



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0074015  
(43) 공개일자 2016년06월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 31/17 (2006.01) A61K 31/10 (2006.01)  
A61K 31/122 (2006.01) A61K 31/167 (2006.01)  
A61K 31/205 (2006.01) A61K 31/353 (2006.01)  
A61K 31/4375 (2006.01) A61K 31/513 (2006.01)  
A61K 31/704 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)  
G01N 33/566 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
A61K 31/17 (2013.01)  
A61K 31/10 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7015704(분할)  
(22) 출원일자(국제) 2011년06월17일  
심사청구일자 2016년06월17일
- (62) 원출원 특허 10-2013-7000152  
원출원일자(국제) 2011년06월17일  
심사청구일자 2014년06월17일
- (85) 번역문제출일자 2016년06월13일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/040994  
(87) 국제공개번호 WO 2011/160093  
국제공개일자 2011년12월22일
- (30) 우선권주장  
61/397,940 2010년06월17일 미국(US)
- (71) 출원인  
캘리포니아 인스티튜트 오브 테크놀로지  
미국 캘리포니아 파사데나 엠씨 6-32 이스트 캘리포니아 블러바드 1200 (우: 91125)
- (72) 발명자  
고다드, 윌리엄, 에이., 3세  
미국 91106 캘리포니아 패서디나 아텐 로드 950  
멘나, 마크  
미국 90024 캘리포니아 로스앤젤레스 콥스톡 애비뉴 875 #5씨  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인 남앤드남

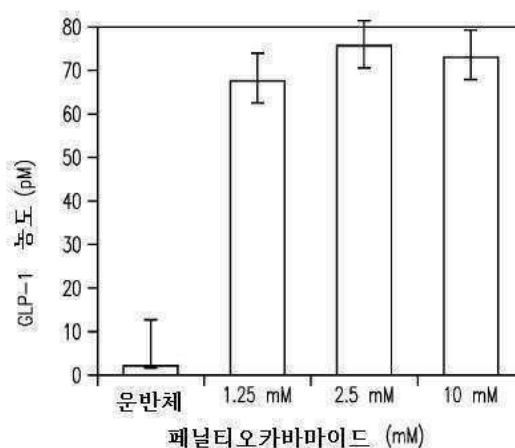
전체 청구항 수 : 총 39 항

(54) 발명의 명칭 호르몬을 조절하기 위한 방법 및 시스템 및 관련 방법, 작용제 및 조성물

(57) 요약

본 명세서에서는 개체의 GI관 세포로부터 생체내에서 또는 생체밖에서 대사성 호르몬의 방출을 조절하기 위한, 쓴맛 수용체 리간드, 관련 작용제, 조합물, 조성물, 방법 및 시스템이 개시된다.

대표도 - 도24a



(52) CPC특허분류

*A61K 31/122* (2013.01)

*A61K 31/167* (2013.01)

*A61K 31/205* (2013.01)

*A61K 31/353* (2013.01)

*A61K 31/4375* (2013.01)

*A61K 31/513* (2013.01)

*A61K 31/704* (2013.01)

*A61K 47/4823* (2013.01)

*G01N 33/566* (2013.01)

(72) 발명자

**팬돌, 스티븐**

미국 90068 캘리포니아 로스앤젤레스 아웃포스트  
드라이브 1819

**아브를, 라빈더**

미국 91106 캘리포니아 패서디나 에스. 체스터 애  
비뉴 118 #18

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

PTU, PTC, 데나토늄 벤조에이트, 글리시리진산 암모늄 염, 에피갈로카테킨 갈레이트, 하이퍼포린, 베르베린 클로라이드, 콥티신 클로라이드, 알릴 메틸 설퍼드, 로틀레린, 쿠르쿠민, 엘라그산, 엠벨린 및/또는 이들의 유도체로부터 선택되는 일 또는 그 이상의 GI 쓴맛 수용체 리간드를, 개체 내에서 일 또는 그 이상의 GI 쓴맛 수용체 리간드의 일 또는 그 이상의 GI 쓴맛 수용체로의 결합을 가능하게 하는 유효량으로, 개체에 투여하는 것을 포함하고, 상기 결합이 대사성 호르몬 GLP-1, PYY 및/또는 CCK의 방출의 조절을 야기하는 것인, 개체 내의 대사성 호르몬의 방출을 조절하기 위한 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 일 또는 그 이상의 GI 쓴맛 수용체 리간드는 PTU, PTC, 데나토늄 벤조에이트, 글리시리진산 암모늄 염, 에피갈로카테킨 갈레이트, 하이퍼포린, 베르베린 클로라이드, 콥티신 클로라이드, 알릴 메틸 설퍼드, 로틀레린, 쿠르쿠민, 엘라그산, 및 엠벨린 및/또는 그들의 작용제 유도체를 포함하고, 상기 결합이 GLP-1, PYY 및/또는 CCK의 방출을 증가시키는 것인, 방법.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 일 또는 그 이상의 GI 쓴맛 수용체 리간드는 데나토늄 벤조에이트 또는 이의 작용제 유도체를 포함하고, 상기 결합이 CCK 방출을 증가시키는 것인, 방법.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 일 또는 그 이상의 GI 쓴맛 수용체 리간드는 상기 일 또는 그 이상의 GI 쓴맛 수용체 리간드의 전신 흡수 및 방출을 방해하기 위해 형성된 상보성 분자와 조합하여 투여되는 것인, 방법.

#### 청구항 5

제4항에 있어서, 상기 적어도 하나의 일 또는 그 이상의 GI 쓴맛 수용체 리간드가 상보성 분자와 컨쥬게이션됨으로써 쓴맛 자극 수용체와의 결합과 관련하여 활성인 부분을 제시하기 위해 형성된 쓴맛 자극 작용제를 제공하는 것인, 방법.

#### 청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, 상기 상보성 분자는 셀룰로오스, PEG, 모노사카라이드, 올리고사카라이드, 아미노산, 및/또는 펩티드인 것인, 방법.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 일 또는 그 이상의 GI 쓴맛 수용체 리간드의 투여는 GI 상피세포를 통한 일 또는 그 이상의 GI 쓴맛 수용체 리간드의 전신 흡수를 최소화하기 위해 제형화된 조성물로 수행되는 것인, 방법.

#### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여는 장 투여로 수행되는 것인 방법.

#### 청구항 9

PTU, PTC, 데나토늄 벤조에이트, 글리시리진산 암모늄 염, 에피갈로카테킨 갈레이트, 하이퍼포린, 베르베린 클로라이드, 콥티신 클로라이드, 알릴 메틸 설퍼드, 로틀레린, 쿠르쿠민, 엘라그산, 엠벨린 및/또는 또는 이들의 유도체로부터 선택되는 일 또는 그 이상의 GI 쓴맛 수용체 리간드를 적합한 운반체와 함께 포함하는 것인, 개체

내의 대사성 호르몬의 방출을 조절하기 위한 조성물.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, 상기 일 또는 그 이상의 GI 쓴맛 수용체 리간드는 일 또는 그 이상의 쓴맛 수용체 리간드의 전신 흡수 및 방출을 방해하기 위해 형성된 상보성 분자와 조합하여 포함되는 것인, 조성물.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 상기 적어도 하나의 일 또는 그 이상의 GI 쓴맛 수용체 리간드는 상보성 분자와 컨쥬게이션됨으로써, 쓴맛 자극 수용체와의 결합과 관련하여 활성인 부분을 제시하기 위하여 형성된 쓴맛 자극 작용제를 제공하는 것인, 조성물.

#### 청구항 12

제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 일 또는 그 이상의 GI 쓴맛 수용체 리간드는 약 1 마이크로몰 내지 약 1.25 밀리몰의 양으로 포함되는 것인, 조성물.

#### 청구항 13

제9항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 약제학적 조성물이고 상기 적합한 운반체는 약제학적으로 허용가능한 운반체인 것인, 조성물.

#### 청구항 14

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 방법에서 동시에, 조합하여 또는 순차적으로 사용하기 위한 일 또는 그 이상의 표적 GI 쓴맛 수용체를 조절할 수 있는 2 이상의 쓴맛 수용체 리간드를 포함하는 것인, 개체 내의 대사성 호르몬의 방출을 조절하기 위한 시스템.

#### 청구항 15

표적 쓴맛 자극제 수용체를 조절하기 위한 쓴맛 자극 작용제로서, 상기 쓴맛 자극제 작용제는 쓴맛 수용체 리간드의 전신 흡수 및 방출을 방해하기 위해 형성된 상보성 분자와 컨쥬게이션된 쓴맛 수용체 리간드를 포함하고,

상기 쓴맛 수용체 리간드는 제1부분 및 제2부분을 포함하고, 상기 제1부분은 쓴맛 수용체에 대한 쓴맛 수용체 리간드의 결합과 관련하여 활성이고 상기 제2부분은 쓴맛 수용체에 대한 쓴맛 수용체 리간드의 결합과 관련하여 불활성이고, 그리고

상기 상보성 분자는 쓴맛 수용체 작용제에 결합하기 위한 쓴맛 수용체 리간드의 제1부분을 제시할 수 있도록 형성된 쓴맛 자극제 작용제를 제공하기 위해 쓴맛 수용체 리간드의 제2부분에 부착되는 것인, 작용제.

#### 청구항 16

제15항에 있어서, 상기 쓴맛 수용체 리간드는 PTU, PTC, 테나토늄 벤조에이트, 글리시리진산 암모늄 염, 에피갈로카테킨 갈레이트, 하이퍼포린, 베르베린 클로라이드, 콤포신 클로라이드 알릴 메틸 설퍼드, 로틀레린, 쿠르쿠민, 엘라그산, 엠벨린 및 이들의 유도체로부터 선택되는 것인, 작용제.

#### 청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서, 상기 상보성 분자는 셀룰로오스, PEG, 모노사카라이드, 올리고사카라이드, 아미노산, 및/또는 펩티드로부터 선택되는 것인, 작용제.

#### 청구항 18

상보성 분자와 컨쥬게이션된 쓴맛 자극 수용체 리간드를 포함하는 쓴맛 자극 작용제로서, 상기 상보성 분자는 쓴맛 자극 수용체 리간드의 전신 방출을 방해하기 위해 형성된 것인, 작용제.

#### 청구항 19

제18항의 일 또는 그 이상의 쓴맛 자극 작용제의 유효량을 개체에 투여하는 것을 포함하는 것인, 개체 내의 표

적 쓴맛 수용체를 활성화시키는 방법.

#### 청구항 20

개체 내의 표적 쓴맛 수용체를 활성화시키기 위한 조성물로, 상기 조성물은 제18항에 따른 일 또는 그 이상의 쓴맛 자극 작용제 및 적합한 운반체를 포함하는 것인 조성물.

#### 청구항 21

쓴맛 자극 작용제를 제공하기 위한 시스템으로, 상기 시스템은 일 또는 그 이상의 쓴맛 자극 수용체 리간드 및 상기 일 또는 그 이상의 쓴맛 수용체 리간드의 전신 방출을 방해하기 위해 형성된 일 이상의 상보성 분자를 포함하고,

상기 일 또는 그 이상의 쓴맛 수용체 리간드는 제18항에 따른 쓴맛 자극 작용제를 제공하기 위해 일 이상의 상보성 분자와 권주게이션될 수 있는 것인, 시스템.

#### 청구항 22

개체 내의 일 또는 그 이상의 쓴맛 수용체를 활성화시키기 위한 일 또는 그 이상의 작용제의 유효량을 개체에 투여하는 것을 포함하는 것인, 개체 내의 대사성 호르몬 및 이와 관련된 생물학적 과정의 방출을 조절하기 위한 방법.

#### 청구항 23

세포 내의 쓴맛 자극 수용체의 활성화에 관여하는 생물학적 반응을 확인하기 위한 방법으로, 상기 방법은:

쓴맛 자극 수용체 리간드의 결합을 가능하게 하기 위한 PTU, PTC, 데나토늄 벤조에이트, 글리시리진산 암모늄염, 에피갈로카테킨 갈레이트, 하이퍼포린, 베르베린 클로라이드, 콕티신 클로라이드 알릴 메틸 설피드, 로틀레린, 쿠르쿠민, 엘라그산, 엠벨린 및 이들의 유도체로부터 선택되는 일 또는 그 이상의 쓴맛 자극 수용체 리간드를 갖는 세포를 쓴맛 자극 수용체에 접촉시키는 단계,

상기 접촉시키는 단계 이후에 세포 내의 생물학적 반응을 검출하는 단계를 포함하는 것인, 방법.

#### 청구항 24

제23항에 있어서, 생물학적 반응을 특징화하기 위한 참고 생물학적 반응과 검출된 생물학적 반응을 비교하는 단계를 더욱 포함하는 것인, 방법.

#### 청구항 25

GI 시스템과 관련된 대사성 호르몬의 방출을 조절할 수 있는 GI 쓴맛 수용체 리간드를 확인하는 방법으로서, 상기 방법은:

GI 시스템 내의 표적 세포에서 발현되는 GI 쓴맛 수용체를 확인하는 단계;

GI 쓴맛 자극 수용체의 구조를 예측하는 단계;

상기 예측된 GI 쓴맛 자극 수용체 구조를 바탕으로 GI 쓴맛 자극 수용체에 결합하는 후보 리간드를 확인하는 단계;

쓴맛 수용체 활성화 검정으로 확인된 후보 리간드를 실험하는 단계; 및

GI 시스템과 관련된 일 이상의 대사성 호르몬의 조절에 상기 후보 리간드가 미치는 효과를 실험하는 단계를 포함하는 것인, 방법.

#### 청구항 26

제25항에 있어서, 상기 후보 리간드는 GI 쓴맛 수용체의 모델링을 통해 확인되는 것인, 방법.

#### 청구항 27

제26항에 있어서, 상기 모델링은 상동관계 모델링인 것인, 방법.

#### 청구항 28

제26항 또는 제27항에 있어서, 상기 모델링은 헬릭스간 수소 결합의 구조를 예측하는 것을 포함하는 것인, 방법.

#### 청구항 29

세포로부터 호르몬 방출을 조절하기 위한 방법으로, 상기 방법은:

GI 쓴맛 수용체 리간드의 결합을 통해 GI 쓴맛 자극 수용체의 특정 형태를 유도하는 단계로, 상기 특정 형태는 GI 쓴맛 자극 수용체의 다수의 활성 형태 중 적어도 하나인 것인 단계;

상기 유도하는 단계 이후에 세포로부터 호르몬 방출의 증가 또는 감소를 검출하는 단계; 및

GI 쓴맛 수용체 리간드의 작용을 통한 상기 증가 및 감소를 조절하는 단계를 포함하는 것인, 방법.

#### 청구항 30

제29항에 있어서,

상기 유도는 제25항에 따른 방법에 의한 GI 쓴맛 수용체 리간드를 확인한 이후에 수행되는 것인, 방법.

#### 청구항 31

대사성 호르몬과 관련된 질병을 개체 내에서 치료 또는 예방하기 위한 방법으로, 상기 방법은:

PTU, PTC, 테나토늄 벤조에이트, 글리시리진산 암모늄 염, 에피갈로카테킨 갈레이트, 하이퍼포린, 베르베린 클로라이드, 콤텐신 클로라이드 알릴 메틸 설퍼드, 로틀레린, 쿠르쿠민, 엘라그산, 및 엠벨린 및 이들의 유도체로부터 선택되는 일 또는 그 이상의 GI 쓴맛 수용체 리간드를, 대사성 호르몬 GLP-1, PYY 및/또는 CCK를 조절하기에 치료적으로 유효양으로 개체에 투여하는 것을 포함하는 것인, 방법.

#### 청구항 32

제31항에 있어서, 상기 일 또는 그 이상의 GI 쓴맛 수용체 리간드는 일 또는 그 이상의 GI 쓴맛 수용체 리간드의 전신 흡수 및 방출을 방해하기 위해 형성된 상보성 분자와 조합하여 투여되는 것인, 방법.

#### 청구항 33

제32항에 있어서, 상기 적어도 하나의 일 또는 그 이상의 GI 쓴맛 수용체 리간드는 쓴맛 자극 수용체로의 결합과 관련하여 활성인 부분을 제시하기 위해 형성된 쓴맛 자극 작용제를 제공하기 위한 상보성 분자와 컨쥬게이트되는 것인, 방법.

#### 청구항 34

제32항 또는 제33항에 있어서, 상기 상보성 분자는 셀룰로오스, PEG, 모노사카라이드, 올리고사카라이드, 아미노산, 및/또는 펩티드인 것인, 방법.

#### 청구항 35

제31항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 일 또는 그 이상의 GI 쓴맛 수용체 리간드의 투여는 GI 상피 세포에 의한 일 또는 그 이상의 GI 쓴맛 수용체 리간드의 전신 흡수를 최소화시키기 위하여 제형화된 조성물로 수행되는 것인, 방법.

#### 청구항 36

제31항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여는 장 투여에 의해 수행되는 것인, 방법.

#### 청구항 37

제31항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 치료적으로 유효양은 약 1 마이크로몰 내지 약 1.25 밀리몰인 것인, 방법.

## 청구항 38

제31항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 질병은 비만, 당뇨병, 간 질환 및/또는 심혈관계 질환인 것인, 방법.

## 청구항 39

제31항 내지 제38항 중 어느 한 항에 따른 방법에서, 동시에, 조합하여 또는 순차적으로 사용하기 위한, PTU, PTC, 데나토늄 벤조에이트, 글리시리진산 암모늄 염, 에피갈로카테킨 갈레이트, 하이퍼포린, 베르베린 클로라이드, 콤펙스 클로라이드 알릴 메틸 셀피드, 로틀레린, 쿠르쿠민, 엘라그산, 엠벨린 및 이들의 유도체로부터 선택되는 2 이상의 쓴맛 수용체 리간드를 포함하는 것인, 개체 내의 대사성 호르몬과 관련된 질병을 치료 또는 예방하기 위한 시스템.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 관련 출원의 상호 참조

[0002] 본 출원은 2010년 6월 17일자 출원된, 미국 가출원 일련 번호 61/397,940 "수용체, 작용제, 질환 및 질병의 치료(Receptors, agents, treatment of diseases and conditions)"에 관한 것으로, 상기 개시내용은 그 전체가 참고문헌으로서 본 명세서에 통합된다.

[0003] 정부 승인 성명

[0004] 미국 정부가 국립 대체 의학 연구 센터 (National Center for Complementary and Alternative Medicine, NCCAM)의 계약 (1 P01 AT003960)에 따라 본 발명에 대한 권리를 가진다.

[0005] 기술분야

[0006] 본 개시내용은 호르몬을 조절하기 위한 방법 및 시스템 및 관련 방법, 리간드, 작용제 및 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0007] 배경

[0008] 호르몬은 종종 매개인자로 확인되는 화학 물질로서, 통상적으로 유기체의 일 부분에 있는 세포 또는 선(gland)에 의해 방출되어 상기 유기체의 다른 부분에 화학 메신저로서 작용한다.

[0009] 다양한 생물학적 과정, 특히 대사 과정이 유기체 내의 호르몬 방출에 관여한다. 특히, 다양한 대사성 호르몬(예를 들면, 펩타이드 기제 호르몬)이 개체 내의 세포 및/또는 기관의 대사 네트워크에 영향을 미침으로써 상기를 조절한다.

[0010] 그러나, 호르몬 생산의 통제, 특히 개체 내의 다양한 질병의 치료와 관련된 호르몬 방출을 조절하기 위한 도전은 계속되고 있다.

### 발명의 내용

#### 과제의 해결 수단

[0011] 요약

[0012] 본 명세서에서는 여러 구현예에서, 대사 호르몬의 방출 및 관련 생물학적 과정을 조절할 수 있고, 상기 조절을 실행하고 상기 조절을 통제할 수 있는 리간드를 확인할 수 있는 방법, 시스템 및 조성물이 제공된다. 특히, 본 명세서에서는 대사성 질병을 치료하기에 적합한 작용제, 조성물, 방법 및 시스템을 포함하는, 대사 호르몬의 방출을 조절하고 관련된 생물학적 과정을 통제하기 위한 작용제, 조성물, 방법 및 시스템이 제공된다.

[0013] 제1측면에 따르면, 개체 내의 대사성 호르몬의 방출 및 관련 생물학적 과정을 조절하기 위한 방법, 시스템 및

조성물이 기술된다. 상기 방법은 PTU, PTC, 데나토늄 벤조에이트, 글리시리진산 암모늄 염, 에피갈로카테킨 갈레이트, 하이퍼포린, 베르베린 클로라이드, 콥티신 클로라이드 알리설퍼드 (Coptisine Chloride Allylsulfide), 로틀레린 (Rottlerin), 쿠르쿠민 (Curcumin), 엘라그산 (Ellagic acid), 엠베린 (Embelin), 및/또는 그들의 유도체로부터 선택되는 일 또는 그 이상의 GI 쓴맛 수용체 리간드를 개체 내에, 상기 일 또는 그 이상의 GI 쓴맛 수용체를 개체 내에 결합시키기에 유효한 양으로 투여하는 것을 포함하는 것으로, 상기 결합은 대사성 호르몬의 방출 및 관련 생물학적 과정을 조절하고, 상기 대사성 호르몬은 GLP-1, PYY 및 CCK로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 상기 시스템은 본 명세서에 기술된 호르몬 방출을 조절하기 위한 방법에서의 동시에 조합하거나 순차적으로 사용하기 위한 적어도 2개의 일 또는 그 이상의 GI 쓴맛 수용체 리간드를 포함한다. 상기 조성물은 적합한 운반체와 함께 개체에 투여시 일 또는 그 이상의 표적 GI 쓴맛 수용체에 결합할 수 있는 일 또는 그 이상의 리간드를 포함한다.

[0014] 제2측면에 따르면, 개체 내의 표적 쓴맛 수용체, 특히 GI 쓴맛 수용체를 조절하기 위한 쓴맛 작용제, 및 관련 방법, 시스템 및 조성물이 기술된다. 상기 쓴맛 작용제는 쓴맛 수용체 리간드와 상기 쓴맛 수용체 리간드의 전신성 흡수 및 방출을 방해하기 위해 형성된 상보성 분자의 조합을 기반으로 한다. 특히, 상기 쓴맛 작용제는 상보성 분자와 친유계이션된 쓴맛 수용체 리간드를 포함할 수 있는 것으로, 상기 리간드는 제1부분 및 제2부분을 포함한다. 쓴맛 작용제에서, 상기 쓴맛 수용체 리간드의 제1부분은 쓴맛 리간드의 쓴맛 수용체로의 결합에 관하여 활성이고 상기 제2부분은 쓴맛 리간드의 쓴맛 수용체에 관하여 비활성이다. 상기 쓴맛 작용제에서, 상기 상보성 분자는 상기 리간드의 제2부분 내의 리간드에 결합하고, 생성된 쓴맛 작용제는 상기 쓴맛 수용체에 결합하기 위한 제1부분을 제시할 수 있도록 형성된다. 상기 방법은 개체에 쓴맛 작용제의 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 상기 조성물은 일 또는 그 이상의 쓴맛 수용체 리간드 및 하나 이상의 상보성 분자를 포함한다. 상기 시스템은 본 명세서에 기술된 쓴맛 작용제를 제공하거나 및/또는 호르몬을 조절하기 위한 방법에서 동시에 조합하거나 순차적으로 사용하기 위한, 적어도 2개의 일 또는 그 이상의 쓴맛 수용체 리간드 및 상보성 분자를 포함한다.

[0015] 제3측면에 따르면, 세포, 특히 GI 관 세포 내의 쓴맛 자극 수용체의 활성화에 관여하는 생물학적 반응을 확인하기 위한 방법 및 시스템이 기술된다. 상기 방법은 상기 세포를 PTU, PTC, 데나토늄 벤조에이트, 글리시리진산 암모늄 염, 에피갈로카테킨 갈레이트, 하이퍼포린, 베르베린 클로라이드, 콥티신 클로라이드 알리 설퍼드, 로틀레린, 쿠르쿠민, 엘라그산, 엠베린, 및/또는 그들의 유도체로부터 선택되는 쓴맛 자극 수용체 리간드와 접촉시키는 것을 포함하는 것으로, 상기 접촉 이후에 상기 리간드의 쓴맛 수용체로의 결합을 가능하게 하고 세포 내의 생물학적 반응의 검출을 가능하게 한다. 몇몇 구현예에서, 상기 방법은 참조 생물학적 반응에 대한 검출된 생물학적 반응을 비교하는 것을 추가로 포함하는 것으로, 생물학적 반응을 특징화한다. 상기 시스템은 본 명세서에 기술된 생물학적 반응을 확인하기 위한 방법에서 동시에 조합하거나 순차적으로 사용하기 위한, 적어도 2개의 일 또는 그 이상의 쓴맛 수용체 리간드 및 세포를 포함한다.

[0016] 제4측면에 따르면, GI 시스템에 관여하는 대사성 호르몬의 방출을 조절할 수 있는 GI 쓴맛 수용체 리간드를 확인하기 위한 후보 리간드를 스크리닝하는 방법, 시스템 및 조성물이 기술되고, 몇몇 구현예에서, 상기 GI 시스템 내의 표적 세포 및 상기 표적 세포 내에서 발현되는 특정 쓴맛 수용체의 특정 위치를 기초로 수행된다. 상기 방법은 GI 시스템 내의 표적 세포를 발현하는 쓴맛 수용체를 확인하고, GI 쓴맛 자극 수용체의 구조를 예측하고, 상기 예측된 구조를 기초로 상기 수용체에 결합하는 후보 리간드를 확인하고, 쓴맛 수용체 활성화 검정법으로 상기 리간드를 실험하고, 그 다음 GI 시스템과 관련된 하나 이상의 대사성 호르몬의 조절에 미치는 리간드의 효과를 실험하는 것을 포함한다.

[0017] 제5측면에 따르면, 세포로부터의 호르몬 방출을 조절하는 방법은 GI 쓴맛 수용체 리간드의 결합을 통한 GI 쓴맛 자극 수용체의 특정 구조를 유도하는 것을 포함하고, 상기 특정 구조는 상기 쓴맛 자극 수용체의 다수의 활성 구조 중 하나 이상이고, 상기 유도 이후에 세포로부터 호르몬 방출의 증가 또는 감소를 검출하고, 그리고 GI 쓴맛 수용체 리간드의 작용을 통한 상기의 상승 또는 감소를 조절하는 것을 포함한다. 몇몇 구현예에서, 상기 유도는 GI 쓴맛 수용체 리간드를 확인하고 진행된다.

[0018] 제6측면에 따르면, 쓴맛 수용체 리간드, 작용제, 및 개체 내에서 대사성 호르몬과 관련된 질병을 치료하거나 예방하기 위한 방법 및 시스템이 기술된다. 상기 방법은 PTU, PTC, 데나토늄 벤조에이트 또는 그들의 유도체로부터 선택된 일 또는 그 이상의 GI 쓴맛 수용체 리간드를 개체에 대사성 호르몬 GLP-1, PYY 및/또는 CCK를 조절하기 위한 치료적으로 유효한 양으로 투여하는 것을 포함한다. 상기 시스템은 개체 내의 본 명세서에 기술된 대사성 호르몬과 관련된 질병을 치료하거나 예방하기 위한 방법에서 동시에 조합하거나 순차적으로 사용하기 위한

본 명세서에 기술된 2 이상의 쓴맛 수용체 리간드 또는 작용제를 포함한다.

[0019] 본 명세서에 기술된 방법, 시스템 및 조성물은 몇몇의 구현예에서, GI 쓴맛 수용체의 활성을 조절하고, 대사성 호르몬의 분비 및 전신 방출을 조절하고 그리고 관련된 대사성 질병 뿐만 아니라, 대사성 질환을 치료하는 것을 포함하는 다른 생물학적 과정을 조절하는 것을 가능하게 한다.

[0020] 본 명세서에 기술된 방법 및 조성물은 GI 및 장 쓴맛 수용체의 활성을 조절하는 것이 바람직한 적용과 관련하여 사용될 수 있는바, 의학적 적용, 생물학적 분석, 식품 가공, 맛/풍미 조절, 영양, 기능식품 조절, 및 임상적 적용을 포함하나 이에 제한되지 않는 진단법을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0021] 본 개시내용의 일 또는 그 이상의 구현예에 대한 상세내용은 첨부된 하기의 도면 및 상세한 설명에서 설명될 것이다. 다른 특징, 목적, 및 이점들이 발명의 상세한 설명 및 도면으로부터 또한 특허청구범위로부터 자명할 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0022] 본 명세서에 통합되어 명세서의 일부를 구성하는 하기의 도면은 본 개시내용의 일 또는 그 이상의 구현예를 예시하고, 발명의 상세한 설명 및 실시예 부분과 함께 본 개시내용의 원리 및 수행에 대한 설명을 제공한다.

도 1은 TAS2R38 쓴맛 수용체 변이체 hTAS2R38<sub>PAV</sub>, hTAS2R38<sub>AAI</sub>, hTAS2R38<sub>PVV</sub> (실험체) 및 hTAS2R38<sub>AVI</sub> (비실험체)에 대한  $\beta 1$  아레날린성 수용체 (h $\beta 1AR$ )에 대한 염기서열 배열을 나타낸다.

도 2는 GPCR 번들 내의 7개의 헬릭스의 배향을 설명하기 위해 사용된 좌표 시스템을 나타낸다. 이중 화살표는 BiHelix 과정과 독립적으로 샘플링된 가장 인접한 헬릭스 쌍을 연결한다. BiHelix 과정은 헬릭스 1과 2를 사용하여 강조된 것으로서, 상기 헬릭스 쌍의 구조가 샘플링될 때, 다른 헬릭스들은 제시하지 않음을 나타낸다.

도 3은 지질과 물을 갖는 TAS2R38 쓴맛 수용체의 분자 동역학 시뮬레이션을 나타낸다. EC 영역이 상단이다.

도 4는 SuperComBiHelix로부터의 쓴맛 수용체 hTAS2R38<sub>PAV</sub> (a), hTAS2R38<sub>AVI</sub> (b), hTAS2R38<sub>AAI</sub> (c), hTAS2R38<sub>PVV</sub> (d)의 예측된 3D 구조를 나타낸다. (내부 헬릭스 H-결합을 형성하는 잔기들을 강조하였다)

도 5는 지질과 물을 사용한 10 ns MD 이후의 쓴맛 수용체 hTAS2R38<sub>PAV</sub> (a) 및 hTAS2R38<sub>AVI</sub> (b)에 대한 예측된 3D 구조를 나타낸다. (내부 헬릭스 H-결합을 형성하는 잔기들을 강조하였으며 이들은 10 ns MD 동안 안정하였다)

도 6은 전체 지질과 물을 사용하여 10 ns MD 동안 쓴맛 수용체 내의 예측된 수소 결합(HB)의 안정성을 나타낸다. (a) hTAS2R38<sub>PAV</sub>내 W108-A262, (b) hTAS2R38<sub>PAV</sub>내 Y199-W108, (c) hTAS2R38<sub>AVI</sub>내 Y199-A266, (d) hTAS2R38<sub>AVI</sub>내 W108-A261.

도 7은 10 ns MD 동안 hTAS2R38<sub>PAV</sub> (a) 및 hTAS2R38<sub>AVI</sub> (b)의 각각의 헬릭스의 Rmsd 변화를 나타낸다. (참고는 마지막 프레임이다)

도 8은 쓴맛 수용체 (a) hTAS2R38<sub>PAV</sub>내 PTC, (b) hTAS2R38<sub>PAV</sub>내 PTU, (c) hTAS2R38<sub>AVI</sub>내 PTC, (d) hTAS2R38<sub>AVI</sub>내 PTU내의 작용제의 예측된 결합 부위를 나타낸다.

도 9는 지질과 물을 사용하여 10 ns MD 이후의 hTAS2R38<sub>PAV</sub> (a) 및 hTAS2R38<sub>PAV</sub> (b) 내의 PTC의 최종 결합 부위를 나타낸다. 결합 모드의 필수 성분들은 보유되어 있지만 부가적으로 유리한 상호작용이 발견되었다.

도 10은 지질과 물을 사용하여 10 ns 분자 역동한 동안 hTAS2R38<sub>PAV</sub> 및 hTAS2R38<sub>AVI</sub>에 대한 PTC의 H-결합 거리를 나타낸다, (a) hTAS2R38<sub>PAV</sub>내 PTC-A262; (b) hTAS2R38<sub>PAV</sub>내 PTC-Y199; (c) hTAS2R38<sub>AVI</sub>내 PTC-C198; (d) hTAS2R38<sub>AVI</sub>내 PTC-물. 특히, 최후의 3개의 수소 결합 (b, c 및 d)의 형성이 원래 예측된 결합 부위 내에 존재하지 않음을 주목.

도 11은 PTU의 화학식, 본 명세서에 기술된 구현예에 따른 작용제를 나타낸다. 도 1의 예시에서, 7개의 탄소 원자는 1 내지 7의 숫자를 의미한다. 황, 질소 및 산소 원자는 각각 S, N 및 O를 나타낸다.

도 12는 상보성 분자(R)에 부착된 PTU를 나타낸다.

도 13은 셀룰로오스 또는 PEG와 같은 상보성 분자에 결합하는 것을 용이하게하는 카르복실산 기 또는 아지드로

기능화된 PTU를 나타낸다.

**도 14**는 PTU에 결합할 수 있는 R기의 예를 나타낸다: A. 셀룰로오스; B. PEG.

**도 15**는 질소, 황, 및 산소 원자가 각각 N, S 및 O로 나타내어진, 대체적 표시법을 사용한 구현예에 따른 작용제로서 PTU의 원자 구조를 나타낸다.

**도 16**은 PTU-셀룰로오스의 원자 구조를 나타낸다.

**도 17**은 제1각도로부터 PTU-셀룰로오스의 원자 구조에 대한 3차원적 도면을 나타낸다.

**도 18**은 제2각도로부터 PTU-셀룰로오스의 원자 구조에 대한 3차원적 도면을 나타낸다.

**도 19**는 각각의 헬릭스에 대한 소수성 중심을 포함하는 hTAS2R47의 TM 헬릭스 예측도를 나타내는데, 지질 이중층 (왼쪽 패널) 및 예측된 구조 (오른쪽 패널)의 중심을 통과하는 면 상에 위치되어 있다.

**도 20**은 hTAS2R47에 복합체화된 데나토늄 벤조에이트, DD2, 4NS, 및 6NS의 리간드 결합 부위를 나타낸다.

**도 21**은 래트 및 인간 TAS2R38 및 수용체에 대한 TM 부위를 나타낸다.

**도 22**는 인간 DP 수용체와 신규한 피리미딘 길항체의 예측 결합 모드를 나타낸다.

**도 23**은 **도 22**에 나타낸, 분자 a를 기반으로한, 변형된 피리미딘 화합물을 나타낸다.

**도 24a**는 다양한 농도에서 PTC에 의해 유발된 내분비선 STC-5 세포로부터의 GLP-1 방출을 나타낸다. X-축은 mM의 세포 배양 내에서 사용된 PTC의 농도를 나타내고; Y-축은 pM의 GLP-1 방출의 양을 나타낸다. 각각의 막대들은 2회 수행하여 얻어진 평균 값을 나타낸다.

**도 24b**는 다양한 농도에서 PTC에 의해 유발된 내분비선 STC-5 세포로부터의 GLP-1 방출을 나타낸다. X-축은 mM의 세포 배양 내에서 사용된 PTC의 농도를 나타내고; Y-축은 pM의 GLP-1 방출의 양을 나타낸다. 각각의 막대들은 2회 수행하여 얻어진 평균 값을 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023]

본 명세서에는 대사성 호르몬의 방출, 관련 대사성 질병 및 다른 관련 생물학적 과정을 조절하기 위한, 예를 들면 개체 내의 대사성 질병을 치료하기 위한 방법, 시스템, 및 조성물이 기술된다.

[0024]

본 명세서에서 세포 및 수용체의 활성화 및/또는 호르몬 방출과 같은, 정량화가능한 생물학적 사건과 관련하여 사용되는, 용어 "조절하다" 또는 "조절"은 활성 또는 생물학적 사건을 간섭하는 과정을 나타낸다. 상기 간섭의 예로는 활성 및/또는 정량화가능한 사건을 증가시키거나, 감소시키거나 또는 유지시키는 것을 포함한다. 예를 들면, GPCR와 같은 세포 수용체의 활성화의 조절은 GPCR를 예를 들면, GPCR 또는 심지어 GPCR 내의 단일 돌연변이와 리간드의 상호작용 이후에 수행될 수 있는, 활성 구조 중 하나로 전환시킴으로써 GPCR의 활성을 증가시키는 것에 의해 수행될 수 있다. 마찬가지로, 활성을 유지하거나 감소하는 것은 각각 GPCR를 유지시키거나 불활성 구조로 전환시킴으로써 수행될 수 있는바, 이는 리간드의 상호작용 또는 GPCR의 다양한 돌연변이에 의해서도 수행될 수 있다. 마찬가지로, 생물학적 호르몬의 방출과 같은 생물학적 사건의 증가, 감소 또는 유지는 GPCR 활성을 조절하는 것에 의해 수행될 수 있는, GPCR의 활성으로부터 발생하는 다양한 세포내 및/또는 세포간 경로의 활성 또는 불활성에 의해 수행될 수 있다. 조절 활성의 검출은 기저 활성 및/또는 기저 정량화가능한 사건, 예를 들면, 조절될 활성 및/또는 사건과 관련된 생물학적 및/또는 화학적 지표의 변화 검출을 통해 수행될 수 있다. 숙련자들은 숙련자들에게 잘 알려지고 본 개시내용의 해석시 확인가능한 기술 및 방법을 사용하여 선택된 사건과 관련된 적절한 생물학적 및/또는 화학적 지표를 확인할 수 있다.

[0025]

본 명세서에서 사용되는 용어 "호르몬"은 종종 매개인자로 확인되는 화학 물질을 나타내는 것으로, 전형적으로 화학적 메신저로 작용하기 위해 유기체의 일 부분에 있는 세포 또는 선으로부터 상기 유기체의 다른 부분으로 방출된다. 예시적인 호르몬은 혈류로 직접 방출되는 내분비선 호르몬, 및 도관으로 직접 분비되어, 상기 도관으로부터 혈류로 또는 세포로부터 측분비(paracrine) 시그널링으로 알려진 과정으로 확산되는 것에 의해 세포로 흐르는 외분비선 호르몬(exocrine hormones 또는 ectohormones)을 포함한다. 호르몬들은 다양한 다세포 유기체, 특히 척추동물에 의해 생산된다. 특히, 척추동물 호르몬은 3개의 화학 종류: 펩타이드 호르몬, 지질 및 인지질-유도 호르몬 및 모노아민으로 분류화될 수 있다. 펩타이드 호르몬은 아미노산 사슬로 이루어진다. 펩타이드 호르몬의 예로는 인슐린 및 성장 호르몬을 포함한다. 지질 및 인지질-유도 호르몬은 리놀린산 및 아라키돈산 및 인지질과 같은 지질로부터 유도된다. 상기 메인 종류는 콜레스테롤 및 아이코사노이드로부터 유도되는 스

테로이드 호르몬이다. 스테로이드 호르몬의 예로는 테스토스테론 및 콜티졸이 있다. 모노아민은 환형 아미노산 데카르복실라제 효소의 작용에 의한 페닐알라닌, 타이로신 및 트립토판과 같은 방향족으로부터 유도된다. 모노아민의 예로는 티록신 및 아드레날린이 있다. 본 출원의 목적의 경우, 호르몬은 펩티드, 지질 및 인지질-유도 호르몬 및 체장을 포함하는 위장관의 내분비선 세포로부터 방출되는 모노아민일 것이다.

[0026] 본 명세서에서 사용된 용어 "대사성 호르몬"은 개체 내의 세포 및 기관의 대사 네트워크를 조절하기 위해 내분비선 시스템에 의해 방출되는 호르몬을 나타낸다. 특히, 대사성 호르몬은 개체 내의 세포 및/또는 기관의 대사 네트워크에 영향을 미치고 상기를 조절하는 펩티드 기저 호르몬일 수 있다. 예시적인 대사성 호르몬은 콜레시스토키닌 (cholecystokinin, CCK), 글루카곤 유사 펩티드-1 (glucagon like peptide-1, GLP-1) 및 펩티드 타이로신 (peptide Tyrosine Tyrosine, PYY)을 포함한다.

[0027] 일 구현예에서, 개체 내의 대사성 호르몬의 방출 및 상기와 관련된 생물학적 과정의 조절은 개체 내의 일 또는 그 이상의 표적 GI 쓴맛 수용체의 구조 변화에 영향을 미칠 수 있는 일 또는 그 이상의 리간드의 유효량을 개체에 투여함으로써 수행될 수 있다.

[0028] 용어 "쓴맛 수용체" 또는 "쓴맛 자극 수용체"는 쓴맛의 감각을 검출하는 포유동물 맛 수용체의 패밀리를 나타내는 것으로, 다른 GPCR와 임의의 상동성을 공유하지 않는, G 프로테인-결합 수용체 (G protein-coupled receptor, GPCR)의 독특한 하부패밀리를 포함한다. 특히, 인간 쓴맛 수용체 패밀리 (TAS2R)는 ~25 쓴맛 수용체를 포함한다. GPCR 수용체들은 일 또는 그 이상의 세포 내 경로의 상향조절 또는 하향조절과 같은 다른 생물학적 반응에 관여하는 다수의 구조를 나타낸다. 구조의 확인은 본 명세서의 실시예 1 내지 3에 기술된 방법과 같은 방법 및 기술 뿐만 아니라 숙련자에 의해 확인가능한 다른 방법 및 기술로 수행될 수 있다. 활성 또는 불활성 구조 내의 TAS2R의 검출은 인 실리코 (in silico) 내의 방법을 포함하는 숙련자에 의해 확인가능한 방법 뿐만 아니라 활성 또는 불활성 구조 중 하나와 관련되어 알려져 있는 생물학적 반응의 검출로 수행될 수 있다. 예를 들면, 쓴맛 촉진 수용체의 활성화의 검출은 TAS2R의 활성 구조로의 전환 이후에 이종삼량체 (heterotrimeric) G 단백질로부터 방출되는, 구스트딘, 및/또는 트랜스딘의 측정에 의해 수행될 수 있다 [Wong 1995].

[0029] TAS2R의 활성 구조로의 전환 또는 유지와 관련되는 다른 예시적인 생물학적 반응은 전형적으로  $Ca^{2+}$ 가 검출되는 세포 내에서 활성 구조인 TAS2R 수용체를 갖는 것의 세포내  $Ca^{2+}$  농도를 증가시킴으로써 제공된다. 구스트딘/트랜스딘의 검출은 상기와 관련된 임의의 생물학적 과정을 검출함으로써 또는 구스트딘/트랜스딘에 대한 항체를 갖는 세포를 면역염색 하는 것에 의해 수행될 수 있다. 세포내  $Ca^{2+}$  농도에서의 변화를 검출하는 것은 GPCR 및 세포내  $Ca^{2+}$  측정을 위한 표준 검정법에 의해 수행될 수 있다 [Tsien 2003; Zacharias 2000; Zhang 2002]. 활성 구조에서 TAS2R와 관련된 부가적인 생물학적 반응은 i) 포스포디에스테라제의 활성화 [Keraviss 2010]; ii) 포타슘 이온 채널 활성의 변경 [Scanziani 2009; Schultz 1998]; iii) 세포 전기력 변화 [Scanziani 2009]; iv) 호르몬 또는 신경전달물질 방출, 및/또는 본원의 개시내용의 해석시 숙련자에 의해 이해될 수 있는 부가적인 반응을 포함한다.

[0030] 본 명세서에 기재된 용어 "GI 쓴맛 수용체" 또는 "GI 쓴맛 자극 수용체"는 개체의 위장 관 (GI 관)내에 위치하는 쓴맛 수용체를 나타낸다. 위장 관은 개체의 전체 위장 관 뿐만 아니라, 위, 소장, 십이지장, 공장, 회장, 대장, 각각 또는 상기의 조합과 같은 임의의 부위를 포함한다. 전형적으로, 상기 GI 쓴맛 수용체는 GI관의 상피 내에; 및 체장의 랑게르한스 섬 내에 위치하는 내분비선 세포의 내강 쪽의 표면 상에 위치한다. 쓴맛 수용체의 하부세트는 다른 종류의 GI 세포 내에 위치하고 있을 것으로 예상된다. 쓴맛 자극 수용체를 제시하는 것으로 알려지거나 예상되는 GI 세포의 예시적인 목록을 실시예 13에 나타내었다. 특히, 일 종류의 GI 세포가 특정 종류의 세포에 의해 결정되는 특정 TS2R의 (일 또는 그 이상의 활성 구조 뿐만 아니라 불활성 구조와 같은) 구조와 관련된 생물학적 반응을 제공하는 것으로 알려지거나 예상된다.

[0031] 본 명세서에서 사용된 용어 "리간드"는 일 또는 그 이상의 결합 부위 내의 특정 수용체에 의해 인식되어 상기 수용체에 결합하는 분자를 나타낸다. 리간드의 예로는 세포 막 수용체의 작용제 및 길항제, 독성물질 및 독액, 바이러스 에피토프, 호르몬, 호르몬 수용체 펩티드, 효소, 효소 기질, 보조 인자, 약물 (예를 들면, 오피오이드, 스테로이드, 등), 렉틴, 당, 폴리뉴클레오타이드, 핵산, 올리고사카라이드, 단백질, 및 단일 클론 항체를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 명세서에서 사용되는 "리간드 수용체 쌍"의 형성은 당업자에게 알려진 다양한 리간드 수용체 결합 검정법에 의해 검출될 수 있는 복합체가 형성될 수 있도록, 분자 인식을 통한 리간드와 수용체 분자의 조합을 나타낸다 [Lefkowitz 1970; de Jong 2005]. 전형적으로, 리간드에서, 2 부

본이 확인될 수 있는바: 제1부분은 상기 리간드의 결합과 관련하여 상응하는 수용체에 활성인 부분이고, 제2부분은 상기 결합과 상응하는 리간드 수용체 쌍의 형성과 관련하여 불활성이다. 특히, 숙련자들은 상기 결합과 관련되고 상응하는 수용체 결합 부위와 상호 작용을 하거나 상호 작용을 야기하는 리간드의 활성 부분 및 상기 결합과 상응하는 리간드 수용체 쌍의 형성에 관여하지 않고 상기에 영향을 미치지 않는 불활성 부분을 이해하고 확인할 수 있을 것이다.

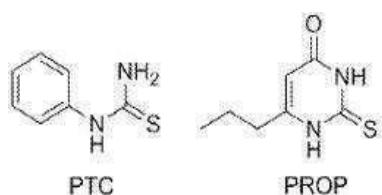
[0032] 본 명세서에 기술된 몇몇 구현예에서, 리간드 수용체 쌍의 형성은 쓴맛 수용체의 구조에 영향을 미치는바, 특히 존재하는 형태를 유지시키거나 존재하는 형태를 새로운 형태로 전환시킨다. 예를 들면, 일부 구현예에서, 상기 리간드는 상기 수용체의 길항체로서 리간드 쌍 수용체 복합체의 형성은 불활성 구조를 유지시킨다. 다른 구현예에서, 상기 리간드는 상기 수용체의 작용제로서, 상기 리간드 쌍 수용체 복합체의 형성은 불활성 형태를 상기 수용체의 일 또는 그 이상의 활성 형태로 전환시킨다. TS2R 수용체 형성은 결국 일 또는 그 이상의 검출가능한 화학적 또는 생물학적 반응을 야기하는 야기되는 일 이상의 세포내 경로의 활성 또는 불활성과 관련된다.

[0033] 몇몇 구현예에서, 쓴맛 자극 수용체의 일 이상의 활성 구조는 표적 수용체가 위치한 내분비선 세포에 의한 대사성 호르몬의 방출을 조절한다. 특히, 쓴맛 수용체 리간드 (BTRL)는 다수의 세포내 경로 중 하나를 활성화시키거나 호르몬 방출에 상응하는 변형을 초래하는 상기 세포내 경로 중 하나의 활성화를 막는다.

[0034] 목적의 특정 호르몬 또는 신경전달물질의 방출에 미치는 효과와 함께, 쓴맛 GPCR의 조절의 검출은 그것의 세포내 부위로부터 세포의 측정의 경우에 세포 외부까지 또는 생체내 측정의 경우에 혈액으로 목적의 호르몬 또는 신경전달물질의 이동을 측정함으로써, 또는 본 명세서에 기술된 다른 생물학적 반응을 검출함으로써 생체의 또는 생체내에서 숙련자들에 의해 수행될 수 있다.

[0035] 특정 호르몬의 방출의 검출은 또한 숙련자들에 의해 확인가능한 기술을 사용하여 세포의 환경 및 체액, 특히 혈액 내의 호르몬의 방출을 검출함으로써 수행될 수 있다. 예를 들면, 혈액 내에서의 검출은 개체의 혈액 샘플을 혈장, 혈청 및 혈액 세포 분획물로 분리하는 것에 의해 수행될 수 있다. 표준 방사선-면역학적 검정법 (radio-immunoassay, RIA) 또는 효소-결합 면역학적 흡착 검정법 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 사용함으로써, 특정 호르몬이 혈청이나 혈장 분획물 내에서 측정된다. 전형적으로, RIA 및 ELISA 모두는 측정될 각각의 호르몬에 대한 특정 항체를 요구한다. 적합한 항체들은 상업적 공급원 및 아카데미 센터로부터의 각각의 호르몬에 대해 입수가 가능하다.

[0036] 몇몇 구현예에서, 세포내 경로의 활성 또는 비활성은 특이적으로 숙련자에게 이해되는, 쓴맛 감각과 관련될 수 있다. 상기 구현예에서, 쓴맛 수용체의 구조에 영향을 미칠 수 있는 리간드는 전형적으로 일 또는 그 이상의 쓴맛 자극제를 포함한다. 본 명세서에서 사용된 용어 "쓴맛 자극제"는 쓴맛의 감각을 일으키는 쓴맛 수용체에 의해 인식되는 물질을 나타낸다. 쓴맛에 대한 감각은 퀴닌과 같은 참조 화합물을 사용함으로써 검출될 수 있다. 따라서, 퀴닌에 의한 쓴맛의 자극 역치는 평균적으로 0.000008 M이다. 다른 쓴맛 물질의 맛 역치는 퀴닌에 따라 결정된다. 본 개시내용에 따른 예시적인 쓴맛 자극제는 6-n-프로필티오우라실 (PTU), 페닐티오카바미드 (PTC), 테나토늄 벤조에이트 및 상기의 일부 유도체를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. PTC 및 PTU (PROP라고도 함)의 화학 구조는 하기와 같다:



[0037]

[0038] 다른 구현예에서, 리간드의 결합 및 관련 TAS2R 수용체의 활성 또는 비활성 구조는 쓴맛 감각과 관련된 일 또는 그 이상의 세포 경로의 활성 또는 비활성과 관련 없다.

[0039] 몇몇 구현예에서, 상기 리간드는 존재하는 리간드의 유도체일 수도 있다. 제1화합물 (예를 들면, PTU)과 관련하여 본 명세서에서 사용된 용어 "유도체"는 상기 제1화합물과 구조적으로 관련된 제2화합물을 나타내는 것으로, 제1화합물의 기능적 특성을 보유하면서, 제1화합물 내에 존재하지 않는 특성이 도입되어 변형된 제1화합물로부터 유도가 가능한 것이다. 따라서, PTU의 유도체 화합물은 일반적으로 원래의 화합물 내에 존재하지 않는 추가 기능과 관련된 것일 수도 있고 관련되지 않은 것일 수도 있는 화학 공식의 변형에 의해 원래의 화합물과 다르다. PTU의 유도체 화합물은 그러나 쓴맛 자극 수용체에 대한 PTU의 결합 능력과 관련된 화합물과 관련하여 본 명세

서에 기술된 일 또는 그 이상의 기능적 활성을 보유한다. 따라서, PTU 또는 다른 BTRL의 유도체는 상기 유도체들이 상응하는 맛 수용체가 일 또는 그 이상의 활성 형태로 전환된 TAS2R38에 대한 결합력을 보유하는 한, 임의의 화학적으로 변형된 자극제 형태를 포함한다. PTU 또는 다른 BTRL의 유도체는 또한 TAS2R38에 대한 결합력은 보유하지만 TAS2R38의 비활성 형태를 변형시키는 능력은 보유하지 않은 임의의 화학적으로 변형된 형태를 포함한다. 구현예에서, 유도체가 표적 수용체의 형태에 영향을 미치는 능력을 유지하는 경우, 화학적 변형은 상기 리간드의 불활성 부분에서 수행될 수 있다. 구현예에서, 상기 유도체가 TAS2R38의 비활성 형태를 변형시키는 능력을 보유하지 않는 경우, 화학적 변형은 상기 리간드의 활성 뿐만 아니라 불활성 부분 상에서 수행될 수 있다. 길항체를 유도하기 위하여 변형된 특정 잔기들이 TAS2R38를 결합시킬 수 있는 리간드를 확인하기 위한 특정 수용체를 모델링함으로써 확인될 수 있다. 상기 TAS2R38 수용체를 활성화하기 위한 리간드의 무능력을 확인하고 TAS2R38의 길항체를 선택하기 위한 리간드의 생물학적 반응이 실험될 수 있다. TAS2R38 상의 길항적 활성과 관련된 PTU-기재 유도체 결합 잔기를 확인하기 위한 길항제 결합 부위의 공동 분석이 수행될 수 있다. 숙련자들은 PTU-기재 유도체 길항제의 동일한 결합 부위를 보존하기 위하여 PTU를 변형시킴으로써 PTU의 추가 길항제 유도체를 확인할 수 있을 것이다. 화학적 변형은 (예를 들면, 상기 리간드 상의 기능기를 추가 상호작용을 생성하기 위해 대체시킴으로써) 쓴맛 수용체 내의 자극제 결합 부위의 모델링에 기반하여 결정된다. 상기 TAS2R38의 구조를 활성화시키는 능력에 영향을 미치지 않는 본 개시내용에 따른 예시적인 자극제의 화학적 변형은 PTU (PROP) 분자 내의 프로필 사슬을 변형시키는 것을 포함하는 바, 상기 기는 예측되는 결합 부위를 기반으로 하는 쓴맛 수용체와 상호작용하지 않기 때문이다. 따라서, 다양한 경우에, 자극제의 예측되는 결합 부위를 기반으로, 작용제 유도체를 위한 핵심 구조는 쓴맛 수용체와 상호작용하는 부분으로서 정의될 수도 있으므로 변형되어서는 안 된다. 이는 각각의 다른 리간드에 대해 다양할 것이다. 유도체의 성질 및 기능은 추후에 기술된다.

[0040] 유효량은 수용체 결합 복합체의 형성 및 호르몬 방출을 가능하게 하는 세포 수준에서 리간드 농도로 생성되는 양이다. 몇몇 구현예에서, 예를 들면, 유효량은 약 1 마이크로몰 내지 약 1.25 밀리몰의 활성 작용제의 농도를 포함한다. 본 명세서에 기술된 PTC, PTU, 테나토늄 벤조에이트 및 다른 리간드에 대해 유효한 것으로 알려지거나 예상되는 추가적인 양은 약 0.5  $\mu$ M 내지 약 1  $\mu$ M, 약 1 $\mu$ M 내지 약 2.5  $\mu$ M, 약 2.5 $\mu$ M 내지 약 5  $\mu$ M, 약 5  $\mu$ M 내지 약 10  $\mu$ M, 약 10  $\mu$ M 내지 약 100  $\mu$ M, 약 100  $\mu$ M 내지 약 500  $\mu$ M, 약 500  $\mu$ M 내지 약 1000  $\mu$ M, 약 1 mM 내지 약 1.25 mM, 약 1.25 mM 내지 약 2.5 mM, 약 2.5mM 내지 약 5 mM, 약 5 mM 내지 약 10 mM을 포함한다. 유효한 것으로 알려지거나 예상되는 부가적인 양은 약 1-2.5  $\mu$ M, 약 2.6  $\mu$ M 내지 약 10 $\mu$ M, 약 11  $\mu$ M 내지 약 100  $\mu$ M; 약 101  $\mu$ M 내지 약 1000  $\mu$ M; 약 1.25 mM 내지 약 10mM을 포함한다.

[0041] 특히, 몇몇 구현예에서, 유효량은 약 2.5  $\mu$ M인 것으로 알려지거나 예상된다. 유효량은 본 명세서에 기술된 다양한 리간드 특히, PTC, PTU, 테나토늄 벤조에이트, 콕티신 클로라이드, 알릴 설피드, 로트렐린, 쿠르쿠민, 엘라그산, 엠벨린 및 본 실시예에서 언급된 다른 모든 리간드 및 이들의 조합이 단독으로 또는 조합되어 알려지거나 예상된다.

[0042] 다양한 구현예에서, GI 쓴맛 수용체 리간드, 특히 쓴맛 자극제 및 관련 작용제의 투여는 원하는 GI 관에 직접 전달을 가능하게 하는 임의의 투여 경로를 통해, 예를 들면, 구강 투여 경로 또는 다른 투여 경로를 통해 수행될 수 있다. 특히, 몇몇 구현예에서, 상기 작용제는 GI 관의 내강으로 전달되어 상기 GI 관의 상피세포를 통해 내강으로부터 전체로 또는 일부의 작용제의 전신 이동을 최소화하여 혈액으로 들어갈 수 있도록 형성된다. 몇몇의 상기 구현예에서, GI 관의 내강으로부터의 전신 이동의 최소화는 작용 특이성을 제공하고 부작용을 감소시킨다.

[0043] 일부 구현예에서, GI 쓴맛 수용체 리간드, 관련 작용제 및 상기를 포함하는 조성물은 GI 또는 장으로 전달될 수 있다. 특히, 다양한 구현예에서, GI는 전체 GI 시스템을 나타낸다. 본 개시내용의 관점에서, 상기 GI 관은 입에서부터 항문까지의 모든 GI 시스템의 부분들; 및 부착된 췌장 및 간을 나타낸다. GI 시스템으로부터 방출된 호르몬의 효과는 결국 전체 유익한 반응을 원하는 췌장 및 간에 미치는 2차 효과를 가지거나 가질 것으로 예상된다.

[0044] 특히, 몇몇 구현예에서, GI 쓴맛 수용체는 위의 상류 GI 관 부분에 위치한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "상류"는 입의 식도 부위를 나타낸다. 몇몇 구현예에서, 쓴맛 수용체는 위 내에 위치하는바, 즉 임의의 쓴맛 수용체는 위 내에 위치한다. 몇몇 구현예에서, 쓴맛 수용체는 장의 쓴맛 수용체, 즉 장 (대장 뿐만 아니라 소장)에 위치하는 쓴맛 수용체의 임의의 유형이다. GI 시스템 내의 다른 쓴맛 수용체들의 분포가 예상된다. GI 시스템 내의 상기 수용체들의 위치화는 본 개시내용의 검토시 숙련자들에 의해 이해되는 바와 같이, 투여되는 작용제의 선택에 영향을 미칠 것이다. 특히, 표적화되는 TAS2R 및 상기 TAS2R를 제시하는 세포들은 조절될 특정 호르몬과 원하는 조절 효과를 기반으로 선택될 수 있다. GI 관 상의 선택된 세포들의 위치가 확인될 수 있다. 선택된 세

포에서 원하는 조절 효과를 얻을 수 있는 리간드는 따라서 선택된 세포가 선택된 관 내로의 전달을 가능하게 하는 적합한 양과 형태로 위치되는 경우, GI 관에 투여될 수 있다. 예를 들면, GLP-1의 증가는 소장 및 대장 내에 위치한 세포 내의 TAS2R38를 활성화시킴으로써 수행될 수 있다. L 세포 내의 TAS2R38를 활성화하기에 적합한 리간드는 PTU이다. 숙련자들은 PTU의 유효량이 L 세포로부터 혈액 내로 GLP-1 생산 방출의 원하는 증가를 얻기 위하여 장으로 바로 전달될 수 있음을 이해할 것이다. 숙련자들은 또한 PTU의 화학적 성질 및 GI 상피세포에 의해 흡수되는 전신적 흡수 능력으로 인해 PTU가 상보성 분자에 바람직하게 컨쥬게이트됨으로써 흡수를 최소화시키고 장 내의 반감기를 최대화시킬 수 있음을 이해할 것이다.

[0045] 몇몇 구현예에서, 상기 GI 및 장의 쓴맛 수용체는 GI 관의 내강 표면에 위치한 내분비선 세포 상에 있는 쓴맛 수용체, 예를 들면, TAS2R38 및 TAS2R47를 포함한다. 몇몇 구현예에서, GI 쓴맛 수용체의 활성화는 상기 내분비선 세포 (상기 세포는 호르몬을 세포로 방출하기 위하여 GI 관 또는 장 내부로부터 활성화될 수 있다)로부터의 방출 또는 상기에 의해 매개되는 방출을 포함하는, 호르몬 방출 세포로부터의 대사성 호르몬의 방출, 그 이후의 전신적 분포를 야기한다. GI 관 또는 장으로의 쓴맛 자극 수용체 리간드의 전달, 그들의 조합 및 조성물은 개재된, 상보성 및 선택적 단계 및 과정을 통해 상기 방출에 영향을 미칠 것으로 예상된다.

[0046] 몇몇 구현예에서, 상기 방법은 개체에 일 또는 그 이상의 GI 쓴맛 수용체 리간드 및/또는 개체에 일 또는 그 이상의 표적 GI 쓴맛 수용체를 활성화시킬 수 있는 관련 작용제를 개체에 일 또는 그 이상의 대사성 호르몬의 방출을 조절할 수 있는 유효량으로 투여하는 것을 포함한다.

[0047] 구현예에서, GI 쓴맛 수용체 리간드, 및 본 명세서에 기술된 작용제는 GI 관으로 전달됨으로써 GI 관의 내분비선 세포, 예를 들면 CCK-함유 I-세포 및 GLP-1 및 PYY-함유 L 세포로부터의 대사성 호르몬의 방출을 조절할 수 있다. 몇몇 구현예에서, 본 명세서에 기술된 리간드 및 작용제는 GI 관의 신경 말단 상에 존재하는 쓴맛 수용체에 유효하며 결국 GI 관 내의 내분비선 세포로부터 호르몬 방출을 조절하는 신경 반응을 조절할 것으로 예상된다.

[0048] 일 구현예에서, GI 쓴맛 수용체 리간드, 관련 작용제, 조성물, 방법 및 시스템은 GLP-1을 조절하기에 적합하다. 몇몇의 상기 구현예에서, 상기 리간드는 PTC, PTU, 글리시리진산 암모늄염, 에피갈로카테킨 갈레이트, 하이퍼포린, 베르베린 클로라이드, 콤텐신 클로라이드 알릴 메틸 설퍼드, 로테린, 쿠르쿠민, 엘라그산, 엠벨린 및/또는 상기의 작용제 유도체일 수 있다. 특히, PTC 및 PTU, 또는 임의의 다른 리간드는 GLP-1을 방출하는 호르몬의 내강 표면에 단독으로 또는 조합하여 적용되고 PYY-함유 L 세포는 호르몬 함유 세포로부터 호르몬 GLP-1 및 PYY를 혈액으로 방출하는 상기 L-세포의 내강 표면 상에 TAS2R38 수용체를 활성화시킬 것이다. 특히, 쓴맛 수용체 리간드, 관련 작용제 및 그들의 조합은 GI 관 내의 GLP-1 및 PYY-함유 L 세포 상의 TAS2R38 수용체 위치의 특정 부위로 전달가능하게 하는 시스템과 관련하여, 약 1 $\mu$ M 내지 약 2.5  $\mu$ M, 약 2.6 $\mu$ M 내지 약 10  $\mu$ M, 약 11  $\mu$ M 내지 약 100  $\mu$ M; 약 101  $\mu$ M 내지 약 1000  $\mu$ M; 약 1.25 mM 내지 약 10 mM의 농도 범위에서 GI 관의 내강 표면에 적용될 수 있다. TAS2R38 수용체를 활성화할 수 있는 다른 리간드들은 GI 관 내의 GLP-1 및 PYY-함유 세포 상에 TAS2R38 수용체 위치의 특이적 부위로의 전달을 가능하게 하고 또한 상기 호르몬 함유 세포로부터 혈액으로의 GLP-1 및 PYY를 방출하는 것으로 예상되는 시스템과 관련하여, 약 1 $\mu$ M 내지 약 2.5 $\mu$ M, 약 2.6  $\mu$ M 내지 약 10  $\mu$ M, 약 11  $\mu$ M 내지 약 100  $\mu$ M; 약 101  $\mu$ M 내지 약 1000  $\mu$ M; 약 1.25 mM 내지 약 10 mM의 농도에서 GI 관의 내강 표면에 적용된다.

[0049] 일 구현예에서, GI 쓴맛 수용체 리간드, 관련 작용제, 조성물, 방법 및 시스템은 CCK의 혈액으로의 방출을 조절하기에 적합하다. 상기 몇몇 구현예에서, 상기 리간드는 데나토늄 벤조에이트 또는 이의 작용제 유도체이다. CCK-함유 I 세포를 방출하는 호르몬의 내강 표면에 단독으로 또는 조합하여 적용되는 작용제들은 호르몬 함유 세포로부터 혈액으로의 호르몬 CCK를 방출시키는 I 세포의 내강 표면 상에 위치하는 TAS2R47 수용체를 활성화시킬 것이다. 특히, 몇몇 구현예에서, 상기 작용제는 GI 관 내의 CCK-함유 I 세포 상의 TAS2R47 수용체의 위치의 특정 부위로 전달시키는 시스템에서, 약 1-25  $\mu$ M, 약 2.6  $\mu$ M 내지 약 10  $\mu$ M, 약 11  $\mu$ M 내지 약 100  $\mu$ M; 약 101  $\mu$ M 내지 약 1000  $\mu$ M, 약 1.25 mM 내지 약 10 mM의 농도로 GI관의 내강 표면에 적용된다. TAS2R47 수용체를 활성화시킬 수 있는 다른 리간드들은 GI 관 내의 CCK-함유 I 세포 상의 TAS2R47 수용체의 위치의 특정 부위로 전달을 가능하게 하거나 상기 호르몬 함유 세포로부터 혈액으로의 CCK 방출시키는 시스템과 관련하여, 약 1  $\mu$ M 내지 약 2.5  $\mu$ M, 약 2.6  $\mu$ M 내지 약 10  $\mu$ M, 약 11  $\mu$ M 내지 약 100  $\mu$ M; 약 101  $\mu$ M 내지 약 1000  $\mu$ M; 약 1.25 mM 내지 약 10 mM의 농도에서 GI관의 내강 표면에 적용된다.

[0050] 일 구현예에서, GI 쓴맛 수용체 리간드 조성물, 방법 및 시스템은 PYY를 조절하기에 적합하다. 몇몇의 상기 구현예에서, PYY는 L-세포에 의해 방출되는 것으로 예상되기 때문에, GLP-1을 조절할 수 있는 작용제는 PYY도 조

절할 수 있을 것으로 예상되거나 알려져 있다.

- [0051] 몇몇 구현예에서, 일 또는 그 이상의 표적 GI 쓴맛 수용체는 TAS2R38를 포함하고, 일 또는 그 이상의 대사성 호르몬은 GLP-1 및 PYY를 포함한다. 다른 구현예에서, 일 또는 그 이상의 표적 GI 쓴맛 수용체는 TAS2R47를 포함하고, 일 또는 그 이상의 대사성 호르몬은 CCK를 포함한다.
- [0052] 몇몇 구현예에서, 일 또는 그 이상의 작용제는 쓴맛 자극제를 포함한다. 특히, 몇몇 구현예에서, 상기 쓴맛 자극제는 PTU, PTC, 데나토늄 벤조에이트, 이들의 유도체 및 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 특히, TAS2R47 (예를 들면, DB)를 활성화하는 리간드와 작용제 및 TAS2R38 (예를 들면, PTU 및 PTC)를 활성화시키는 리간드와 작용제는 약 1  $\mu$ M 내지 약 2.5  $\mu$ M, 약 2.6  $\mu$ M 내지 약 10  $\mu$ M, 약 11  $\mu$ M 내지 약 100  $\mu$ M, 약 101  $\mu$ M 내지 약 1000  $\mu$ M, 약 1.25 mM 내지 약 10 mM의 농도에서 GI 관의 내강 표면에 단독으로 또는 조합하여 적용된다. 일부 구현예에서, TAS2R47 수용체 또는 TAS2R38의 각각의 위치의 특정 부위로 전달시키는 시스템 내에서 수행되는 경우, 투여는 혈액 내로 호르몬을 방출시키는 것으로 알려지거나 예상된다. 몇몇 구현예에서, TAS2R47을 활성화시키는 리간드 및 작용제는 장의 상단부에 있는 I 세포로부터의 호르몬 CCK를 혈액 내로 방출시키는 것으로 알려지거나 예상된다. 일 구현예에서, TAS2R38을 활성화시키는 작용제 또는 리간드는 장의 하단부에 있는 L 세포로부터의 호르몬 GLP-1 및 PYY를 혈액 내로 방출시키는 것으로 알려지거나 예상된다.
- [0053] 더 특히, 몇몇 구현예에서, 상기 쓴맛 자극제는 PTU, PTC, 이들의 유도체 및 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 일 또는 그 이상의 대사성 호르몬은 GLP-1 및 PYY를 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 쓴맛 자극제는 데나토늄 벤조에이트, 이의 유도체 및 이의 조합물로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 일 또는 그 이상의 대사성 호르몬은 CCK를 포함한다. 몇몇 구현예에서, 상기 조합은 특히 장 내강을 떠나지 않는 형태로 전달될 수 있다. 이러한 방법으로, 각각은 장 내에 적절한 위치로 전달될 것이다. 특히, 몇몇의 상기 구현예에서, 조합은 식사 전에 또는 식사 중에 투여될 수 있다. 이동 속도로 인하여, I 세포에 대한 리간드는 L 세포에 대한 리간드가 L 세포에 도달하기 전에 I 세포에 도달할 것이다. 따라서, 주로 위의 공복을 더디게 하는 CCK의 효과는 초기에 발생할 것으로 예상된다. 예를 들면, 한 케이스에서, 상기 작용제의 투여 후 약 30 분 내지 약 2시간 쯤에, 상기 L 세포에 대한 리간드는 표적 세포에 도달하여 CCK와 마찬가지로 위 공복에 영향을 미치지만 포만감 및 인슐린 방출도 향상시키는 GLP-1 및 PYY의 방출을 개시할 것으로 예상된다. 효과의 조합은 체중 조절 및 당뇨병 뿐만 아니라 이러한 장애의 결론에도 유리할 것으로 예상된다. 몇몇 구현예에서, 지속되는 이점은 연장된 시간 동안 (예를 들면, 수 개월 동안) 모든 식사 전에 또는 식사와 함께 투여되는 리간드 및/또는 작용제의 조합으로 예상된다.
- [0054] 몇몇 구현예에서, 일 또는 그 이상의 작용제는 쓴맛 자극제를 포함하고, 일 또는 그 이상의 표적 GI 쓴맛 수용체는 I 세포에 위치한 TAS2R47 및 L 세포에 위치한 TAS2R38를 포함하고, 그리고 일 또는 그 이상의 호르몬은 CCK, GLP-1 및 PYY를 포함한다. 특히, 몇몇 구현예에서, 일 또는 그 이상의 작용제가 쓴맛 자극제를 포함하는 경우, 상기 일 또는 그 이상의 표적 GI 쓴맛 수용체는 L 세포에 위치한 TAS2R38를 포함하고, 그리고 일 또는 그 이상의 호르몬은 L 세포에 위치한 PYY, GLP-1를 포함한다. 다른 구현예에서, 일 또는 그 이상의 작용제가 쓴맛 자극제를 포함하는 경우, 상기 일 또는 그 이상의 GI 쓴맛 수용체는 I 세포에 위치한 TAS2R47를 포함하고, 그리고 일 또는 그 이상의 호르몬은 I 세포에 위치한 CCK를 포함한다. 더 구체적으로, 상기 구현예에서, 상기 쓴맛 자극제는 PTU, PTC, 데나토늄 벤조에이트, 이들의 유도체 및 이들의 조합물로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 일 또는 그 이상의 표적 GI 쓴맛 수용체 L 세포에 위치한 TAS2R38를 포함하고, 그리고 일 또는 그 이상의 호르몬은 PYY, GLP-1를 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 쓴맛 자극제는 PTU, PTC, 데나토늄 벤조에이트, 이들의 유도체 및 이들의 조합물로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 상기 일 또는 그 이상의 표적 GI 쓴맛 수용체는 I 세포에 위치한 TAS2R47를 포함하고, 그리고 상기 일 또는 그 이상의 호르몬은 CCK를 포함한다.
- [0055] 몇몇 구현예에서, 상기 일 또는 그 이상의 작용제는 일 또는 그 이상의 쓴맛 자극제를 포함하는 조성물이다. 특히, 몇몇 구현예에서, 상기 일 또는 그 이상의 쓴맛 자극제는 PTU, PTC, 이들의 유도체 및 이들의 조합물로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 상기 일 또는 그 이상의 대사성 호르몬은 GLP-1 및 PYY를 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 일 또는 그 이상의 쓴맛 자극제는 데나토늄 벤조에이트, 이들의 유도체 및 이들의 조합물로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 상기 일 또는 그 이상의 대사성 호르몬은 CCK를 포함한다.
- [0056] 몇몇 구현예에서, 상기 일 또는 그 이상의 작용제는 일 또는 그 이상의 쓴맛 자극제를 포함하는 조성물을 포함한다. 특히, 몇몇 구현예에서, 상기 일 또는 그 이상의 쓴맛 자극제는 PTU, PTC, 데나토늄 벤조에이트, 이들의 유도체 및 이들의 조합물로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 상기 일 또는 그 이상의 표적 쓴맛 수용체는 L 세포에 위치한 TAS2R38를 포함하고, 상기 일 또는 그 이상의 호르몬은 PYY, GLP-1를 포함한다. 다른 구현예에서,

상기 일 또는 그 이상의 쓴맛 자극제는 PTU, PTC, 테나토늄, 이들의 유도체 및 이들의 조합물로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 상기 일 또는 그 이상의 표적 쓴맛 수용체는 L 세포에 위치한 TAS2R47를 포함하고, 상기 일 또는 그 이상의 호르몬은 CKK를 포함한다.

[0057] 몇몇 구현예에서, 상기 일 또는 그 이상의 작용제는 쓴맛 자극제를 포함하고 상기 투여는 일 또는 그 이상의 작용제를 개체의 GI 관으로 경구 투여함으로써 수행되고, 상기 일 또는 그 이상의 표적 GI 쓴맛 수용체는 TAS2R38 및 TAS2R47를 포함하고 상기 일 또는 그 이상의 대사성 호르몬은 PYY, GLP-1 및 CCK를 포함하는 것으로, 여기서 상기 쓴맛 자극제는 GI 관으로의 구강 투여에 특히 적합한바, 구체적으로 쓴맛 자극이나 그것의 대사물질도 시스템 내로의 전달에 부작용을 야기하지 않으며, GI 관을 통한 흡수 및 전신 분배를 최소화시킨다. 특히, 몇몇 구현예에서, 일 또는 그 이상의 표적 GI 쓴맛 수용체는 TAS2R38를 포함하고, 상기 일 또는 그 이상의 대사성 호르몬은 PYY, GLP-1를 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 일 또는 그 이상의 표적 GI 쓴맛 수용체는 TAS2R47를 포함하고, 상기 일 또는 그 이상의 대사성 호르몬은 CCK를 포함한다.

[0058] 몇몇 구현예에서, 상기 작용제는 구강 또는 다른 투여시, GI 관 또는 장의 전부 또는 일부로 또는 상기를 통해 운반될 수 있는 쓴맛 자극을 포함한다.

[0059] 일 구현예에서, 투여가 구강 경로 직장 경로 또는 장의 원하는 관으로의 리간드의 전달에 적합한 다른 경로에 의해 수행되는 경우, 리간드 또는 이들의 조합물은 쓴맛 수용체가 전달될 리간드에 존재하는 경우, GI 관 또는 장의 부분에 전달되기 전에 리간드가 열화, 첨가 반응, 소화 효소 또는 다른 과정, 대사성 또는 세균성 과정 등을 통해 기능을 잃지 않도록 제형화될 수 있다.

[0060] 몇몇 구현예에서, 상기 리간드는 구강 투여 또는 다른 투여 경로시, GI 관 또는 장의 일부 또는 전부로 및 상기를 통해 이동될 수 있다. 다른 구현예에서, 상기 리간드는 본질적으로 GI 관을 통한 최소한의 흡수를 갖거나 GI 관을 통한 흡수를 최소화시키기 위하여 변형된다. 몇몇 구현예에서, 장 내의 리간드의 반감기를 연장시키기 위하여, 상기 리간드는 비-열화되거나 최소한의 경우 소화 효소 또는 다른 화학물질 및 위와 장의 작용에 의한 열화에 내성이 있거나 영향을 받지 않을 것으로 예상된다. 만약 존재하는 경우, 터더(tether)는 작용제의 기능화/결합을 간섭/억제하지 않는 방식으로 및/또는 작용제의 기능화/결합을 간섭/억제하지 않는 작용제 상의 지점에서 작용제에 연결되기 위한 것이다.

[0061] 몇몇 구현예에서, 리간드는 조성물 내에 포함될 수 있는데, 작용제로서 사용되도록 또는 작용제 내에서 사용되도록 조합되어 제공되거나 그렇지 않은 경우 변형된다. 특히, 몇몇 구현예에서, 리간드는 GI 관을 통과하는 리간드의 흡수를 최소화시키기 위하여 제형화된 조성물 내에 포함된다.

[0062] 몇몇 구현예에서, 리간드 또는 작용제 또는 이들의 조합물은 세포 근처 또는 장의 부분에 특이적으로, 또는 특정 세포에 직접 작용제를 전달하는 조성물 내에 포함될 수 있다. 특히, 몇몇 구현예에서, 전달은 (미셀 캡슐화를 포함하는) 캡슐화, 다른 구현예에서는 세포 또는 환경을 표적화하는 다부분 블럭 코-폴리머의 사슬에 컨쥬게이션된 후 숙련자에 의해 확인가능한 기술 및 방법을 따라 작용제/리간드 '페이로드(payload)'를 방출하거나 활성화시킴으로써 수행될 수 있다.

[0063] 몇몇 구현예에서, 리간드 쓴맛 자극의 전신 흡수를 방해하기 위해 구성된 상보성 분자와 조합되어 투여될 수 있다.

[0064] 본 명세서에서 사용된 용어 "상보성 분자"는 상응하는 TAS2R(들)에 결합하기 위한 리간드의 활성을 실질적으로 변경함이 없이 GI 관을 통한 흡수를 최소화시키기 위하여 일 이상의 BTRL의 분포를 변형시키기 위해 고안된 분자를 나타낸다. 본 개시내용에 따른 상보성 분자의 예시적인 유형은 핵산, 단백질, PEG, 모노사카라이드 및 올리고사카라이드 (예를 들면, 셀룰로오스)와 같은 폴리머를 포함한다. 상기 분자들은 호르몬 방출에 대한 그들의 효과를 연장시키기 위하여 GI 시스템에서의 BTRL의 흡수를 방해하는 것으로 알려지거나 예상된다. 예시적인 상보성 분자는 모노사카라이드, 올리고사카라이드, 아미노산, 펩티드, 및 폴리머, 예를 들면, 셀룰로오스 또는 PEG를 포함한다.

[0065] 본 명세서에서 사용된 용어 "모노사카라이드"는 생물학적으로 중요한 탄수화물의 가장 기본적인 단위를 나타낸다. 전형적으로, 모노사카라이드는 하기와 같은 화학식을 가지는 것으로:  $C_x(H_2O)_y$ , 여기서 x는 3 이상을 나타낸다. 모노사카라이드는 탄소 원자의 수 x에 의해: 디오스 (2) 트리오스 (3) 테트로스 (4), 펜토스 (5), 헥소스 (6), 헵토스 (7) 등으로 분류될 수 있다. 모노사카라이드는 선형 사슬 모노사카라이드, 개방형 사슬 스테레오이소머, 및 환형 이소머로 분류될 수 있다. 모노사카라이드의 예로는 글루코스 (덱스트로스), 프럭토스 (레볼루오스), 갈락토스, 자일로스와 리보스를 포함한다. 모노사카라이드는 수크로오스 및 폴리사카라이드 (예를 들면,

셀룰로오스 및 전분)과 같은 디사카라이드의 구성 성분(building block)이다. 게다가, 히드록실기 (제1 및 마지막은 제외)를 지지하는 각각의 탄소 원자는 동일한 화학 공식을 갖는 모든 이소머 형태의 수를 증가시키는, 키타다. 예를 들면, 갈락토오스 및 글루코오스는 모두 알도헥소스이나 다른 화학 및 물리적 성질을 가진다.

[0066] 본 명세서에서 사용된 용어 "올리고사카라이드"는 단순 당 (모노사카라이드)로도 알려진, 적은 수 (전형적으로, 2 내지 10)의 성분 당을 함유하는 사카라이드 폴리머를 나타낸다. 올리고사카라이드는 많은 기능을 가지는 것으로; 예를 들면, 상기는 동물 세포의 플라스마 막 상에서 흔히 발견되어 세포-세포 인식에서 역할을 할 수 있다. 일반적으로, 그들은 단백질 내의 아미노산 측쇄 또는 지질 모이어티 (글리칸 참고)와 양립가능한 O- 또는 N- 결합으로 발견된다.

[0067] 본 명세서에서 사용된 용어 "아미노산", "아미노산 모노머" 또는 "아미노산 잔기"는 20개의 천연적으로 발생되는 아미노산, 비-천연 아미노산, 및 인공 아미노산을 나타내는 것으로, D 및 L 광학 이성질체를 포함한다. 특히, 비-천연 아미노산은 천연적으로 발생되는 아미노산의 D-스테레오이소머 (그들은 효소 분해에 영향을 받지 않기 때문에 유용한 리간드 구성 성분들을 포함한다)를 포함한다. 용어 "인공 아미노산"은 표준 아미노산 결합 화학을 사용하여 함께 쉽게 결합할 수 있으나, 천연적으로 발생하는 아미노산과 유사하지 않은 분자 구조를 가진다. 용어 "아미노산 유사체"는 일 또는 그 이상의 각각의 분자가 다른 원자, 이소토프, 또는 다른 기능기르 대체되었지만 그 외에는 그러한 유사체가 유래되는 원래의 아미노산과 동일한 아미노산을 나타낸다. 이러한 모든 아미노산들은 표준 아미노산 결합 화학물질을 사용하여 펩티드 또는 폴리펩티드 내에 합성 통합될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 "폴리펩티드"는 일 또는 그 이상의 모노머를 포함하거나 아미노산 모노머 이외의 구성 성분들을 포함하는 폴리머를 포함한다. 용어 모노머, 하부단위, 또는 구성성분들은 폴리머를 형성하기 위한 동일하거나 다른 화학 성질을 갖는 다른 모노머와 화학적으로 결합될 수 있는 적절한 조건 하의 화학적 화합물을 나타낸다. 용어 "폴리펩티드"는 일 또는 그 이상의 구성 성분들이 아마이드 또는 펩티드 결합 이외의 화학 결합에 의해 다른 것들과 공유 결합된 폴리머를 포함하는 것으로 추가 의도된다.

[0068] 본 명세서에서 사용된 용어 셀룰로오스는 공식  $(C_6H_{10}O_5)_n$ 를 갖는 유기 화합물, 수백개 내지 수만개 이상의  $\beta$  (1 →4) 결합된 D-글루코오스 단위의 선형 사슬로 이루어지는 폴리사카라이드를 나타낸다. 셀룰로오스는 대부분 토류 유기 화합물이다. 모든 식물 성분들의 약 33%는 셀룰로오스 (코튼의 셀룰로오스 함량은 90% 이고 나무는 40-50%이다)이다. 조성물 특히, 개체를 위한 약제학적 조성물 내에 투여될 셀룰로오스의 합성 및 사용을 위한 방법 및 기술은 숙련자에 의해 확인가능하다.

[0069] 본 명세서에서 사용된 용어 "폴리에틸렌 글리콜" 또는 "PEG"는 폴리에테르 화합물을 나타낸다. 예시적인 PEG 분자는 PEG, PEO, 또는 에틸렌 옥사이드의 올리고머 또는 폴리머를 나타내는 POE를 포함한다. 3개의 이름들은 화학적으로 동의어지만, 역사적으로 PEG는 20,000 g/mol 이하의 분자량을 갖는 올리고머 및 폴리머, PEO는 20,000 g/mol 이상의 분자량을 갖는 폴리머, 및 POE는 임의의 분자량을 갖는 폴리머를 나타내는 경향이 있다. PEG 및 PEO는 그들의 분자량에 따라 액체 또는 저-용융 고체이다. PEG는 에틸렌 옥사이드의 중합화에 의해 제조됨으로써, 300 g/mol 내지 10,000,000 g/mol의 분자량 범위에서 상업적으로 이용가능하다. 몇몇 구현예에서, 상보성 분자로 사용되기에 적합한 PEG는 PEG 10,000이다 [Kerckhoffs, 2010].

[0070] 일 구현예에서, 상기 리간드는 GI 시스템 내의 리간드의 흡수를 최소화하기 위해 설정된 상보성 분자와 함께 조성물 내에 포함될 수 있다. 일 구현예에서, 조성물은 일 이상의 작용제 및/또는 리간드 뿐만 아니라 적합한 운반체 또는 첨가제를 포함할 수 있다. 예시적인 조성물은 PTU-셀룰로오스 또는 PTU PEG를 포함한다. 숙련자들은 GI 관을 통화하여 흡수 불가능하기에 적합하고, 기준에 맞도록 결합되거나 캡슐화된 상보성 분자를 확인할 수 있다.

[0071] 몇몇 구현예에서, 상기 쓴맛 자극제 수용체 리간드는 상기 상보성 분자와 컨쥬게이션될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 "컨쥬게이트" 또는 "컨쥬게이션"은 공유 결합을 통하여 2 이상의 분자가 복합체로 형성된 것을 나타낸다. 본 명세서에서 사용된 용어 "공유 결합"은 공유 결합으로 알려진, 원자 사이의 전자 쌍을 공유하는 것을 특징으로 하는 화학 결합의 형성 과정을 나타낸다. 공유 결합은 원자가 그들의 전자를 공유하는 경우 전자 사이의 인력 및 척력의 안정한 균형을 나타내는 것으로, 많은 종류의 상호작용, 예를 들면,  $\sigma$ -결합,  $\pi$ -결합, 금속 대 금속 결합, 아고스틱(agostic) 상호작용, 및 3-중심 2-전자 결합을 포함한다. 몇몇 구현예에서, 상기 컨쥬게이션기는 도 13에 나타내어진 카르복실산 및 아지드와 같은 반응성 기로 예상되는 바, 대부분의 유형의 상보성 분자의 결합을 촉진시킨다. 특히, 몇몇 구현예에서, 컨쥬게이션은 상보성 분자와 쓴맛 수용체 리간드의 직접 결합시킴으로써 수행될 수 있다. 몇몇 구현예에서, 상기 상보성 분자는 간접 부착에 의해 컨쥬게이션될 수 있는 것으로, 여기서 쓴맛 수용체 리간드는 일 또는 그 이상의 부가적인 분자 (예를 들면, 상기 상보성 분자에

리간드의 부착을 가능하게 하거나 이를 촉진시키는 링커)를 통해 상보성 분자에 공유결합된다. 특히, 컨쥬게이션은 상기 상보성 분자에 결합된 리간드를 포함하는 생성된 작용제가 상응하는 GI 쓴맛 수용체에 결합에 대해 제시될 수 있도록 수행된다.

- [0072] 화합물 또는 기능기와 관련하여 본 명세서에서 사용된 용어 "제시"는 부착된 화합물 또는 기능기의 화학적 반응성을 유지하기 위하여 수행되는 부착을 나타낸다. 따라서, 리간드 상에 존재하는 기능기는 기능기를 화학적으로 특징화하는 일 또는 그 이상의 화학 반응을 적합한 조건 하에 수행할 수 있다.
- [0073] 본 명세서에서 사용된 용어 "부착" 또는 "부착된"은 직접 또는 간접 부착을 포함하는, 2 또는 그 이상의 성분을 함께 유지하기 위하여 결합, 링크, 힘 또는 타이에 의해 연결되거나 연합되는 것을 나타내는 것으로, 예를 들면 제1분자는 제2 분자 또는 물질에 직접 결합되거나, 또는 일 또는 그 이상의 매개 분자는 제1분자와 제2분자 또는 물질 사이에 위치된다.
- [0074] 본 명세서에서 사용된 용어 "기능기"는 상기의 구조의 특징적인 화학 반응을 초래하는 분자 구조 내부의 원자의 특정 기를 나타낸다. 예시적인 기능기는 히드로카본, 할로젠 함유기, 산소 함유기, 질소 함유 기 및 인 및 황 함유기를 포함하는바, 상기 모두는 당업자에게 확인가능하다. 특히, 본 개시내용의 측면에서 기능기는 카르복실산, 아민, 트리아릴포스핀, 아지드, 아세틸렌, 설폰일 아지드, 티오산 및 알데히드를 포함한다. 특히, 예를 들면, 제1기능기 및 제2기능기는 하기의 결합 파트너를 포함하기 위하여 선택될 수 있다: 카르복실산 기 및 아민기, 아지드 기 및 아세틸렌 기, 아지드 및 트리아릴포스핀 기, 설폰일 아지드 및 티오 산, 및 알데히드 및 1차 아민. 부가적인 기능기는 본 개시내용을 검토하는 동안 숙련자에 의해 확인가능할 수 있다. 용어 "상응하는 기능기"는 다른 기능기와 반응할 수 있는 기능기를 나타낸다. 따라서, 서로 반응할 수 있는 기능기는 상응하는 기능기로도 불릴 수 있다.
- [0075] 몇몇 구현예에서, 컨쥬게이션된 쓴맛 자극제 또는 조성물은 PTU를 포함한다. 몇몇의 상기 구현예에서, PTU는 상보성 분자에 공유 결합된다. 특히, 몇몇 구현예에서, 도 11에 나타난 바와 같이, PTU의 단일의 수소 원자는 PTU 및 상보성 분자 모두에 결합되거나, 상기 내에 통합되거나, 또는 상기에 의해 통합됨으로써 공유되는 OH 기능기에 의해 치환된다.
- [0076] 특히, 몇몇 구현예에서, 상기 상보성 분자는 핵산이다. 몇몇 구현예에서, 상기 상보성 분자는 단백질이다. 몇몇 구현예에서, 상기 상보성 분자는 모노사카라이드이다. 몇몇 구현예에서, 상기 상보성 분자는 올리고사카라이드이다.
- [0077] 몇몇 구현예에서, 상기 조성물은 PTU 및 2 이상의 상보성 분자를 포함하는 것으로, 여기서 일 이상의 상보성 분자는 PTU에 공유 결합되고, 일 이상의 다른 상보성 분자는 상기 리간드에 공유 결합되지 않는다.
- [0078] 특히, 몇몇 구현예에서, 일 이상의 상보성 분자 및 PTU 사이의 공유 결합은 PTU 및 상보성 분자 모두에 결합됨으로써, 상기 내에 통합됨으로써, 또는 상기에 의해 통합됨으로써 공유되는 카르복실 또는 아지드 기능기 (도 13)에 의해 도 11에 나타난 PTU의 단일의 수소 원자의 치환을 통한다.
- [0079] 몇몇 구현예에서, PTU는 GI 관 또는 장으로의 전달에 사용하기 위해, 또는 GI 또는 장 쓴맛 수용체의 조절을 위해, 특히 GI 또는 장 쓴맛 수용체 TAS2R38 또는 다른 GI 또는 장 쓴맛 수용체를 활성화하거나 조절하기 위해 변형되거나, 구성되거나, 캡슐화되거나 그렇지 않으면 제조된다.
- [0080] 몇몇 구현예에서, 개체 내의 표적 쓴맛 자극제 수용체의 활성화가 기술된다. 상기 방법은 PTU, PTC, 데나토늄, 이들의 유도체 및 이들의 조합물로 이루어지는 군으로부터 선택된 일 또는 그 이상의 작용제의 유효량을 개체에 투여하는 것을 포함한다. 상기 시스템은 상기 군으로부터 선택되는 2 이상의 작용제를 포함한다. 상기 조성물은 상기 동일한 군으로부터 선택되는 일 또는 그 이상의 작용제를 포함한다.
- [0081] 몇몇 구현예에서, 상기 컨쥬게이트된 쓴맛 자극제 작용제는 베르베린 클로라이드, 시아니딘 클로라이드, 콤텐신 클로라이드, 상기의 임의의 기능적 유도체 및 상기의 임의의 조합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 일 또는 그 이상의 화합물을 포함한다. 몇몇 구현예에서, 상기 내분비선 세포는 I 세포이다. 다른 구현예에서, 상기 내분비선 세포는 L-세포이다. 몇몇 구현예에서, 베르베린 클로라이드, 시아니딘 클로라이드, 콤텐신 클로라이드, 상기의 임의의 기능기 유도체 및 상기의 임의의 조합물이 또한 단순 리간드로서 본 명세서에서 기술된 방법, 조성물 및 시스템 내에 제공될 수 있다. 상기 몇몇의 구현예에서, 리간드 및 관련된 작용제들은 기능식품 용도를 위한 적용에서 사용될 수 있다.
- [0082] 일 구현예에서, 쓴맛 자극제 수용체 리간드 및 관련 조성물의 사용, 및 GI 및 장 쓴맛 수용체의 조절은 GLP-1,

PYY, CCK 및 다른 대사성 호르몬의 방출을 직접 조절할 수 있는 것으로, 상기 대사성 및 관련 질병 및 질환 및 상기와 관련되는 생물학적 과정을 조절하기 위한 대사성 호르몬을 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다. GLP-1, PYY, CCK, 및 다른 대사성 호르몬은 GI 관의 내강 내에 위장 구성성분에 의해 혈액으로 방출되는 것으로 알려져 있고, 위 공복, 포만감, 인슐린 분비, 지질 대사, 및 다른 대사성-관련 과정과 같은 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다.

- [0083] 본 명세서에서 사용된 용어 "상태"는 개체의 몸의 신체적 상태 (전체로서 또는 일 또는 그 이상의 그것의 부분으로서)를 나타내는 것으로, 개체의 완전한 신체적, 정신적 및 사회 복지적인 상태와 관련된 표준 신체적 상태에 순응하는 것은 아니다. 본 명세서에서 사용된 용어 상태는 질병 및 질환을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니며, 상기 용어 "질병"은 몸체 또는 그것의 임의의 일부분의 기능적 장애를 갖는 생존 개체의 상태는 나타내고, 용어 "질환"은 몸체 또는 그것의 임의의 일부분의 정상 기능이 손상된 생존 개체의 상태는 나타내고 전형적으로 증후 및 증상을 구별함으로써 나타내어진다.
- [0084] 2개의 아이тем과 관련하여 본 명세서에서 사용된 단어 "관련된"은 제1아이тем의 발생이 제2아이тем의 발생에 의해 수반되도록 2개의 아이тем 사이의 관계를 나타내는 것으로, 원인-효과 관계 및 증상/증후-질병 관계를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0085] 따라서, 본 명세서에서 사용된 용어 "대사성 상태", "대사성 질병" 또는 "대사성 관련 상태"는 대사성 호르몬 방출의 조절을 통해 치료가 가능한 상태 또는 질병을 포함하는, 일 또는 그 이상의 대사성 과정 및/또는 장애와 관련된 장애 또는 질병을 나타낸다. 본 개시내용에 따른 예시적인 대사성 상태 또는 장애는 비만, 당뇨, 간 질환 및 심혈관 질환을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 비만 및 당뇨는 몇몇의 암의 증가된 위험과 관련있기 때문에, 비만과 당뇨의 치료는 상기 암 뿐만 아니라 대사성 증후군에도 유리한 효과를 미칠 것이다.
- [0086] 상기 기술된 대사성 상태 또는 질병과 관련된 생물학적 과정의 관점에서 본 명세서에서 사용된 용어 "생물학적 과정"은 위 공복, 포만감, 인슐린 분비, 지질 대사를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아닌, 상기 기술된 대사성 장애 또는 질환에 영향을 이치거나 및/또는 야기하는 생물학적 과정을 나타낸다.
- [0087] 몇몇 구현예에 따르면, 쓴맛 수용체 리간드, 및 관련 조성물 방법 및 시스템은 본 명세서에서 대사성 호르몬과 관련된 상태를 개체에서 치료하거나 예방하기 위해 사용된다.
- [0088] 본 명세서에서 사용된 용어 "치료"는 약물적으로 또는 수술적으로 상태를 케어하거나 다루기 위한 의료 행위의 일 부분인 임의의 활동을 나타낸다.
- [0089] 본 명세서에서 사용된 용어 "예방"은 개체 내에서 상태로부터의 사망률 및 병적 상태의 부담을 줄이기 위한, 임의의 활동을 의미한다. 그것은 1차, 2차 및 3차 예방 수준으로 발생하는 것으로, 여기서 a) 1차 예방은 질병의 발전을 막는 것이고; b) 2차 예방 활동은 이른 질병 치료를 목표로함으로써 질병의 전진 및 증후의 발병을 예방하기 위한 개입의 기회를 증가시키는 것이고; 그리고 c) 3차 예방은 기능을 회복시키고 질병-관련 합병증을 감소시킴으로써 이미 성립된 질병의 부정적 영향을 줄이는 것이다.
- [0090] 작용제의 투여 관점에서 본 명세서에서 사용된 용어 "개체는" 단일의 생물학적 유기체를 포함하는 것으로, 동물, 특히 고등 동물, 특히 척추동물 예를 들면 포유동물, 특히 인간을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0091] 유효량, 특히 치료적으로 유효한 양의 쓴맛 수용체 리간드 또는 작용제 단독 또는 조합은 약 1 마이크로몰 내지 약 1.25 밀리몰을 포함한다. 본 명세서에 기술된 PTC, PTU, 테나토늄 벤조에이트 및 다른 리간드에 유효한 것으로 알려지거나 예상되는 추가적인 양은 약 0.5  $\mu$ M 내지 약 1  $\mu$ M, 약 1  $\mu$ M 내지 약 2.5  $\mu$ M, 약 2.5  $\mu$ M 내지 약 5  $\mu$ M, 약 5  $\mu$ M 내지 약 10  $\mu$ M, 약 10  $\mu$ M 내지 약 100  $\mu$ M, 약 100  $\mu$ M 내지 약 500  $\mu$ M, 약 500  $\mu$ M 내지 약 1000  $\mu$ M, 약 1 mM 내지 약 1.25 mM, 약 1.25 mM 내지 약 2.5 mM, 약 2.5 mM 내지 약 5 mM, 약 5 mM 내지 약 10 mM를 포함한다. 유효한 것으로 알려지거나 예상되는 추가적인 양은 1-2.5  $\mu$ M, 약 2.6  $\mu$ M 내지 약 10  $\mu$ M, 약 11  $\mu$ M 내지 약 100  $\mu$ M; 약 101  $\mu$ M 내지 약 1000  $\mu$ M; 약 1.25 mM 내지 약 10 mM를 포함한다.
- [0092] 일 구현예에서, GLP-1, PYY, CCK 또는 다른 대사성 호르몬의 방출 또는 상기 방출의 조절을 통해 치료되거나 예방될 수 있는 질병 및 상태는 비만; 당뇨병; 다른 대사성 상태 및 질병; 간 질환 및 심혈관계 질환을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 비만과 당뇨병은 여러 암의 증가된 위험이 관련되기 때문에, 비만과 당뇨병의 치료는 상기 암들에 유리하게 영향을 미치는 것으로 예상된다.
- [0093] 몇몇 구현예에서, 본 명세서에서 사용되는 쓴맛 수용체 리간드, 특히 쓴맛 자극제 및/또는 작용제는 적합한 운

반체와 함께 조성물 내에 포함될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 "운반체"는 활성 성분으로서 조성물 내에 포함되는 쓴맛 수용체 리간드에 대한 용매, 담체, 결합제 또는 희석제로 일반적으로 작용하는 다양한 매질을 나타낸다. 예시적인 조성물은 PTU, PTC, 데나토늄 벤조에이트, 글리시리진산 암모늄 염, 에피갈로카테킨 갈레이트, 하이퍼포린, 베르베린 클로라이드, 콤텐신 클로라이드 알릴 메틸 설퍼드, 로트레린, 쿠르쿠민, 엘라그산, 엠벨린, 이들의 유도체 및 이들의 조합물을 포함한다. 몇몇 구현예에서, 상기 조성물은 전신 방출을 위해 제형화된다.

[0094] 몇몇 구현예에서, 상기 리간드 또는 관련 작용제, 조합물 또는 조성물은 장투여에 의해 투여된다. 장 투여는 성분이 소화관을 통해 제공되는 경우 투여의 전신 경로로서, 구강 투여, 위 식이 튜브에 의한 투여, 십이지장 식이 튜브에 의한 투여, 위루술, 장 영양보충, 및 직장 투여를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 특히, 몇몇 구현예에서, 상기 화합물에 적합한 투여는 고체 또는 액체 제형 형태인 구강 투여이다.

[0095] 몇몇 구현예에서, 상기 조성물이 개체에 투여되기 위한 것인 경우, 상기 조성물은 약제학적 조성물일 수 있고, 쓴맛 수용체 리간드 및 약제학적으로 허용가능한 운반체를 포함한다.

[0096] 몇몇 구현예에서, 리간드는 부형제 또는 희석제와 함께 약제학적 조성물 내에 포함될 수 있다. 특히, 몇몇 구현예에서, 약제학적 조성물은 일 또는 그 이상의 양립가능하고 약제학적으로 허용가능한 운반체, 특히 약제학적으로 허용가능한 희석제 또는 부형제와 조합된, 리간드를 함유하는 것이 개시된다.

[0097] 본 명세서에서 사용된 용어 "부형제"는 약물의 활성 성분을 위한 담체로 사용되는 비활성 물질을 나타낸다. 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물에 적합한 부형제는 리간드에 대한 개체의 몸 흡수력을 증가시키는 임의의 물질을 포함한다. 적합한 부형제는 또한 편리하고 정확한 투여를 가능하게 하는 리간드로 제형을 최대 사용될 수 있는 임의의 물질을 포함한다. 단일-투여 용량에서의 사용 외에도, 부형제는 리간드의 취급시 도움을 주기 위한 제조 과정에서 사용될 수 있다. 투여 경로 및 약물 형태에 따라, 다른 부형제가 사용될 수도 있다. 예시적인 부형제는 항부착제, 바인더, 코팅분해제, 필러, 풍미제 (예를 들면, 감미료) 및 착색제, 유동화제, 윤활제, 보존제, 흡수제를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0098] 본 명세서에서 사용된 용어 "희석제"는 조성물의 활성 성분을 희석시키거나 나르기 위해 나오는 희석 작용제를 나타낸다. 적합한 희석제는 의료 제제의 점도를 감소시킬 수 있는 임의의 물질을 포함한다.

[0099] 장 투여를 위한 예시적인 조성물은 정제, 캡슐, 점적약, 및 좌약을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0100] 몇몇 구현예에서, 리간드는 일 또는 그 이상의 호르몬을 조절하기 위하여, 다른것과 및/또는 다른 분자와 조합하여 투여될 수 있다. 유효한 것으로 예상되는 다수의 조합 형태가 존재한다. 예를 들면, TAS2R38 및 TAS2R47 모두를 조절하는 조합은 본 개시내용의 검토시 숙련자에 의해 이해되는, CCK 및 PPY/GLP-1의 방출시 생성되는 것으로 예상된다. 몇몇 구현예에서, 조합은 단일 세포로의 투여 보다는 더 큰 효과를 가지는 것으로 예상된다. 특히, 다수의 리간드, 특히 쓴맛 자극제의 조합은 호르몬, 특히 대사성 호르몬과 관련된 몇몇 상태를 해결하기 위하여 사용될 수 있을 것으로 예상된다. 예를 들면, DB 및 PTU+PEG는 투여시 CCK 및 PPY를 방출함으로써 포만감을 해결하는 것으로 예상되기 때문에, 비만을 치료하기에 적합한 것으로 예상된다. 이는 TAS2R-포함 호르몬-방출 세포 상의 TAS2R 수용체를 활성화시키는 T2R 리간드에 의한 활성화 반응시 다른 GT 점막 세포로부터 분비되는 다른 호르몬을 발생시킬 것으로 예상된다.

[0101] 일 구현예에서, 리간드의 조합은 각각의 내분비선 세포 유형에서 유익한 부가 효과를 제공할 것으로 예상된다. 예를 들면, 상기 세포 유형은 L 세포에 대한 TAS2R38 또는 I 세포에 대한 TAS2R47 외에도 다른 유형의 쓴맛 GPCR를 포함할 수 있다. 다른 유형의 맛 수용체의 예로는 베르베린 클로라이드, 시아니딘 클로라이드, 콤텐신 클로라이드에 반응하는 수용체를 포함하는 것으로 예상된다.

[0102] 상기에서 본 방법에 유효한 것으로 알려지거나 예상되는 적합한 투여 스케줄은 본 개시내용의 검토시 숙련자에 의해 이해되는, 식사 전 및 식사 동안 작용제의 전달을 포함한다.

[0103] 본 개시내용의 실시예 부분은 본 명세서에 기술된 조성물 및 방법의 예시 뿐만 아니라 리간드/작용제의 기능적 및 물리적 상호작용, 이들의 조합 및 쓴맛 수용체를 조사하기 위한 적용자에 의해 수행되는 연구도 예시한다.

[0104] 본 개시내용의 추가 이점 및 특징은 실험 부분만을 참고하여 예시로서만 제공되는 실시예의 하기 상세한 개시내용으로부터 이하에서 더욱 자명해질 것이다.

[0105] **실시예**

- [0106] 본 명세서에 개시된 활성 작용제, 방법, 시스템 및 조성물은 하기의 실시예에서 더욱 예시되고, 상기는 예시하기 위한 방법으로 제공되는 것일 뿐 본 발명을 제한하려고 의도된 것은 아니다.
- [0107] **실시예 1: BTR의 3D 구조를 예측하기 위한 방법 및 시스템**
- [0108] GEnSeMBLE 및 GenDock 방법 및 시스템을 사용하여 쓴맛 자극제 수용체의 3D 구조를 예측하였다.
- [0109] 정렬(Alignment) 및 상동성(Homologize). TAS2R38 수용체의 서열을 **도 1**에 나타난 바와 같이 칠면조  $\beta 1$  아드레날린 수용체 (th $\beta$  1AR)로 정렬하였다. 그 다음, h $\beta$  1AR의 잔기들을 정렬된 TAS2R38 수용체의 염기서열로 돌연변이화하여 TAS2R38 수용체의 초기 3D 구조를 생성하였다.
- [0110] 헬릭스의 최적화. 예측된 단백질의 TM 도메인을 추출하여 7개의 단일 헬릭스를 생성하고, 드라이딩 힘장(dreiding force field)을 사용하여 최소화시키고 [Mayo 1990], 통합함으로써 템플레이트에 대응하는 7개의 헬릭스 번들을 형성하였다.
- [0111] 템플레이트 구조의 건설. 7개의 TM 도메인 각각을 기술하기에 최적의 헬릭스들이 주어지면, 그들을 x-ray 템플레이트를 사용하여 7-헬릭스 번들로 위치시켰다. 각각의 실험 템플레이트들은 42개의 자유도: 7개의 TM 헬릭스 각각에 대한 x, y, z,  $\theta$ ,  $\phi$  및  $n$  값 ( $6 \times 7 = 42$  전체)을 가졌다. 소수성 중심에는 지질 이중층의 중심을 통과하는 평면으로 정의되는,  $z = 0$ 을 교차하는 잔기가 존재한다. 이는 단백질의 소수성 프로파일이나 상동성에 의해 계산된다. 최적화된 자유도는 헬릭스  $\theta$ 의 경사각, 헬릭스  $\phi$ 의 스위프각(sweep angle), 및 헬릭스 축 주위의 헬릭스  $n$ 의 회전을 나타낸다.
- [0112] 바이헬릭스(BiHelix). 헬릭스를 최소화한 이후에, 건설된 모든 가능한 7-헬릭스 번들에 대하여 7개의 헬릭스 각각이 GPCR의 7개의 헬릭스에 대한  $12^7 = 35,000,000$  패킹을 이루게하는, 그들의 축들에 대한 12개의 방위 ( $30^\circ$  증분)를 나타낼 수 있는 것으로 간주하였다. BiHelix 절차 [Goddard 2010]를 가장 근접한 이웃의 바이-헬릭스 상호작용을 갖는 12개의 세트, TM1-TM2, TM1-TM7, TM2-TM3, TM2-TM4, TM2-7, TM3-TM4, TM3-TM5, TM3-TM6, TM3-TM7, TM4-TM5, TM5-TM6 및 TM6-TM7를 고려하여 건설된 평균 필드를 사용하여 상기 35 백만의 패킹의 에너지를 추정하였다. 이때 SCREAM를 사용함으로써 각각의 경우에 대한 측세를 최적화하였다 [Kam 2008].
- [0113] 콤비헬릭스(CombiHelix). 그 다음, 7-헬릭스 번들을 BiHelix로부터의 최상의 1000개의 결과로 건설하고 SCREAM을 사용하여 측세를 다시-최적화하였다. 각각의 번들을 또한 내제적 막에 함침함으로써, 대전된 잔기를 액체에 노출시키는 헬릭스 회전을 불리하게 할 수 있는 막 용매화 효과를 컴퓨터로 산정하였다. 상기 막 용매화는 문헌 [Goddard 2010]에 기술되어 있다.
- [0114] 수퍼헬릭스(SuperBiHelix). 단계 E로부터의 회전 각 ( $n$ )의 최적화 설정을 위하여, 기울기 ( $\theta$ ,  $\phi$ )의 범위를  $n$ 으로 동시에 샘플링함으로써 최적의 7-헬릭스 번들을 얻었다. 다시, 강하게 상호작용하는 헬릭스 12쌍 고려하였으나 기울기의 효과를 설명하기 위한 것이다. 상기 7개의-헬릭스 번들을 **도 1**에 나타난 바와 같이, 3 쿼드헬릭스(quadhelix) 번들로 분할하였다. 각각의 쿼드헬릭스에 대해 가장 낮은 에너지를 갖는 2000개의 구조를 에너지를 증가시킴에 따라 선택하였다. 최종적으로, 각각의 헬릭스 구조 리스트로부터, 각각의 헬릭스에 대한 최상의 36 구조를 사용하여  $36^7 \approx 8 \times 10^{10}$  전체 번들의 에너지를 계산하고, 가장 낮은 에너지를 갖는 상기 과정으로부터 측정된 1000개의 조합을 출력하였다.
- [0115] 수퍼콤비헬릭스(SuperComBiHelix). 상기 SuperBiHelix로부터의 상위 1000 헬릭스 번들을 7-헬릭스 번들로 건설하고 측세를 다시 최적화하였다. 그 다음, 상기 구조를 10 단계에 대하여 최소화하였다. 이와 같은 과정은 낮게-위치된 번들의 앙상블을 야기한다. 낮게-위치된 구조에 대한 조사는 어느 헬릭스가 유연한(flexible) 것인지를 보여주며, 활성화에 대한 통찰력을 제공할 수 있다.
- [0116] 세포외 (EC) 및 세포내 (IC) 루프 구조의 예측. 상기 쓴맛 수용체의 MD 연구에서 사용하기 위한 3개의 EC 및 IC 루프에 대한 초기 구조를 제공하기 위하여, 쓴맛 수용체와 t $\beta$  1AR의 정렬을 결정 구조에 대한 상기 루프를 스레드(threaded)하는 상동성에 대해 사용하였다. 그 다음, 고정된 헬릭스 번들 원자를 갖는 상기 루프에 최소화 및 동역학을 수행하였다. 상기 루프들은 꽤 유연하고 용매에 의해 강하게 영향을 받을 것으로 예상되었는데, 이는 이전 단계에서는 단지 암시적으로 취급되었다.
- [0117] **실시예 2: BTR 리간드 결합 부위를 확인하기 위한 방법 및 시스템**
- [0118] 하기의 방법 및 시스템을 사용하여 도킹 리간드 및 예상 단백질 구조를 확인하였다.

- [0119] 사용하여 확인된 상위 10개의 전체 에너지를 갖는 BTR의 구조를 작용제 PTC 및 PTU를 도킹하기 위한 SuperBiHelix 단계로부터 선택하였다.
- [0120] PTC 및 PTU의 구조 및 전하를 쿼텟 기구 (6-311G\*\* 기초 세트가 구비된 B3LYP)를 사용하여 계산하였다. 2개의 PTC 형태이성질체(conformer) 및 4개의 PTU 형태이성질체를 사용하여 도킹하였다. 도킹을 위한 GemDock 일반 과정을 사용하였다.
- [0121] 상기 GenDock 방법을 사용하여 리간드-결합 형태를 선택하고 그들의 결합 에너지를 계산하였다. 전체 단백질을 32 영역 (각각은 10 Å의 측면을 가짐)으로 분할하고 스캐닝하여 추정적 결합 영역을 확인하였다 (6개의 소수성 잔기, I, L, V, F, Y, 및 W가 알라닌화됨). 상기 ScanBindSite 과정은 매장 점수 및 결합 에너지의 조합을 기초로 최적의 영역을 선택하는, 상기 추정적 영역의 각각에 1000의 형태를 발생시키기 위하여 DOCK4.0 [Kuntz 1982]를 사용하였다. 이러한 최적의 영역은 조합된 것이고 10,000개의 포즈들이 DREIDING 2 FF [Mayo 1990]를 사용하여 점수화된, DOCK4.0를 사용하여 발생하였다. 상위 1000개를 (에너지에 의함) 탈-알라닌화하고, SCREAM한 후, DREIDING 3 FF를 사용하여 최소화하였다. 그 다음, 상위 1% (10개)를 선택하여 결합 부위 복합체를 (10개의 결합 포즈 중 어느 하나를 갖는 4 Å 내부의 모든 잔기들을 포함하는 단일화된 결합 부위를 사용하여) 더욱 최소화하였다. 그 다음, 상기 단백질 및 리간드를 염 브리지 내의 양성자를 적절하게 전달하고 양성자를 보태거나 측쇄에 노출된 양성자를 떼어냄으로써 중성화시켰다 (이는 더 신뢰가능한 에너지 비교를 제공함) [Bray 2008]. 그 다음, 최상의 결합 에너지를 갖는 최종 덕킹된 구조를 선택하였다.
- [0122] 분자 동역학 시뮬레이션(Molecular Dynamics Simulation). BiHelix 내의 지질과 물에 대한 설명이 지질 이중층의 불충분한 층을 갖는 것으로 내재 되고, 쓴맛 수용체의 예측된 구조에 대한 분자 동역학 (MD) 시뮬레이션을 내재된 지질 이중층 및 물 내에서 10 ns 동안 리간드의 존재 또는 부존재 하에 수행하였다. 내재적 물 및 주기적으로 무한한 지질을 포함하는 NAMD [Phillips 2005]를 사용하는 MD 시뮬레이션을 수행하여 단백질과 지질 및 물의 상호작용을 측정하였다. 상기 예측된 단백질 구조에서 지질 분자를 없애고 1-palmytoil-2-oleoylsn-glycero-3-phosphatidylcholine (POPC)의 주기적 구조 내에 삽입하였다. 이 과정에서, 지질 분자를 단백질의 5 Å 내에서 제거하였다. 그 다음, 상기를 물 분자의 박스 내로 삽입하고 지질 및 단백질의 5 Å 내에서 물을 제거하였다. 클로라이드 이온을 첨가하여 상기 시스템의 전하를 중성으로 하였다. 막 및 물 분자를 고정된 단백질을 사용하여 최소화한 후 NPT 시뮬레이션 내에서 500 ps 동안 평형시켰다. 최종적으로, 전체 시스템을 최소화한 후, NPT 시뮬레이션 내에서 10 ns 동안 가동시켰다. 모든 NPT 시뮬레이션을 감쇄 계수 (damping coefficient)  $1\text{PS}^{-1}$  및 수조 온도 310 K에서 Langevin 역동학을 사용하여 가동시켰다. 상기 압력은 표적 압력 1 atm 및 바로 스텝 오실레이션 및 댐핑 시간 200 fs 에서 Nose-Hoover Langevin 피스톤 압력 조절에 의해 일정하게 유지시켰다. 스텝 사이즈는 적용된 주기적 경계 조건 하에, 1 fs이었다. 전체 시스템 (도 3)은 주기적 세포 마다 41570 원자 전체에 대해 예측된 단백질, 101 지질 분자, 7528 물 분자, 및 19 염소 이온을 함유한다. 박스 크기는 75 Å, 75 Å 85 Å 까지 이었다. NAMD 프로그램을 그 다음 사용하여 수조 온도 310 K 하에 NPT MD를 10 ns 동안 수행하였다.
- [0123] **실시예 3: 인간 내의 hTAS2R38 쓴맛 수용체의 구조 예측**
- [0124] 본 출원인은 인간 PAV 및 AVI TAS2R38 수용체의 구조 예측을 수행하였다. 도 21은 인간 및 래트 내의 상기 수용체에 대한 막횡단 (TM) 영역의 예측된 결과를 나타낸다. 본 출원인은 상기 TM 영역을 사용하여 최적화된 헬릭스를 생성하였다 (TM 5, 6, 및 7은 그들의 프롤린 근처의 벤드를 나타낸다).
- [0125] PAV 및 AVI 인간 T2R38 단백질의 구조를 예측함에 있어서, 본 출원인은 AVI의 TM7이 PAV의 것에 대해 30도 회전함으로써, 더 벌크한(bulkier) 잔기, I,가 단백질의 외부를 향하여 더 배향됨을 발견하였다. 모든 다른 TM은 동일한 회전을 나타내었다. 상기 PAV 단백질은 4개의 상호헬릭스 수소 결합에 의해 안정화되었다:
- [0126] a. TM2의 H68을 갖는 TM1의 T32 (2.01 Ang.); TM3의 Q104를 갖는 TM2의 Q77 (1.85 Ang.);
- [0127] b. TM3의 W108을 갖는 TM2의 Q77 (2.01 Ang.); TM4의 H126을 갖는 TM3의 R138 (1.64 Ang.).
- [0128] 상기 AVI 단백질은 2개의 상호헬릭스 수소 결합에 의해 안정화되었다:
- [0129] a. TM3의 Q104를 갖는 TM2의 Q77 (1.86 Ang.); TM3의 W108을 갖는 TM2의 Q77 (2.02 Ang.)
- [0130] PAV 및 AVI에 대한 PTC의 예비적인 도킹 시뮬레이션의 결과는 ~1.6 kcal/mol 까지의 PAV에 더 강하게 결합하는 PTC이었다. PTC는 PAV의 TM1 내에서 E25와 결합하는 1.84 Ang 수소 결합을 형성하였으나, AVI에서는 아니었다.

[0131] **실시예 4: 3D 구조 TAS2R38 쓴맛 수용체 모델링 및 TAS2R38 쓴맛 수용체의** 다양한 다형성에 대한 3D 구조의 비교

[0132] 본 출원인은 상동체 방법을 기초로 템플레이트로서 터키  $\beta$ 1 아드레날린 수용체 ( $t\beta$ 1AR)를 사용하여 TAS2R38 쓴맛 수용체 (4개의 단상형 hTAS2R38<sub>PAV</sub>, hTAS2R38<sub>AVI</sub>, hTAS2R38<sub>AAI</sub> 및 hTAS2R38<sub>PVV</sub>)의 구조 모델을 건설하였다.

[0133] 본 출원인은  $t\beta$ 1AR TM을 단축시키거나 연장시킴으로써 상동체 기술을 사용하여 얻어진 TM 예측물을 적절하게 하였다. 최소화 이후에,  $t\beta$ 1AR로부터의 7개의 TM 분절을 조합한 (루프 및 8개의 헬릭스는 없음) 초기 구조를 건설하였다. 다른 헬릭스 회전각  $\eta$ , 기울기각  $\theta$  및 스위치각  $\phi$ 을 갖는 수천개의 앙상블을 문헌 [Goddard 2010]에 기술되어 있는 BiHelix 및 SuperBiHelix 기술을 기초로 발생시켰다.

[0134] **도 1**은 상동체 모델링에 의한 3D 구조를 건설하는데 사용된 hTAS2R38<sub>PAV</sub>, hTAS2R38<sub>AVI</sub>, hTAS2R38<sub>AAI</sub> 및 hTAS2R38<sub>PVV</sub> 사이의 막횡단 (TM) 서열 정렬을 나타낸다. **표 1**에 나타난 바와 같이, BiHelix 결과는 4개의 변이체의 헬릭스가 헬릭스 6을 제외하고는 동일한 회전각을 가짐을 제시한다.

[0135] **표 1**  $\beta$ 1 아드레날린 수용체 템플레이트 내의 쓴맛 수용체에 대한 ComBiHelix 결과.

| 수용체<br>변이체              | 회전각 |     |    |    |            |     |    | 전체 에너지 (Kcal/mol) |
|-------------------------|-----|-----|----|----|------------|-----|----|-------------------|
|                         | H1  | H2  | H3 | H4 | H5         | H6  | H7 |                   |
| hTAS2R38 <sub>PAV</sub> | 30  | 330 | 60 | 90 | <b>180</b> | 270 | 30 | 598.1             |
| hTAS2R38 <sub>AVI</sub> | 30  | 330 | 60 | 90 | <b>330</b> | 270 | 30 | 668.9             |
| hTAS2R38 <sub>AAI</sub> | 30  | 330 | 60 | 90 | <b>240</b> | 270 | 30 | 584.1             |
| hTAS2R38 <sub>PVV</sub> | 30  | 330 | 60 | 90 | <b>240</b> | 270 | 30 | 597.4             |

[0136]

[0137] 상기 TAS2R38 쓴맛 수용체, 클래스 C GPCR은 클래스 A GPCR 내에 존재하는 잘-보존된 모티프의 일부가 결실된 것이다. 따라서, TAS2R38 쓴맛 수용체는  $h\beta$ 1AR로부터의 헬릭스간 수소 결합을 안정하게 하는 다른 세트를 가질 수도 있을 것이 예상될 수 있다. TAS2R38 쓴맛 수용체의 4개의 변이체에 대한 예측된 3D 구조를 **도 4**에 나타내었고, 헬릭스간 H-결합을 형성하는 잔기들을 강조하였다.

[0138] 본 출원인들은 hTAS2R38<sub>PAV</sub> 단백질 내의 Y199 (5)와 W108 (3) 사이, 및 Y199 (5)와 A262 (6) 사이에 내부 헬릭스 수소 결합을 발견하였다. W108 (3) 및 A(V)262 (6) 사이에 결합된 내부 헬릭스는 hTAS2R38<sub>AAI</sub> 및 hTAS2R38<sub>PVV</sub> 단백질 모두에 존재하였다. 상기 내부 헬릭스 결합은 hTAS2R38<sub>AVI</sub> 단백질에서는 존재하지 않았다.

[0139] 상기 4개 변이체의 3D 구조를 해결하기 위하여, 본 출원인들은 hTAS2R38<sub>PAV</sub> 및 hTAS2R38<sub>AVI</sub> 단백질 구조에 대한 분자 역동학 시뮬레이션을 10 ns 수행하였다.

[0140] **도 5**는 지질과 물로 10 ns MD 이후의 hTAS2R38<sub>PAV</sub> 및 hTAS2R38<sub>AVI</sub> 단백질의 3D 구조를 나타낸다. hTAS2R38<sub>PAV</sub> 단백질 사이의 수소 결합은 깨졌고, hTAS2R38<sub>AAI</sub> 및 hTAS2R38<sub>PVV</sub> 단백질 내에서도 동일한 Y199 (5)와 W108 (3) 사이, 및 W108 (3)와 A262 (6) 사이에 2개의 새로운 수소 결합이 발생하였다. 본 출원인들은 또한 hTAS2R38<sub>AVI</sub> 단백질에서 W108 (3)와 A261 (6) 사이, 및 Y199 (5)와 A266 (6) 사이에서 2개의 새로운 헬릭스간 수소 결합을 발견하였다. **도 6**은 상기 새로운 H-결합들이 10 ns MD 동안 모두 유지됨을 나타낸다.

[0141] **도 7**은 10 ns MD 동안 헬릭스 단편들의 제공된 평균 제공 편차 (root mean square deviation, rmsd) 시간 변화를 나타낸다. 여기서, rmsd는 10 ns 궤적에 대한 마지막 프레임에 관한 것이다. 궤적 내의 마지막 것에 대한 초기의 예측된 구조로부터의 전체 rmsd의 범위는 hTAS2R38<sub>PAV</sub> 내에서 0.5-2.5 Å이고 hTAS2R38<sub>AVI</sub> 내에서 1.0-7.0 Å이었다. 마지막 2 ns에서의 포커싱하면, 상기 변동은 2.0 Å에 도달하는 hTAS2R38<sub>PAV</sub> 내의 TM2를 제외하고는, 0.5 내지 1.5 Å이었다.

[0142] **실시예 5: 작용제 PTC 및 PTU에 대한 TAS2R38 쓴맛 수용체의 결합 부위 모델링**

[0143] 본 출원인은 GenDOCK 기술을 사용하여 TAS2R38 쓴맛 수용체의 4개의 예측된 (최하의 에너지) 구조에 대한 작용제의 결합 부위를 예측하였다. hTAS2R38<sub>PAV</sub> 및 hTAS2R38<sub>AVI</sub> 단백질 내의 작용제 PTC 및 PTU의 예측된 결합 부위를 **도 8**에 나타내었다. PTC 및 PTU는 TM 3, 5 및 6 헬릭스 사이에 위치하였다. 가장 중요한 잔기들 (공동 분석)을 (괄호 내에는 리간드와의 상호작용 에너지를 포함한다) 하기에 나타내었다:

[0144] a. PTC와 Xx hTAS2R38<sub>PAV</sub>: ALA262 (-5.336), TYR199 (-5.209), CYS 112 (-2.68), TRP108 (-2.579), LEU 109(-2.564), ILE 265(-1.235), PRO 204(-1.106), SER 266(-0.976).

[0145] b. PTU와 hTAS2R38<sub>PAV</sub>: ALA262 (-4.085), TYR199 (-2.975), TRP108 (-2.127), CYS 112 (-1.746), VAL203 (-1.699), LEU109 (-1.655), ALA263 (-1.155), PRO204 (-1.056).

[0146] c. PTC 와 - hTAS2R38<sub>AVI</sub>: ALA105 (-4.637), TRP108 (-3.035), CYS 198 (-2.410), ILE265 (-1.982), LEU109 (-1.937), VAL262 (-1.525), SER202 (-1.289), SER266 (-0.999).

[0147] d. PTU와 hTAS2R38<sub>AVI</sub>: SER266 (-4.047), GLN104 (-3.994), CYS 198 (-3.075), TRP108 (-3.072), ILE265 (-2.243), VAL262 (-2.032), LEU109 (-1.965), ALA 105 (-1.149).

[0148] **도 9**에 나타낸 바와 같이, hTAS2R38<sub>PAV</sub>에 있는 PTC와 ALA262 사이의 2개의 강한 수소 결합, 및 hTAS2R38<sub>PAV</sub>에 있는 PTC와 TYR199 사이에  $\pi-\pi$  상호작용이 존재하였다. hTAS2R38<sub>PAV</sub>에 있는 PTU와 ALA262 사이에 수소 결합이 존재하였다. hTAS2R38<sub>AVI</sub>에서, PTC는 H-결합에 의해 ALA 105와 상호 작용한 반면, PTU는 H-결합에 의해 SER266 및 GLN104와 상호작용하였다. 또한, PTC 및 PTU가 다른 자극제 hTAS2R38<sub>AAI</sub> 및 hTAS2R38<sub>PVV</sub>에 도킹하였다. 이러한 결과는 잔기 262가 문헌 [Bufer 2005]에 의해 보고된 바와 같이 실험 데이터와 일치하는 쓴맛을 내는데 매우 중요함을 제시한다.

[0149] 예측된 hTAS2R38<sub>PAV</sub>/PTC 및 hTAS2R38<sub>AVI</sub>/PTC 복합체를 무한의 지질 막으로 삽입하고 물로 완전히 (2.3절에 기술한 과정을 사용하여) 용매화시킨 이후에, 본 출원인들은 MD의 10 ns를 수행하였다. **도 9a**는 초기 예측된 구조와 10 ns 분자 동역학 이후의 hTAS2R38<sub>PAV</sub>/PTC 복합체의 구조를 비교하였다. 원래의 예측된 구조에서의 수소 결합은 10 ns 동역학 동안 안정한 상태로 존재하고 있음이 관찰되었다. 그러나, 하나의 추가적인 수소 결합이 hTAS2R38<sub>PAV</sub> 내의 PTC의 -NH<sub>2</sub>기와 Y199 (5)사이에서 형성되었다. 도 10은 hTAS2R38<sub>PAV</sub> 내의 PTC 사이의 수소 결합 거리에 대한 시간이 변화함에 따라 나타내었다.

[0150] i. -NH - A262 (6): 상기 수소 결합 거리는 초기 10 ps 동안 4.9 Å까지의 우발적인 연장을 제외하고는, 거의 1.7과 3.0 Å 사이에서 존재하였다.

[0151] ii. -NH<sub>2</sub> - Y199 (5): 초기 거리는 6.6 Å이었으나, 3.0 Å으로 빨리 수축된 후 2.0 Å과 4.0 Å 사이에서 주로 변동을 거듭하고, 최종적으로 ~2.5Å로 돌아왔다.

[0152] 따라서, 본 출원인들은 PTC가 hTAS2R38<sub>PAV</sub> 구조 내의 TM5 및 TM6와의 강한 상호작용을 형성한다는 결론을 내렸다. TM5 및 TM6 사이의 리간드 결합은 TM3와 TM6 및 TM3와 TM5 사이의 강한 결합을 깨트렸다.

[0153] **도 9b**에 나타낸 바와 같이, 10 ns 분자 동역학 이후에 hTAS2R38<sub>AVI</sub>/PTC 복합체의 구조 내의 리간드가 초기에 예측된 구조에 비해, 위로 움직였다. 리간드와 A 105 사이의 초기 H-결합이 깨졌기 때문에, 물 분자가 상기 결합 부위로 움직이고 리간드와 H-결합을 형성하였다. hTAS2R38<sub>AVI</sub> 단백질 내의 리간드의 삽입은 W108 (3) 및 A261 (6) 사이의 내부 헬릭스 수소 결합을 깨트리는 반면, Y199 (5) 및 A261 (6) 사이는 그렇지 않았다.

[0154] **실시예 6: TAS2R38 쓴맛 수용체의 활성화**

[0155] 단백질 구조 예측 및 MD 시뮬레이션 결과는 W108 (3) 및 A(또는 V)262 (6) 사이의 H-결합이 실험체 hTAS2R38<sub>PAV</sub>, hTAS2R38<sub>AAI</sub> 및 hTAS2R38<sub>PVV</sub>를 안정화시키는 것으로 예상되고, W108 (3) 및 A261 (6) 사이의 H-결합이 비-실험체 hTAS2R38<sub>AVI</sub>를 안정화시킬을 나타낸다. 본 출원인은 또한 PTC 및 PTU가 수소 결합에 의해 실험체 (hTAS2R38<sub>PAV</sub>, hTAS2R38<sub>AAI</sub> 및 hTAS2R38<sub>PVV</sub>) 내의 A(또는 V)와 상호작용하는 반면 비-실험체 (hTAS2R38<sub>AVI</sub>)와 리간드 사이에는 어

떠한 H0결합도 존재하지 않음을 발견하였다. 본 출원인은 작용제-결합 실험체와 작용제-결합 비-실험체 사이의 차이를 설명하고자 한다. 상기 주된 차이는 쓴맛 수용체 내의 위치 262와 관련된다. 상기 잔기 262는 TM3-TM6 상호작용 뿐만 아니라 수용체에 대한 작용제의 결합에도 관여한다.

[0156] 활성화 동안 로돕신 상의 형광 실험은 TM3-TM6 상호작용이 GPCR 활성화에 관여함을 나타내었다 [Farrens 1996]. 돌연변이 실험은 위치 262가 TAS2R38 쓴맛 수용체에서 쓴맛을 나타내는데 중요한 것임을 나타내었다 [Bufe 2005]. 따라서, 상기 결과들은 실험체 내의 W108 (3) 및 A(또는 V)262 (6)사이 및 작용제와 A(또는 V)262(6) 사이의 H-결합이 GPCR 활성화 및 쓴맛에 매우 중요한 역할을 함을 나타내는데, 이는 실험 데이터와 일치하였다 [Bufe 2005].

[0157] 게다가, 표 1에 나타난 바와 같이, A262V 및 V296I의 돌연변이는 hTAS2R38<sub>AVI</sub> 내의 TM5의 큰 회전 각을 초래하고 Y199를 TM6에 더 가깝게 만듦으로써 Y199 및 A266 사이의 수소 결합의 형성이 V262를 제외하고, W108 및 A261사이의 H-결합을 형성하게 야기할 수 있도록 하였다. 비록 A262V의 돌연변이가 hTAS2R38<sub>PVV</sub> 내에서 존재하였지만, TM5의 더 작은 회전각이 TM5-TM6 수소 결합 상호작용의 형성을 야기할 수 없었다. 따라서, 상기 TM3 및 TM6 사이의 수소 결합 상호작용은 수용체를 활성화시키기 위하여 시그널을 세포내로 전달할 수도 있다.

[0158] 중요하게, PTC 및 PTU는 모두 실험체 (hTAS2R38<sub>PAV</sub>, hTAS2R38<sub>AAI</sub> 및 hTAS2R38<sub>PVV</sub>)의 잔기 262와는 H-결합을 가졌으나, 비실험체 (hTAS2R38<sub>AVI</sub>)와는 그렇지 않았다. MD 시뮬레이션 결과는 PTC가 hTAS2R38<sub>PAV</sub> 구조의 TM6 내의 TM5 및 A262 내의 Y199와 안정한 H-결합을 형성하는 반면, hTAS2R38<sub>AVI</sub> 내의 PTC는 V262로부터 떨어지려는 경향이 있음을 나타낸다. PTC와 쓴맛 구조 사이의 상호작용에 관여하는, 잔기 262는 쓴맛 화합물을 맞나게 하는데 매우 중요한 것으로, 이는 문헌과도 일치한다 [Bufe 2005].

[0159] TAS2R38 G-단백질 결합된 수용체 (GPCR)의 4개의 단상형의 3D 구조를 예측함으로써 쓴맛 수용체를 이해하였다. 본 출원인들은 hTAS2R38<sub>PAV</sub> (실험체) 내의 W108 (3) 및 A262 (6) 사이 및 hTAS2R38<sub>AVI</sub> (비-실험체) 내의 W108 (3) 및 A261 (6) 사이의 H-결합 형성이 단백질 구조를 안정화시킬 수 있음을 발견하였다. 이러한 구조를 더욱 입증하기 위하여, 본 출원인들은 GenDock 방법을 사용하여 hTAS2R38<sub>PAV</sub>, hTAS2R38<sub>AVI</sub>, hTAS2R38<sub>AAI</sub> 및 hTAS2R38<sub>PVV</sub> 각각에 결합된 PTC와 PTU의 결합 부위 및 3D 구조를 예측하였다. 예측된 결합 부위들은 TM3, TM5 및 TM6 사이의 영역에서 PTC 및 PTU에 있었다. 상기 PTC 및 PTU는 실험체 (hTAS2R38<sub>PAV</sub>, hTAS2R38<sub>AAI</sub> 및 hTAS2R38<sub>PVV</sub>) 내의 잔기 262와 H-결합을 형성할 수 있었으나, 비-실험체 (hTAS2R38<sub>AVI</sub>)와는 그렇지 않았다. hTAS2R38<sub>PAV</sub> 내의 PTC와 A262 (6) 및 PTC와 Y199 사이의 H-결합은 안정하였다. 그러나, hTAS2R38<sub>AVI</sub> 내의 PTC는 10 ns MD 동안 V262 (6)와 떨어져 위로 이동하였다. 결론적으로, 상기 결과들은 TM3 및 TM6 사이의 수소 결합 상호작용이 세포내로 신호를 전달함으로써 수용체를 활성화시킬 수 있으며, 실험체 내의 작용제와 잔기 262 사이의 H-결합이 쓴맛에 관여함을 나타내었는데, 이는 실험 결과와도 일치하는 것이다 (Bufe, et al., 2005).

#### [0160] 실시예 7: 인간 TAS2R47 (hTAS2R47) 쓴맛 수용체의 모델링

[0161] 본 출원인들은 문헌 [Pronin 2004]에 의한 연구에서 실험된 리간드 패밀리와 복합된 hTAS2R47의 예비의 3-D 구조를 얻었다. 상기 결과를 상기 방법의 유효성을 제공하는 다른 GPCR (인간 프로스타글란딘 DP)에 대한 구조 예측 결과와 함께, 하기에 나타내었다.

[0162] 본 출원인들은 MembStruk를 사용하여 hTAS2R47에 대한 3-D 구조를 얻었고, MSCDock를 사용하여 hTAS2R47에 대한 4개의 리간드: 테나토늄 (DD), DD2 (테나토늄 유도체), 4-니트로 사카린 (4NS), 및 6-니트로 사카린 (6NS)을 위한 결합 부위를 예측하였다. 이러한 리간드들은 hTAS2R47, 43 및 44의 활성화를 연구하기 위하여, 문헌 [Proline 2004]에 의해 사용되어 왔다.

[0163] 도 19에 4개의 리간드를 도킹하기 위해 사용된 예측된 결합 영역과 함께 hTAS2R47에 대한 예측된 TM 헬릭스 도메인 및 예측된 TM 헬릭스 변들 구조를 나타내었다. TM7 헬릭스 내의 가시적 밴드는 TM7 염기서열 내의 중간 프롤린의 위치에서 발생하였다.

[0164] 도 20은 4개의 리간드에 대한 예측된 결합 부위를 나타낸다. 프로닌 등의 문헌[Pronin 2004]에는 hTAS2R47가 테나토늄에 의해 가장 강하게 활성화되는 반면, DD2 및 6NS는 더 적게 수용체를 활성화시키고 4NS는 매우 약한 역작용제와 같이 작용한다는 것이 나와있다. 본 출원인들은 테나토늄이 가장 큰 예측 결합 에너지를 야기하는 반면 다른 리간드들은 (DD2, 4NS, 6NS) 테나토늄과 비교하여 25% 이상 약한 결합 에너지로 결합함을 발견하였다.

이러한 결과들은 실험적 활성화 비율과 컴퓨터화된 결합 에너지 사이에 상관 관계가 존재한다는 것을 가정하는, 프롤린 등에 의한 문헌 [Pronin 2004]에서의 것과 일치한다. 상기 예측된 DD와 Asp150(TM4)의 상호작용은 돌연 변이유발 연구들과 일치한 것이다. 예측된 리간드: hTAS2R47 복합체는 다수의 결합 부위 및 다른 리간드에 대한 다수의 결합 모드를 나타낸다.

[0165] **실시예 8: 프로스타글란딘 DP 수용체 및 길항제 결합 부위들의 구조**

[0166] 본 출원인들은 이전 세대의 MembStruk 방법을 사용하여 DP 프로스타글란딘 수용체의 구조를 예측한 후 HierDock로 상기 예측된 구조를 사용하여 4개의 리간드 패밀리에 대한 결합 부위를 예측하였다. 하기에 요약된, 본 연구는 예측된 GPCR 구조체가 약물 발전에서 사용시 충분히 정확함을 나타낸다.

[0167] 납 화합물에 대한 예측된 결합 모드를 도 22에 나타내었는바, 상기는 수용체와 리간드의 중요한 상호작용의 설명을 제공한다: i) 벤젠 고리 A상의 메톡시는 R310(7)와 상호작용한다, ii) 벤젠 고리 A 및 피리미딘 고리는 L26(1), K76(2), F115(3), S316(7), L312(7), 및 1315(7)를 포함하는 소수성의 공동 내에 존재한다, iii) 상기 보존된 시그네처 리간드 D72(2)는 상기 리간드의 HN-CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 부분의 양성자와 H-결합을 형성한다, iv) 벤젠 고리 B는 N34(1), L68(2), T62(2), 및 D319(7)와 상호작용하는, TM127 사이에 위치한다. v) 벤젠 고리 B 상의 O-메틸은 T62(2)를 갖는 HB를 형성한다.

[0168] 상기 예측된 결합 모드를 바탕으로, 본 출원인은 많은 변형된 화합물들의 결합 에너지를 예측하였다. 도 23에 나타낸 8개의 상기 케이스들을 실험적으로 테스트하였는바, 예측된 상대적 결합 에너지와 상대적 결합 상수 사이의 완벽하게 일치하였다 [Li 2007].

[0169] 화합물 b는 고리 B와 S316(7) 및 D319(7) 사이의 더 나은 상호작용을 야기하는, 링커 HN-CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 상에 변형을 가졌는바, 상기는 본 출원인에 의해 예측된 것이고 1.4 kcal/mol까지의 결합 에너지를 향상시켰다. 정말로, Sanofi-Aventis는 b의 경우 IC<sub>50</sub> = 104 nM으로 측정되었고, 이는 인자 8에 의해 개선된 것이다.

[0170] 화합물 c 및 d는 고리 B 상에 변형과 관련있다. 화합물 d는 결합으로부터 CH<sub>2</sub>를 제거함으로써, 예측된 결합 에너지를 1.7 kcal/mol까지 감소시켰는바, 이는 반 데르 발스 접촉에 의한 반발력으로 인한 것이다. 이는 IC<sub>50</sub>을 1073 nM 까지 증가시키는 것으로, 실험적으로 확인되었다. 화합물 c는 벤젠을 티오펜으로 치환시킴으로써 3 kcal/mol의 예측된 개선 및 78의 인자에 의한 IC<sub>50</sub>의 측정된 개선을 야기하였다.

[0171] 화합물 e 내지 i는 고리 A 상에 변형을 가졌다. 카르복산 또는 다른 유사기로의 치환은 R310(7)와의 유리한 상호작용으로 인해 결합시 상당한 개선을 야기할 것으로 예상되었다. 이러한 화합물들은 또한 도 23에 나타낸 바와 같이 개선된 결합 친화도 (IC<sub>50</sub>)을 가지는 것으로 실험에 의해 확인되었다. 실제, 이론에 의한 최상의 화합물 i는 출발 화합물 a에 비해 더 나은 IC<sub>50</sub>=0.8 nM, 1000 배로 최상의-측정된 결합을 가졌다. 게다가, 상위 2번째, 3번째 등으로 예측된 화합물들은 실험에서와 같이 정확히 동일한 염기서열이었다.

[0172] **실시예 9: 대표적인 PTU 유도체**

[0173] GI 시스템 내의 쓴맛 수용체의 지속적인 활성화를 위하여, 쓴맛 수용체 리간드 (예를 들면, PTU 유도체)는 GI 시스템 내에 존재하나 흡수되지 않는 것이 바람직하다, 이것은 흡수, 분배, 대사, 배출 및 독성과 같은 변경된 약물동역학적 특성을 갖는 리간드가 요구되기 때문이다.

[0174] hTAS2R38<sub>PAV</sub> (도 8)에서의 PTU 결합 부위를 바탕으로, 프로필기가 노출되어 있으나 상기 수용체와 상호작용하지 않는 것으로 관찰되었다. 이는 상기 기능기가 아미노산, 펩티드, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 또는 사카라이드와 같은 상보성 분자에 부착하기 위해 잠재적으로 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0175] PTU의 화학식 (C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S)을 도 11에 나타내었는바, 7개의 탄소 원자들은 1 내지 7의 숫자로 표시된다. 상기 황, 질소 및 산소 원자들은 각각 S, N, 및 O를 나타낸다. 탄소 원자 1, 2, 및 3은 탄소 원자 4에 부착하는 사슬을 형성한다. 탄소 원자 2 및 3은 각각 2개의 수소 원자를 가지며 탄소 원자 1은 3개의 수소 원자를 가진다. 상기 3개의 수소 원자들 중 하나는 OH 기능기에 의해 치환되거나 상기 프로필기는 카르복실산 또는 아지드기와 기능화됨으로써 아미노산, 펩티드, PEG, 모노사카라이드, 올리고사카라이드 또는 다른 적합한 상보성 분자와 공유 결합을 형성할 수 있다.

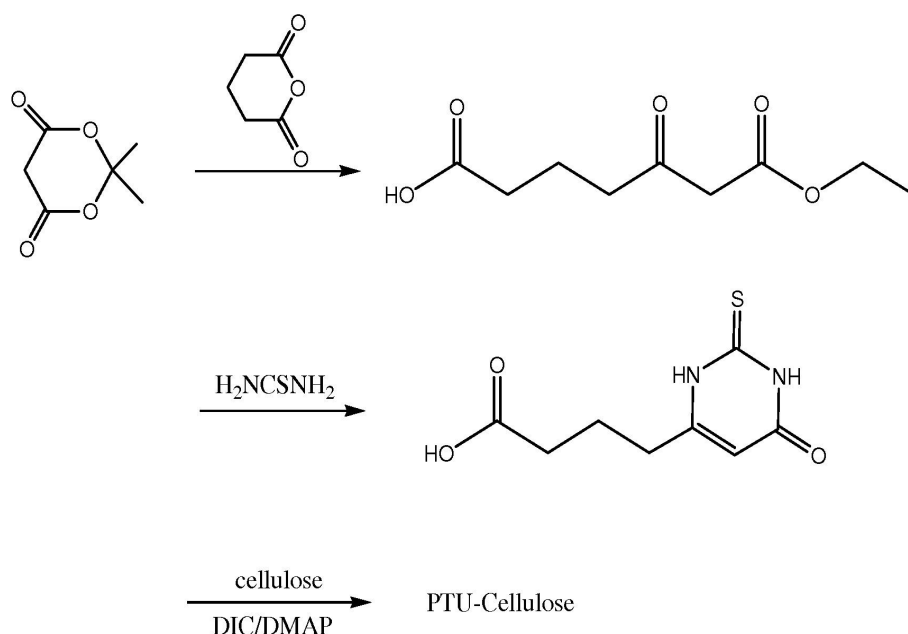
[0176] 길이 n을 갖는 링커를 통한 임의의 R 기능기에 부착되는 PTU를 도 12에 나타내었는바, 여기서 n은 1-20 범위의 값을 가질 수 있다. 상기 부착은 실제로 카르복실산 및 아지드와 같은 반응성기를 사용하여 PTU를 우선 기능화함으로써 촉진될 수 있다 (도 13). 이러한 반응성기는 셀룰로오스 및 PEG (도 14)와 같은 거대 분자를 PTU에 부

착시킴으로써 원하는 약물동태학적 특성을 갖는 PTU 유도체를 생성할 수 있게 한다.

[0177] PEG의 장 투과성은 그들의 분자량에 매우 크게 의존하는 것으로 나타났다 [Kerckhoffs 2010]. 이는 PEG의 분자량에 대해 10,000의 낮은 한계를 제공하는바, 예를 들면, 호르몬 방출을 지속적으로 조절하는 장 내의 쓴맛 수용체의 연장된 활성화를 위한 GI 시스템에서, PEG에 결합하는 PTU를 유지시킬 것이다.

[0178] **실시예 10: 상보성 분자와 컨쥬게이트된 활성 작용제의 제조: PTU-셀룰로오스**

[0179] 적합한 상보성 분자와 컨쥬게이트된 활성 작용제는 공지된 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 적합한 상보성 분자와의 컨쥬게이션을 위한 예시적인 반응 계획은 수행하였다. 예로서, PTU-셀룰로오스의 화학적 합성은 하기와 같다:



[0180]

[0181] 계획 PTU-셀룰로오스 컨쥬게이트를 위한 합성 경로

[0182] PTU의 약물동태학 특성 중 하나 (분포)는 셀룰로오스로의 컨쥬게이션을 통한 변형이었다. 상기 및 다른 변형이 PTU의 전체 약물동태학 프로파일 (흡수, 분포, 대사, 배출, 및 독성)을 변화시킬 수 있다.

[0183] **실시예 11: PYY의 증가된 방출을 야기하는 PTC의 투여**

[0184] 본 출원인은 표준 위관 영양에 의해 살진 의식이 있는 숫컷 Sprague-Dawley 래트의 위 내로 5 ml 식염수 또는 5 ml 식염수 내의 5mM PTC를 투여하였다 (중량당 250-300 gm). 상기 래트를 그 다음 45분 이후에 안락사시키고 심장에 구멍을 뚫어 혈액을 제거한 후 CURE 항체 9153 (Gift of J Reeve, University of California, Los Angeles)을 사용하여 최근 변경된 방사면역검정법에 의해 혈액 내의 PYY를 측정하였다. 결과는 하기와 같이 PYY 수준의 배증가를 입증하였다: 식염수 영양된 래트 (n=5) 71 +/- 35 pM, PTC 영양된 래트 (n=5) 154 +/- 44 pM. 래트의 희생시 흥미로운 관찰은 PTC-처리 래트의 위 내에 남아있는 액체의 양은 1-2 ml 범위인 반면 식염수-처리 래트의 위 내에는 0.5 ml 미만이 존재하였다는 점이다. 상기 관찰은 TAS2R38와의 상호작용을 통해 PTC가 위 공복을 조절한다는 것을 나타낸다.

[0185] **실시예 12: 내분비선 세포 내의 GLP-1 방출을 초래하는 PTC 투여**

[0186] 특정 쓴맛 수용체에 대한 리간드의 선택성을 조사하기 위한 세포-기재 시스템의 실현가능성을 측정하기 위하여, 본 출원인은 STC-5 세포를 선택하고 상기 세포들로부터 PTC가 GLP-1 상에 미치는 효과를 측정하였다. 본 출원인들은 STC-5 세포가 여러 쓴맛 수용체 중에서 TAS2R38를 가지고 있음을 입증하였다.

[0187] GLP-1 방출 실험에서, STC-5 세포 또는 NCI-H716 세포의 선택된 내분비선 세포주를 사용하여 여러 가능한 리간드에 의해 유발된 GLP-1의 방출을 실험하였다. 내분비선 세포를 운반체 (0.01% DMSO) 특정 농도의 후보 리간드를 함유하는 무-혈청 DME/F12 배지에서 특정 배양 시간 동안 배양하였다. 배양 이후에 배지 내의 분비 활성 GLP-1을 GLP-1 RIA 키트를 사용하여 측정하였다 (Linco Research ®, Missouri, USA).

[0188] 특히, STC-5 세포를 운반체 (0.01% DMSO) 및 PTC를 함유하는 무-혈청 DME/F12 배지에서 상기 나타낸 농도에서 30분 동안 배양하였다. 배지 내의 활성 GLP-1의 분비를 GLP-1 RIA 키트를 사용하여 측정하였다 (Linco Research, Missouri, USA). 모든 군에 대한 실험을 2회씩 수행하였다.

[0189] 도 24A 및 24B에 예시한 결과는 PTC가 상기 세포로부터의 GLP-1 방출에 큰 영향을 미치나, 운반체 (음성 대조군 또는 PTC 농도 0)은 그렇지 않음을 나타낸다. 이는 GLP-1과 같은 쓴맛 리간드가 GLP-1의 방출에 유효하게 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0190] 실시예 13: 내분비선 세포주, NCI-H716 세포로부터의 글루카곤-유사 펩티드-1 (GLP-1) 방출

[0191] NCI-H716 세포의 내분비선 세포주를 사용하여 여러 가능한 리간드에 의해 유발된 GLP-1의 방출을 실험하였다.

[0192] NCI-H716 세포를 나타낸 농도에서 후보 리간드를 사용하여 운반체 (0.01% DMSO)를 함유하는 무-혈청 DME/F12 배지에서 배양하였다. 배지 내의 분비 활성 GLP-1를 GLP-1 RIA 키트 (Linco Research, Missouri, USA)를 사용하여 측정하였다. 상기 결과를 표 2에 요약하였다. 모든 군에 대한 실험은 2회씩 수행하였다.

[0193] 표 2. 다양한 리간드에 의해 유발된 NCI-H716 세포에 의한 GLP-1 방출

| 군                         | 농도           | GLP-1 (pmol/mg 단백질) |
|---------------------------|--------------|---------------------|
| 대조군                       | 0            | 58.47               |
| PTC                       | 2.5 $\mu$ m  | 98.73               |
| 부틸레이트                     | 2.5 mM       | 100.77              |
| 글리시리진산 암모늄 염              | 10 $\mu$ m   | 71.95               |
| 에피갈로카테킨 갈레이트              | 1 $\mu$ m    | 91.15               |
| 인삼 뿌리                     | 10 $\mu$ m   | 62.21               |
| 하이퍼포린                     | 5 $\mu$ g/ml | 104.87              |
| 베르베린 클로라이드                | 10 $\mu$ m   | 86.41               |
| 콥티신 클로라이드                 | 10 $\mu$ m   | 121.35              |
| 알릴 메틸 설퍼드                 | 10 $\mu$ m   | 91.547              |
| 홉스 (Hopsteiner BetaBio45) | 10 $\mu$ m   | 86.149              |
| 로틀렐린                      | 0.05%        | 111.18              |
| 쿠르쿠민                      | 10 $\mu$ m   | 61.52               |
| 엘라그산                      | 10 $\mu$ m   | 77.25               |
| 엠벨린                       | 10 $\mu$ m   | 83.55               |

[0194]

[0195] PTRU, 에피갈로카테킨 및 베르베린 클로라이드는 예시적인 쓴맛 자극 수용체 리간드로서, 또한 쓴맛 자극제이다. 홉스테이너는 예시적인 리간드의 조합으로서 쓴맛 자극 조합을 야기한다. 인삼 뿌리는 다수의 다양한 성분들을 포함하는 예시적인 쓴맛 자극 수용체 리간드의 조합이다. 잔존하는 리간드는 쓴맛 자극제가 아니다. 표 2에 예시된 결과는 PTC, 부티르산염, 글리시리진산, 에피갈로카테킨 갈레이트, 하이퍼포린, 베르베린, 콥티신, 알릴 설퍼드, 홉스 (Hopsteiner BetaBio45 조성물) 내의 B-산, 로틀렐린, 엘라그산 및 엠벨린 각각이 L-세포를 나타내는 모델 세포주인, NCI-H716 세포로부터의 GLP-1의 방출을 증가시킴을 나타낸다.

[0196] 실시예 14: 쓴맛 자극 수용체 및 관련 호르몬을 제공하는 내분비선 세포

[0197] 본 쓴맛 자극 수용체 리간드로 예상되거나 알려진 예시적인 내분비선 세포를 상기 다양한 GI 세포 각각과 관련된 특정 대사성 호르몬과 함께 하기의 표 3에 나타내었다.

[0198] 표 3. 내분비선 세포의 종류 및 그들의 분비 산물

| 세포 종류              | 분비 호르몬                    | 위치          |
|--------------------|---------------------------|-------------|
| $\alpha$ 세포        | 글루카곤                      | 췌장 (랑게르한스섬) |
| $\beta$ 세포         | 인슐린, 섬                    | 췌장 (랑게르한스섬) |
| 세포 종류              | 분비 호르몬                    | 위치          |
|                    | 아밀로이드, 폴리펩티드              |             |
| PP 세포              | 췌장 폴리펩티드                  | 췌장 (랑게르한스섬) |
| $\delta$ 세포 (D 세포) | 소마토스타틴                    | 췌장 (랑게르한스섬) |
| 세포                 | 가스트린                      | 위- 종종 췌장내   |
| X/A-유사 세포          | 글레틴, 네스파틴-1               | 위- 종종 췌장내   |
| GIP 세포 (K 세포)      | GIP, 세닌                   | 소장          |
| S 세포               | 세크레틴                      | 소장          |
| I 세포 (CCK 세포)      | 클레치스토키닌                   | 소장          |
| N 세포               | 뉴로텐신                      | 소장          |
| L 세포               | PYY, GLP-1, GLP-2, 옥신토모듈린 | 소장 및 대장     |

[0199]

[0200] 약어: CCK, 콜레시스토키닌(cholecystokinin); GIP, (가스트린 억제 폴리펩티드, gastric inhibitory polypeptide); GLP, (글루카곤-유사 펩티드, glucagon-like peptide); PPY, (펩티드 YY, peptide YY).

[0201] 문헌 [Field, B.C.T. et al. Bowels control brain: gut hormones and obesity Nat. Rev. Endocrinol, 2010; 6:444-453.]

[0202] 실시예 15: 특정 리간드에 대한 상보성 분자의 선택

[0203] 측정된 리간드에 연결되는 적절한 상보성 분자를 선택하기 위하여, 상기 리간드가 종래의 문헌을 참고로 측정된 최소 중량 크기를 갖는 분자에 연결될 수 있는 것으로 예상된다. 숙련자들은 특정 분자량의 PEG가 장의 내강에 남아있지 않을 것이라는 것을 알거나 문헌에서 발견할 것이다. 따라서, 상기 분자량 이상은 GI 쓴맛 수용체에 결합하기 위한 리간드에 컨쥬게이트되어 장의 내강을 통해 흡수되지 않는 상보성 분자에 대해 사용되는 것들이다.

[0204] 일 측면에서, 숙련자들은 분자량 M (sub r) 400, 1500, 4000 및 10,000를 실험하여 특정 조건 하에 10,000 중량 PEG가 7% ~ 33%의 (적은) 연구 집단에서 장 밖으로 이동하는 (소변에 존재하는) 것을 나타내는 (건강한 환자와 비교한) IBS 환자에 대한 연구 (Kerckhoffs)을 참고할 수 있을 것이다.

[0205] 10,000 중량 PEG가 비-IBS 환자 내에서 나올 것이라는 것은 명확하지 않고, 더 적은 중량의 집단이 충분할 지도 모른다는 것을 암시하지만, IBS 뿐만 아니라 비-IBS 군의 경우, 더 큰 중량의 상보성 PEG가 바람직할 수 있다.

[0206] 따라서, 분자의 분자량은 장 내에서 작용제를 유지시키기 위한 것이고, 여기서 그것은 10,000 또는 그 이상의 범위 내일 것이라 예상된다. 이 경우, 연결된 분자는 PEG 또는 다른 연결체 모두가 소화 효소 또는 다른 화학물질 및 위와 장의 작용에 의한 분해에 내성이 있거나 영향을 받지 않아야 할 것으로 예상된다. 상기 연결체는 작용제의 기능화/결합화를 간섭/억제하지 않는 방식으로 및/또는 작용제의 기능화/결합을 간섭/억제하지 않는 작용제 상의 지점에서 작용제에 연결되어야 할 것이다. 셀룰로오스 또는 PEG에 부착함에 의한 변형은 상기 효과를 달성할 것이라고 예상된다.

[0207] 요약하면, 본 명세서에는, 다수의 구현예에서, 개체의 GI관의 세포부터 생체 안에서 또는 생체 밖에서 대사성 호르몬의 방출을 조절하기 위한 쓴맛 수용체 리간드, 관련 작용제, 조합물, 조성물, 방법 및 시스템이 기술되어 있다.

[0208] 상기 설명된 예시들은 당업자에게 완성된 개시내용과 본 개시내용에 따른 배열, 장치, 리간드, 작용제, 조성물, 시스템 및 방법들의 제조방법과 사용방법에 대한 설명을 제공하기 위한 것이고, 상기 본 발명자들이 본 발명의 범위를 상기 개시내용에 한정하려고 의도한 것은 아니다. 본 명세서에 언급된 모든 특허 및 간행물은 개시내용과 관련있는 당업계의 숙련자들의 수준을 나타낸다.

[0209] 배경기술, 요약, 상세한 설명, 및 실시예에 인용된 (특허, 특허 출원서, 간행물, 발췌문, 실험 방법, 서적 또는 다른 개시내용을 포함하는) 각각의 문서의 전체 개시내용은 본 명세서에서 참고로서 통합된다. 본 개시내용에 인용된 모든 참고자료는 각각의 참고자료가 그의 전체로서 각각 참고자료로서 통합되는 것처럼 통합된다, 그러

나, 상기 인용 문헌과 본 개시내용 사이에 임의의 불일치하는 사항이 있는 경우, 본 개시내용이 우선한다.

[0210] 본 명세서에서 사용되고 있는 용어들 및 표현들은 설명하기 위한 용어로서 사용되는 것이며 제한되지 않고, 나타내고 설명된 특징 및 그들의 부분과 동등물을 배척하기 위해 그러한 용어들 및 표현들이 사용된 것은 아니나, 다양한 변형들이 청구된 개시내용의 범위 내에서 가능할 것으로 인식된다. 따라서, 본 개시내용이 구현예, 예시적인 구현예 및 임의의 특성에 의해 구체적으로 개시되어 있다 하더라도, 본 명세서에서 기재된 변형 및 변이들은 당업계에서 당업자들에 의해 되풀이될 수 있으며, 그러한 변형 및 변이들은 첨부된 특허청구범위에 의해 정의되는 바와 같이 본 개시내용의 범위 내의 것으로 고려된다.

[0211] 본 명세서에서 사용된 전문용어들은 특정 구현예만을 설명하기 위한 목적으로 사용된 것이고 상기를 제한하려는 것은 아니다. 명세서 및 첨부된 특허청구범위 내에서 사용된, 단수 형태 "a", "an", 및 "the"는 달리 지시사항이 없으면 복수의 지시물들을 포함한다. 용어들의 "복수형태"는 달리 지시사항이 없으면 2 또는 그 이상의 지시물들을 포함한다. 달리 정의되지 않으면, 본 명세서에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어들은 본 개시내용에 포함되는 것으로 당업계의 숙련자들에 의해 일반적으로 이해되는 의미와 동일한 의미를 가진다.

[0212] 마쿠쉬 그룹 또는 다른 그룹들이 본 명세서에서 사용될 때, 모든 각각의 그룹의 구성요소 및 모든 조합물 및 가능한 상기 기들의 하부 조합물이 본 개시내용에 각각 포함되는 것으로 의도된다. 본 명세서에 설명되거나 예시된 성분 또는 물질들의 모든 조합이 달리 언급되지 않으면, 본 개시내용을 수행하기 위해 사용될 수 있다. 당업자들은 구체적으로 예시된 것들과 다른 방법, 장치 요소, 및 물질들이 과도한 실험을 수행함이 없이 본 개시내용의 실시예에 포함될 수 있다. 임의의 방법, 장치 요소, 및 물질들에 대한 모든 당업계에 공지된 기능적 등가물들이 본 개시내용에 포함되는 것으로 의도된다. 범위가 명세서 내에, 예를 들면 온도 범위, 주기 범위, 시간 범위 또는 조성물 범위로 주어진 경우, 모든 중간 범위 및 모든 하부범위 뿐만 아니라, 모든 범위에 포함되는 각각의 수치가 본 개시내용에 포함되는 것으로 의도된다. 본 명세서에 개시된 범위 또는 기에 대한 임의의 일 또는 그 이상의 각각의 구성요소들은 본 개시내용의 청구범위로부터 배제될 수 있다. 본 명세서에서 예시적으로 기술된 개시내용은 임의의 요소 또는 요소의 부재, 본 명세서에 구체적으로 개시되지 않은 제한 또는 제한물들로 수행될 수 있다.

[0213] 본 개시내용의 여러 구현예가 기술되어 있다. 본 명세서에 제공된 특정 구현예는 본 개시내용의 유용한 구현예의 예로서 본 개시내용이 본 명세서에 설명된 장치, 장치 성분, 방법 단계의 다수의 변형을 사용하여 수행될 수 있는 것임은 당업자들에게 자명할 것이다. 당업자에게 자명한 바와 같이, 본 방법에 유용한 방법 및 장치는 다수의 임의의 조성물 및 공정 요소 및 단계를 포함한다.

[0214] 특히, 다양한 변형들이 본 개시내용의 정신 및 범위를 벗어남이 없이 만들어질 수 있다는 것이 이해될 것이다. 따라서, 다른 구현예는 하기의 청구범위의 범위 내이다.

[0215]

참고문헌

- Bray JK and Goddard WA (2008). The structure of human serotonin 2c G protein-coupled receptor bound to agonists and antagonists, *J Mol Graph Model* **27**:66-81.
- Bufo B et al. (2005). The Molecular Basis of Individual Differences in Phenylthiocarbamide and Propylthiouracil Bitterness Perception, *Curr Biol* **15**:322-7.
- de Jong LA et al. (2005). Receptor-ligand binding assays: technologies and applications, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **829**:1-25.
- Farrens D et al. (1996). Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin, *Science* **274**:768-70.
- Field BCT et al. (2010). Bowels control brain: gut hormones and obesity, *Nature Rev Endocrin* **6**:444-53.
- Goddard WA et al. (2010). Predicted 3D structures for adenosine receptors bound to ligands: Comparison to the crystal structure, *J Struct Biol* **170**:10-20.
- Kam VWT and Goddard WA (2008). Flat-bottom strategy for improved accuracy in protein side-chain placements, *J Chem Theor Comput* **4**:2160-9.
- Kenakin T and Miller LJ (2010). Seven Transmembrane Receptors as Shapeshifting Proteins: The Impact of Allosteric Modulation and Functional Selectivity on New Drug Discovery, *Pharmacol Rev* **62**:265-304.
- Keravis T and Lugnier C (2010). Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDE) and peptide motif, *Curr Pharm Des* **16**:1114-25.
- Kerckhoffs AP et al. (2010). Intestinal permeability in irritable bowel syndrome patients: effects of NSAIDs, *Dig Dis Sci* **55**:716-23.
- Kuntz ID et al. (1982). A geometric approach to macromolecule-ligand interactions, *J Mol Biol* **161**:269-288.
- Lefkowitz RJ et al. (1970). Radioreceptor assay of adrenocorticotrophic hormone: new approach to assay of polypeptide hormones in plasma, *Science* **170**:633-5.

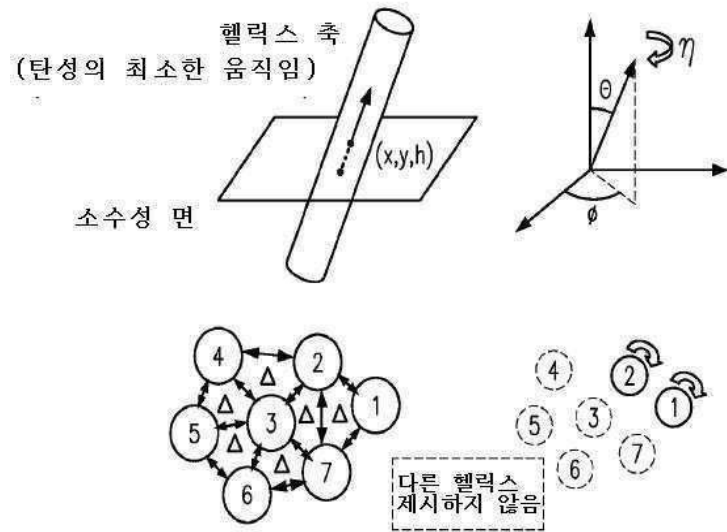
[0216]

- Li Y et al. (2007). Prediction of the 3D structure and dynamics of human DP G-protein coupled receptor bound to an agonist and an antagonist, *J Am Chem Soc* **129**:10720-31.
- Lim KT et al. (1997). Molecular dynamics for very large systems on massively parallel computers: The MPSim program, *J Comput Chem* **18**:501-521.
- Mayo SL et al. (1990). DREIDING: a generic force field for molecular simulations, *J Phys Chem* **94**:8897-909.
- Phillips JC et al. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD, *J Comput Chem* **26**:1781-1802.
- Pronin AN et al. (2004). Identification of Ligands for two human bitter T2R receptors, *Chem Senses* **29**:583-93.
- Scanziani M and Hausser M (2009). Electrophysiology in the age of light, *Nature* **461**:930-9.
- Schultz SG (1998). A century of (epithelial) transport physiology: from vitalism to molecular cloning, *Am J Physiol Cell Physiol* **274**:C13-23.
- Tsien RY (2003). Imagining imaging's future, *Nat Rev Mol Cell Biol Suppl S*:SS16-21.
- Wong GT et al. (1996). Transduction of bitter and sweet taste by gustducin, *Nature* **381**:796-800.
- Zacharias DA et al. (2000). Recent advances in technology for measuring and manipulating cell signals, *Curr Opin Neurobiol* **10**:416-21.
- Zhang J et al. (2002). Creating new fluorescent probes for cell biology, *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:906-18.

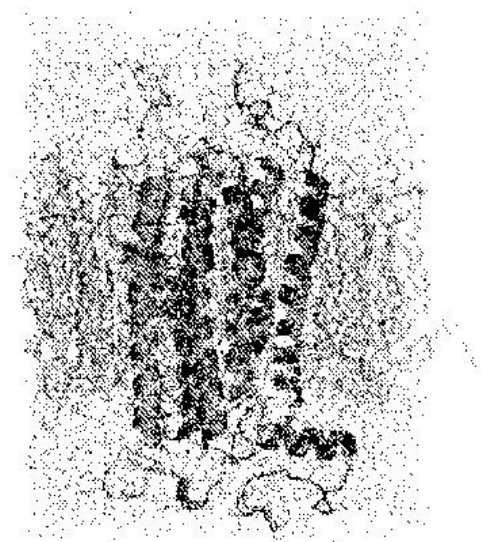
[0217]



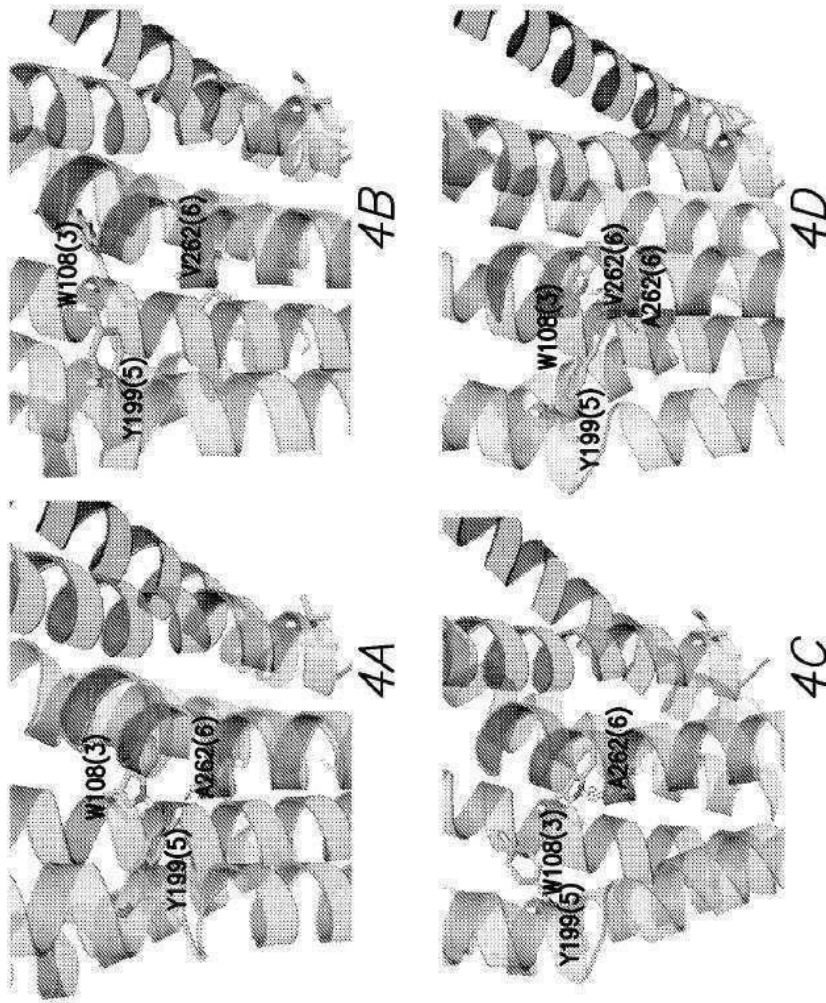
도면2



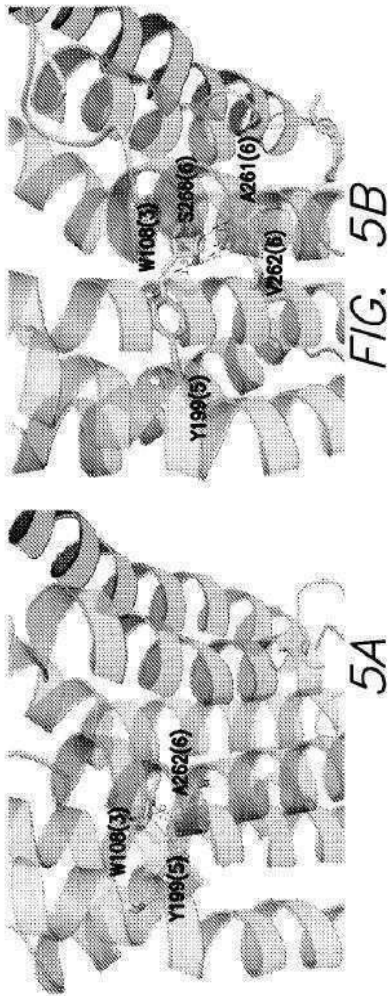
도면3



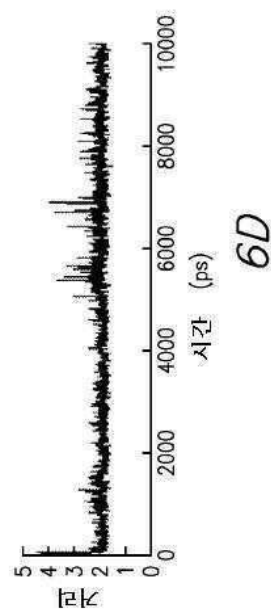
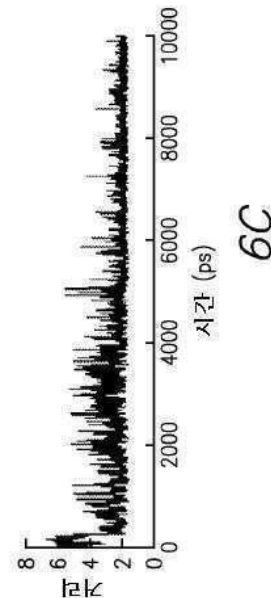
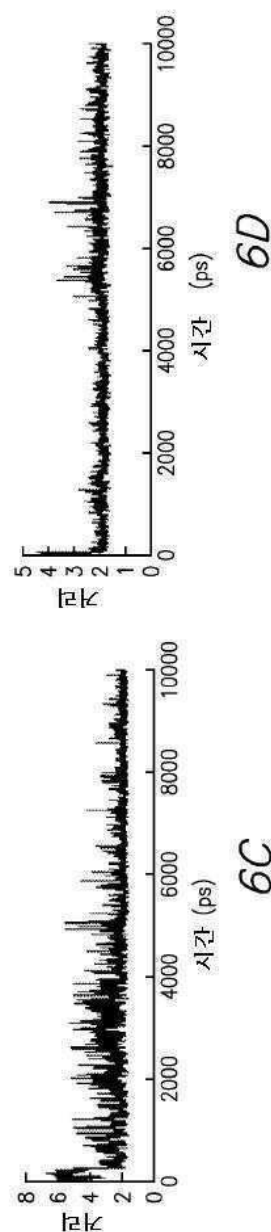
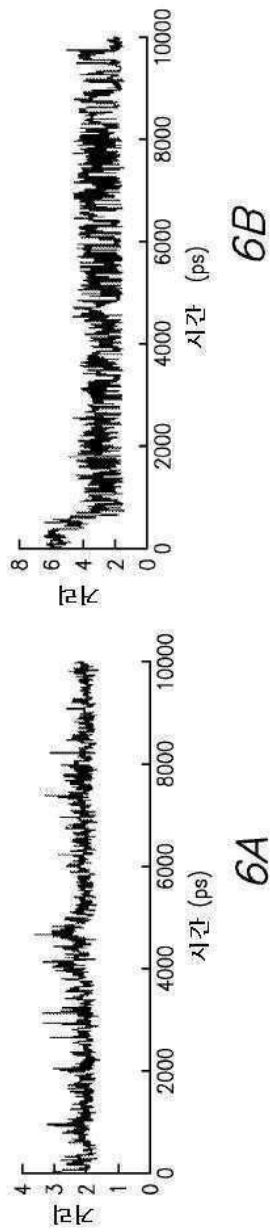
도면4



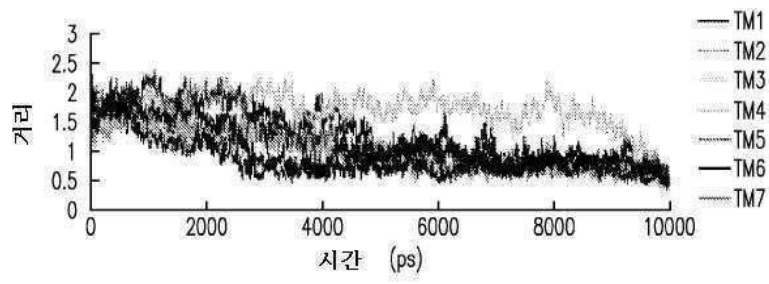
도면5



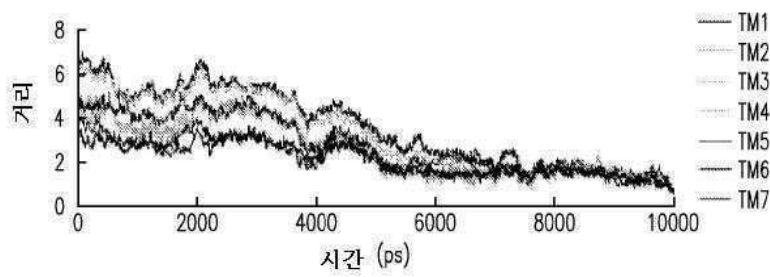
도면6



도면7

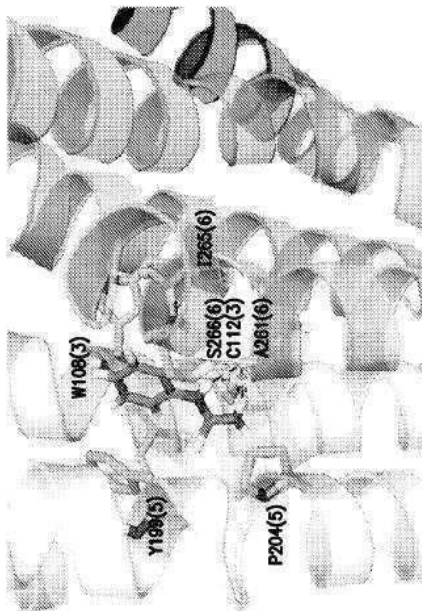
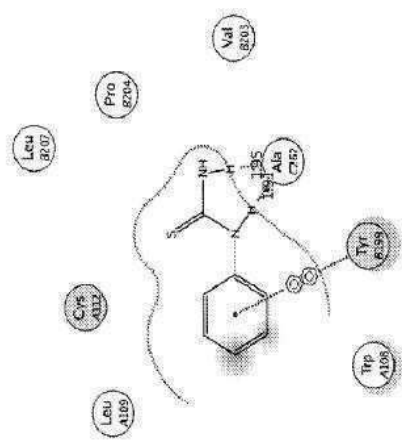


7A

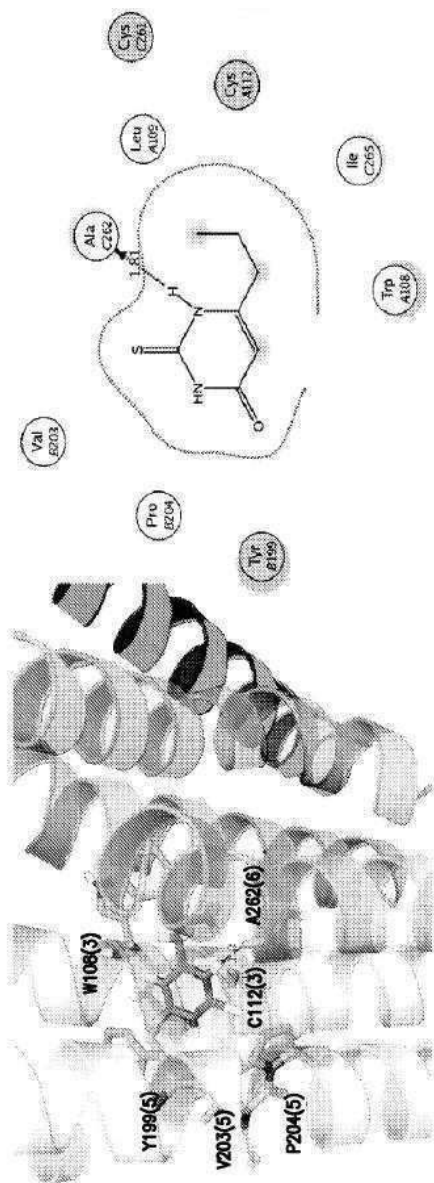


7B

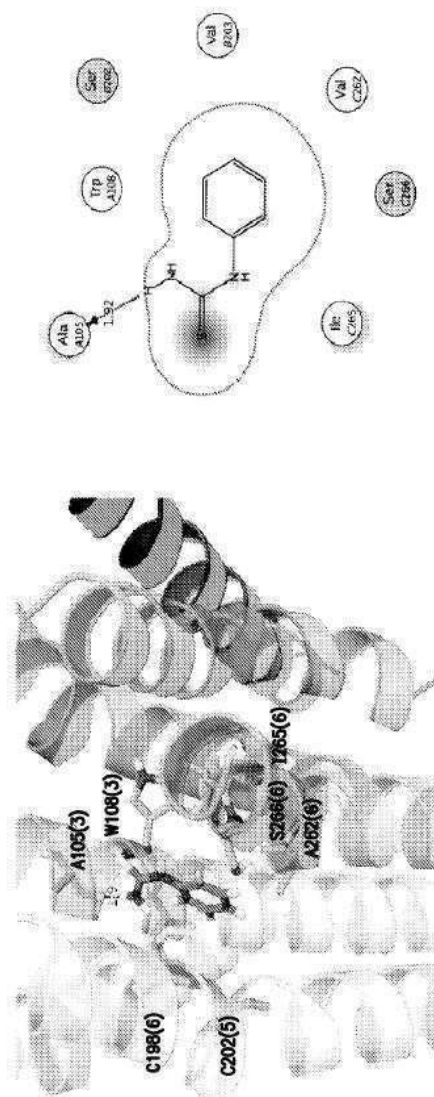
도면 8a



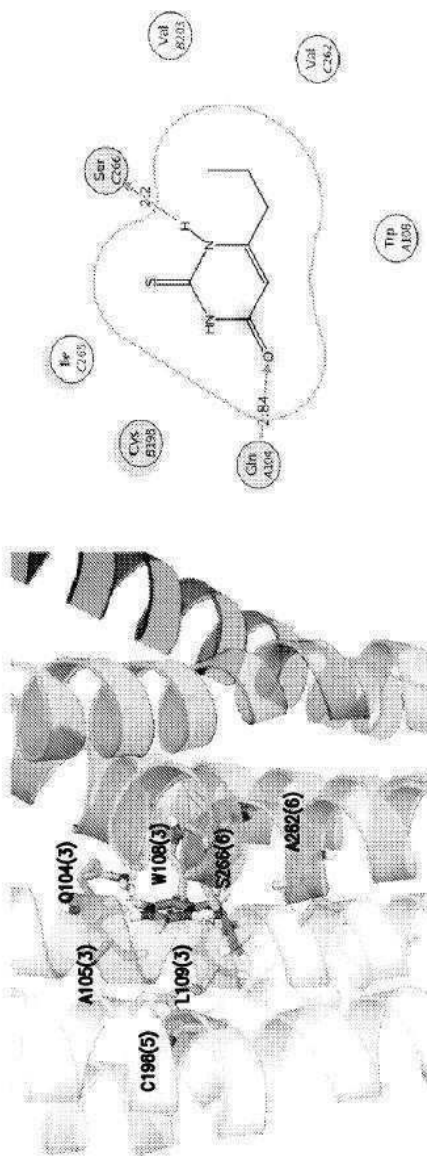
도면8b



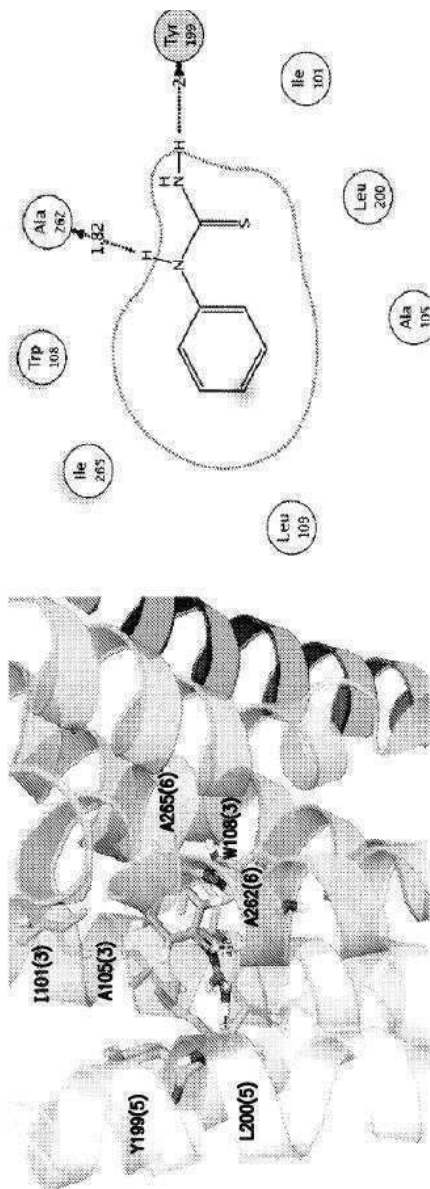
도면8c



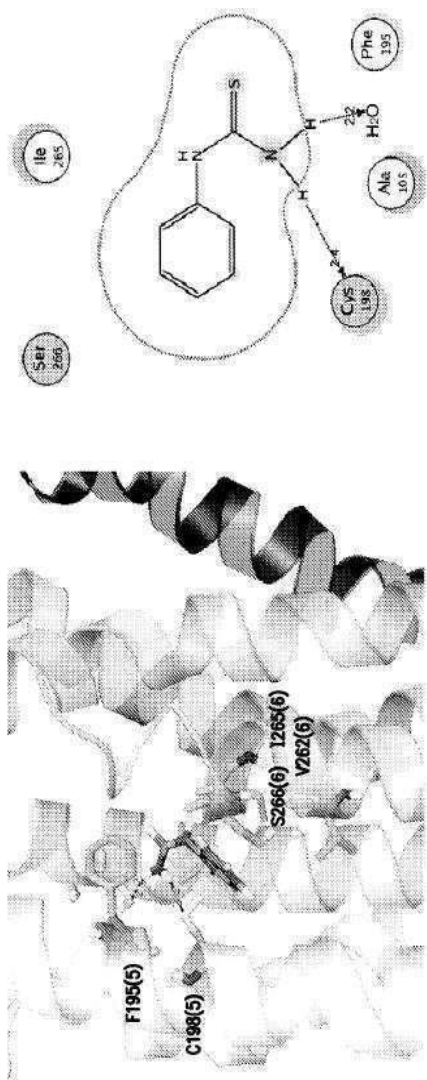
도면 8d



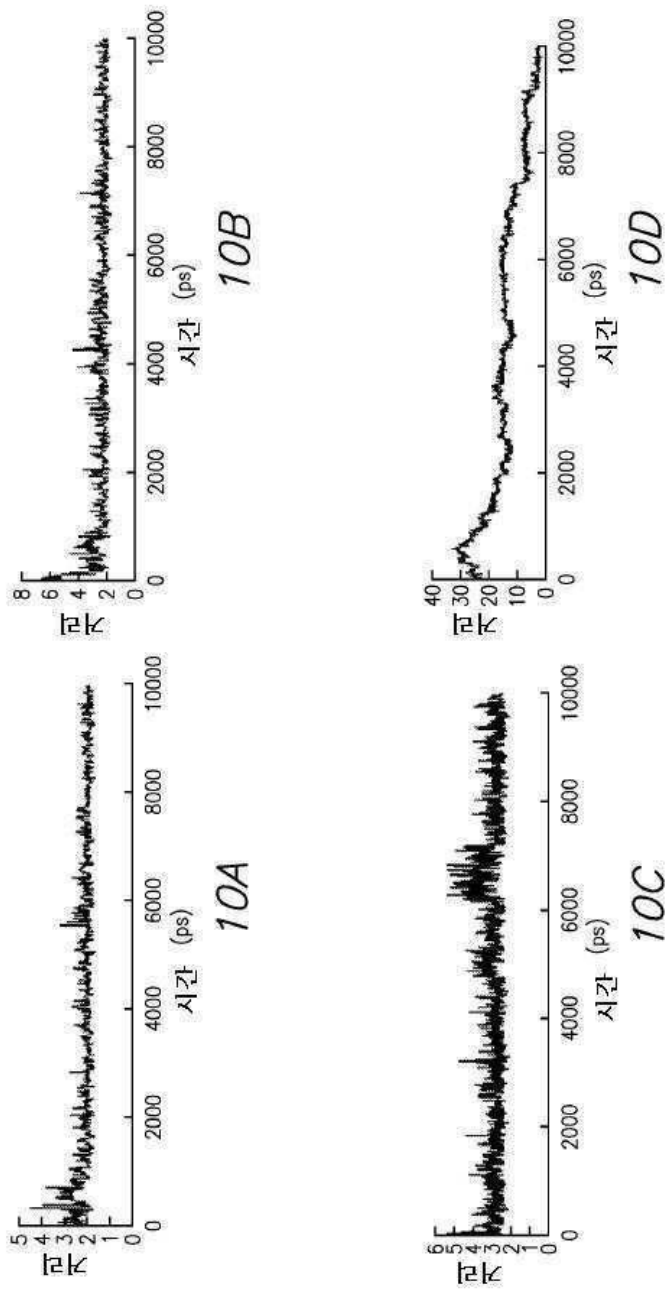
도면9a



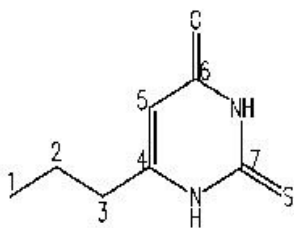
도면9b



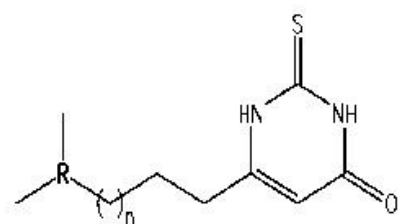
도면10



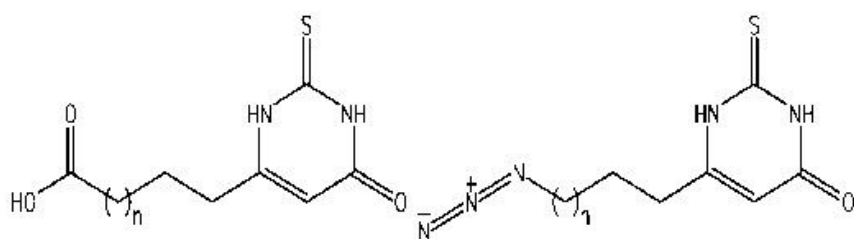
도면11



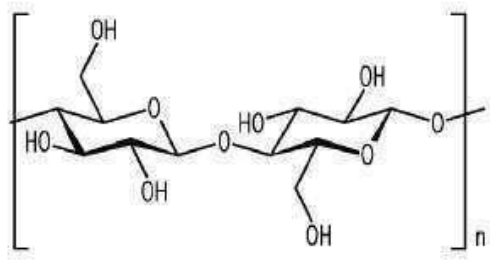
도면12



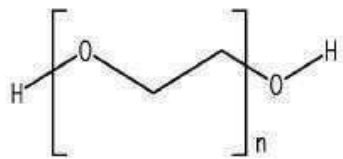
도면13



도면14

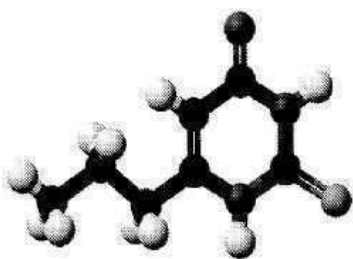


14A

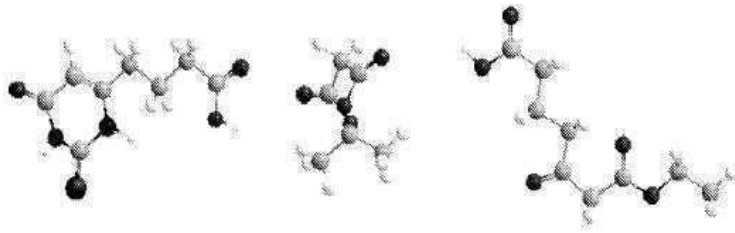


14B

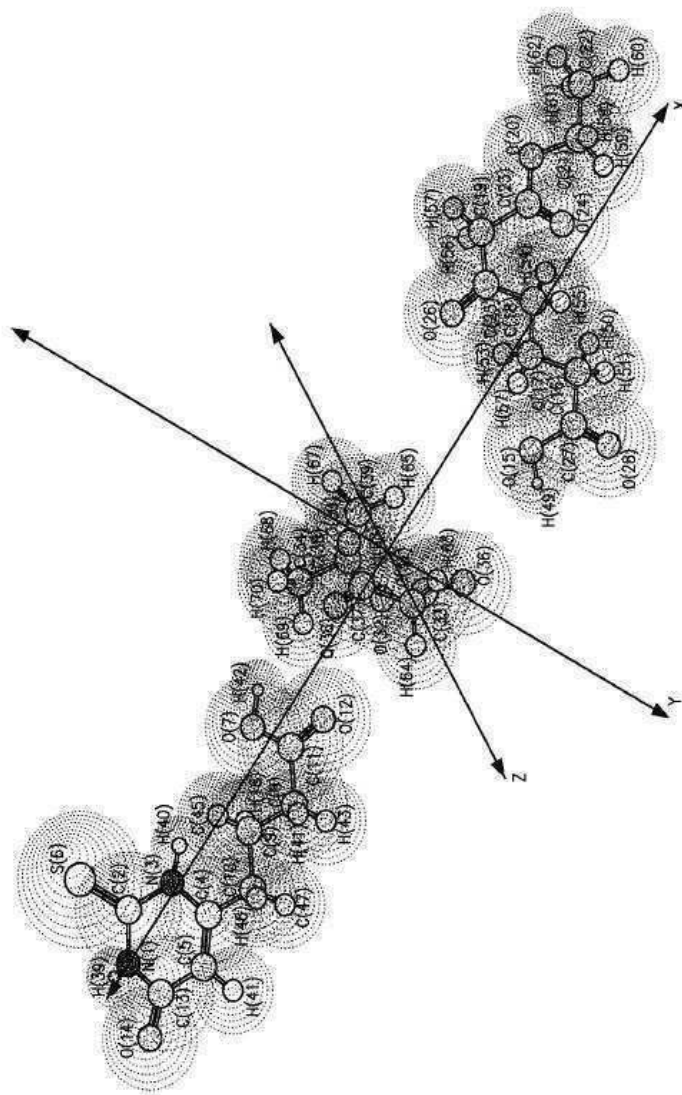
도면15



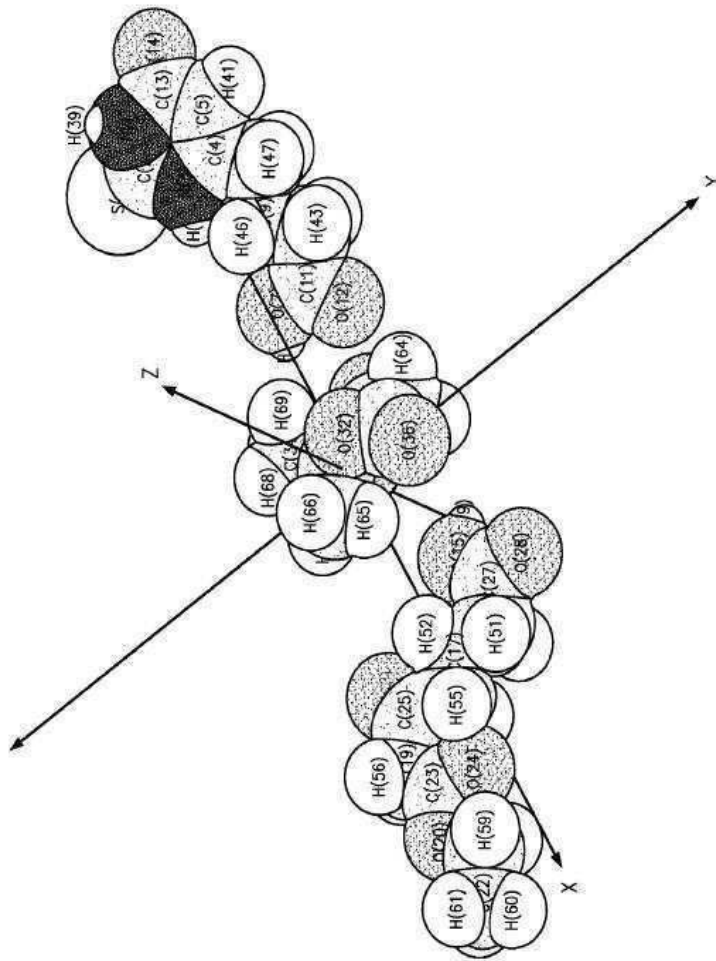
도면16



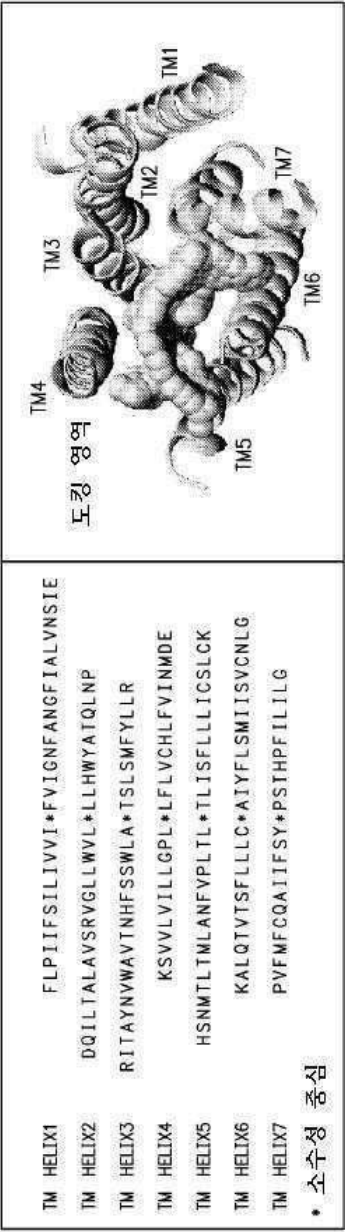
도면17



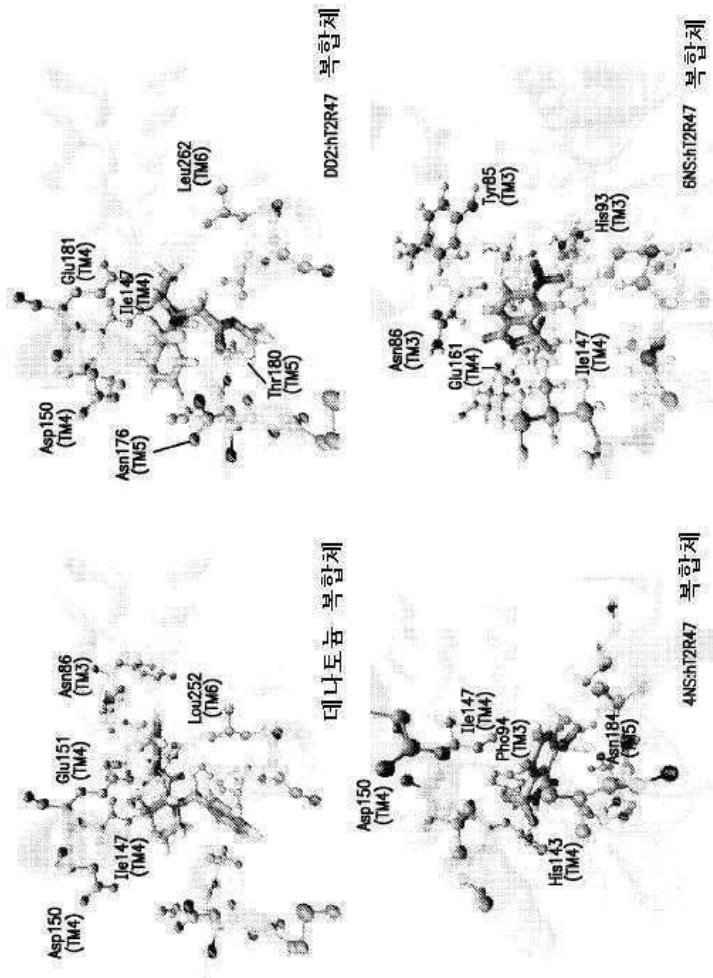
도면18



도면19



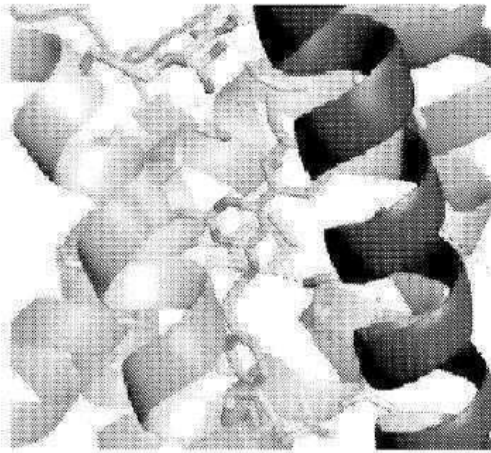
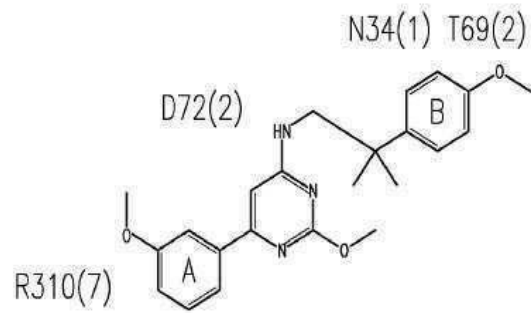
도면20



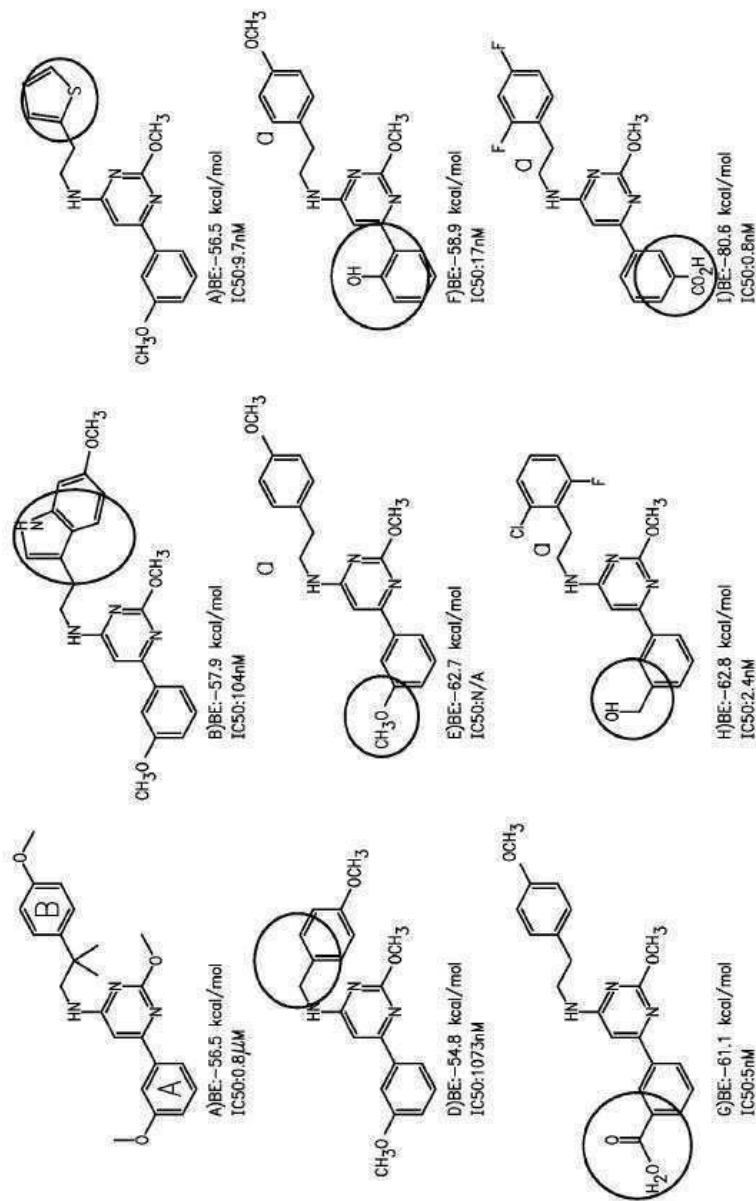
도면21

|                                               |       |         |                                               |      |         |
|-----------------------------------------------|-------|---------|-----------------------------------------------|------|---------|
| 소수성 중심                                        |       |         | 소수성 중심                                        |      |         |
| * h                                           | TM 1  | 13 43   | * h                                           | TM 7 | 279 299 |
| r                                             | TM 1  | 13 43   | r                                             | TM 7 | 279 299 |
| h                                             | TM 2f | 83 54   | r                                             | TM 7 | 279 299 |
| r                                             | TM 2f | 82 54   | r                                             | TM 7 | 279 299 |
| h                                             | TM 3  | 90 133  | r                                             | TM 7 | 279 299 |
| r                                             | TM 3  | 94 133  | r                                             | TM 7 | 279 299 |
| h                                             | TM 4f | 165 138 | r                                             | TM 7 | 279 299 |
| r                                             | TM 4f | 161 138 | r                                             | TM 7 | 279 299 |
| h                                             | TM 5  | 188 221 | r                                             | TM 7 | 279 299 |
| r                                             | TM 5  | 187 220 | r                                             | TM 7 | 279 299 |
| h                                             | TM 6f | 269 247 | r                                             | TM 7 | 279 299 |
| r                                             | TM 6f | 268 243 | r                                             | TM 7 | 279 299 |
| h                                             | TM 7  | 280 300 | r                                             | TM 7 | 279 299 |
| r                                             | TM 7  | 279 299 | r                                             | TM 7 | 279 299 |
| * 소수성 중심                                      |       |         | * 소수성 중심                                      |      |         |
| EVRSTFLFISVLEFAVGFLTNAFVFLVNFWD               |       |         | EVRSTFLFISVLEFAVGFLTNAFVFLVNFWD               |      |         |
| EAKISFLFSVVEFAVGIMANAFIVLVNFWD                |       |         | EAKISFLFSVVEFAVGIMANAFIVLVNFWD                |      |         |
| KQFHTLQIASLFLGLFLRSISLCLLVCD                  |       |         | KQFHTLQIASLFLGLFLRSISLCLLVCD                  |      |         |
| QFCALQIADLLLGQLFLRTISLCLLAID                  |       |         | QFCALQIADLLLGQLFLRTISLCLLAID                  |      |         |
| HSYQAIIMLWMIANQANLWLAACLSLLYCSKLIREFSHTFLICLA |       |         | HSYQAIIMLWMIANQANLWLAACLSLLYCSKLIREFSHTFLICLA |      |         |
| AILTLWMSANQVSLWLAACLSLLYCAKIVREFSHTFPLHLA     |       |         | AILTLWMSANQVSLWLAACLSLLYCAKIVREFSHTFPLHLA     |      |         |
| RSFFCWYCLVTCICSLIIGLLMQSIKR                   |       |         | RSFFCWYCLVTCICSLIIGLLMQSIKR                   |      |         |
| DWLCLATCVGSFLLAVLLMQLFRR                      |       |         | DWLCLATCVGSFLLAVLLMQLFRR                      |      |         |
| DLNLFYSFLFCYLWSVPPFLLFLVSSGMLTVSLG            |       |         | DLNLFYSFLFCYLWSVPPFLLFLVSSGMLTVSLG            |      |         |
| KLNFFYSFYFCNVGSPPSLVFLISSGLVVISLG             |       |         | KLNFFYSFYFCNVGSPPSLVFLISSGLVVISLG             |      |         |
| LPVSIFAACSSIVFFCFFSVLSK                       |       |         | LPVSIFAACSSIVFFCFFSVLSK                       |      |         |
| LPISILAACFSVVYCLFSVLFIIAR                     |       |         | LPISILAACFSVVYCLFSVLFIIAR                     |      |         |
| MVCVGIMAACPSGHAAIISG                          |       |         | MVCVGIMAACPSGHAAIISG                          |      |         |
| MVCIGMMAACPSGHAAIISG                          |       |         | MVCIGMMAACPSGHAAIISG                          |      |         |
| *                                             |       |         | *                                             |      |         |

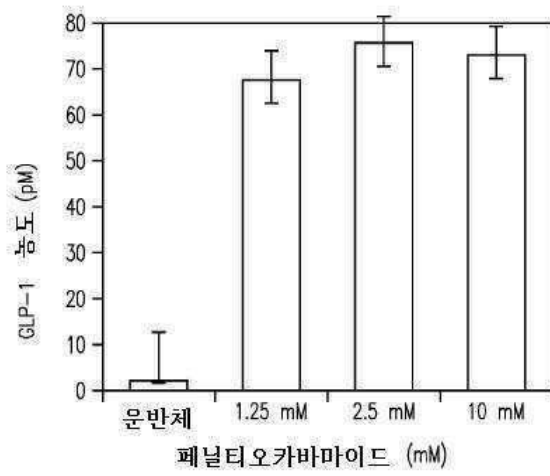
도면22



도면23



도면24a



도면24b

