



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0096165
(43) 공개일자 2020년08월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/37 (2006.01) G01N 33/542 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12Q 1/37 (2013.01)
G01N 33/542 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-0012449
(22) 출원일자 2020년02월03일
심사청구일자 2020년02월03일
- (30) 우선권주장
1020190013755 2019년02월01일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
- (72) 발명자
박지영
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
김민
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
리앤목특허법인

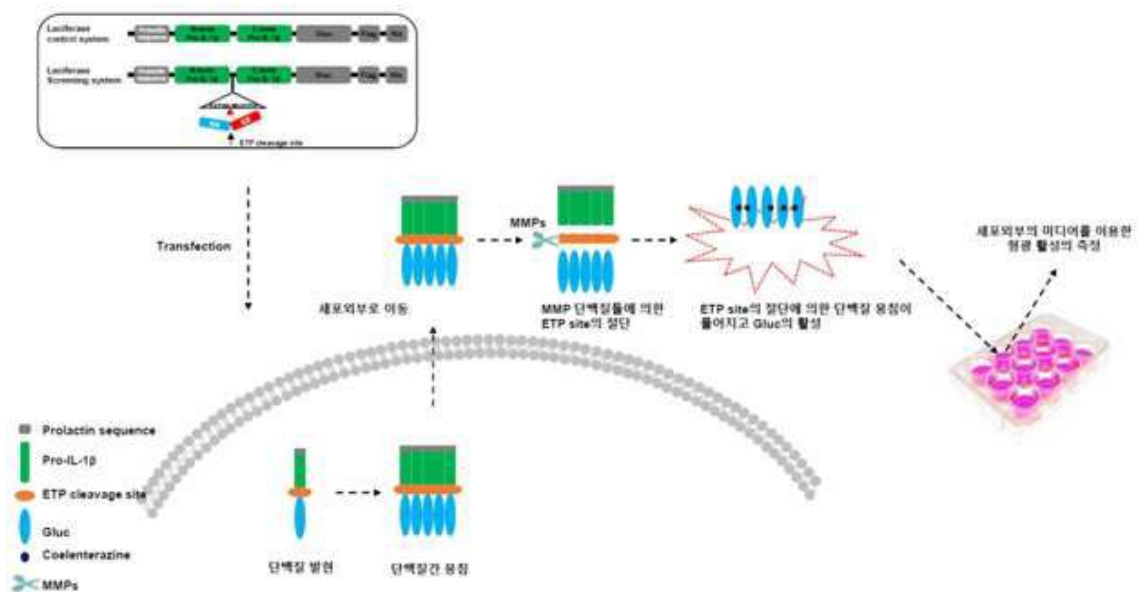
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 엔도트로핀 절단 효소의 저해제를 포함하는 엔도트로핀 활성 저해용 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 엔도트로핀 절단 효소의 저해제를 포함하는 엔도트로핀 활성 저해용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 상기 조성물은 비만 세포에서 주로 발현되는 ETP의 생성 및 이의 활성을 억제함으로써 비만, 당뇨, 간 질환 뿐만 아니라 암의 치료에 이용될 수 있다.

대표도 - 도4b



(52) CPC특허분류

G01N 33/573 (2013.01)

G01N 2333/95 (2013.01)

G01N 2500/00 (2013.01)

(72) 발명자

이상민

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

조우빈

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711075430

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)

연구과제명 비만 연관 대사성 질환에서 세포외기질 단백질 Col6A3 유래 endotrophin의 생성 및 활성화
기전규명

기 여 율 50/100

주관기관 울산과학기술원

연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711081584

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오.의료기술개발(R&D)

연구과제명 비만 연관 당뇨 및 암질환 개선을 위한 천연물 신약후보 발굴 및 작용기전 규명

기 여 율 40/100

주관기관 울산과학기술원

연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711091661

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 집단연구지원(R&D)

연구과제명 대사 스트레스 세포대응 연구센터

기 여 율 10/100

주관기관 울산과학기술원

연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

엔도트로핀(endotrophin) 절단 효소의 저해제를 포함하는 엔도트로핀 활성 저해용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 효소는 세포외기질 금속함유 단백분해 효소(Matrix metalloproteinase, MMP)인 것인 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 MMP는 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-18, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-23, MMP-24, 및 MMP-25로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 것인 조성물.

청구항 4

엔도트로핀 절단 효소의 저해제를 유효성분으로 포함하는 비만, 당뇨, 암 또는 간질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 효소는 세포외기질 금속함유 단백분해 효소(Matrix metalloproteinase, MMP)인 것인 약학적 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 MMP는 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-18, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-23, MMP-24, 및 MMP-25로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 것인 약학적 조성물.

청구항 7

청구항 4에 있어서, 상기 절단 효소는 엔도트로핀의 활성을 감소시키는 것인 약학적 조성물.

청구항 8

청구항 4에 있어서, 상기 간 질환은 간염, 간섬유화, 및 알코올성 간 질환으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인 약학적 조성물.

청구항 9

엔도트로핀 절단 효소의 저해제를 유효성분으로 포함하는 비만, 당뇨, 암 또는 간질환의 예방 또는 개선용 건강 기능식품.

청구항 10

엔도트로핀 절단 효소의 저해제를 포함하는 엔도트로핀 활성 저해제 스크리닝용 키트.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 키트는 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring)인 것인 스크리닝용 키트.

청구항 12

개체로부터 분리된 생물학적 시료에 엔도트로핀 활성 저해제 후보물질을 첨가하는 단계;

엔도트로핀 단백질의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계; 및

상기 단백질의 발현 수준이 상기 후보물질을 첨가하기 이전 보다 감소한 경우, 상기 후보물질을 엔도트로핀 활성 저해제인 것으로 판단하는 단계를 포함하는 엔도트로핀 활성 저해제의 스크리닝 방법.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 단백질의 발현 수준은 웨스턴 블롯(western blotting), 닷 블롯(dot blotting), 효소면역분석법(enzyme-linked immunosorbent assay), 방사능 면역분석법(RIA), 방사면역확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역 전기영동, 면역조직화염색, 면역침전법(immunoprecipitation), 보체 고정 분석법, 유세포 분석법(FACS) 또는 단백질 칩 방법을 이용하는 것인 스크리닝 방법.

청구항 14

청구항 12에 있어서, 상기 후보물질은 2-싸이옥소-5-({5-[3-(트리플루오로메틸)페닐]-2-푸릴}메틸렌)-1,3-싸이아졸리딘-4-온(2-thioxo-5-({5-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-2-furyl}methylene)-1,3-thiazolidin-4-one), 2-클로로-N-(6-메틸-2,3,4,9-테트라하이드로-1H-카바졸-1-일)아세트아마이드(2-chloro-N-(6-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-yl)acetamide), 4,4'-(4,4'-바이페닐디일디이미노)비스(4-옥소-2-부텐오익 애씨드)(4,4'-(4,4'-biphenyldiylidimino)bis(4-oxo-2-butenic acid)), 3-아미노-5-(4-니트로벤질리딘)-2-싸이옥소-1,3-싸이아졸리딘-4-온(3-amino-5-(4-nitrobenzylidene)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-one), 6-브로모-3-[3-(3-니트로페닐)아크릴로일]-4-페닐-2(1H)-퀴놀리논(6-bromo-3-[3-(3-nitrophenyl)acryloyl]-4-phenyl-2(1H)-quinolinone), 3-[(4-브로모-2-클로로페닐)아미노]-1-페닐-2-프로펜-1-온(3-[(4-bromo-2-chlorophenyl)amino]-1-phenyl-2-propen-1-one) 및 2-(N-벤질-4-메톡시페닐설폰아미도)-5-((디에틸아미노)메틸)-N-하이드록시-3-메틸벤즈아미드(2-(N-benzyl-4-methoxyphenylsulfonamido)-5-((diethylamino)methyl)-N-hydroxy-3-methylbenzamide) 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것인 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 엔도트로핀 절단 효소의 저해제를 포함하는 엔도트로핀 활성 저해용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 급증하고 있는 비만은 암의 발병 및 진행과 관련이 깊다. 비만은 당뇨 및 심혈관 질환을 비롯한 다양한 대사성 질환을 유발한다고 알려져 있는데, 특히 유방암, 자궁암, 간암, 대장암을 포함하는 다양한 암들의 주요 위험인자로도 알려져 있다. 비만 혹은 당뇨 시 유도되는 대사 스트레스 및 지방세포에서 분비되는 아디포카인(adipokine)의 변화가 어떻게 암의 진행에 영향을 주는지 분자적 수준에서 그 기전을 규명하는 것은 매우 중요하다. 비만한 암환자의 경우 암의 성장과 전이가 빠르고, 항암제 처리 후 재발률이 정상체중 환자에 비해 높음에 대한 임상결과가 알려져 있다. 이는 비만 혹은 당뇨가 암의 진행을 촉진하는 특정한 환경적 요소를 제공하기 때문이라고 여겨질 수 있다.

[0003] 엔도트로핀(Endotrophin, ETP)은 지방세포에서 분비되는 type VI 콜라겐의 알파3 사슬의 C-말단 프로펩티드가 절단되면서 생성되는 단백질로 비만과 암의 연결고리로 알려져 있다. ETP이 활성화 되면, 내피세포 이동(endothelial cell migration) 및 혈관신생(angiogenesis)을 현저히 촉진시키는 효과가 나타난다. ETP는 비만 및 당뇨가 유도된 경우 지방세포에서 그 양이 증가하게 되고, 염증반응 및 섬유화 반응을 촉진할 수 있다. 특히, 유방암 동물모델에서 ETP의 암 미세환경 내에서의 과발현이 암의 성장과 전이를 증가시킬 수 있음이 확인된 바 있고(JCI 122(11):4243-56, 2012), 항암제인 시스플라틴(cisplatin) 내성 및 시스플라틴과 TZD(rosiglitazone)를 동시 처리한 경우 증가되는 항암효과를 설명하는 기전도 제시된 바 있다(EMBO Molecular Medicine 5(6):935-48, 2013).

[0004] 최근 상술한 비만과 암의 상관관계를 설명하는 다양한 연구, 특히 지방세포와 암세포간의 상호작용이 어떻게 각기 다른 세포의 대사과정을 조절하는지에 대한 연구가 활발히 진행 중에 있다. 이 가운데서 ETP 및 이의 저해제를 활용한 새로운 치료제의 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 일 양상은 엔도트로핀(endotrophin) 절단 효소의 저해제를 포함하는 엔도트로핀 활성 저해용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0006] 다른 양상은 엔도트로핀 절단 효소의 저해제를 유효성분으로 포함하는 비만, 당뇨, 암 또는 간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0007] 다른 양상은 엔도트로핀 절단 효소의 저해제를 유효성분으로 포함하는 비만, 당뇨, 암 또는 간 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.
- [0008] 다른 양상은 엔도트로핀 절단 효소의 저해제를 유효성분으로 포함하는 엔도트로핀 활성 저해제 스크리닝용 키트를 제공하는 것이다.
- [0009] 다른 양상은 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 엔도트로핀 활성 저해제 후보물질을 첨가하는 단계; 엔도트로핀 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 단백질의 발현 수준이 상기 후보물질을 첨가하기 이전 보다 감소한 경우, 상기 후보물질을 엔도트로핀 활성 저해제인 것으로 판단하는 단계를 포함하는 엔도트로핀 활성 저해제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 일 양상은 엔도트로핀(endotrophin, ETP) 절단 효소의 저해제를 포함하는 엔도트로핀 활성 저해용 조성물을 제공한다. 상기 엔도트로핀은 지방세포에서 분비되는 Col6a3 단백질의 C-말단 프로펩티드가 절단되면서 생성되는 단백질이다. 일 구체예에 있어서, 상기 Col6a3 단백질의 C-말단은 서열번호 1로 표시되는 C2-C5 도메인인 것일 수 있다. 상기 효소는 세포외기질 금속함유 단백질분해 효소(Matrix metalloproteinase, MMP) 인 것일 수 있다. 상기 MMP는 조직재형성 기능을 하는 것으로서, 생리적으로 종양 전이, 배아 발생 및 상처 치유의 역할을 담당할 수 있다. 구조적으로 대부분의 MMP는 촉매 도메인, 카복시말단 헤모펙신-유사 도메인(헤모펙신 도메인) 및 효소가 활성화되는 동안 절단되는 프로도메인을 가질 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 MMP는 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-18, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-23, MMP-24, 및 MMP-25로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [0011] 본 명세서에서 용어, "효소 저해제"는 용어 효소 억제제(enzyme inhibitor)와 혼용되어 사용될 수 있으며 효소의 반응물을 감소시키는 물질을 의미한다. 일 구체예에 있어서, 상기 저해제는 2-싸이옥소-5-({5-[3-(트리플루오로메틸)페닐]-2-푸릴}메틸렌)-1,3-싸이아졸리딘-4-온(2-thioxo-5-({5-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-2-furyl)methylene}-1,3-thiazolidin-4-one), 2-클로로-N-(6-메틸-2,3,4,9-테트라하이드로-1H-카바졸-1-일)아세트아마이드(2-chloro-N-(6-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-yl)acetamide), 4,4'-(4,4'-바이페닐디일 디이미노)비스(4-옥소-2-부텐오닉 애씨드)(4,4'-(4,4'-biphenyldiylidimino)bis(4-oxo-2-butenonic acid)), 3-아미노-5-(4-니트로벤질리딘)-2-싸이옥소-1,3-싸이아졸리딘-4-온(3-amino-5-(4-nitrobenzylidene)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-one), 6-브로모-3-[3-(3-니트로페닐)아크릴로일]-4-페닐-2(1H)-퀴놀리논(6-bromo-3-[3-(3-nitrophenyl)acryloyl]-4-phenyl-2(1H)-quinolinone), 3-[(4-브로모-2-클로로페닐)아미노]1-페닐-2-프로펜-1-온(3-[(4-bromo-2-chlorophenyl)amino]-1-phenyl-2-propen-1-one), 2-(N-벤질-4-메톡시페닐설폰아미도)-5-((디에틸아미노)메틸)-N-하이드록시-3-메틸벤즈아미드(2-(N-benzyl-4-methoxyphenylsulfonamido)-5-((diethylamino)methyl)-N-hydroxy-3-methylbenzamide) 또는 이의 조합인 것일 수 있다. 상기 저해제는 MMP 단백질의 활성을 저해함으로써 Col6a3 단백질의 절단, 즉 엔도트로핀 단백질의 생성을 억제할 수 있다.
- [0012] 본 명세서에서 용어, "절단"은 Col6a3 단백질이 세포외로 분비되면서 절단되어 형성되는 엔도트로핀 단백질의 펩티드 결합을 분해하는 것을 의미하며, 절단 부위 내지 도메인은 엔도트로핀 단백질의 펩티드 부위 절단을 위한 효소적 활성을 갖는 폴리펩티드 서열을 의미한다. 본 명세서에서 용어, "절단 부위" 또는 "절단 예상 부위"는 엔도트로핀 단백질이 생성되기 위해 절단되는 Col6a3 단백질의 아미노산 일부 부위를 의미한다. 일 실시예에 있어서, 엔도트로핀 단백질의 절단 부위는 서열번호 1로 표시되는 C2-C5 도메인의 3097번째 아미노산과 3098번째 아미노산 사이인 것일 수 있다.
- [0013] 다른 양상은 엔도트로핀 절단 효소의 저해제를 유효성분으로 포함하는 비만, 당뇨, 암 또는 간질환의 예방 또는

치료용 약학적 조성물을 제공한다. 엔도트로핀 절단 효소 저해제의 구체적인 내용은 전술한 바와 같다. 일 구체예에 있어서, 상기 간질환은 간염, 간섬유화, 알코올성 간 질환 또는 이의 조합인 것일 수 있다.

- [0014] 일 양상에 따른 비만, 당뇨, 암 또는 간질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구제 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화되어 사용할 수 있고, 제형화를 위하여 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다.
- [0015] 상기 담체 또는, 부형제 또는 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함한 다양한 화합물 혹은 혼합물을 들 수 있다.
- [0016] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조할 수 있다.
- [0017] 경구 투여를 위한 고형제제는 상기 엔도트로핀 절단 효소 저해제에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 제조할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다.
- [0018] 경구를 위한 액상 제제로는 현탁액, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용하는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 포함할 수 있다.
- [0019] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등을 사용할 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤젤라틴 등을 사용할 수 있다.
- [0020] 일 양상에 따른 비만, 당뇨, 암 또는 간질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서는 1일 0.0001 내지 2,000 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 2,000 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수회 나누어서 투여할 수도 있다. 다만, 상기 투여량에 의해서 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0021] 일 양상에 따른 비만, 당뇨, 암 또는 간질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유 동물에 다양한 경로로 투여할 수 있다. 투여의 모든 방식은 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해서 투여할 수 있다.
- [0022] 또 다른 양상은 엔도트로핀 절단 효소의 저해제를 유효성분으로 포함하는 비만, 당뇨, 암 또는 간질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다. 엔도트로핀 절단 효소의 저해제의 구체적인 내용은 전술한 바와 같다.
- [0023] 일 양상에 따른 비만, 당뇨, 암 또는 간질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품에 있어서, 상기 엔도트로핀 절단 효소의 저해제를 건강기능식품의 첨가물로 사용하는 경우 이를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 예방, 건강 또는 치료 등의 각 사용 목적에 따라 적합하게 결정할 수 있다.
- [0024] 건강기능식품의 제형은 산제, 과립제, 환, 정제, 캡슐제의 형태뿐만 아니라 일반 식품 또는 음료의 형태 어느 것이나 가능하다.
- [0025] 상기 식품의 종류에는 특별히 제한은 없고, 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초콜렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함할 수 있다.
- [0026] 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 상기 엔도트로핀 절단 효소의 저해제는 원료 100 중량부에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가할 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 또한 본 발명은 천연물로부터의 분획물을 이용하는 점에서 안전성 면에서 문제가 없으므로 상기 범위 이상의 양으로도 사

용할 수 있다.

- [0027] 일 양상에 따른 건강기능식품 중 음료는 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명에 따른 음료 100 mL당 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g일 수 있다.
- [0028] 상기 외에 일 양상에 따른 비만, 당뇨, 암 또는 간질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제를 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 수면 개선용 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 제한되지 않으나 본 발명의 건강기능식품 100 중량부 대비 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0029] 다른 양상은 엔도트로핀 절단 효소의 저해제를 포함하는 엔도트로핀 활성 저해제 스크리닝용 키트를 제공한다. 엔도트로핀 절단 효소 저해제의 구체적인 내용은 전술한 바와 같다. 일 구체예에 있어서, 상기 키트는 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring)인 것인 스크리닝용 키트인 것일 수 있다.
- [0030] 또한, 상기 엔도트로핀 활성 저해제 스크리닝용 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함하여 구성될 수 있다. 예를 들면, 상기 키트는 LISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 스크리닝용 키트일 수 있다. ELISA 키트는 상기 단백질에 대한 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 엔도트로핀 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한 ELISA 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소(예: 항체와 컨주게이트됨) 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다. 또한, 예를 들면, 상기 키트는 분석결과를 알 수 있는 신속한 테스트를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 래피드(rapid) 키트 일 수 있다. 래피드 키트는 단백질에 대한 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 엔도트로핀 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한 래피드 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 래피드 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 특이 항체와 2차 항체가 고정된 나이트로 셀룰로오스 멤브레인, 항체가 결합된 비드에 결합된 멤브레인, 흡수패드와 샘플 패드 등 다른 물질 등을 포함할 수 있다. 또한, 예를 들면, 상기 키트는 질량 분석을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 MS/MS 모드인 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트일 수 있다. SIM(Selected Ion Monitoring)이 질량분석기의 소스 부분에서 한 번 충돌하여 생긴 이온을 이용하는 방법인 반면, MRM은 상기 한 번 깨진 이온 중에서 특정 이온을 한 번 더 선택하여 연속적으로 연결된 또 다른 MS의 소스를 한 번 더 통과시켜 충돌시킨 후 이 중에서 얻은 이온들을 이용하는 방법이다. 상기 MRM(Multiple reaction monitoring) 분석 방법들을 통하여, 정상 대조군, 또는 동일 개체의 단백질 발현 수준과 비만, 당뇨, 암 및/또는 간 질환을 가진 개체에서의 단백질 발현 수준을 비교할 수 있고, 또한, 콜라겐 제6형 유전자에서 엔도트로핀 단백질로의 유의한 발현량 증감여부를 판단하여, 후보물질의 엔도트로핀 활성 저해 여부를 스크리닝 할 수 있다.
- [0031] 다른 양상은 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 엔도트로핀 활성 저해제 후보물질을 첨가하는 단계; 엔도트로핀 단백질의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계; 및 상기 단백질의 발현 수준이 상기 후보물질을 첨가하기 이전 보다 감소한 경우, 상기 후보물질을 엔도트로핀 활성 저해제인 것으로 판단하는 단계를 포함하는 엔도트로핀 활성 저해제의 스크리닝 방법을 제공한다. 상기 엔도트로핀 활성 저해제의 구체적인 내용은 전술한 바와 같다.
- [0032] 상기 개체는 비만, 당뇨, 암 및/또는 간 질환을 가지고 있는 대상으로서 특히 비만한 대상일 수 있다. 상기 개체는 척추동물, 포유동물, 또는 인간 (*Homo sapiens*)을 포함할 수 있다. 또한, 상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨일 수 있다.
- [0033] 상기 후보 물질은 엔도트로핀의 활성을 저해하는 물질 또는 엔도트로핀 절단 효소의 저해제로서 효과를 나타낼 것으로 기대되는 물질로서, 예를 들어, 임의의 물질(substance), 분자(molecule), 원소(element), 화합물

(compound), 실체물(entity) 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 단백질, 폴리펩티드, 저분자 유기 화합물(small organic molecule), 다당류(polysaccharide), 폴리뉴클레오티드 등을 포함할 수 있다. 또한, 자연 산물(natural product), 합성 화합물 또는 화학 화합물 또는 2개 이상의 물질의 조합일 수도 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 후보 물질은 2-싸이옥소-5-({5-[3[(트리플루오로메틸)페닐]-2-퓨릴]메틸렌}-1,3-싸이아졸리딘-4-온(2-thioxo-5-({5-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-2-furyl}methylene)-1,3-thiazolidin-4-one), 2-클로로-N-(6-메틸-2,3,4,9-테트라하이드로-1H-카바졸-1-일)아세트아마이드(2-chloro-N-(6-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-yl)acetamide), 4,4'-(4,4'-바이페닐디일디이미노)비스(4-옥소-2-부텐오닉 애씨드)(4,4'-(4,4'-biphenyldiyl-diimino)bis(4-oxo-2-butenonic acid)), 3-아미노-5-(4-니트로벤질리딘)-2-싸이옥소-1,3-싸이아졸리딘-4-온(3-amino-5-(4-nitrobenzylidene)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-one), 6-브로모-3-[3-(3-니트로페닐)아크릴로일]-4-페닐-2(1H)-퀴놀리논(6-bromo-3-[3-(3-nitrophenyl)acryloyl]-4-phenyl-2(1H)-quinolinone), 3-[(4-브로모-2-클로로페닐)아미노]1-페닐-2-프로펜-1-온(3-[(4-bromo-2-chlorophenyl)amino]-1-phenyl-2-propen-1-one), 2-(N-벤질-4-메톡시페닐설폰아미도)-5-((디에틸아미노)메틸)-N-하이드록시-3-메틸벤즈아미드(2-(N-benzyl-4-methoxyphenylsulfonamido)-5-((diethylamino)methyl)-N-hydroxy-3-methylbenzamide) 또는 이의 조합인 것일 수 있다. 상기 엔도트로핀 단백질 발현 수준의 측정은 예를 들어, 웨스턴 블롯(western blotting), 닷 블롯(dot blotting), 효소면역분석법(enzyme-linked immunosorbent assay), 방사능 면역분석법(RIA), 방사면역확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역 전기영동, 면역조직화학염색, 면역침전법(immunoprecipitation), 보체 고정 분석법, 유세포 분석법(FACS) 또는 단백질 칩 방법 등이 사용될 수 있다.. 또한, 상기 엔도트로핀 단백질 활성 수준의 측정은 예를 들어, 세포주에서 엔도트로핀에 의한 혈관생성(angiogenesis), 세포이동성(mobility), EMP(epithelial mesenchymal transition), 섬유화(fibrosis)의 증가 등을 측정하는 것일 수 있다. 일 실시예에서는 루시퍼라제 효소 활성 측정법을 이용하여 엔도트로핀의 활성 수준을 측정하였다.

[0034] 다른 양상은 엔도트로핀 활성 저해제 스크리닝 시스템을 제공한다.

[0035] 상기 엔도트로핀 활성 저해제는 엔도트로핀의 생성, 활성을 저해하는 물질 또는 엔도트로핀 절단 효소의 저해제로서 효과를 나타낼 것으로 기대되는 물질을 의미한다. 일 구체예에 있어서, 상기 시스템은 5 내지 15개의 아미노산 서열이 삽입된 IL-1b 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 세포주를 포함한다. 상기 재조합 벡터는 형광 단백질 유전자를 포함하는 것일 수 있다. 상기 형광 단백질은 루시퍼라제(luciferase), 녹색 형광 단백질(GFP), 변형된 녹색 형광 단백질(modified green fluorescent protein), 증강된 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescent protein; EGFP), 적색 형광 단백질(RFP), 증강된 적색 형광 단백질(ERFP), 청색 형광 단백질(BFP), 증강된 청색 형광 단백질(EBFP), 황색 형광 단백질(YFP), 증강된 황색 형광 단백질(EYFP), 남색 형광 단백질(CFP), 및 증강된 남색 형광 단백질(ECFP)로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[0036] 다른 양상은 5 내지 15개의 아미노산 서열이 삽입된 IL-1b 유전자 및 형광 단백질 유전자를 재조합하여 형질전환 세포를 형성하는 단계; 형질전환 세포를 배지에서 배양하는 단계; 및 상기 형광 단백질의 형광을 측정하는 단계를 포함하는 엔도트로핀 활성 저해제의 스크리닝 방법을 제공한다. 상기 삽입된 아미노산 서열은 엔도트로핀 절단 부위인 것일 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 IL-1b 유전자에 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열 또는 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열이 추가로 포함된 것일 수 있다. 상기 형광 단백질의 형광을 측정하는 단계 전, 엔도트로핀 활성 저해제 후보물질을 처리하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 후보물질에 의해 형광 단백질의 형광 수준이 상기 후보물질을 첨가하기 이전 보다 감소한 경우, 상기 후보물질을 엔도트로핀 활성 저해제인 것으로 판단할 수 있다. 상기 후보물질의 구체적인 내용은 전술한 바와 같다.

[0037] 따라서, 일 양상에 따른 스크리닝 시스템 및 이를 이용한 스크리닝 방법은 엔도트로핀의 활성을 저해하는 물질을 검색하기 위한 바이오센서로서, 상기 단백질과 연관된 비만, 당뇨, 암 및/또는 간질환의 치료제 개발에 유용한 도구가 될 수 있다.

발명의 효과

[0038] 일 양상에 따른 엔도트로핀 절단 효소의 저해제를 포함하는 엔도트로핀 활성 저해용 조성물은 비만 세포에서 주로 발현되는 엔도트로핀의 생성 및 이의 활성을 억제함으로써 비만, 당뇨뿐만 아니라 암의 치료에 이용될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 간 손상이 진행되는 과정에서 엔도트로핀이 간세포와 비 간세포의 상호작용을 억제하여 간염 및 간 섬유화를 예방할 수 있는바, 간질환의 맞춤 치료제로써 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0039] 도 1은 엔도트로핀 단백질을 분리한 후, 아미노산 서열 분석을 통해 절단 부위를 분석한 과정을 나타낸다.
- 도 2a는 엔도트로핀 단백질에 결합하는 단백질을 분리, 동정하기 위하여 APEX 시스템을 이용하여 유방암 세포에서 엔도트로핀 결합 단백질을 분리하고 LC-MS/MS 장비를 이용하여 결합 단백질을 동정한 결과를 나타낸 그림이다.
- 도 2b는 엔도트로핀 단백질에 결합하는 단백질을 분리, 동정하기 위하여 인간 단백질 칩을 이용하여 2만 5천 개의 인간 단백질에 대한 엔도트로핀 결합 단백질을 동정한 결과를 나타낸 그림이다.
- 도 3a는 결합 단백질 후보군 MMP2가 실제로 엔도트로핀과 결합하는지 여부를 면역침강법 및 웨스턴 블롯으로 확인한 결과이다.
- 도 3b는 결합 단백질 후보군 MMP9가 실제로 엔도트로핀과 결합하는지 여부를 면역침강법 및 웨스턴 블롯으로 확인한 결과이다.
- 도 4a는 MMP 단백질의 활성 저해제를 스크리닝하기 위한 루시페라제 컨트롤 시스템 및 루시페라제 스크리닝 시스템을 나타낸 그림이다.
- 도 4b는 도 4a의 각 시스템을 세포 내로 발현시켜 스크리닝 시스템이 작동하는지 여부를 확인한 그림이다.
- 도 5는 루시페라제 에세이를 이용하여 구축된 시스템을 이용한 MMP 단백질 간의 활성을 측정한 결과를 나타낸다.
- 도 6는 루시페라제 시스템을 이용하여 MMP 단백질 저해제에 대한 활성을 검증한 결과이다.
- 도 7a는 MMP1 단백질의 활성을 저해하는 화합물을 스크리닝한 결과이다.
- 도 7b는 MMP9 단백질의 활성을 저해하는 화합물을 스크리닝한 결과이다.
- 도 7c는 MMP16 단백질의 활성을 저해하는 화합물을 스크리닝한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0040] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[실시예]

[0042] 실시예 1. 엔도트로핀(endotrophin, ETP)의 아미노산 서열 분석

- [0043] 제6형 콜라겐(타입 VI) 단백질은 A1, A2 및 A3 사슬로 구성되며, 세 개의 사슬이 이루는 모노머(monomer)가 테트라머(tetramer)를 형성하면 세포 밖으로 분비되는데, 이때 A3 사슬의 C5 도메인이 잘려져 나온 것이 바로 ETP이다. 본 실시예에서는 제6형 콜라겐 단백질로부터 절단되는 ETP의 아미노산 서열을 분석하고자 하였다.
- [0044] 먼저, 당업자가 이해하는 유전자 재조합 방법을 이용하여 Col6a3 유전자를 HEK-293T 세포에 형질전환 한 후 제6형 콜라겐 단백질을 발현시켜 ETP를 생성하였다. 구체적으로, Col6a3 단백질의 2619 내지 3177번째 아미노산 서열에 해당되는 C2-C5 서열을 PRA-GFP 벡터에 삽입하여 C2-C5발현 벡터를 제작하였다. 이후, 상기 단백질이 세포 밖으로 분비되는지 여부를 확인하기 위하여 HEK-293T 세포에 C2-C5 발현 벡터를 형질전환 하였다. 이때, 생성된 ETP는 FLAG-tag를 이용하여 분리하였다. 재조합 단백질의 성공적인 발현 여부를 확인하기 위하여 (주)라이프사이언스래보라토리에 의뢰하여 N 말단 서열 분석을 수행하였다. 그 결과, 콜라겐 단백질의 3097번째 아미노산과 3098번째 아미노산 사이가 절단되는 것을 확인하였다. 또한, site-direct mutagenesis를 이용하여 콜라겐 단백질의 절단 부위가 상기의 분석결과와 일치하는지 확인하였다. 구체적으로, 3097번째 아미노산인 류신과 3098번째 아미노산인 메티오닌을 하기 표 1의 프라이머를 사용하여 알라닌으로 치환하였다. 이때, quikchange II site-directed mutagenesis kit(Agilent Technologies 社)을 사용하여 아미노산을 치환하였다.

표 1

서열번호	프라이머 서열	
서열번호 2	정방향	5' CTAGTTCAACCATCAATGCAATGGTGAGCACAGAACC 3'
서열번호 3	역방향	5' GGTTCGTGCTCACCATTGCATTGATGGTTGAACTAG 3'
서열번호 4	정방향	5' CTAGTTCAACCATCAATCTAGCGGTGAGCACAGAACCATTGG 3'
서열번호 5	역방향	5' CCAATGGTTCTGTGCTACCGCTAGATTGATGGTTGAACTAG 3'

- [0046] 류신과 메티오닌을 모두 알라닌으로 치환한 결과, ETP 단백질의 생성이 저해되는 것을 확인하였다.
- [0047] 도 1은 엔도트로핀 단백질을 분리한 후, 아미노산 서열 분석을 통해 절단 부위를 분석한 과정을 나타낸다.
- [0048] 도 1에 나타난 바와 같이, ETP 단백질은 Col6a3 단백질의 3097번째 아미노산 및 3098번째 아미노산 사이가 절단되어 생성되는 것을 확인할 수 있다.
- [0049] **실시예 2. ETP에 결합하는 결합 단백질의 동정 및 결합 확인**
- [0050] **2-1. 결합 단백질의 동정**
- [0051] 상기 실시예 1에서 확인된 바와 같이 Col6a3의 특정 부위가 절단됨으로써 ETP 단백질이 생성되는바 ETP에 결합하는 결합 단백질이 곧 ETP의 생성 또는 활성화에 관여하는 단백질이라 예상하였다. 따라서, 본 실시예에서는 하기 3가지 방법을 이용하여 ETP에 결합하는 결합 단백질을 스크리닝 하고자 하였다.
- [0052] (1) APEX 시스템
- [0053] APEX 시스템은 근접-표지(proximity labeling) 기반 시스템으로 APEX는 완두콩 또는 대두로부터 유래된 단일 형태의 아스코르빈산 과산화효소(ascorbate peroxidase, APEX) 리포터이다. 상기 기법은 살아있는 세포에서 발현시킨 APEX 단백질에 과산화수소가 있는 조건에서 산화촉매반응을 통해 Biotin-Phenol(BP)를 Biotin-phenoxy화 함으로써 결과적으로 주변의 단백질을 바이오틴화 한다. 상기 시스템을 이용하여 ETP에 APEX를 표지한 클론을 마우스 유방암 세포인 4T-1 세포에 형질전환하여 과발현 시킨 후 BP 및 과산화수소를 처리하여 ETP와 결합한 단백질을 바이오틴화 시켰다. 바이오틴화된 단백질을 스트렙타비딘-비드로 정제한 후, 질량분석법을 이용하여 동정하였다.
- [0054] (2) ETP 항체 이용
- [0055] ETP 항체를 이용하여 인간 배아 신장 세포에서 ETP 결합 단백질을 분리하였다. 구체적으로, ETP에 FLAG를 부착시킨 클론을 HEK-293T 세포에 형질전환하여 과발현 시킨 후 FLAG-tag로 ETP를 분리, 정제하였다. 이후, 질량분석법을 이용하여 결합단백질을 동정하였다.
- [0056] (3) 인간 단백질 칩 이용
- [0057] ETP를 HEK-293T 세포에 발현시킨 후, FLAG-tag로 분리, 정제하였다. 이후, 진온바이오텍에 분석을 의뢰하여 인간 단백질 칩을 이용하여 약 2만 5천 개의 인간 단백질에 대한 ETP 결합 단백질을 동정하였다.
- [0058] 도 2a는 APEX 시스템을 이용하여 엔도트로핀 결합 단백질을 동정한 결과를 나타낸 모식도이다.
- [0059] 도 2b는 인간 단백질 칩을 이용하여 엔도트로핀 결합 단백질을 동정한 결과를 나타낸 그림이다.
- [0060] 그 결과, MMP1, MMP2, MMP9 및 MMP16을 ETP 결합 단백질의 후보군으로 확보할 수 있었다.
- [0061] **2-2. ETP 단백질과의 결합여부 확인**
- [0062] 상기 실시예 2-1에서 확보된 결합 단백질 후보군이 실제로 ETP와 결합하는지 확인하기 위하여 세포주 수준에서 면역침강법과 웨스턴 블롯을 사용하였다. 구체적으로, 인간 MMP2와 MMP9 유전자에 FLAG-tag를 첨가한 후 ETP 유전자와 함께 HEK-293T 세포에 형질전환하여 MMP 및 ETP 단백질을 발현시켰다. 발현된 단백질들을 추출한 후 FLAG 비드를 이용하여 MMP 단백질을 정제하였다. 이때, ETP 단백질들이 MMP 단백질에 결합하게 되면 MMP 단백질과 함께 ETP 단백질이 함께 정제된다. 정제된 MMP2 단백질과 MMP9 단백질이 ETP와 서로 결합할 수 있는지 여부를 각각 FLAG 항체와 ETP 항체를 이용하여 웨스턴 블롯으로 확인하였다.
- [0063]
- [0064] 도 3a는 결합 단백질 후보군 MMP2가 실제로 엔도트로핀과 결합하는지 여부를 면역침강법 및 웨스턴 블롯으로 확인한 결과이다.
- [0065] 도 3b는 결합 단백질 후보군 MMP9가 실제로 엔도트로핀과 결합하는지 여부를 면역침강법 및 웨스턴 블롯으로 확인한 결과이다.
- [0066] 도 3a 및 도 3b에 나타난 바와 같이, MMP-2 및 MMP-9가 ETP에 결합하는 것을 확인할 수 있다.

[0067] **실시예 3. MMP 단백질의 활성 저해제 스크리닝 시스템 구축 및 확인**

[0068] **3-1. 스크리닝 시스템 구축**

[0069] 상기 실시예 2에서 발굴한 MMP 단백질의 활성을 저해하면, ETP의 생성을 억제할 수 있는바 본 실시예에서는 MMP 단백질의 활성을 저해할 수 있는 화합물 또는 천연물을 스크리닝하기 위한 시스템을 구축하고자 하였다.

[0070] 먼저 상기 스크리닝 시스템을 구축하기 위하여, 도 4a에 나타난 바와 같이 MMP 단백질에 의해 절단되는 ETP의 절단 부위를 IL-1b 유전자에 삽입하여 유전자 재조합을 수행하였다.

[0071] 도 4a는 MMP 단백질의 활성 저해제를 스크리닝하기 위한 루시페라제 컨트롤 시스템 및 루시페라제 스크리닝 시스템을 나타낸 그림이다. Mouse IL-1b의 유전자는 addgene(USA)으로부터 구입하여 준비하였고, pGL4 luciferase reporter 벡터(promega)를 이용하였다. PRL-N-pro-ILb-C-pro-ILb를 PCR을 이용하여 pGL4 luciferase reporter 벡터에 클로닝한 후 루시페라제 컨트롤 시스템을 구축하였다. 또한, PRL-N-pro-ILb-ETP cleavage site-C-pro-ILb를 상기와 동일한 방법으로 pGL4 luciferase reporter 벡터에 클로닝하여 루시페라제 스크리닝 시스템을 구축하였다. 이때, ETP 절단 부위(cleavage site)에 각각 7개의 아미노산(LMMVSTEP) 또는 12개의 아미노산(SSTINLMVSTEP)을 추가로 삽입하였다.

[0072] 다음으로, 상기에서 구축한 스크리닝 시스템을 세포 내로 발현 시켜 스크리닝 시스템이 작동하는지 여부를 확인하였다.

[0073] 도 4b는 도 4a의 각 시스템을 세포 내로 발현 시켜 스크리닝 시스템이 작동하는지 여부를 확인한 그림이다.

[0074] 루시페라제는 생물발광에 관여하는 효소이며 유전자의 조절이나 기능 또는 생리 활성물질의 스크리닝을 위해 리포터 유전자로서 널리 사용되고 있다. 또한, IL-1b 단백질은 발현되면서 서로 응집(aggregation)되는 특징을 가지고 있다. 일반적으로 단백질이 발현될 때 루시페라제 활성을 나타내지 못하므로, IL-1b 단백질이 응집되는 특징을 이용하여 루시페라제 활성을 측정함으로써 스크리닝 시스템의 작동 여부를 확인하고자 하였다.

[0075] IL-1b 유전자의 말단에 Gaussia Luciferase (Gluc) 유전자를 첨가한 후 루시페라제 활성을 측정해보면 IL-1b 단백질의 응집 현상으로 인해 Gluc의 기질인 코엘렌테라진(Coelenterazine)을 첨가하더라도 루시페라제 활성을 나타내지 못한다. 그러나 IL-1b 유전자 중간에 ETP 절단 부위(cleavage site)를 첨가하게 되면 단백질 발현 후 MMP에 의하여 IL-1b 단백질이 절단되고, 절단된 IL-1b 단백질 간의 응집 현상이 사라지는 바 Gluc가 활성을 나타낸다. 따라서, 코엘렌테라진을 첨가할 경우 루시페라제 활성을 가지는 것이다.

[0076] 즉, 일 양상에 따른 스크리닝 시스템은 MMP 단백질들의 활성을 측정할 수 있을 뿐만 아니라 ETP 단백질의 절단 여부를 루시페라제 활성 측정을 통해 확인함으로써 MMP 단백질들의 활성을 조절하는 약물을 동정할 수 있다. 또한, 세포를 파괴하여 루시페라제의 활성을 측정하는 종래 시스템과는 달리 일 양상에 따른 스크리닝 시스템은 세포 외부로 분비되는 각 단백질에 시그널 펩타이드를 부착하여 루시페라제 활성을 쉽게 측정할 수 있다는 이점이 있다.

[0077] **3-2. 스크리닝 시스템의 작동 확인**

[0078] MMP 단백질에 의해 상기 실시예 3-1에서 구축한 스크리닝 시스템이 작동하는지 여부를 확인하였다. 구체적으로, 12웰에 1웰 당 상기 실시예 3-1에서 제조한 컨트롤 루시페라제 시스템 200 ng, β -galactosidase 발현 유전자 40 ng을 MMP 전구체(Pro-MMP) 100 ng 또는 MMP 활성체(ca-MMP) 100ng과 함께 HEK-293T 세포에 형질전환하였다. 이때, IL-1b 유전자에 ETP 절단 예상 부위의 7개 아미노산(LMVSTEP) 또는 12개(SSTINLMVSTEP) 아미노산을 삽입하였다. ETP 절단 예상 부위를 삽입하지 않은 대조군(Control) 유전자도 동일한 방법으로 세포에 형질전환하였다. 형질전환된 HEK-293T 세포주를 무 혈청 (Serum free) 배지에서 24시간 동안 배양한 후, 각각의 배지를 수득하였다. 이후, 동일한 부피(50 μ l)의 배지를 코엘렌테라진 (1.43 μ M, 500x stock) 용액과 반응시켜 절대적 루시페라제 활성도를 측정하였다. 이후, 형질전환된 각각의 HEK-293T 세포주 내부에서 발현된 β -galactosidase을 표준화하여 루시페라제 활성을 측정함으로써 스크리닝 시스템의 작동 여부를 확인하였다.

[0079] 도 5는 루시페라제 에세이를 이용하여 구축된 시스템을 이용한 MMP 단백질 간의 활성을 측정한 결과를 나타낸다. A는 ETP 절단 예상 부위의 아미노산 7개(LMVSTEP)를 IL-1b 단백질 사이에 삽입한 시스템을 이용하여 MMP 단백질들의 활성을 측정한 결과이다. 각각 전구체 MMP(Pro-MMP), 활성체 MMP (ca-MMP) 또는 대조군 발현 유전자를 세포에 형질전환 시킨 후 루시페라제 활성도를 측정하였다. 그 결과, MMP1, MMP2, MMP9 및 MMP16 단백질에 의해 시스템이 활성화되는 것을 확인할 수 있었다. B는 ETP 절단 예상 부위의 아미노산 12개(SSTINLMVSTEP)를 IL-1b 단백질 사이에 삽입하였다는 점을 제외하고는 A와 동일한 방법으로 루시페라제 활성을 측정하였다. 그

결과, MMP1, MMP2, MMP9 및 MMP16 단백질에 의해 시스템이 활성화되는 것을 확인할 수 있었다. 즉, MMP1, MMP2, MMP9 및 MMP16 단백질에 의해 루시퍼라제 활성이 나타나는데, 상기 단백질이 ETP의 활성을 저해하는 것을 알 수 있다.

[0080] 도 6는 루시퍼라제 시스템을 이용하여 MMP 단백질 저해제에 대한 활성을 검증한 결과이다. ETP 절단 예상 부위의 아미노산 7개(LMVSTEP)를 IL-1b 단백질 사이에 삽입한 시스템을 이용하여 MMP9 단백질 저해제인 2-(N-benzyl-4-methoxyphenylsulfonamido)-5-((diethylamino)methyl)-N-hydroxy-3-methylbenzamide (CAS 1177749-58-4)를 처리하고 루시퍼라제 활성을 측정하였다.

[0081] 그 결과, MMP9 저해제에 의해 루시퍼라제 활성이 저해되는 것을 확인할 수 있는데, 루시퍼라제 시스템을 이용하여 MMP 단백질을 저해하는 신규 생리활성 물질을 스크리닝할 수 있을 것으로 예상된다.

[0082] 실시예 4. MMP 단백질 활성 저해제의 스크리닝

[0083] 상기 실시예 2 및 3-2에서 스크리닝한 결과를 바탕으로 MMP1, MMP9 및 MMP16의 활성을 저해하는 화합물을 스크리닝 하였다. ETP 절단 예상 부위의 아미노산 12개(SSTINLMVSTEP)를 IL-1b 단백질 사이에 삽입한 시스템을 이용하여 MMP 단백질의 활성을 측정하였다. 각각의 활성체(ca-MMP) 또는 대조군 발현 유전자를 세포에 형질전환 한 후, 생리활성 화합물을 최종 농도가 10 μ M이 되도록 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포의 루시퍼라제 활성을 측정하여 처리된 생리활성 화합물이 MMP 단백질의 저해제로 작용하는지 확인하였다.

[0084] 도 7a는 MMP1 단백질의 활성을 저해하는 화합물을 스크리닝한 결과이다. 도 7a에 나타난 바와 같이, 화합물 #1014('2-thioxo-5-({5-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-2-furyl)methylene)-1,3-thiazolidin-4-one)가 MMP1 단백질의 활성을 유의적으로 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

[0085] 도 7b는 MMP9 단백질의 활성을 저해하는 화합물을 스크리닝한 결과이다. 도 7b에 나타난 바와 같이, 처리한 생리활성 화합물은 MMP9 단백질의 활성을 유의적으로 저해하지는 못하는 것을 확인할 수 있었다.

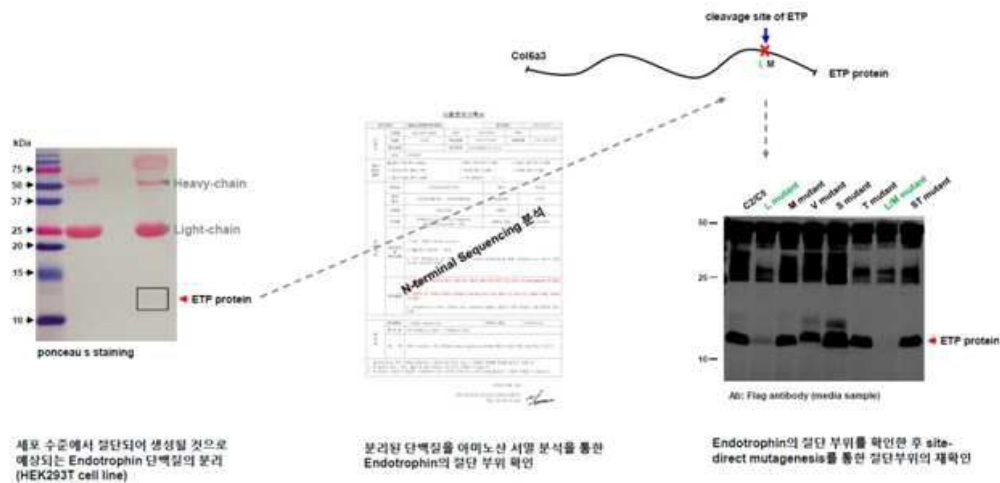
[0086] 도 7c는 MMP16 단백질의 활성을 저해하는 화합물을 스크리닝한 결과이다. 도 7c에 나타난 바와 같이, #123(2-chloro-N-(6-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-yl)acetamide), #901('4,4'-(4,4'-biphenyldiyl-diimino)bis(4-oxo-2-butenic acid)), #998('3-amino-5-(4-nitrobenzylidene)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-one), #1030('6-bromo-3-[3-(3-nitrophenyl)acryloyl]-4-phenyl-2(1H)-quinolinone) 및 #1128('3-[(4-bromo-2-chlorophenyl)amino]-1-phenyl-2-propen-1-one)를 포함한 5개의 화합물이 MMP16 단백질의 활성을 유의적으로 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

[0087] 즉, 일 양상에 따른 스크리닝 시스템으로 동정된 화합물은 MMP 단백질들의 활성을 유의적으로 저해하는 바, 엔도트로핀의 생성 및/또는 활성을 억제할 수 있다.

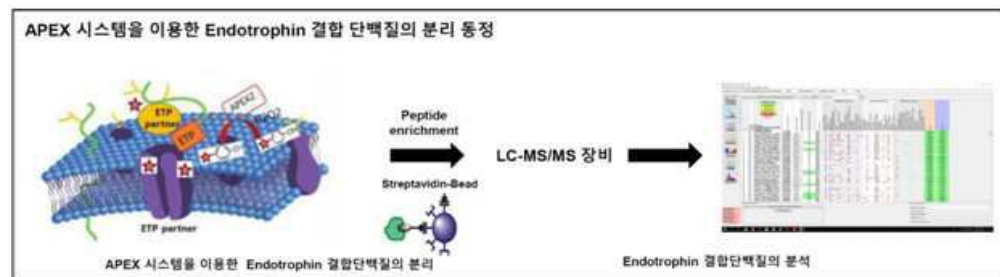
[0088] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

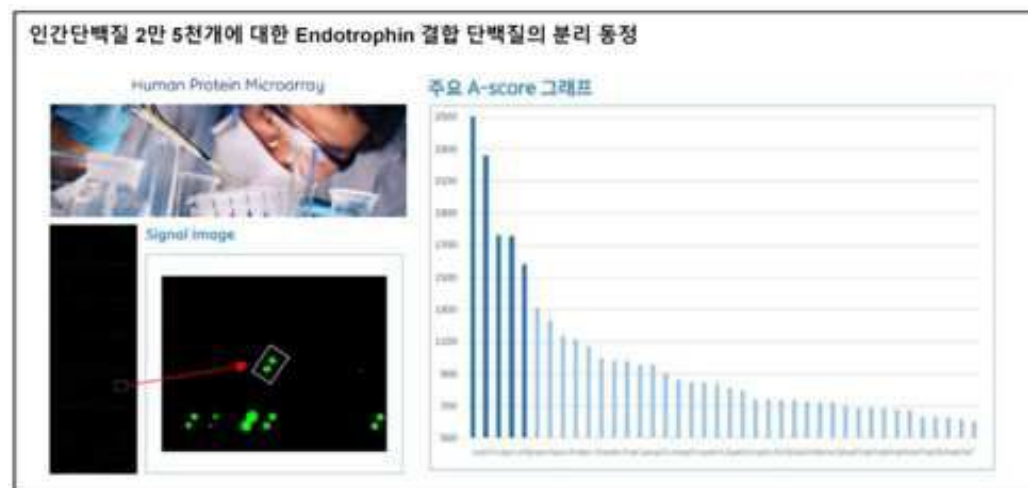
도면1



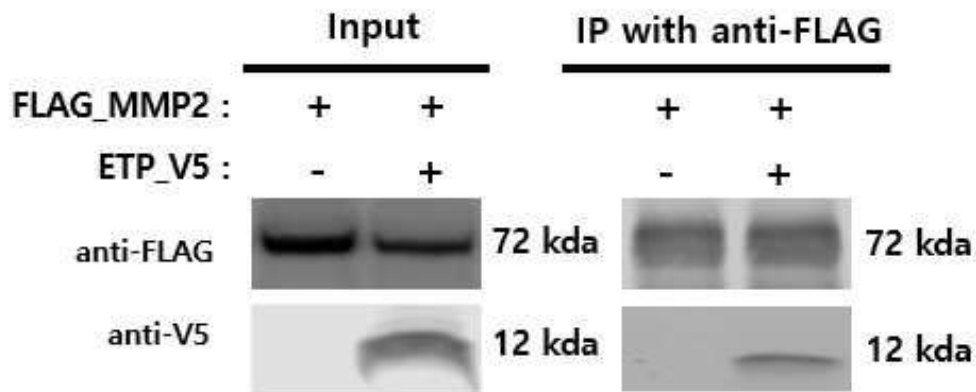
도면2a



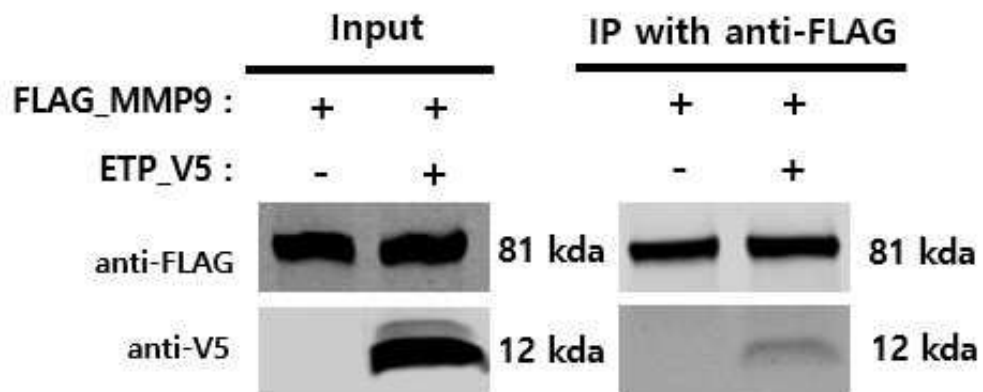
도면2b



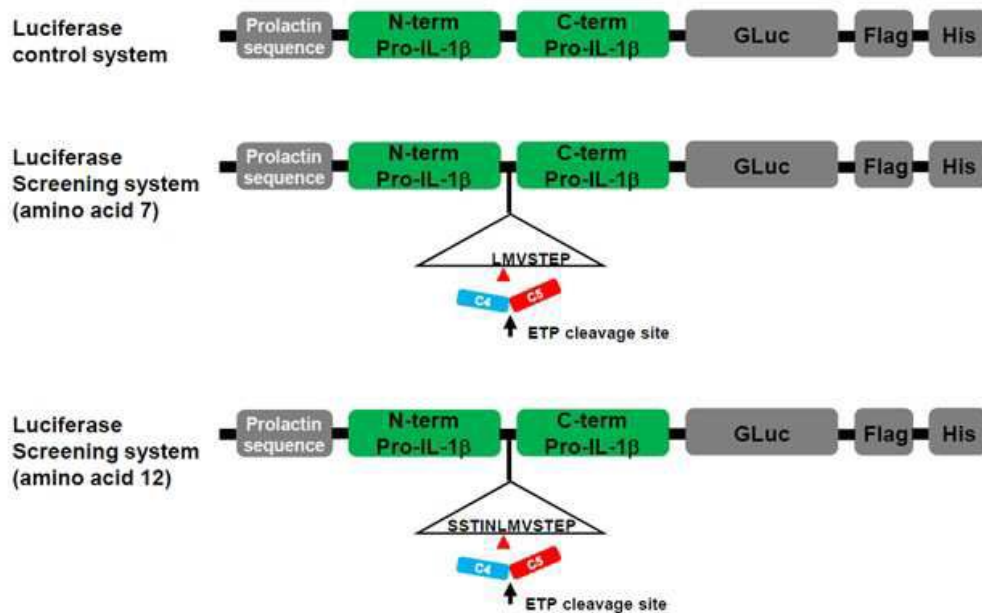
도면3a



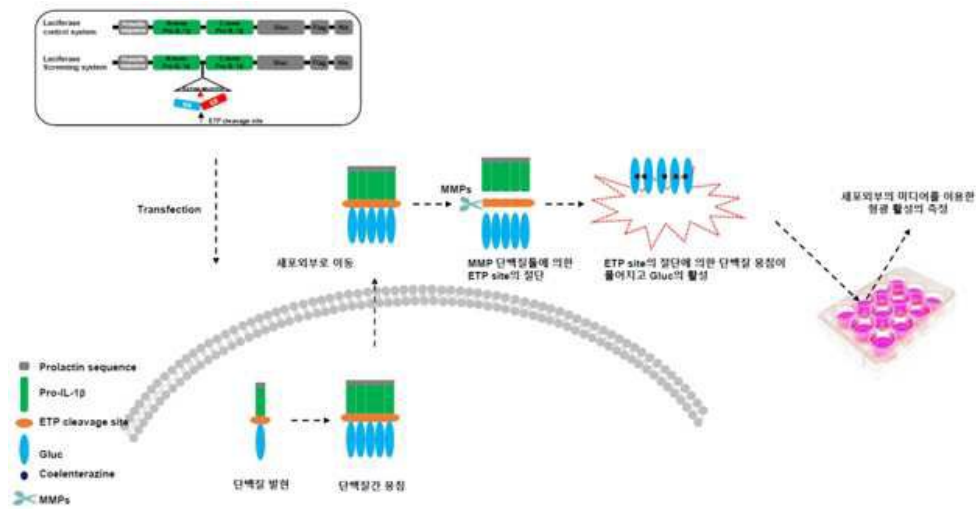
도면3b



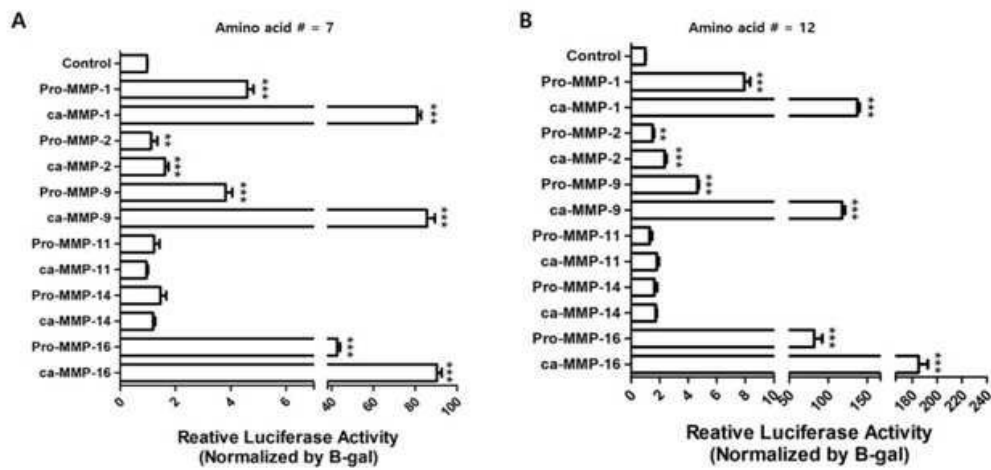
도면4a



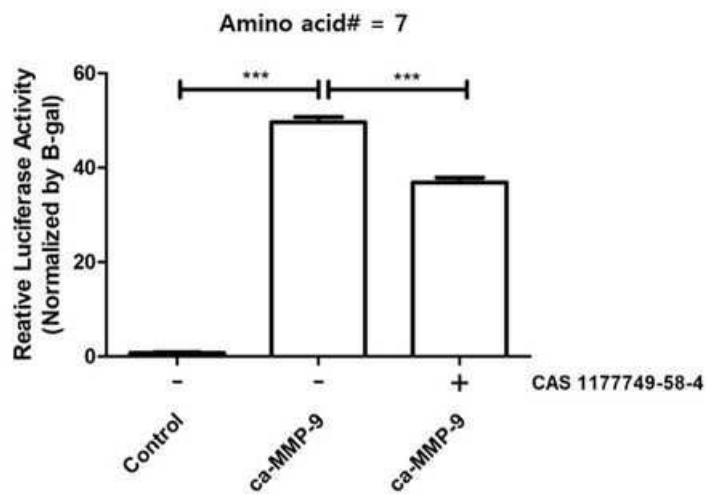
도면4b



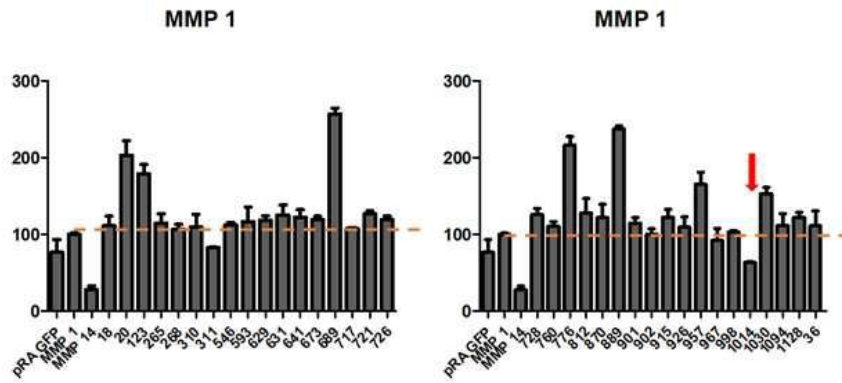
도면5



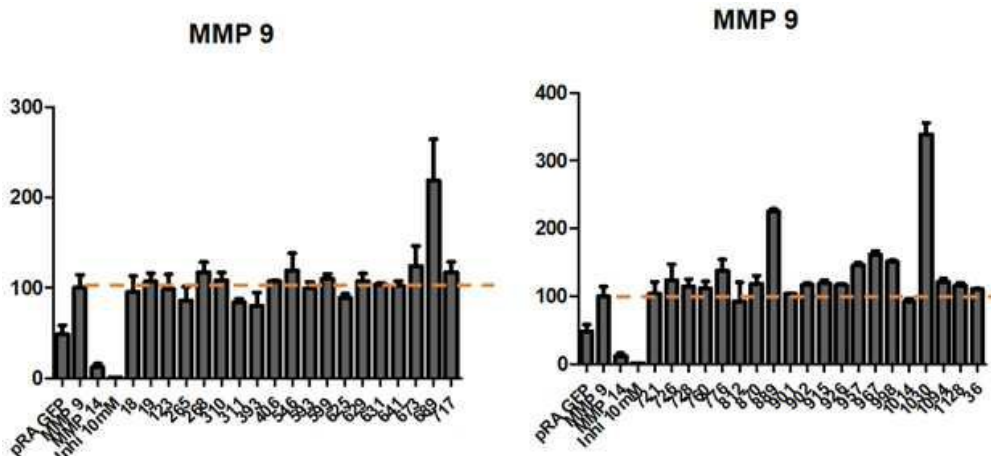
도면6



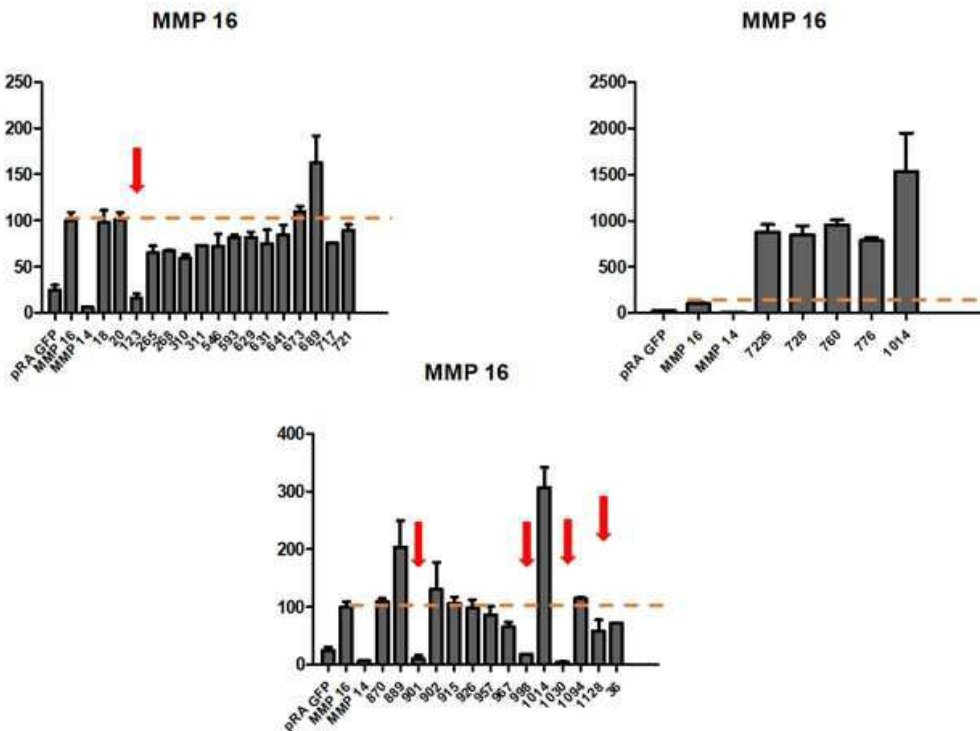
도면7a



도면7b



도면7c



서열 목록

<110> UNIST(ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)
 <120> Composition for inhibiting endotrophin activity comprising an
 inhibitor of endotrophin cleavage enzyme and uses thereof
 <130> PN131225
 <150> KR 10-2019-0013755
 <151> 2019-02-01
 <160> 8
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 559
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Col6a3_C2-C5 domain

<400> 1
 Asp Met Ala Phe Ile Leu Asp Ser Ala Glu Thr Thr Thr Leu Phe Gln
 1 5 10 15

Phe Asn Glu Met Lys Lys Tyr Ile Ala Tyr Leu Val Arg Gln Leu Asp
 20 25 30

Met Ser Pro Asp Pro Lys Ala Ser Gln His Phe Ala Arg Val Ala Val
 35 40 45

Val Gln His Ala Pro Ser Glu Ser Val Asp Asn Ala Ser Met Pro Pro
 50 55 60

Val Lys Val Glu Phe Ser Leu Thr Asp Tyr Gly Ser Lys Glu Lys Leu
 65 70 75 80

Val Asp Phe Leu Ser Arg Gly Met Thr Gln Leu Gln Gly Thr Arg Ala
 85 90 95

Leu Gly Ser Ala Ile Glu Tyr Thr Ile Glu Asn Val Phe Glu Ser Ala
 100 105 110

Pro Asn Pro Arg Asp Leu Lys Ile Val Val Leu Met Leu Thr Gly Glu
 115 120 125

Val Pro Glu Gln Gln Leu Glu Glu Ala Gln Arg Val Ile Leu Gln Ala
 130 135 140

Lys Cys Lys Gly Tyr Phe Phe Val Val Leu Gly Ile Gly Arg Lys Val
145 150 155 160

Asn Ile Lys Glu Val Tyr Thr Phe Ala Ser Glu Pro Asn Asp Val Phe
165 170 175

Phe Lys Leu Val Asp Lys Ser Thr Glu Leu Asn Glu Glu Pro Leu Met
180 185 190

Arg Phe Gly Arg Leu Leu Pro Ser Phe Val Ser Ser Glu Asn Ala Phe
195 200 205

Tyr Leu Ser Pro Asp Ile Arg Lys Gln Cys Asp Trp Phe Gln Gly Asp
210 215 220

Gln Pro Thr Lys Asn Leu Val Lys Phe Gly His Lys Gln Val Asn Val

225 230 235 240

Pro Asn Asn Val Thr Ser Ser Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Thr Thr
245 250 255

Lys Pro Val Thr Thr Thr Lys Pro Val Thr Thr Thr Thr Lys Pro Val
260 265 270

Thr Thr Thr Thr Lys Pro Val Thr Ile Ile Asn Gln Pro Ser Val Lys
275 280 285

Pro Ala Ala Ala Lys Pro Ala Pro Ala Lys Pro Val Ala Ala Lys Pro
290 295 300

Val Ala Thr Lys Met Ala Thr Val Arg Pro Pro Val Ala Val Lys Pro
305 310 315 320

Ala Thr Ala Ala Lys Pro Val Ala Ala Lys Pro Ala Ala Val Arg Pro
325 330 335

Pro Ala Ala Ala Ala Ala Lys Pro Val Ala Thr Lys Pro Glu Val Pro
340 345 350

Arg Pro Gln Ala Ala Lys Pro Ala Ala Thr Lys Pro Ala Thr Thr Lys
355 360 365

Pro Met Val Lys Met Ser Arg Glu Val Gln Val Phe Glu Ile Thr Glu

370 375 380

Asn Ser Ala Lys Leu His Trp Glu Arg Ala Glu Pro Pro Gly Pro Tyr

385 390 395 400
 Phe Tyr Asp Leu Thr Val Thr Ser Ala His Asp Gln Ser Leu Val Leu
 405 410 415
 Lys Gln Asn Leu Thr Val Thr Asp Arg Val Ile Gly Gly Leu Leu Ala
 420 425 430
 Gly Gln Thr Tyr His Val Ala Val Val Cys Tyr Leu Arg Ser Gln Val
 435 440 445

 Arg Ala Thr Tyr His Gly Ser Phe Ser Thr Lys Lys Ser Gln Pro Pro
 450 455 460
 Pro Pro Gln Pro Ala Arg Ser Ala Ser Ser Ser Thr Ile Asn Leu Met
 465 470 475 480
 Val Ser Thr Glu Pro Leu Ala Leu Thr Glu Thr Asp Ile Cys Lys Leu
 485 490 495
 Pro Lys Asp Glu Gly Thr Cys Arg Asp Phe Ile Leu Lys Trp Tyr Tyr
 500 505 510
 Asp Pro Asn Thr Lys Ser Cys Ala Arg Phe Trp Tyr Gly Gly Cys Gly

 515 520 525
 Gly Asn Glu Asn Lys Phe Gly Ser Gln Lys Glu Cys Glu Lys Val Cys
 530 535 540
 Ala Pro Val Leu Ala Lys Pro Gly Val Ile Ser Val Met Gly Thr
 545 550 555
 <210> 2
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer of Leucine
 <400> 2
 ctagttcaac catcaatgca atggtgagca cagaac
 <210> 3

 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

36

<220><223> Reverse primer of Leucine
 <400> 3
 ggttctgtgc tcaccattgc attgatgggt gaactag 37
 <210> 4
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer of Methionine
 <400> 4
 ctagtccaac catcaatcta gcggtgagca cagaaccatt gg 42
 <210> 5
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer of Methionine
 <400> 5
 ccaatgggtc tgtgtcacc gctagattga tggttgaact ag 42
 <210> 6
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ETP
 <400> 6
 Thr Glu Pro Leu Ala Leu Thr Glu Thr Asp Ile Cys Lys Leu Pro Lys
 1 5 10 15
 Asp Glu Gly Thr Cys Arg Asp Phe Ile Leu Lys Trp Tyr Tyr Asp Pro
 20 25 30
 Asn Thr Lys Ser Cys Ala Arg Phe Trp Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn
 35 40 45
 Glu Asn Lys Phe Gly Ser Gln Lys Glu Cys Glu Lys Val Cys Ala Pro
 50 55 60
 Val Leu Ala Lys Pro Gly Val Ile Ser Val Met Gly Thr
 65 70 75

<210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ETP cleavage site 1
 <400> 7

Leu Met Val Ser Thr Glu Pro

1 5

<210> 8
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> ETP cleavage site 2

<400> 8

Ser Ser Thr Ile Asn Leu Met Val Ser Thr Glu Pro

1 5 10