co-IP/Input/Actin, % of ND)
C
DMSO
TM
XBP-1 expression (% of control, DMSO)
GRP78 expression (% of control, DMSO)
MC4R expression (% of control, DMSO)
D
Binding of MC4R and GRP78 (co-IP/Input/actin, % of control, DMSO)

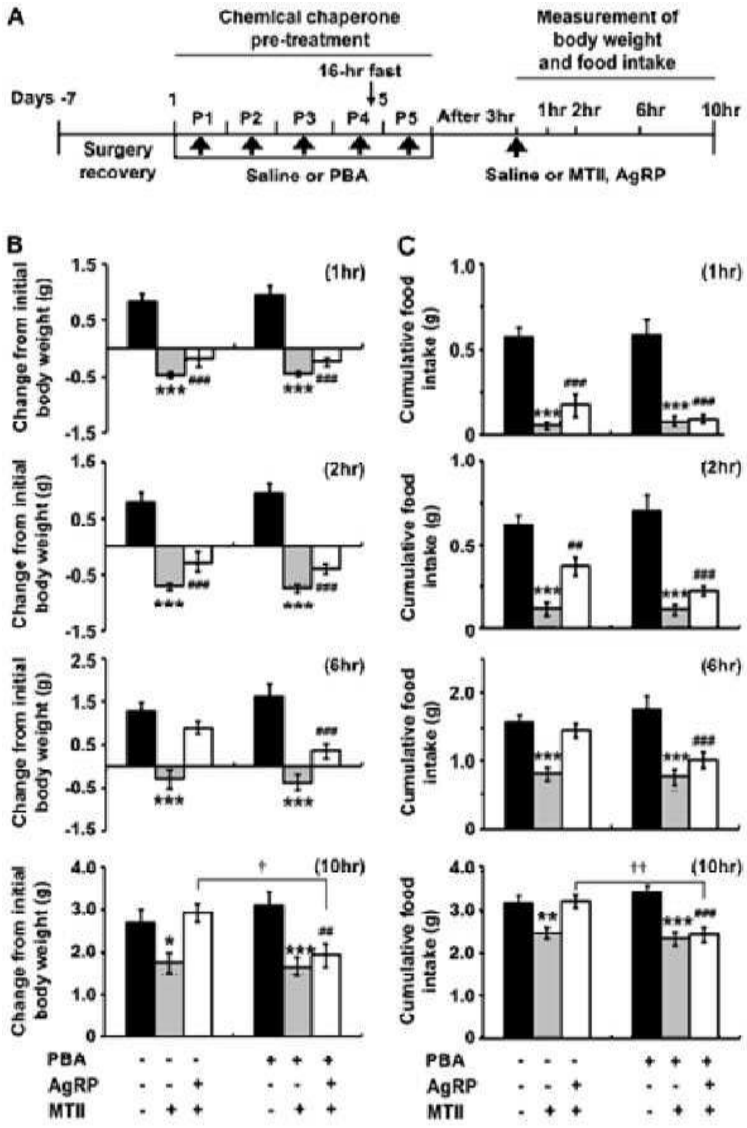
도면8


A
U6
shGRP78
CMV
EGFP
B
GRP78 mRNA (% control)
60.3
118.9
PVN
Arc
C
Lenti-control
Lenti-shGRP78
GFP
DAB
PVN
3V

도면9


A
* uni + bilaterally
Days
-14
Recovery
-7
7 days
Measurement
of basal BW and FI
(every day at 5:00 PM)
1
40 days
Measurement of BW and FI
(every day at 5:00 PM)
41
Measurement
of VO2 and activity
48
Check of injection site
and knockdown effect
Surgery
Sacrifice
B
ND: Lenti-shGRP78
ND: Lenti-shGRP78
HFD: Lenti-control
HFD: Lenti-shGRP78
Body weight (g)
Weeks on diet
Relative changes in
body weight (% of initial BW)
Weeks on diet
C
Lenti-control
Lenti-shGRP78
Food intake per day (kcal)
Normal
Diet
High-fat
Diet
D
Lenti-control
Lenti-shGRP78
Oxygen Consumption
(ml/min/kg^0.75)
Normal
Diet
High-fat
Diet
E
Lenti-control
Lenti-shGRP78
Distance traveled (cm)
Normal
Diet
High-fat
Diet

도면10



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Method for screening inhibitors of obesity

<130> P16-B350

<160> 1

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GRP78 shRNA

<400> 1

aatcaaggtc tatgaaggtg a 21