



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0081569
(43) 공개일자 2012년07월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0003145
(22) 출원일자 2012년01월10일
심사청구일자 2012년01월10일
(30) 우선권주장
1020110002577 2011년01월11일 대한민국(KR)

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산 남구 무거2동 산29
(72) 발명자
이병주
울산광역시 울주군 범서읍 구영리 구영2차푸르지
오아파트 502동 502호
김재근
울산광역시 울주군 범서읍 구영리 풍경채아파트
101동 1306호
진성호
울산광역시 중구 성안동 장한리치빌 4차 101동
801호
(74) 대리인
특허법인 충정

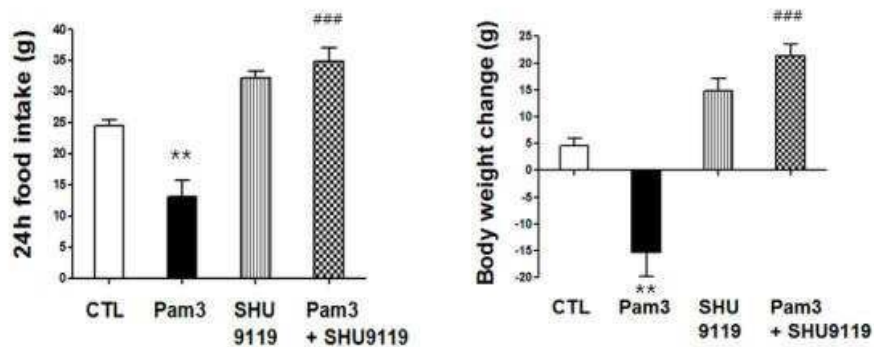
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 TLR2의 신규한 용도

(57) 요약

본 발명은 톨 유사 수용체(TLR2)의 신규한 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 TLR2 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머를 포함하는 섭식 장애의 진단용 조성물, 키트 및 마이크로어레이에 관한 것이며, 또한, 상기 유전자의 발현을 억제하거나 또는 상기 유전자로부터 발현되는 단백질의 활성을 억제할 수 있는 억제제를 포함하는 섭식 장애의 예방 또는 치료용 조성물 및 상기 억제제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, TLR2 유전자 발현의 활성은 식욕을 억제하고, 체중을 감소시키는 효과가 있으며, TLR2 리간드와; IKK 억제제, MC 수용체 대항물질(antagonist) 및 COX 억제제 중 적어도 하나를 통하여 식욕을 조절할 수 있으므로, 섭식 장애, 특히 비만, 폭식증, 거식증 또는 과식증의 예방 및 치료에 유용하게 적용할 수 있다.

대표도 - 도10



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009K001268

부처명 교육과학기술부

연구사업명 뇌기능활용 및 뇌질환 치료기술개발연구사업

연구과제명 신기능 단백질에 의한 뇌기능 제어 연구

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2010.04.01 ~ 2011.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

TLR2 유전자의 뉴클레오티드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머를 포함하는 섭식 장애의 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 TLR2 유전자의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 1로 나타내는 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 섭식 장애의 진단용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 섭식 장애는 비만, 폭식증, 거식증 및 과식증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 섭식 장애의 진단용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 TLR2는 뇌의 시상하부에서 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 발현을 촉진하고, COX-2(cyclooxygenase2) 및 마이크로조말 프로스타글란딘 E 합성효소-1(microsomal prostaglandin E synthase-1; mPGES1)의 발현을 촉진시키는 작용을 통해 식욕을 감소시키는 작용을 하는 것을 특징으로 하는 섭식 장애의 진단용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 TLR2의 식욕 감소효과는 멜라노코르틴 수용체의 기작에 의해 조절되며, 멜라노코르틴 수용체의 길항제(antagonist)에 의해 TLR2의 식욕 감소효과가 억제되는 것을 특징으로 하는 섭식 장애의 진단용 조성물.

청구항 6

TLR2 유전자의 뉴클레오티드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머를 포함하는 섭식 장애의 진단용 키트.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 TLR2 유전자의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 1로 나타내는 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 섭식 장애의 진단용 키트.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 섭식 장애는 비만, 폭식증, 거식증 및 과식증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 섭식 장애의 진단용 키트.

청구항 9

TLR2 유전자의 뉴클레오티드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머를 포함하는 섭식 장애의 진단용 마이크로어레이.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 TLR2 유전자의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 1로 나타내는 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 섭식 장애의 진단용 마이크로어레이.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 섭식 장애는 비만, 폭식증, 거식증 및 과식증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 섭식 장애의 진단용 마이크로어레이.

청구항 12

(a) TLR2 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계;

(b) 상기 TLR2 유전자의 발현양, TLR2 단백질의 양 또는 TLR2 단백질의 활성을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 (b) 단계의 측정 결과, TLR2 유전자의 발현양, TLR2 단백질의 양 또는 TLR2 단백질의 활성이 감소되는 경우에 상기 시료는 섭식 장애의 치료 또는 예방용 물질로 판정하는 단계를 포함하는, 섭식 장애의 예방 또는 치료용 물질을 스크리닝하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 섭식 장애는 비만, 폭식증, 거식증 및 과식증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 섭식 장애의 예방 또는 치료용 물질을 스크리닝하는 방법.

청구항 14

TLR2 유전자의 뉴클레오티드 서열에 상보적인 서열을 가지는 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 siRNA(small interference RNA) 올리고뉴클레오티드를 유효성분으로 포함하는 섭식 장애의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 15

TLR2의 리간드와; IKK 억제제, MC 수용체 길항제(antagonist) 및 COX 억제제 중 적어도 하나를 유효성분으로 포함하는 섭식 장애의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서,

상기 섭식 장애는 비만, 폭식증, 거식증 및 과식증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 섭식 장애의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 툴 유사 수용체 2(TLR2)의 신규한 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 섭식 장애와 관련된 툴 유사 수용체 2의 신규한 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 음식 섭취 및 신체에서의 이의 전환은 모든 생물의 삶에 필수적인 부분이다. 따라서, 섭취 및 음식의 전환에서의 일탈은 문제 및 또한 병을 야기한다. 특히 선진국에서, 사람의 생활 양식 및 영양물 섭취에서의 변화는 최근 수십년간 병적인 과체중(비대 또는 비만으로도 불린다)을 촉진시켜 왔다. 병에 걸린 사람들에서, 비만은 직접적으로 제한된 이동성 및 삶의 질의 감소를 야기한다. 비만이 종종 기타 질병, 예를 들면, 당뇨병, 이상

지질혈증, 고혈압, 동맥경화증 및 관상동맥성 심장 질환을 야기하는 추가 요인이 있다. 또한, 과체중은 그 자체만으로도 지지 및 이동 기관에 대한 부담을 증가시키고, 이는 만성 통증 및 질병, 예를 들면, 관절염 또는 골관절염을 야기할 수 있다. 따라서, 비만은 사회적으로 심각한 건강 문제이다.

[0003] 용어 비만은 체내의 과도한 지방조직을 의미한다. 이와 관련하여, 비만은 기초적으로 건강상의 위험을 야기하는 뚱뚱함의 증가된 수준으로서 나타내진다. 정상적인 개인과 비만한 개인 사이의 명확한 구분은 없으나, 비만을 동반한 건강상의 위험은 뚱뚱함 증가의 수준에 따라 연속적으로 증가되는 것으로 가정된다. 단순하게는, 본 발명에서는 체중(kg)을 신장(m)의 제곱으로 나누는 것으로 정의되는 체질량지수(BMI)가 25 이상, 보다 특히 30 이상인 개체를 바람직하게는 비만으로 간주한다.

[0004] 신체적 활동성 및 영양의 변화 이외에, 최근 효과적으로 체중을 감소시키기 위한 설득력있는 치료 선택이 없다. 그러나, 비만은 심각하고 심지어 생명을 위협하는 질환의 발생에서 중요한 위험 인자이기 때문에, 비만을 예방 및/또는 치료하기 위한 약제학적 활성 물질에 대한 접근이 무엇보다도 중요하다.

[0005] 대사성 질환(Metabolic Disease)이란, 체내의 과잉영양 축적 및 운동부족으로 인한 비만, 당뇨, 고혈압 및 동맥경화 등과 같은 위험인자가 함께 나타나는 증후군을 말하며, 최근에는 세계보건기구와 미국 국립보건연구원의 심, 폐, 혈액 연구소가 제정한 성인 치료프로그램 III을 통해 대사증후군 또는 인슐린저항성(Insulin resistance syndrome) 증후군이라고 공식 명명되었다. 또한, 2001년에 공표된 미국 NCEP(National Cholesterol Education Program)의 ATP에 따르면, 허리둘레가 남자 40인치(102 cm), 여자 35인치(88 cm) 이상인 복부 비만, 중성지방(triglycerides) 150 mg/dL 이상, HDL 콜레스테롤이 남자 40 mg/dL, 여자 50 mg/dL 이하, 혈압 130/85 mmHg 이상, 공복혈당(fasting glucose)이 110 mg/dL 이상 등의 다섯 가지 위험인자 중 한 환자가 세 개 이상을 나타낼 경우 이를 대사성 질환으로 판정하게 되며, 동양인의 경우에 있어서는 허리둘레가 남자 90, 여자 80 이상일 때 복부비만으로 다소 조정되어 있고, 이와 같은 규정을 적용할 경우 한국인은 전 인구의 25% 정도가 대사증후군 증상을 나타낸다는 최근의 연구 보고도 있다.

[0006] 한편, 경제발전에 따른 생활수준의 향상으로 대사성 질환의 주원인이 되는 비만에 속하는 현대인들이 급속히 증가하고 있다. 이러한 비만은 과다 열량의 섭취로 인해 여분의 열량이 체내에 지방의 형태로 축적되는 현상을 말하는 것으로서, 특히 내장 기관에 증식되고 있는 지방세포가 더욱 직접적으로 지질대사에 영향을 주어 발생한다고 알려져 있다(Bjorntorp P, Diabetes Care 14, 1132~1143, 1991, Frayn KN, Visceral fat and insulin resistance-causative or correlatives British J Nutr 83, 71~77, 2000, Wajchenberg BL, Endocr Rev 21: 697~738, 2000). 또한, 이러한 비만 및 당뇨병과 같은 대사성 질환을 일으킬 수 있는 위험 요인 중 대표적인 것이 지방화(Adipogenesis)인데, 지방화란 미성숙지방세포(preadipocytes)로부터 지방세포가 분화되어 지방을 축적하게 되는 과정을 말하며, 성숙한 지방 세포는 섬유아세포(fibroblast)와 같은 미성숙지방세포로부터 분화되어 궁극적으로 세포 내에 지방 방울(lipid droplet)을 형성하게 된다. 지방세포 분화는 근세포, 골세포 또는 지방세포를 형성할 수 있는 중간엽 줄기세포에서 시작되며, 지방전구세포에서 형태학적으로나 생화학적으로 완벽히 성숙된 지방세포로 분화되기 위해서는 지방세포 분화와 관련된 유전자의 조절부위에 중요한 전사활성인자가 활성화되어야 하며(Gregoire et al., 1998), 여러 호르몬과 다양한 전사인자들의 상호작용을 통하여 매우 복잡한 과정으로 이루어진다. 지방세포 분화를 유도하는 외부 신호 중 인슐린은 가장 널리 알려져 있는 호르몬으로서 지방세포의 대사조절에 중추적인 역할을 담당하고 있다. 지방전구세포는 인슐린 자극에 의해 지방세포로 분화를 시작하는데 인슐린은 당질의 흡수와 중성지방의 합성을 증가시키는 등의 복잡한 기전을 통해 지질의 형태로 에너지를 저장하고, 리포프로틴 리파아제(lipoprotein lipase)를 활성화시킴으로써 혈액 내에 순환하는 리포프로틴 유래의 지방산 흡수를 촉진하기도 한다(Giorgino et al., 2005). 또한, 지방세포의 분화조절은 최종적으로 PPAR, C/EBP family, ADD1/SREBP 등의 전사인자들이 담당하고 있는 것으로 알려져 있다(Rosen et al., 2000). 이들 전사인자들은 지방세포의 분화과정 중 다른 시점에서 발현이 유도되며 서로 상호작용을 통하여 여러 지방세포 특이 유전자들의 발현을 조절하고, 지방대사의 활성화와 지방세포 분화를 유도한다고 밝혀져 있다(Morrison and Farmer, 2000). 이러한 전사조절인자 중 대표적인 것으로서 C/EBP(CCAAT/enhancer binding protein)와 PPAR(peroxisome proliferation activating receptor)를 들 수 있다. 이들은 지방세포 특이유전자의 조절부위에 결합하여 전사를 촉진함으로써 지방세포분화를 촉진시킨다. 또한, 3T3-L1 지방전구세포주가 지방세포로 분화되기 위해서는 많은 지방특이 유전자의 전사가 복잡적으로 활성화되어야 하는데 이들의 변화를 유발시키는 중요한 요소인 C/EBP는 지방특이 유전자의 조절부위에 결합하여 전사를 촉진시킨다. 다른 전사인자인 PPAR의 경우, 분화과정의 초기 단계인 지방전구세포에서 최고로 발현되어 지방 특이적 유전자에 직접 작용하는 중요 조절자로서 모든 지방생성과정의 프로그램을 관장한다(Olofsson et al., 2008).

- [0007] 따라서 비만을 포함하는 대사성 질환들은 앞서 기술한 바와 같이 세포 내에서 매우 복잡한 메카니즘에 의해 유발되는 것인 만큼, 상기 메카니즘을 보다 효율적으로 조절함으로써 대사성 질환을 진단하고 예방 및 치료할 수 있는 기술들의 개발이 필요하다. 한편, 현재까지 개발된 종래기술들에 있어서, 세계적으로 많은 관심을 가지고 있는 비만치료제의 경우, 지금까지 알려진 비만치료제들 중 가장 대표적인 약물들로는 제니칼(XenicalTM, 로슈 제약회사, 스위스), 리덕틸(ReductilTM, 애보트사 미국), 엑소리제(ExoiseTM, 아코파마, 프랑스) 등이 있다. 그러나 이들 약물들은 심장질환, 호흡기 질환, 신경계질환 등의 부작용과 함께 그 효능의 지속성이 낮아 더욱 효율적인 비만치료제의 개발이 필요한 실정이다.
- [0008] 또한, 사람의 신체 건강에 악영향을 미치는 정도로 식이 행동에 장애가 있을 때, 이러한 상태를 섭식 장애라고 한다. 섭식 장애의 가장 일반적인 유형은 신경성 다식증과 신경성 식욕부진이다. 신경성 다식증("다식증")은 음식에 대해 반복적이고 끊임없는 욕구를 느끼고, 흔히 폭식과 이후 체중 증가를 방지하기 위한 부적절한 보상 행동이 뒤따르는 섭식 장애이다. 부적절한 보상 행동은 전형적으로 자기-유도 구토, 단식, 지나친 운동 및 하제와 이뇨제의 복용을 포함한다. 다식증 환자는 보통 3개월 이상, 1주일에 평균 2번 정도의 폭식과 부적절한 보상 행동을 나타낸다. 여대생들에서는 많게는 17%가 체중이 통상적으로 정상이거나 조금 날씬한 편임에도 불구하고, 다식증 행동을 보이는 것으로 보고되었다. 신경성 식욕부진(거식증)은 운동 스트레스가 동반될 수도 있는 자발적인 금식이 그 특징이다. 식욕부진인 사람은 나이 및 키를 기준으로 한 최소 정상 수준보다 낮은 체중을 유지한다. 보상적인 하제 행동(purging behavior)을 수반하지 않는 폭식 역시 음식물의 다량 섭취 또는 몰래 부적절한 음식물의 섭취, 및 체중 증가가 특징인 섭식 장애의 한 유형이다.
- [0009] 섭식 장애에는 신체적 및 심리학적 요인 두 가지가 있는데, 섭식 장애는 음식물에 관한 것이 아니라 음식물은 섭식 장애가 있는 사람이 남용하는 수단에 불과하다고 한다. 섭식 장애의 결과로 심각한 의학적 합병증이 발병할 수 있다. 섭식 장애는 어떤 사람에게는 가법지만, 어떤 사람에게는 심각하거나 심지어는 생명을 위협할 수도 있다. 전형적으로, 병에 걸린 사람은 다른 사람에게 본인의 비정상적인 행동을 숨길려고 시도할 것이며, 섭식 장애의 진단을 거부하거나 치료를 회피할 수 있다.
- [0010] 인체에서, 음식물 섭취는 내부 및 외부 자극들의 복합적인 상호 작용에 의해 조절된다. 미주 신경은 위로부터 뇌의 포만중추에 구심성 정보를 전달하는 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 미국 특허 5,188,104(Cyberonics, Inc.) 및 미국 특허 5,263,480(Cyberonics, Inc.)에는, 환자가 미리 결정된 시간 동안 섭취한 음식물의 양을 감지하여, 상기 시간 동안의 섭취량이 미리 정해진 수준을 초과한다면 자극 신호를 환자의 미주 신경에 가하는 것을 포함하는, 다식증 등의 섭식 장애를 치료하는 방법이 개시되어 있다. 신경 자극기에서 자극 발생기의 출력 신호 파라미터는 음식물의 과도한 섭취를 감지하면(즉, 정해진 시간 동안 음식물을 삼키는 총 횟수에 의해 상기 시간 동안 미리 정해진 수준을 초과한다면), 환자의 위 포만감을 유도하는 방식으로 미주 신경을 자극하도록 프로그래밍 되어 있다.
- [0011] 미국 특허 5,540,734(Cyberonics, Inc.)에는, 여러가지 의학적, 정신의학적 또는 신경학적 장애의 치료, 조절 또는 예방을 환자의 삼차 신경 및 설인 신경 중 어느 하나 또는 둘다에 조절성 전기 신호(modulating electric signal)를 가함으로써, 달성할 수 있는 것으로 언급되어 있다. 치료가능한 장애는 신경성 식욕부진, 다식증 및 강박성 과식을 포함한 섭식 장애이다.
- [0012] 미국 특허 5,782,798(Medtronic, Inc.)에는, 섭식과 포만을 조절하는 뇌의 신경 회로가 측면 시상하부(식이) 및 배쪽 내측 시상하부(포만)에서 신경원을 포함하고 있는 것으로 보고되어 있다. 이식가능한 신호 발생기, 전극, 이식가능한 펌프 및 카테터에 의해 섭식 장애를 치료하기 위하여, 약물과 전기 자극을 이용하는 특정 기법들이 개시되어 있다. 카테터를 뇌에 외과적으로 이식하여 약물을 주입하고, 전극을 뇌에 이식하여 전기 자극을 제공한다. 뇌의 자극 부위는 측면 시상하부, 뇌실결 핵 및 배쪽 내측 시상하부를 포함한다.
- [0013] 미국 특허 출원 공개번호 2005/0027284(Advanced Neuromodulation Systems, Inc.)에는, 슬하대상 영역(subgenual cingulate area), 뇌량밑 이랑 영역(subcallosal gyrus area), 배측/내측 전전두엽 피질 영역(ventral/medial prefrontal cortex area), 배측/내측 백색질, 브로드만 영역(Brodman) 24, 브로드만 영역 25 및/또는 브로드만 영역 10과 같은 뇌의 뇌량밑 영역의 자극에 의한, 기분 장애 및/또는 불안 장애의 완화 또는 조절 방법이 제안되어 있다.
- [0014] 그러나, 기존 치료법에 충분히 반응하지 않는 중증 섭식 장애나 생명을 위협하는 섭식 장애를 가진 환자를 치료하기 위한 새로운 방법이 여전히 요구되고 있다.
- [0015] 한편, 톨(Toll) 단백질은 초파리에서 배아의 발달 조절자로서 발견이 되었다. 톨은 인터루킨-1의 성분과 상동성을 가지는 타입 I의 막투과 수용체이다. 최근에, 여러 포유류의 톨(Toll) 유사체가 발견이 되었고, 톨 유사

수용체(Toll-like receptor; TLR)라 지정되었다. 최소한 10여개의 TLR들이 클론 되었고, 이들 중 일부는 병원균-연관 분자 패턴(pathogen-associated microbial pattern)이라고 부르는 병원균의 보존되어진 모티브인 미생물 구성 부분의 특정 패턴에 대한 세포반응을 조절한다.

[0016] TLR은 병원균-연관 분자 패턴의 선천적인 인식 및 후천적 면역에서 주요한 역할을 한다. TLR 중에서 주로 연구된 것이 TLR2 및 TLR4이다. TLR2는 주로 단핵구/마크로파지 및 다형핵의 세포(polymorphonuclear cell; PMN)에서 주로 존재하며 그람 양성 세균에 반응한다. 반면에 TLR4는 그람 음성 세균으로부터의 LPS(lipopolysaccharide)를 필요로 하며, 주로 단핵구/마크로파지, PMN, 장내 상피세포 및 태줄 정맥 내피 세포에 있다.

[0017] Dzieglewski 등이 출원한 WO 01/34688A1 (2000. 11. 7)에는 TLR2 특이적 항체가 기술되어 있으며, 상기 항체를 포함하여 TLR2 활성을 감소시키는 약학적 조성물을 이용하여 박테리아 감염을 막는 방법을 개시하고 있다.

[0018] Evelyn, A. KURT-JONES 등에 의한 미국특허출원공개번호 US 2005/0074823A1 (2004. 8. 20) 특허출원에서는 TLR2를 선택적으로 저해하는 항체가 개시되어 있다.

[0019] 그러나, 상기 TLR2의 섭식 조절과의 관련성은 아직 보고된 바 없다.

[0020] 이에, 본 발명자들은 섭식 장애를 진단하고 예방하며 치료할 수 있는 새로운 방법을 연구하던 중, 면역과 관련된 톨 유사 수용체2(TLR2)에서 염증을 유발하는 기작이 섭식 조절에 영향을 미치기 때문에 상기 TLR2를 이용하여 섭식 장애를 진단하거나 섭식 장애를 예방 또는 치료할 수 있음을 알아내고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0021] 따라서, 본 발명의 목적은 섭식 장애의 진단용 조성물, 진단용 키트 및 진단용 마이크로어레이를 제공하는 것이다.

[0022] 또한, 본 발명의 목적은 섭식 장애를 예방 또는 치료할 수 있는 물질을 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

[0023] 나아가, 본 발명의 목적은 섭식 장애의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0024] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 TLR2 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머를 포함하는 섭식 장애의 진단용 조성물을 제공한다.

[0025] 또한, 본 발명은 TLR2 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머를 포함하는 섭식 장애의 진단용 키트를 제공한다.

[0026] 또한, 본 발명은 TLR2 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머를 포함하는 섭식 장애의 진단용 마이크로어레이를 제공한다.

[0027] 또한, 본 발명은 (a) TLR2 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; (b) 상기 TLR2 유전자의 발현양, TLR2 단백질의 양 또는 TLR2 단백질의 활성을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계의 측정 결과, TLR2 유전자의 발현양, TLR2 단백질의 양 또는 TLR2 단백질의 활성이 감소되는 경우에 상기 시료는 섭식 장애의 치료 또는 예방용 물질로 판정하는 단계를 포함하는, 섭식 장애의 예방 또는 치료용 물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0028] 나아가, 본 발명은 TLR2 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열을 가지는 안티센스 또는 siRNA(small interference RNA) 올리고뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 섭식 장애의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0029] 또한, 본 발명은 TLR2 리간드 및 IKK 억제제를 유효성분으로 포함하는 이용하여 섭식 장애의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0030] 나아가, 본 발명은 TLR2 리간드 및 MC 수용체 대항물질(antagonist)을 유효성분으로 포함하는 이용하여 섭식 장애의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0031] 또한, 본 발명은 TLR2 리간드 및 COX 억제제를 유효성분으로 포함하는 이용하여 섭식 장애의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0032] 본 발명에 따르면, TLR2 유전자 발현의 활성화는 식욕을 억제하고, 체중을 감소시키는 효과가 있으며, TLR2 리간드와; IKK 억제제, MC 수용체 대항물질(antagonist) 및 COX 억제제 중 적어도 하나를 통하여 식욕을 조절할 수 있으므로, 섭식 장애, 특히 비만, 폭식증, 거식증 또는 과식증의 예방 및 치료에 유용하게 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 본 발명에 따른 일실시예에 의한 TLR2 Ligand의 처리 유무에 의한 식욕억제 효과를 나타내는 그래프이다.

도 2는 본 발명에 따른 일실시예에 의한 TLR2 Ligand의 처리 유무에 의한 체중변화를 나타내는 그래프이다.

도 3은 본 발명에 따른 일실시예에 의한 TLR2 활성화 및 IKK 억제제에 의한 식욕조절 효과를 나타내는 그래프이다.

도 4는 본 발명에 따른 일실시예에 의한 TLR2 활성화 및 IKK 억제제에 의한 체중변화를 나타내는 그래프이다.

도 5는 본 발명에 따른 일실시예에서 Rat(흰쥐)의 ARC 내에서 TLR2와 NeuN 및 α-MSH의 분포도를 면역조직염색 화학법을 통해 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

도 6은 TLR2의 작용제인 Pam3CSK4가 Rat(흰쥐) 동물모델을 대상으로 한 실험을 통해 음식 섭취 및 체중변화에 미치는 영향을 조사한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 TLR2의 작용제인 Pam3CSK4가 Rat(흰쥐) 동물모델을 대상으로 한 실험에서 활동성 및 체온변화에 미치는 영향을 조사한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 TLR2가 Rat(흰쥐)의 시상하부에서 염증성 사이토카인의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR, 웨스턴 블롯 및 면역조직염색화학법을 통해 수행한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 마우스 실험동물의 시상하부에서 Pam3CSK4에 의한 염증성 사이토카인 및 프로스타글란딘 합성 효소의 발현 수준을 RT-PCR을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 멜라노코르틴 수용체 3/4에 대한 길항제(SHU9119)가 Pam3CSK4으로 유도된 Rat(흰쥐) 동물모델에서 먹이섭취 및 체중변화에 미치는 영향을 조사한 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 TLR2 및 MyDD88 유전자가 결핍된 마우스 모델을 대상으로 Pam3CSK4을 주입한 후, 각 마우스의 먹이섭취 및 체중에 미치는 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 12는 TLR2 및 MyDD88 유전자가 결핍된 마우스 모델을 대상으로 Pam3CSK4을 주입한 후, 각 마우스의 뇌 시상하부에서 p-STAT3 및 SOCS3의 발현정도를 웨스턴블롯 및 PCR을 수행하여 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0035] 본 발명은 TLR2 유전자를 이용한 섭식 장애를 진단할 수 있는 방법을 제공한다는 점에 특징이 있으며, 구체적으로 TLR2 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머를 포함하는 섭식 장애의 진단용 조성물을 제공한다.

[0036] 앞서 종래기술에서도 기술한 바와 같이, 사람의 신체 건강에 악영향을 미치는 정도로 식이 행동에 장애가 있을 때, 이러한 상태를 섭식 장애라고 하며, 섭식 장애의 가장 일반적인 유형은 신경성 다식증과 신경성 식욕부진이 있다. 신경성 다식증("다식증")은 음식에 대해 반복적이고 끊임없는 욕구를 느끼고, 흔히 폭식과 이후 체중 증가를 방지하기 위한 부적절한 보상 행동이 뒤따르는 섭식 장애이다. 부적절한 보상 행동은 전형적으로 자기-유도 구토, 단식, 지나친 운동 및 하제와 이뇨제의 복용을 포함한다. 다식증 환자는 보통 3개월 이상, 1주일에 평균 2번 정도의 폭식과 부적절한 보상 행동을 나타낸다.

[0037] 반면, 신경성 식욕부진은 운동 스트레스가 동반될 수도 있는 자발적인 금식이 그 특징이다. 식욕부진인 사람

은 나이 및 키를 기준으로 한 최소 정상 수준 보다 낮은 체중을 유지한다.

- [0038] 본 명세서에서의 섭식 장애는 사람의 신체 건강에 악영향을 미치는 정도로 식이 행동에 장애가 있을 때, 이러한 상태 또는 이로부터 발생하는 질환을 모두 포함하여, 특별히 제한되지는 않으나, 비만, 폭식증, 거식증, 과식증 등을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 식욕부진에 의한 거식증일 수 있다.
- [0039] 본 발명에서는 이러한 섭식 장애를 진단할 수 있는 방법으로 TLR2 유전자 용도를 처음으로 규명하였는데, 즉, 본 발명의 일실시예에 따르면, TLR2에 의한 마우스의 식욕 및 체중변화를 측정한 결과, TLR2의 활성을 증가시키는 경우 마우스의 식욕이 억제되는 것으로 나타났으며(도 1 참조), 이에 따라 체중의 감소폭도 크게 일어났다(도 2 참조).
- [0040] 따라서 체내에서 TLR2 유전자의 발현 또는 활성이 증가되면, 식욕 감소 및 체중 감소 변화가 일어난다는 사실을 알 수 있었으며, 이러한 TLR2 유전자의 발현 또는 단백질의 발현량의 측정을 통해 거식증과 같은 섭식 장애를 진단할 수 있다는 것을 알 수 있었다.
- [0041] 한편, 본 발명의 진단용 조성물에 포함되는 상기 프로브 또는 프라이머는 TLR2 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 특징이 있으며, 본 발명에서 언급한 TLR2 유전자의 서열은 서열번호 1에 나타내었다.
- [0042] 상기 진단은 병리 상태를 확인하는 것을 나타내는 용어로서, 본 발명에서의 진단은 TLR2 유전자의 발현 유무 및 발현 정도를 확인하여 섭식 장애의 발병여부, 발진 및 경감 등을 판단하는 것도 포함하는 의미를 갖는다.
- [0043] 본 발명의 진단용 조성물은 본 발명의 TLR2 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머 이외에도 상기 프로브 또는 프라이머의 구조 또는 생리활성을 안정하게 유지시켜 주는 완충액 또는 반응액이 추가로 포함할 수 있으며, 안정성을 유지하기 위해, 분말 상태 또는 적절한 완충액에 용해된 상태로 제공될 수 있다.
- [0044] 또한, 본 발명의 진단용 조성물은 진단의 신속도 및 편리성을 높이기 위해, 적합한 담체 또는 지지체상에 고정된 다양한 방법을 이용하여 고정화된 상태로 제공될 수 있다(Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow & Lane; Cold Spring Harbor, 1988). 적합한 담체 또는 지지체의 예로는 아가로스, 셀룰로즈, 니트로셀룰로즈, 텍스트란, 세파텍스, 세파로즈, 리포솜, 카복시메틸 셀룰로즈, 폴리아크릴아미드, 폴리스테린, 반려암, 여과지, 이온교환 수지, 플라스틱 필름, 플라스틱 튜브, 유리, 폴리아민-메틸 비닐-에테르-말레산 공중합체, 아미노산 공중합체, 에틸렌-말레산 공중합체, 나일론, 컵, 플랫 팩(flat packs) 등이 포함될 수 있다. 그 외의 다른 고체 기질로는 세포 배양 플레이트, ELISA 플레이트, 튜브 및 폴리머성 막이 있다. 상기 지지체는 임의의 가능한 형태, 예를 들어 구형(비드), 원통형(시험관 또는 웰 내면), 평면형(시트, 시험 스트립)을 가질 수 있다.
- [0045] 본 명세서에서, 상보적(complementary)이라는 용어는 어떤 특정한 혼성화 또는 어닐링 조건 하에서 본 발명의 TLR2 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 선택적으로 혼성화할 수 있을 정도의 상보성을 갖는 것을 의미한다. 따라서 상보적이라는 용어는 완전 상보적(perfectly complementary)과는 다른 의미를 가지며, 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 TLR2 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 선택적으로 혼성화할 수 있을 정도이면, 하나 또는 그 이상의 미스매치(mismatch) 염기서열을 가질 수 있다.
- [0046] 본 명세서에서, 프로브라는 용어는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타겟 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것을 말한다. 본 발명에 따른 프로브는 단일쇄일 수 있으며, 바람직하게는 올리고디옥시리보뉴클레오타이드일 수 있다. 본 발명의 프로브는 자연 dNMP (즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 뉴클레오타이드 유사체 또는 유도체를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 프로브는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 프로브는 골격 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 펩타이드 핵산 (PNA) (M. Egholm et al., Nature, 365:566-568(1993)), 포스포로티오에이트 DNA, 포스포로디티오에이트 DNA, 포스포로아미데이트 DNA, 아마이드-연결된 DNA, MMI-연결된 DNA, 2'-O-메틸 RNA, 알파-DNA 및 메틸포스포네이트 DNA, 당 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 2'-O-메틸 RNA, 2'-플루오로 RNA, 2'-아미노 RNA, 2'-O-알킬 DNA, 2'-O-알릴 DNA, 2'-O-알카이닐 DNA, 핵소스 DNA, 피라노실 RNA 및 안히드로핵시톨 DNA, 및 염기 변형을 갖는 뉴클레오타이드 예컨대, C-5 치환된 피리미딘(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 에틸-, 프로피닐-, 알카이닐-, 티아졸릴-, 이미다졸릴-, 피리딜- 포함), C-7 치환기를 갖는 7-데아자퓨린 (치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-,

에틸-, 비닐-, 포르밀-, 알카이닐-, 알켄일-, 티아졸릴-, 이미다졸릴-, 피리딜-), 이노신 및 디아미노퓨린을 포함할 수 있다.

[0047] 본 명세서에서, 프라이머란 용어는 적합한 온도 및 적합한 완충액 내에서 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오시드 트리포스페이트 및 중합반응 효소) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 요소, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변화가 있을 수 있다. 또한, 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서의 프라이머는 주형인 TLR2 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 또한, 본 발명에 따른 프라이머는 유전자 증폭 반응에 이용될 수 있는 것이 바람직하다. 상기 증폭 반응은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 말하며, 이러한 유전자 증폭 반응들에 대해서는 당업계에 잘 알려져 있고, 예컨대, 중합효소 연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR), 리가아제 연쇄반응(LCR), 전자 중재 증폭(TMA), 핵산 염기서열 기판 증폭(NASBA) 등이 포함될 수 있다.

[0048] 또한, 본 발명은 TLR2 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머를 포함하는 섭식 장애의 진단용 키트를 제공한다.

[0049] 상기 진단용 키트에 포함되는 프로브 또는 프라이머용어에 대해서는 앞서 기술된 바와 같으며, 바람직하게 서열번호 1의 염기서열에 상보적인 서열을 갖는 것을 사용할 수 있다. 본 발명의 섭식 장애 진단용 키트가 단일 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소(예컨대, *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermisflavus*, *Thermococcus litoralis* 또는 *Pyrococcus furiosus*(Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있으며, 본 발명의 섭식 장애 진단용 키트가 면역 분석에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, 이차항체 및 표지의 기질을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징(packaging) 또는 컴파트먼트(compartment)로 제작될 수 있다.

[0050] 나아가, 본 발명은 TLR2 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머를 포함하는 섭식 장애의 진단용 마이크로어레이를 제공한다.

[0051] 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, 상기 프로브 또는 프라이머는 혼성화 어레이 요소(hybridizable arrayelement)로서 이용되며, 기체(substrate) 상에 고정화된다. 바람직한 기체는 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 겔, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함할 수 있다. 상기 혼성화 어레이 요소는 상기 기체 상에 배열되고 고정화되며, 이와 같은 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 상기 혼성화 어레이 요소는 에폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기체에 결합될 수 있다.

[0052] 한편, 본 발명의 마이크로어레이에 적용되는 시료 DNA는 표지(labeling)되고, 마이크로어레이상의 어레이 요소와 혼성화 될 수 있다. 혼성화 조건은 다양할 수 있으며, 혼성화 정도의 검출 및 분석은 표지 물질에 따라 다양하게 실시될 수 있다.

[0053] 또한, 본 발명은 (a) TLR2 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; (b) 상기 TLR2 유전자의 발현량, TLR2 단백질의 양 또는 TLR2 단백질의 활성을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계의 측정 결과, TLR2 유전자의 발현량, TLR2 단백질의 양 또는 TLR2 단백질의 활성이 감소되는 경우에 상기 시료는 섭식 장애의 치료 또는 예방용 물질로 판정하는 단계를 포함하는, 섭식 장애의 예방 또는 치료용 물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0054] 본 발명의 방법에 따르면, 먼저 TLR2 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시킬 수 있다. 여기서 상기 시료는 TLR2 유전자의 발현량, TLR2 단백질의 양 또는 TLR2 단백질의 활성에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시료는 화학물질, 뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, siRNA(small interference RNA) 및 천연물 추출물을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 이후, 시료가 처리된 세포에서 TLR2 유전자의 발현량, TLR2 단백질의 양 또는 TLR2 단백질의 활성을 측정할 수 있으며, 측정 결과, TLR2 유전자의 발현량, TLR2 단백질의 양 또는 TLR2 단백질의 활성이

감소되는 것이 측정되면 상기 시료는 섭식 장애의 치료 또는 예방용 물질로 판정될 수 있다.

[0055] 상기에서 TLR2 유전자의 발현량, TLR2 단백질의 양 또는 TLR2 단백질의 활성을 측정하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 수행될 수 있는데, 예를 들면, 이에 제한되지는 않으나, 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), 웨스턴 블랏, 노던 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA:radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion) 및 면역침전분석법(immunoprecipitation assay) 등을 이용하여 수행할 수 있다.

[0056] 나아가, 본 발명은 TLR2 유전자의 발현을 억제하거나 또는 TLR2 단백질의 발현 및 활성을 감소시키는 물질을 유효성분으로 포함하는 섭식 장애의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0057] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 화합물질, 뉴클레오타이드, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA(small interference RNA) 올리고뉴클레오타이드 또는 천연물 추출물을 유효성분으로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 본 발명의 TLR2 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열을 가지는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 siRNA(small interference RNA) 올리고뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함할 수 있다.

[0058] 본 발명에서 "안티센스 올리고뉴클레오타이드"란 용어는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다. 본 발명의 안티센스 서열은 TLR2 mRNA에 상보적이고 TLR2 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하며, TLR2 mRNA의 번역, 세포질내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다.

[0059] 또한, 상기 안티센스 핵산은 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al., Curr Opin Struct Biol., 5(3):343-55(1995)). 핵산 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당간 결합 등으로 변형될 수 있다. 또한, 안티센스 핵산은 하나 이상의 치환된 당 모이어티(sugar moiety)를 포함할 수 있다. 안티센스 핵산은 변형된 염기를 포함할 수 있다. 변형된 염기에는 하이포크잔틴, 6-메틸아데닌, 5-메틸피리미딘(특히 5-메틸시토신), 5-하이드록시메틸시토신(HMC), 글리코실 HMC, 젠토비오실 HMC, 2-아미노아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-데아자구아닌, N6(6-아미노헥실)아데닌, 2,6-디아미노퓨린 등이 있다. 또한, 본 발명의 안티센스 핵산은 상기 안티센스 핵산의 활성 및 세포 흡착성을 향상시키는 하나 이상의 모이어티(moiety) 또는 컨쥬게이트(conjugate)와 화학적으로 결합될 수 있다. 콜레스테롤 모이어티, 콜레스테릴 모이어티, 콜릭산, 티오에테르, 티오펀, 지방성 사슬, 인지질, 폴리아민, 폴리에틸렌 글리콜 사슬, 아다만탄 아세트산, 팔미틸 모이어티, 옥타데실아민, 핵심아미노-카르보닐-옥시콜레스테롤 모이어티 등의 지용성 모이어티 등이 있고 이에 제한되지는 않는다. 지용성 모이어티를 포함하는 올리고뉴클레오타이드와 제조 방법은 본 발명의 기술 분야에서 이미 잘 알려져 있다(미국특허 제5,138,045호, 제5,218,105호 및 제5,459,255호). 상기 변형된 핵산은 뉴클레오사이드에 대한 안정성을 증가시키고 안티센스 핵산과 표적 mRNA와의 결합 친화력을 증가시킬 수 있다.

[0060] 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 통상의 방법으로 시험관에서 합성되어 생체 내로 투여하거나 생체 내에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 합성되도록 할 수 있다. 시험관에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 일에는 RNA 중합효소 I를 이용하는 것이다. 생체 내에서 안티센스 RNA가 합성되도록 하는 한 가지 예는 인식부위(MCS)의 기원이 반대 방향에 있는 벡터를 사용하여 안티센스 RNA가 전사되도록 하는 것이다. 이런 안티센스 RNA는 서열 내에 번역 중지 코돈이 존재하도록 하여 펩타이드 서열로 번역되지 않도록 하는 것이 바람직하다.

[0061] 본 발명에서 "siRNA" 용어는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱을 매개할 수 있는 핵산 분자를 의미한다(국제공개 특허번호 00/44895, 01/36646, 99/32619, 01/29058, 99/07409 및 00/44914 참조). siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운(knock-down) 방법으로서 또는 유전자치료 방법으로 제공된다.

[0062] 본 발명의 siRNA 분자는, 센스 가닥(TLR2 mRNA 서열에 상응하는 서열)과 안티센스 가닥(TLR2 mRNA 서열에 상보적인 서열)이 서로 반대쪽에 위치하여 이중체를 이루는 구조를 가질 수 있으며, 또한, 본 발명의 siRNA 분자는 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥을 가지는 단일쇄 구조를 가질 수 있다. 나아가 siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 별지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분

이 포함될 수 있다. 또한, siRNA 말단 구조는 TLR2 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하고, 점착 말단 구조는 3'-말단 돌출 구조와 5'-말단 돌출 구조 모두 가능하다.

[0063] 또한, 본 발명의 siRNA 분자는 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥 사이에 짧은 뉴클레오티드 서열이 삽입된 형태를 가질 수 있으며, 이 경우 뉴클레오티드 서열의 발현에 의해 형성된 siRNA 분자는 분자내 혼성화에 의하여 헤어핀 구조를 형성하게 되며, 전체적으로는 스템-앤드-루프 구조를 형성하게 된다. 이 스템-앤드-루프 구조는 인 비트로 또는 인 비보에서 프로세싱되어 RNAi를 매개할 수 있는 활성의 siRNA 분자를 생성한다.

[0064] 나아가, 본 발명에 따른 TLR2 유전자의 발현을 억제하거나 TLR2 단백질의 발현 및 활성을 감소시키는 물질 또는 TLR2에 의해 활성화된 염증반응관련 signal을 감소시키는 물질로서, 상기 화합물질로는 IKK 억제제, MC 수용체 대항물질(antagonist), COX 억제제 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0065] 본 발명의 일실시예에 따르면, TLR2 리간드에 의해 TLR2가 활성화된 마우스는 식욕이 억제되었으나, IKK 억제제, MC 수용체 대항물질(antagonist) 및 COX 억제제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 억제제를 함께 투여 시 식욕 억제가 개선되는 것으로 나타났으며(도 3, 실시예 3, 5, 6 참조), 체중 감소 효과 역시 개선되는 것으로 나타났다(도 4 참조).

[0066] 더불어 본 발명자들은 TLR2의 조절 이상으로 유발되는 섭식 장애의 원인을 보다 구체적으로 확인하기 위해, 본 발명의 일실시예에서는 TLR2의 작용을 활성화시킬 수 있는 작용제(agonist)를 쥐의 측뇌실에 주입하고 면역조직화학염색법을 통해 TLR2의 분포 및 위치를 분석한 결과, 뇌의 ARC 지역에서 뇌 신경세포 마커인 NeuN과 함께 위치하고 있는 것으로 나타났다(도 5 참조).

[0067] 따라서 TLR2가 뇌의 신경조직에서 식욕 조절 메커니즘에 영향을 줄 수 있다는 것을 알 수 있었다.

[0068] 뿐만 아니라, TLR2의 자극을 활성화시켰을 경우, 뇌의 시상하부에서 염증성 사이토카인의 발현에 미치는 영향을 조사한 결과, 염증성사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 mRNA의 발현을 촉진시키는 작용을 하는 것으로 나타났고, arachidonic acid를 프로스타글란딘으로 전환시켜주는 rate-limiting 효소인 cyclooxygenase2(COX2)와 프로스타글란딘 E2 (PGE2)의 생합성(biosynthesis) 마지막 단계를 특이적으로 촉매 하는 효소인 microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES1)의 mRNA 수준도 증가시키는 것을 알 수 있었으며, 인산화된 NF- κ B p65 (Phosphorylated NF- κ B p65, P-p65)도 증가되는 것으로 나타났다(도 8 및 도 9 참조).

[0069] 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 TLR2가 뇌에서 염증성 인자(또는 조절자)의 합성을 활성화시켜 염증성 반응을 유도하는 작용을 한다는 것을 알 수 있었다.

[0070] 나아가, 본 발명자들은 이러한 실험 결과를 토대로 TLR2의 발현 또는 활성을 억제할 경우, 식욕 감소 작용에 따른 섭식 장애를 예방 및 치료할 수 있다는 사실을 예측할 수 있었다.

[0071] 따라서 TLR 리간드와; IKK 억제제, MC 수용체 대항물질(antagonist) 및 COX 억제제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 억제제를 함께 사용하면 섭식 장애, 특히 비만, 폭식증, 거식증 또는 과식증을 예방 및 치료할 수 있다.

[0072] 한편, 멜라노코르틴(melanocortin)은 동물 및 사람에 존재하는 천연 펩티드 호르몬으로서 MC 수용체에 결합하여 이 수용체를 자극하는 것으로 알려져 있고, 멜라노코르틴의 예로는 α -MSH(멜라닌 세포 자극 호르몬), β -MSH, γ -MSH, ACTH(부신 피질 자극 호르몬) 및 그의 펩티드 단편이 있다. MSH는 주변 색소 침착을 조절하는 작용이 주로 알려져 있으며, 반면 ACTH는 스테로이드신생(steroidogenesis)을 유도하는 것으로 알려져 있다. 또한, 멜라노코르틴은 다수의 다른 생리학적 효과도 매개하는데, 동기 유발, 학습, 기억, 행동, 염증, 체온, 통증 인지, 혈압, 심박수, 혈관 긴장, 나트륨 배뇨 향진, 뇌혈류, 신경 성장 및 복구, 태반 발달, 알도스테론 합성 및 방출, 티록신 방출, 정자 발생, 난소 웨이트, 프로락틴 및 FSH 분비작용에 영향을 주며, 여성에 있어서는 자궁 출혈, 피지 및 페로몬 분비, 성적인 행동, 음경 발기, 혈당치, 자궁내 태아 성장, 식품에 의해 동기 유발되는(food motivated) 행동과, 분만과 관련된 기타 상황에 영향을 주는 것으로 보고되어 있다.

[0073] 또한, 멜라노코르틴의 수용체로서 MC-4 및 MC-3 수용체가 있는데, 둘 모두는 섭식 행동의 조절과 연관된 뇌 영역인 시상하부에 편재되어 있다. MC-3/MC-4 수용체에 대하여 선택성을 나타내는 화합물은 뇌실내 및 말초주입 후 식품 섭취를 변경시키는 것으로 밝혀져 있는데, 구체적으로는 작동제는 섭식을 감소시키는 것으로 밝혀졌으며 반면 길항제는 섭식을 증가시키는 것으로 밝혀졌다. 따라서 MC-4 및 MC-3 수용체는 포유류의 체중

조절 제어에 중요한 역할을 한다.

[0074] 이에 본 발명자들은 본 발명의 TLR2에 의한 식욕 감소가 멜라노코르틴 수용체의 신호전달과도 관련성이 있는지 확인하기 위해, 본 발명의 실시예에서는 TLR2의 작용제를 처리한 군과 멜라노코르틴 수용체의 길항제를 처리한 군 및 TLR2의 작용제와 멜라노코르틴 수용체의 길항제를 모두 처리한 군을 대상으로 음식 섭취와 체중 변화를 조사하였는데, 그 결과 TLR2의 작용제에 의해 감소된 음식 섭취 감소와 체중 감소를 멜라노코르틴 수용체의 길항제가 회복시키는 것으로 나타났다(도 10 참조).

[0075] 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 TLR2의 식욕 감소 작용은 멜라노코르틴 수용체의 기작에 의해 조절되며, 멜라노코르틴 수용체의 길항제(antagonist)에 의해 TLR2의 식욕 감소효과가 억제된다는 사실을 알 수 있었다.

[0076] 상기 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 약학적으로 허용되는 담체로는 예를 들면, 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등과 같은 경구 투여용 담체 및 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등과 같은 비경구 투여용 담체 등이 있으며 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995). 본 발명에 따른 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 적합한 형태로 제형화 될 수 있다. 즉, 본 발명의 약학적 조성물은 공지의 방법에 따라 다양한 비경구 또는 경구 투여용 형태로 제조될 수 있으며, 비경구 투여용 제형의 대표적인 것으로는 주사용 제형으로 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하다. 주사용 제형은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제를 사용하여 당업계에 공지된 기술에 따라 제조할 수 있다. 예를 들면, 각 성분을 식염수 또는 완충액에 용해시켜 주사용으로 제형화될 수 있다. 또한, 경구투여용 제형으로는, 이에 한정되지는 않으나, 분말, 과립, 정제, 환약 및 캡슐 등이 있다.

[0077] 상기와 같은 방법으로 제형화된 약학적 조성물은 유효량으로 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다. 상기에서 '유효량'이란 환자에게 투여하였을 때, 예방 또는 치료 효과를 나타내는 양을 말한다. 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여량은 투여 경로, 투여 대상, 연령, 성별, 체중, 개인차 및 질병 상태에 따라 적절히 선택할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있으나, 바람직하게는 1~10000/체중kg/day, 더욱 바람직하게는 10~1000/체중kg /day의 유효용량으로 하루에 수회 반복 투여될 수 있다.

[0078] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0079] <실시예 1>

[0080] TLR2에 의한 식욕억제 효과 측정

[0081] C57BL/6J 마우스를 정상군과 TLR2 유전자 결손(KO)군으로 나누어 헤테로다имер TLR1/TLR2 리간드인 자이모산(zymosan)(20mg/kg)을 복강 내(intraperitoneal, IP) 주사하여 TLR2를 활성화하였다. 이후 24시간 동안 정상군과 TLR2 유전자 결손군의 마우스의 사료 섭취량을 측정하였다. 군당 5마리를 대상으로 실험하였으며, 사료 섭취량은 평균값으로 측정하였다. 측정 결과를 표 1 및 도 1에 나타내었다.

표 1

사료섭취량 비교분석

구분	사료 섭취량 (g)
C57BL/6J (대조군)	2.72

C57BL/6J (TLR2 활성군)	0.62
TLR2 KO (대조군)	3.03
TLR2 KO (TLR2 활성군)	1.52

[0083] 그 결과, 표 1 및 도 1에 나타난 바와 같이, TLR2 유전자가 결손된 마우스군에서는 사료 섭취량이 1.52g인 반면, TLR2 유전자가 있는 정상군에서는 TLR2 리간드인 자이모산으로 TLR2 활성화시 사료 섭취량이 0.62g으로 감소하는 것으로 나타났다.

[0084] 따라서, TLR2 활성화에 의해 식욕 억제 효과가 나타남을 알 수 있으므로, 섭식 장애 또는 대사성 질환, 특히 비만, 폭식증, 거식증 또는 과식증의 예방 및 치료와 함께 이들 질환의 진단에 유용하게 적용할 수 있다.

[0085] <실시예 2>

[0086] TLR2에 의한 마우스의 체중변화 측정

[0087] C57BL/6J 마우스를 정상군과 TLR2 유전자 결손(KO)군으로 나누어 체중을 측정한 후, 헤테로다имер TLR1/TLR2 리간드인 자이모산(zymosan)(20mg/kg)을 복강 내(intraperitoneal, IP) 주사하여 TLR2를 활성화하였다. 이후 24시간 동안 사료를 섭취시킨 후에 정상군과 TLR2 유전자 결손군의 마우스의 체중을 측정하여 체중 변화를 측정하였다. 군당 5마리를 대상으로 실험하였다. 측정 결과를 표 2 및 도 2에 나타내었다.

표 2

[0088] 체중변화분석

구분	마우스 체중변화 (g)
C57BL/6J (대조군)	0.12
C57BL/6J (TLR2 활성군)	-1.77
TLR2 KO (대조군)	0.4
TLR2 KO (TLR2 활성군)	- 0.62

[0089] 표 2 및 도 2에 나타난 바와 같이, TLR2 유전자가 결손된 마우스군에서는 체중이 0.62 g 감소된 반면, TLR2 유전자가 있는 정상군에서는 TLR2 리간드인 자이모산으로 TLR2 활성화시 체중이 1.77 g까지 감소하는 것으로 나타났다.

[0090] 따라서, TLR2 활성화에 의해 체중이 큰 폭으로 감소됨을 알 수 있으므로, 섭식 장애, 특히 비만, 폭식증, 거식증 또는 과식증의 예방 및 치료에 유용하게 적용할 수 있다.

[0091] <실시예 3>

[0092] TLR2 리간드 및 IKK 억제제에 의한 식욕 조절 효과 측정

[0093] C57BL/6J 마우스를 대조군과 TLR2 활성군, IKK 억제제+TLR2 활성(zymosan) 처리군으로 나누어 헤테로다имер TLR2/TLR6 리간드인 FSL-1(10 ng/2 μ l)을 뇌혈관 내(intracerebroventricular, ICV)에 주사하여 TLR2를 활성화하였다. 이후 24시간 동안 대조군과 TLR2 활성군, IKK 억제제+TLR2 활성(zymosan) 처리군 마우스의 사료 섭취량을 측정하였다. 군당 5마리를 대상으로 실험하였으며, 사료 섭취량은 평균값으로 측정하였다. 측정 결과를 표 3 및 도 3에 나타내었다.

표 3

[0094] 식욕조절효과 결과

구분	사료 섭취량 (g)
정상군 (대조군)	4.4
정상군 (TLR2 활성)	0.8
정상군(IKK 억제제 처리군)	2.1

[0095] 표 3 및 도 3에 나타난 바와 같이, 대조군에서는 사료 섭취량이 4.4g인 반면, TLR2 유전자가 있는 정상군에서는 TLR2 리간드인 자이모산으로 TLR2 활성화 시 사료 섭취량이 0.8g으로 감소하였으나, IKK 억제제를 투여한 군에서는 사료 섭취량이 2.1g으로서 식욕억제가 개선되는 것으로 나타났다.

[0096] 따라서, TLR2 리간드 및 IKK 억제제를 통하여 식욕을 조절할 수 있으므로, 섭식 장애, 특히 비만, 폭식증, 거식증 또는 과식증의 예방 및 치료에 유용하게 적용할 수 있다.

[0097] <실시예 4>

[0098] TLR2 리간드 및 IKK 억제제에 의한 체중변화 측정

[0099] C57BL/6J 마우스를 대조군과 TLR2 활성화군, IKK 억제제+TLR2 활성화(zymosan) 처리군으로 나누어 체중을 측정 한 후, IKK 억제제 처리군에는 IKK 억제제로서 (I κ B Kinase inhibitor peptide)을 복강내 주사하였다. 이후, 20분 뒤에 헥세라다이머 TLR2/TLR6 리간드인 FSL-1(10 ng/2 μ l)을 뇌혈관 내(intracerebroventricular, ICV)에 주사하여 TLR2를 활성화하였다. 이후 24시간 동안 사료를 섭취시킨 후, C57BL/6J 마우스를 대조군과 TLR2 활성화군, IKK 억제제+TLR2 활성화(zymosan) 처리군의 마우스의 체중변화를 측정하였다. 군당 5마리를 대상으로 실험하였으며, 사료 섭취량은 평균값으로 측정하였다. 측정 결과를 표 4 및 도 4에 나타내었다.

표 4

[0100] 체중변화

구분	마우스 체중변화 (g)
정상군 (대조군)	+ 0.3
정상군 (TLR2 활성화)	- 3.7
정상군(IKK 억제제 처리군)	- 2.1

[0101] 표 4 및 도 4에 나타난 바와 같이, 대조군에서는 체중이 0.3g 증가된 반면, TLR2 유전자가 있는 정상군에서는 TLR2 리간드인 FSL-1으로 TLR2 활성화 시 체중이 3.7g까지 감소하는 것으로 나타났으나, IKK 억제제를 함께 투여한 군에서는 체중변화가 -2.1g으로써, 체중감소가 개선되는 것으로 나타났다.

[0102] 따라서, TLR2 리간드 및 IKK 억제제를 통하여 체중감소를 조절할 수 있으므로, 섭식 장애, 특히 비만, 폭식증, 거식증 또는 과식증의 예방 및 치료에 유용하게 적용할 수 있다.

[0103] <실시예 5>

[0104] TLR2 리간드 및 MC 수용체 대항물질(antagonist)에 의한 식욕 조절 효과 측정

[0105] IKK 억제제 대신 MC 수용체 대항물질(antagonist)(SHU9119)를 사용하는 것을 제외하고는 실시예 3과 동일한 방법으로 수행하여 사료 섭취량을 측정한 결과, MC 수용체 억제제 처리군 또한 IKK 억제제 처리군과 마찬가지로 TLR2 활성화에 의한 식욕 억제가 개선되는 것으로 나타났다.

[0106] <실시예 6>

[0107] TLR2 리간드 및 COX 억제제에 의한 식욕 조절 효과 측정

[0108] IKK 억제제 대신 COX 억제제(indomethacin)를 사용하는 것을 제외하고는 실시예 3과 동일한 방법으로 수행하여 사료 섭취량을 측정한 결과, MC 수용체 대항물질(antagonist) 처리군 또한 IKK 억제제 처리군과 마찬가지로 TLR2 활성화에 의한 식욕 억제가 개선되는 것으로 나타났다.

[0109] 따라서, TLR2 리간드와; IKK 억제제, MC 수용체 대항물질(antagonist) 및 COX 억제제 중 적어도 하나를 통하여 식욕을 조절할 수 있으므로, 섭식 장애, 특히 비만, 폭식증, 거식증 또는 과식증의 예방 및 치료에 유용하게 적용할 수 있다.

[0110] <실시예 7>

[0111] 면역조직화학염색법에 의한 뇌에서의 TLR2 분포 확인

[0112] 본 발명자들은 뇌에서 TLR2의 분포 정도를 확인하기 위해 면역조직화학염색법을 수행하였는데, 먼저 이러한 실험을 위한 동물모델로서, 8주령의 SD(Sprague-Dawley) rat(흰쥐)와 C57BL/6 mice(생쥐)(Hyo Chang Bioscience, Tae-Ku, Korea) 및 TLR2와 MyD88이 유전적으로 결핍된 생쥐(울산대학교 SPF 사육실)를 사용하였고, 동물실험은 울산대학교의 임상시험심사위원회(The Institutional Review Board of University of Ulsan)와 미국국립보건원의 실험동물사용과 주의 지침서(National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)에 따라 수행되었다. 흰쥐와 생쥐들은 명암이 12시간 주기로 조절된 광주기(photoperiod)와 23~25° C의 온도로 유지된 사육실에서 관리되었고, 사료와 물은 제한적으로 공급되지 않은 상태에서 사육시킨 후, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0113] 면역조직화학염색법의 수행은, 먼저 TLR2의 agonist인 Pam3C나4를 흰쥐의 측뇌실로 주입한 후 복강에 2.5% 트리브로모에탄올(250mg/kg B.W., sigma-Aldrich)을 주입하여 마취시켰다. 개복 후 심장으로 0.1M PB와 3% 파라포름알데히드를 차례로 주입하여 관류고정을 진행하였다. 이후 뇌를 적출하고 20% 수크로스 용액에 담근 다음, 12시간이 경과한 후에 O.C.T compound (Tissue-Tek)에 급속 냉동한 후 보관하였다. 동결된 뇌는 30 μm로 박절하여 poly-L-lysine으로 코팅된 슬라이드 글라스에서 하룻밤 동안 건조시켜 고정시켰다. 항원성 회복을 위하여 조직을 96°C 시트레이트 버퍼에 30분 동안 처리한 다음, 0.1M PB에 30분간 처리하였다. 또한, 내제적 퍼옥시다제(endogenous peroxidase)의 차단을 위해 3% H₂O₂에 30분 처리 한 다음, 배경 염색을 줄이기 위해 블로킹 용액(4% non fat dry milk (Difco), 0.3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in 0.1M PB)에 30분 동안 반응시켰다. 1차 항체와 2차 항체를 사용하여 반응시킨 후 형광현미경을 이용하여 관찰하였다.

[0114] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, TLR2는 신경세포 마커인자인 NeuN과 함께 염색되는 것을 알 수 있었고(도 5a 참조), POMC 뉴론에도 위치하는 것으로 확인되었다(도 5b 참조). 또한, TLR2 agonist인 Pam3CSK4에 의해 TLR2가 유도되는 것을 확인할 수 있었다(도 5c 및 5d 참조).

[0115]

[0116] <실시예 8>

[0117] TLR2 작용제(agonist)에 따른 식욕, 체중, 활동성 및 체온 조절 효과분석

[0118] TLR2의 작용제 처리에 따른 TLR2의 활성이 마우스 동물모델을 대상으로 한 실험에서 식욕, 체중, 활동성 및 체온조절 등 에너지 항상성(energy homeostasis)에 어떠한 영향을 주는지 확인하기 위한 실험을 수행하였는데, 상기 실시예 7에서 준비한 마우스 동물 모델을 대상으로 TLR2의 agonist인 Pam3CSK4를 흰쥐의 측뇌실로 주입한 후, 24시간이 경과한 다음, 마우스의 식욕 정도와 체중변화를 측정하였다. 이때 대조군으로는 정상 마우스를 사용하였다.

[0119] 그 결과, 대조군에 비해 Pam3CSK4 처리군의 24시간 먹이 섭취량이 상당히 감소하는 것으로 나타났으며(도 6a 참조), Pam3CSK4의 anorectic effect가 체중 변화에도 영향을 미치는지 확인한 결과, 대조군은 평균 +4.8 g의 체중 변화를 보였고, Pam3CSK4 처리 군에서는 평균 -19 g의 체중 감소 변화를 보였다. 또한, 흥미롭게도, Pam3CSK4에 의한 체중 감소는 Pam3CSK4 처리군과 동일한 먹이 섭취량을 처리한 Pair-fed 군 보다 상당히 큰 것을 확인할 수 있었다(도 6b 참조). 이러한 결과는 측뇌실에 주입한 Pam3CSK4가 먹이 섭취뿐만 아니라 에너지 소비에도 영향을 미칠 수 있다는 것을 보여준다.

[0120] 또한, 활동성 및 체온 조절에 미치는 영향을 확인하기 위해, TLR2의 agonist인 Pam3C나4를 흰쥐의 측뇌실로 주입한 후, 복강에 2.5% 트리브로모에탄올(250mg/kg B.W., sigma-Aldrich)을 주입하여 마취시킨 후, 흰 쥐의 복강에 biotelemetry transmitters(Mini-Mitter, Bend, OR)를 삽입하여 체온과 운동 활성도를 측정하였다. 삽입된 transmitter에서 측정되어 전송되는 체온 정보는 각 cage 아래에 위치한 receiver(model RA 1000; Mini-Mitter)로 10분 간격으로 측정되었다. 운동 활성도는 삽입된 transmitter의 위치변화를 10분 간격으로 수집하여 측정하였다. 수집된 정보는 결과 분석 프로그램 (Vital View; Mini-Mitter)을 이용하여 분석하였다.

- [0121] 그 결과, 활동기인 밤 주기(dark period)에는 대조군에 비해 Pam3CSK4를 처리한 군이 상당히 낮은 운동 활성도를 보였고, 대조군의 체온은 낮 주기 동안에는 낮고 밤 주기 동안에는 상승하는 일주기(circadian) 변화를 나타내었다. 또한, 밤 주기가 시작되기 3시간 전에 Pam3CSK4를 주입한 흰 쥐는 체온이 증가하는 것을 확인하였고, 주입 6시간 쯤 최고조를 나타내는 것을 알 수 있었다(도 7a 및 7b 참조).
- [0122] <실시예 9>
- [0123] TLR2의 염증반응 관련 인자에 미치는 영향 분석
- [0124] 뇌에서 TLR2가 질병 반응(sickness response)을 조절하는지 알아보기 위해, 합성 lipopeptide인 Pam3CSK4(Pam3Cys-Ser-Lys4, 각각 1.5 µg/3 µl, 200ng/2 µl EMC microcollections, Tuebingen, Germany)를 TLR2 작용제(agonist)로 사용하여, 앞서 기술한 실시예에 기재된 방법과 동일하게 Pam3CSK4를 주입한 후, 90분 또는 3시간 후에 실험동물을 치사시킨 다음, 시상하부를 적출한 후 RNA와 단백질을 추출한 후, 염증성 사이토카인들의 발현 여부를 RT-PCR과 웨스턴블롯을 수행하여 확인하였다.
- [0125] RNA의 추출을 위해, 먼저 준비된 동물모델의 시상하부 조직에 TRI 시약(Bio science) 1 ml을 첨가하고 균질기(homogenizer)를 사용하여 조직을 용해시켰다. 이후 4℃에서 5분간 둔 방치한 다음 클로로포름(sigma) 200 µl를 처리하고 15초간 볼텍싱한 후, 상온에서 10분간 둔 뒤 14000rpm 으로 20분간 원심 분리하여 RNA, DNA 및 단백질 층을 분리시켰다. 이후 RNA를 포함한 투명한 상층액은 새로운 마이크로 튜브로 옮기고 이소프로판올(MERCK) 500 µl를 첨가하여 볼텍싱한 뒤, -80℃ 에서 밤새도록 방치한 후, 14000rpm으로 20분간 원심 분리하여 RNA를 침전시켰다. 상층액을 모두 제거하고 펠렛에 70% 에탄올 500 µl를 넣고 14000rpm으로 5분간 세척한 뒤, 상층액을 제거하였다. 이후 마이크로 튜브를 스핀 다운하여 상층액을 완전히 제거한
- [0126] 후, 공기 중에서 건조시킨 다음, DEPC가 처리된 물 20 µl 를 넣어 RNA를 녹여 분리 하였다. 추출한 RNA는 spectrophotometer로 농도를 측정하였다.
- [0127] cDNA 합성은 앞서 추출한 RNA 1 µg 에 oligo dT (QIAGEN) 1 µl 를 넣고 DEPC 처리 물로 9 µl를 맞춘 다음, 혼합액을 65℃ water bath에서 10분간 변성시킨 다음, 곧 바로 얼음에 넣어서 10분간 식히고, 5X M-MLV 반응 버퍼(Promega) 4 µl, 100 mM DTT (Promega) 2 µl, 2.5 mM dNTP (TaKaRa) 4 µl, M-MLV Reverse Transcription (Promega) 1 µl를 넣은 후 37℃ water bath에서 2시간 동안 cDNA를 합성시켰다. 이후 합성된 cDNA를 주형으로 한 RT-PCR 반응은 다음과 같이 수행하였는데, 합성한 cDNA 1 µl를 주형으로 하기 표에 기재된 프라이머들을 이용하여 PCR을 수행하였다. 5 pmol/µl 농도의 정방향과 역방향 프라이머를 각각 1 µl 첨가한 후, 2x EF PCR Pre-mix (SOLGENT)를 사용하여 전체 양을 10 µl로 맞춘 후 PCR을 수행하였는데, PCR 조건은 94℃ 에서 4분 동안 pre-denaturation, 94℃ 에서 40 초 동안 denaturation, 각 프라이머의 적정 온도에 따라 40초 동안 어닐링, 72℃ 에서 40초 동안 연장 반응하는 조건으로 33회 cycle을 수행하고 마지막으로 72℃ 에서 6 분 동안 연장 반응시켰다.

표 5

프라이머 서열(흰쥐를 대상으로 한 경우)

Gene	Primer sequence (5'→3')	Accession number	Product size (bp)
TLR2	CATGCATTCCTCAGACCCTG ATGGTTGTCACTGCTTCCA	NM 198769.2	245
TNF-α	TAGCCACGTCGTAGCAAAC GGAGGCTGACTTTCTCCTGG	X66539.1	236
IL-1β	GCTTCAGGAAGGCAGTGTCA CAGACAGCACGAGGCATTTT	NM 031515.2	237
IL-6	TGGATGCTTCCAACTGGAT TGGAAAGTTGGGGTAGGAAGG	NM 012589.1	221
COX-2	TGGGAAGCTTTCTCCAACCT GTGAAGTGCTGGGCAAAGAA	U03389.1	203
mPGES-1	GGTCATCAAGATGTACGCGG GTTGGGTCCCAGGAATGAGT	AB041998.1	217
GAPDH	GGCCAAAAGGGTCATCATCT GTGATGGCATGGACTGTGGT	NM 017008.3	201

[0128]

표 6

프라이머 서열(TLR2 및 MyD88 유전자가 결핍된 마우스를 대상으로 한 경우)

Gene	Primer sequence (5'→3')	Accession number	Product size (bp)
TLR2	CCATCGAAAAGAGCCACAAA GCTTTCCTCTCAATGGGCTC	NM 011905.3	157
MyD88	CTGCTACTGCCCAACGATA GGAGACAGGCTGAGTGCAAA	NM 010851.2	240
TNF-α	TAGCCACGTCGTAGCAAAC CTTTGAGATCCATGCCGTTG	NM 013693.2	96
IL-1β	GTTGACGGACCCCAAAAGAT AAGGTCCACGGGAAAGACAC	NM 008361.3	179
IL-6	TCCATCCAGTTGCCTTCTTG CCACGATTTCCAGAGAACA	NM 031168.1	165
COX-2	ACCCTCCTCACATCCCTGAG AAGCCAGATGGTGGCATACA	NM 011198.3	95
mPGES-1	GAGCCACCGCAACGACATG CAGATGGTGGGCCACCTCCC	BC 024960	248
GAPDH	GGAGCCAAAAGGGTCATCAT GTGATGGCATGGACTGTGGT	NM 008084.2	203

[0129]

[0130]

웨스턴 블릿은 상기 동물모델(흰쥐)로부터 적출한 시상하부 조직에 프로테아제 억제제 칵테일과 포스포타제 억제제 칵테일(phosphatase inhibitor cocktail) (Roche) 을 포함한 용해버퍼(T-PER mammalian cell protein extract reagent; Pierce) 100 μl를 분주하여 균질기로 분쇄하였다. 1시간 동안 얼음 위에서 배양시킨 후, 14000rpm으로 15분간 원심 분리하였다. 이후 상층액을 취하여 단백질 정량 후 SDS-sample loading

buffer(0.1875M Tris-HCl (pH 6.8), 6% SDS, 30% glycerol, 0.03% bromophenol blue, 15% beta-mercaptoethanol)를 넣고 10분간 끓여서 denaturation 하여, 10% SDS-Polyacrylamide gel에 전기영동 하였다. 분리된 단백질은 PVDF(Polyvinylidene difluoride; Whatman) 막으로 이동시킨 후, TBS-Tween (Tris-buffered saline/Tween 20; 0.1% Tween 20, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCL)으로 세척한 후, 비특이적 부위에 항체가 결합하는 것을 방지하기 위해 5% non fat dry milk (Difco)가 함유된 TBS-Tween으로 상온에서 90분 동안 블로킹 시켰다, 이후, 일차 항체로 Phospho-NF- κ B p65 (Ser 536) (1:1000, Cell signaling technology), NF- κ B p65 (1:1000, Santa cruz biotechnology), β -actin (1:4000, SIGMA) 을 TBS-Tween에 희석하여 처리하였다. 일차 항체 처리시간은 Phospho-NF- κ B p65 (Ser 536), NF- κ B p65의 경우, 4℃ 저온실에서 밤새도록 처리하였고, β -actin은 60분 동안 처리하였다. 일차 항체 처리 후, TBS-Tween으로 5분간 2번, 10분간 2번 세척한 후, β -actin에는 anti-mouse IgG HRP 항체 (1:4000, Santa Cruz Biotechnology)를 이차 항체로 60 분간 처리하고 Phospho-NF- κ B p65 (Ser 536), NF- κ B p65 는 anti-rabbit IgG HRP 항체 (1:4000, GE Healthcare)를 60분간 처리 하였다. 그 후 TBS-Tween으로 5분간 2번, 10분간 2번의 세척을 마친 후, ECL plus 웨스턴 블롯팅 검출 시스템 키트(Amersham Biosciences)로 검출하였다. 이후 Luminescent 영상 분석기(GE Healthcare)로 확인하였다.

[0131] 그 결과, Pam3CSK4 처리군의 경우, 대조군에 비해 TNF- α , IL-1 β 와 IL-6의 mRNA 수준이 증가되어 있는 것으로 나타났고, arachidonic acid를 프로스타글란딘으로 전환시켜주는 rate-limiting 효소인 cyclooxygenase2 (COX2)와 프로스타글란딘 E2 (PGE2)의 생합성(biosynthesis) 마지막 단계를 특이적으로 촉매 하는 효소인 microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES1)의 mRNA 수준도 증가되어 있는 것으로 나타났다(도 8a 참조). 또한 Pam3CSK4 처리군에서는 인산화된 NF- κ B p65 (Phosphorylated NF- κ B p65, P-p65)도 증가되는 것으로 나타났고(도 8b 참조), 면역조직염색법을 통한 결과에서도 Pam3CSK4 처리군이 대조군에 비해 뇌 조직에서 P-p65가 증가된 것으로 나타났고, 핵 특이적 마커인 Hoechst와 병합하여 핵으로 이동된 P-p65를 확인 할 수 있었다(도 8d~8f 참조). 따라서 이러한 결과들은 TLR2가 뇌에서 염증성 조절자의 합성을 활성화시킴으로써 염증 반응을 유도하는데 관여하고 있다는 것을 알 수 있다.

[0132] 또한, 염증 반응을 측정하기 위해 정상 마우스와 TLR2와 MyD88이 유전적으로 결여된 마우스의 측뇌실로 Pam3CSK4를 주입한 후, 주입 3시간 후, 중기저 시상하부(mediobasal hypothalamus)를 구분하여 적출한 시료를 가지고 RT-PCR을 수행한 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, Pam3CSK4을 처리한 군에서 TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2, mPGES1의 mRNA 수준이 정상마우스 군 및 TLR2와 MyD88이 유전적으로 결여된 마우스 군에 비해 증가되어 있는 것을 확인하였다.

[0133] 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 TLR2와 이의 하부 신호전달 인자인 MyD88에 의해 염증반응이 조절 되고, 그 결과 anorexia와 같은 통증(염증) 반응에 영향을 준다는 것을 알 수 있었고, 나아가 TLR2의 발현 또는 활성을 억제할 경우, 염증성 인자들의 발현 감소를 통해 염증반응을 억제할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

[0134] <실시예 10>

[0135] Pam3CSK4의 식욕조절 작용에 멜라노코르틴 수용체 3 및 4의 길항제가 미치는 영향

[0136] 일반적으로 POMC 뉴런이 활성화되면 멜라노코르틴 수용체(melanocortin receptors 3/4(MC3/4R))를 활성화시키는 신경전달체(neurotransmitter)인 α -melanocyte stimulating hormone(α -MSH)이 분비되는데, 그 결과 먹이섭취량을 감소시키는 작용을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 멜라노코르틴은 LPS로 유도된 신경성 식욕 부진증(LPS-induced anorexia)과도 관련이 있는데 이것은 증가된 α -MSH 때문이며, 뇌에서 멜라노코르틴 수용체를 억제하면 LPS의 먹이섭취감소 효과(anorexic effect)가 약화된다고 알려져 있다. 따라서 본 발명자들은 멜라노코르틴 수용체에 대한 길항제(antagonist)인 SHU9119를 흰쥐의 측뇌실로 주입한 다음, Pam3CSK4의 먹이섭취 감소 효과가 멜라노코르틴 수용체 3/4에 의해 조절되는지 확인하는 실험을 수행하였는데, 멜라노코르틴 3/4(MC3/4R) 수용체에 대한 길항제인 SHU9119와 COX inhibitor(indomethacin)를 제3뇌실로 주입하고, 30분 후 Pam3CSK4를 주입하였다. 이후 먹이를 제한하지 않았으며 24시간동안 측정된 먹이량을 측정하였다. SHU9119와 indomethacin이 Pam3CSK4로 유도된 발열(hyperthermia)과 운동성 저하(hypoactivity)에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 체온과 운동성을 측정할 수 있는 biotelemetry transmitter를 사용하여 측정하였다.

[0137] 그 결과, 도 10에 나타낸 바와 같이, Pam3CSK4로 유도되는 식욕 저하 효과는 완전히 완전히 사라지는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 이 결과는 TLR2가 멜라노코르틴 작용을 통해 먹이 섭취 조절 작용을 한다는 사실을 알 수 있었다.

[0138]

[0139] <실시예 11>

[0140] TLR2의 유전자가 결핍된 마우스에서 Pam3CSK4가 미치는 영향조사

[0141] TLR2와 MyD88이 유전적으로 결여된 마우스(생쥐)를 사용하여 뇌에서 TLR2 작용제에 의한 식욕 감소 효과의 유무를 확인하였다. 생쥐의 측뇌실로 Pam3CSK4를 주입하고 음식 섭취량과 체중을 측정한 결과, Pam3CSK4를 주입한 정상 마우스 군에서는 음식 섭취정도가 감소하는 것으로 나타난 반면, TLR2와 MyD88의 유전자가 결핍된 생쥐는 Pam3CSK4의 식욕 감소 효과가 사라진 것으로 나타났다(도 11 참조). 또한 Pam3CSK4를 주입한 정상군에 비해 TLR2와 MyD88 유전자 결핍 생쥐에서 체중감소가 적게 나타난 것으로 나타났다.

[0142] <실시예 12>

[0143] TLR2 자극의 활성이 p-STAT3와 SOCS3의 발현에 미치는 영향 분석

[0144] 나아가 본 발명자들은 TLR2의 자극을 활성화 시키면 렙틴 신호전달과 관련되어 있는 p-STAT3 및 SOCS3의 신호 경로에 영향을 주는지 확인하기 위해, 정상마우스와 TLR2 유전자가 결핍된 TLR2 KO 마우스 및 MyD88 유전자가 결핍된 MyD88 KO 마우스를 사용하여 상기 각 마우스에 Pam3CSK4를 처리한 후, 마우스의 시상하부에서 p-STAT3 및 SOCS3의 발현변화를 웨스턴 블롯과 PCR방법을 사용하여 분석하였다. 이때 대조군으로는 각 마우스 군에 Pam3CSK4를 처리하지 않은 군을 사용하였다.

[0145] 분석 결과, 도 12에 나타낸 바와 같이, 정상마우스 군에 Pam3CSK4를 처리한 경우 p-STAT3의 발현은 증가하는 것으로 나타났으며, 반면 TLR2 KO 마우스 군에 Pam3CSK4를 처리한 군은 정상마우스 군에 Pam3CSK4를 처리한 경우에 비해 p-STAT3의 발현이 현저하게 감소된 것으로 나타났다.

[0146] 또한, SOCS3의 발현 역시 TLR2 KO 마우스 군에 Pam3CSK4를 처리한 군이 정상마우스 군에 Pam3CSK4를 처리한 군에 비해 SOCS3의 발현이 현저하게 감소된 것으로 나타났으며, MyD88 유전자가 결핍된 MyD88 KO 마우스를 대상으로 한 실험에서도 위와 동일한 결과를 보였다.

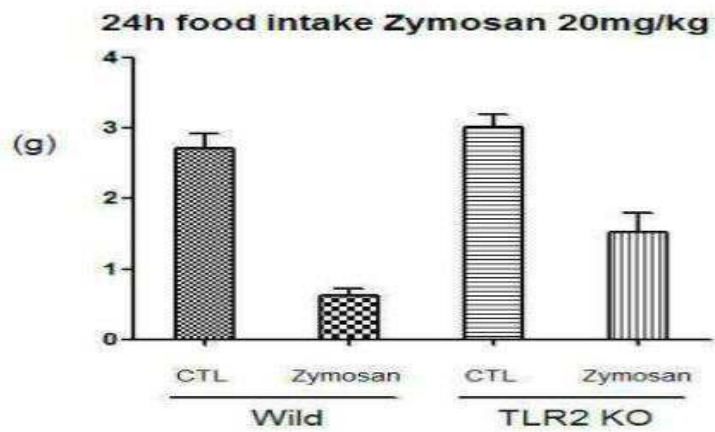
[0147] 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 TLR2가 뇌에서 렙틴 신호와 관련되어 있는 p-STAT3 및 SOCS3의 신호경로에도 영향을 미쳐 섭식 장애 질환의 증상을 조절할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

[0148]

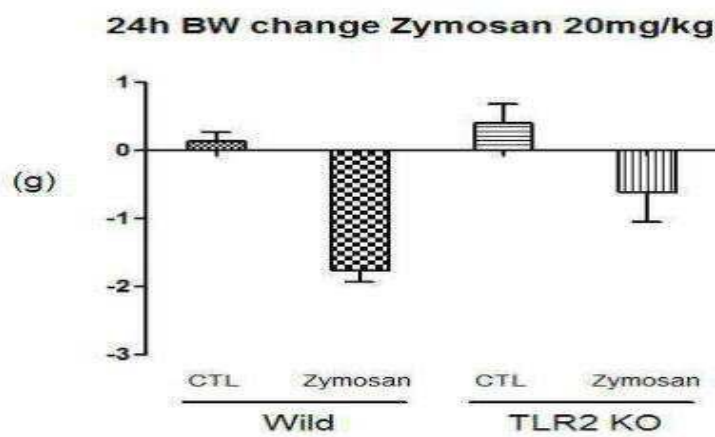
[0149] 이상, 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

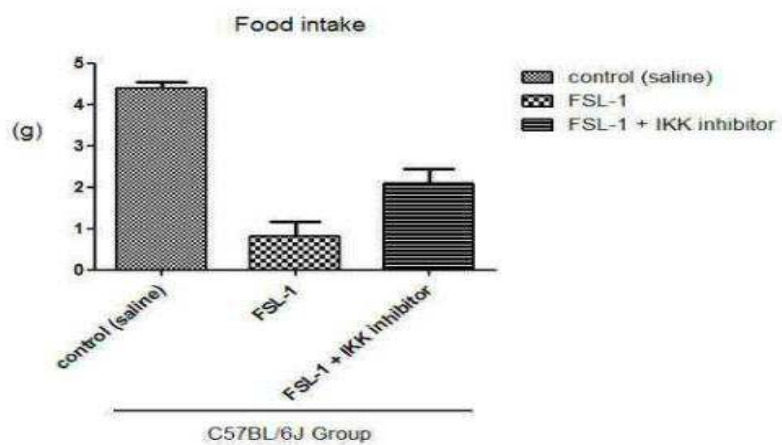
도면1



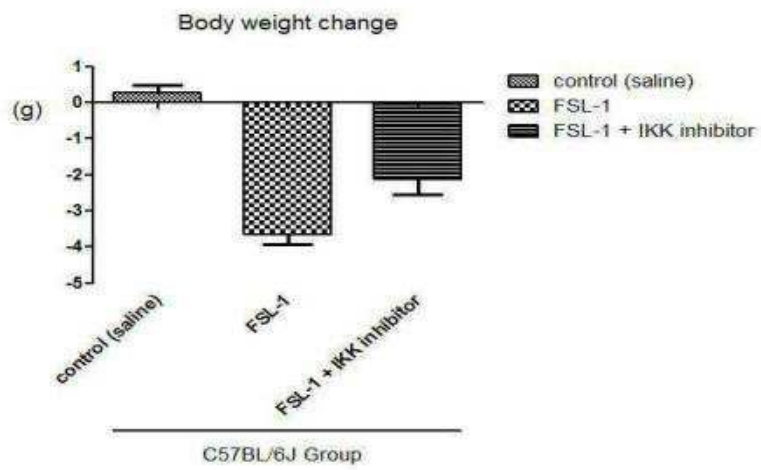
도면2



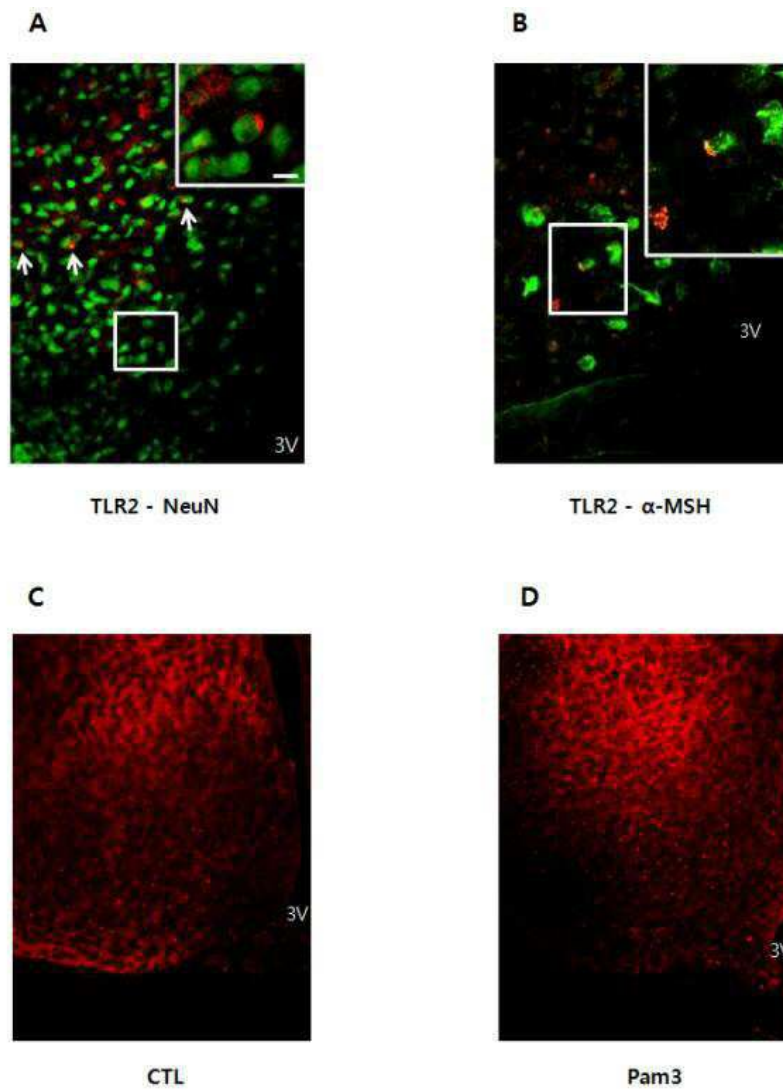
도면3



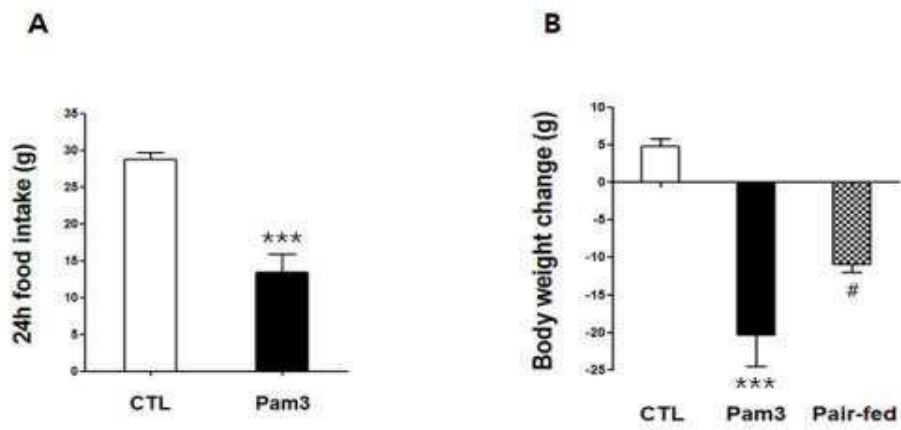
도면4



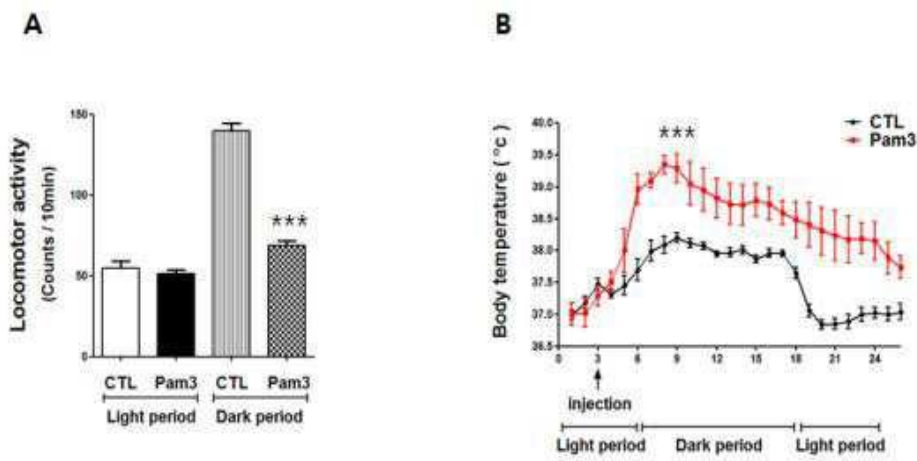
도면5



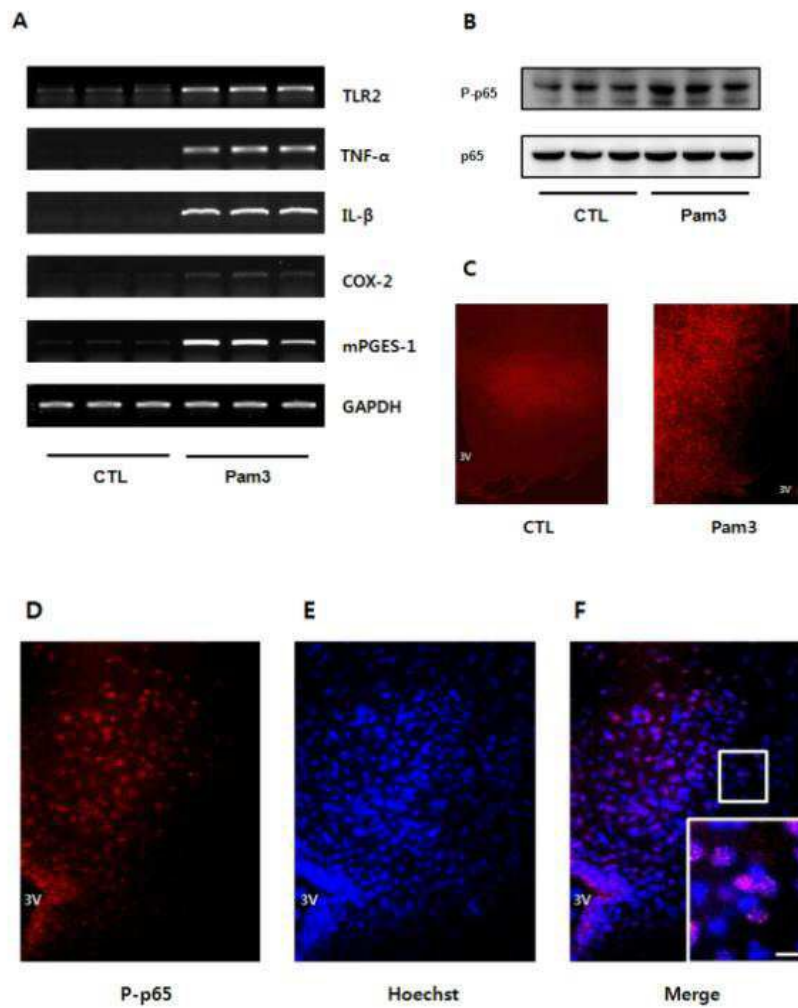
도면6



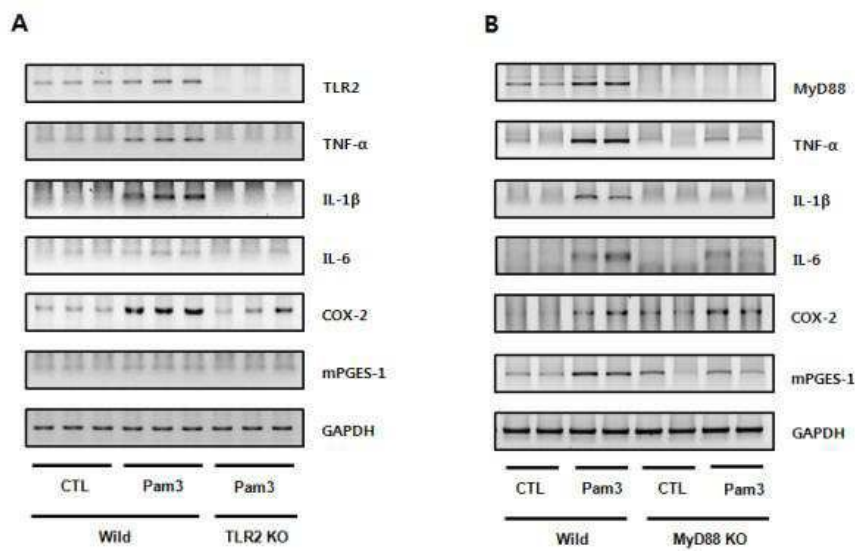
도면7



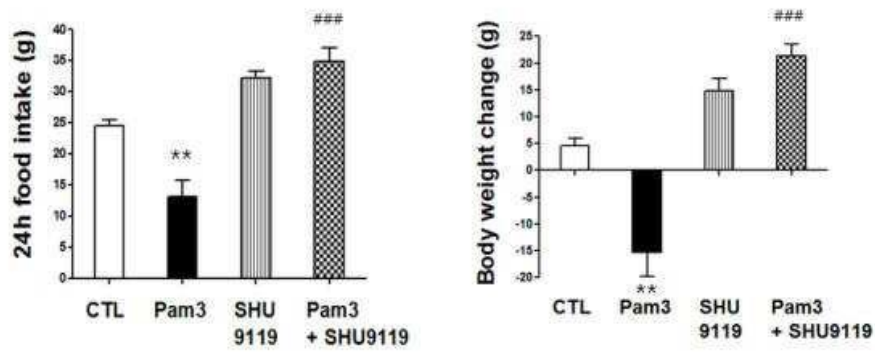
도면8



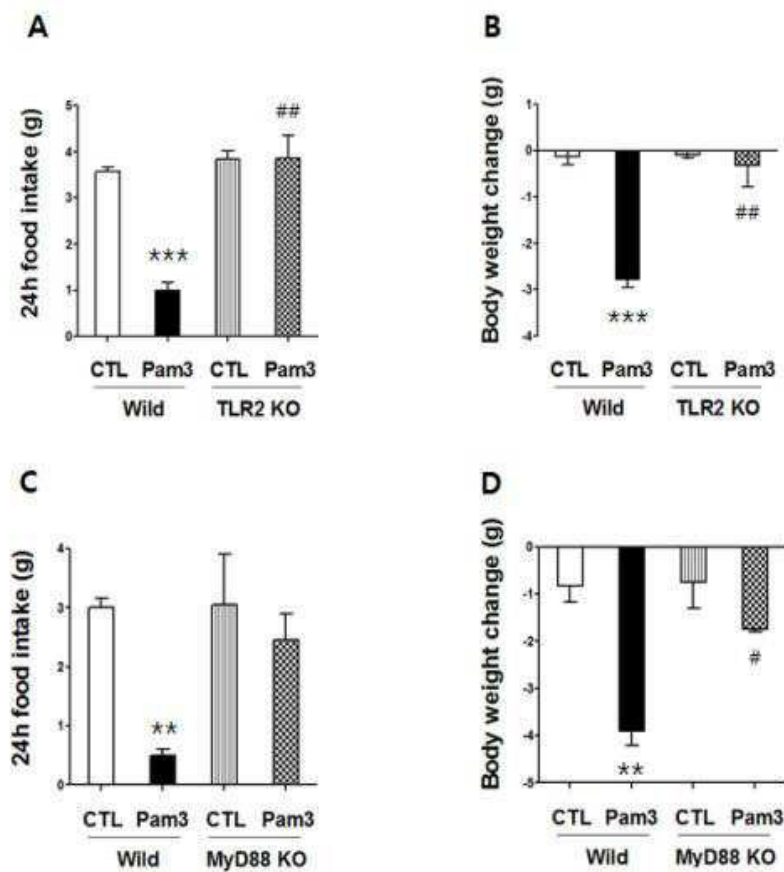
도면9



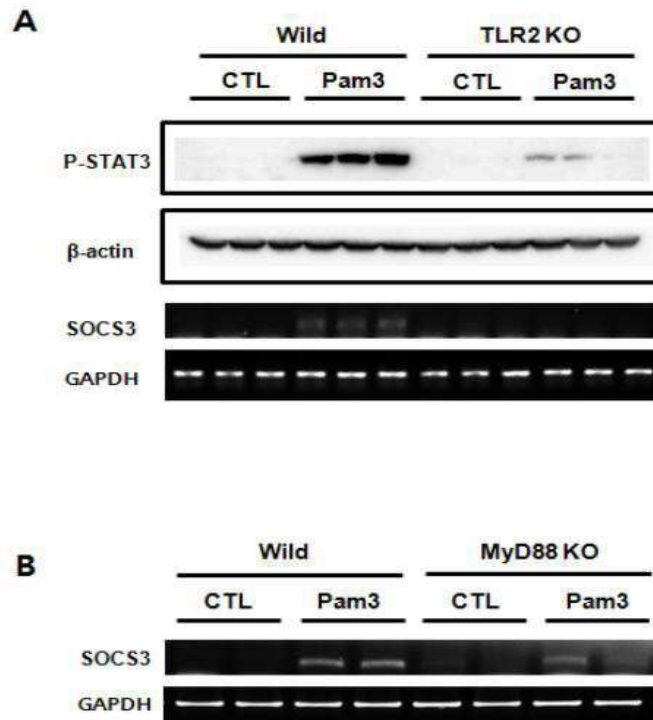
도면10



도면11



도면12



서열목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation of Ulsan University
- <120> Novel use of TLR2
- <130> np12-1003
- <150> KR 2011/0002577
- <151> 2011-01-11
- <160> 1
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 2355
- <212> DNA
- <213> TLR2 cDNA sequence
- <400> 1

```

atgctacgag ctctttggct cttctggatc ttggtggcca taacagtcct cttcagcaaa      60
cgctgttctg ctcaggagtc tctgtcatgt gatgcttctg ggggtgtgtga tggccgctcc      120
aggctctttca cctctattcc ctcgggactc acagcagcca tgaaaagcct tgacctgtct      180

ttcaacaaga tcacctacat tggccatggt gacctccgag cgtgtgcgaa cctccaggtt      240
ctgatgttga agtcaggcag aatcaataca atagagggag acgcctttta ttctctgggc      300
agtcttgaac atttggattt gtctgataat cacctatcta gtttatcttc ctcttggttc      360

```

gggccccctt cctctttgaa atacttaaac ttaatgggaa atccttacca gacactgggg	420
gtaacatcgc tttttcccaa tctcacaat ttacaaaccc tcaggatagg aaatgtagag	480
actttcagt agataaggag aatagatttt gctgggctga cttctctcaa tgaacttgaa	540
attaaggcat taagtctccg gaattatcag tcccaaagtc taaagtcgat ccgcgacatc	600
catcacctga ctcttcactt aagcgagtct gctttcctgc tggagatttt tgcagatatt	660
ctgagttctg tgagatatatt agaactaaga gatactaact tggccaggtt ccagttttca	720
ccactgccc tagatgaagt cagctcaccg atgaagaagc tggcattccg aggctcggtt	780
ctcactgatg aaagctttta cgagctcctg aagctgttgc gttacatctt ggaactgtcg	840
gaggtagagt tcgacgactg taccctcaat gggctcggcg atttcaacc ctcggagtca	900
gacgtagtga gcgagctggg taaagtagaa acagtcacta tccggaggtt gcataatccc	960
cagttctatt tgttttatga cctgagtact gtctattccc tctggagaa ggtgaagcga	1020
atcacagtag agaacagcaa ggtcttctg gttccctgct cgttctccca gcatttaaaa	1080
tcattagaat tcttagacct cagcgaaaat ctgatggttg aagaatattt gaagaactca	1140
gcctgtaagg gagcctggcc ttctctacaa acctagttt tgagccagaa tcatttgaga	1200
tcaatgcaaa aaacaggaga gattttgtg actctgaaaa acctgacctc tcttgacatc	1260
agcaggaaca cttttcatcc gatgcccgc agctgtcagt ggccagaaaa gatgcgcttc	1320
ctgaatttgt ccagtacagg gatccgggtg gtaaaaacgt gcattctca gacgtggag	1380
gtgttgatg ttagtaacaa caatcttgac tcattttctt tgttcttgcc tcggtgcaa	1440
gagctctata ttccagaaa taagctgaaa acactcccag atgcttcgtt gttccctgtg	1500
ttgctggtca tgaanaatcag agagaatgca gtaagtactt tctctaaaga ccaacttgg	1560
tcttttccca aactggagac tctggaagca ggcgacaacc actttgtttg ctctgcgaa	1620
ctctatctt ttactatgga gacgccagct ctggctcaaa tcttggttga ctggccagac	1680
agctacctgt gtgactctcc gcctcgcctg cacggccaca ggcttcagga tggccggccc	1740
tccgtcttgg aatgtacca ggctgcactg gtgtctggag tctgctgtgc cttctcctg	1800
ttgatcttgc tcgtagggtc cctgtgccac catctccacg gactgtggtt cctgagaatg	1860
atgtggcgt ggctccaggc caagaggaag cccaagaaag ctccctgcag ggacgtttgc	1920
tatgatgctt ttgtttccta cagtgagcag gattccattt gggtggagaa cctcatggtc	1980
cagcagctgg agaactctga cccgcccttt aagctgtgtc tccacaagcg ggacttcgtt	2040
ccgggcaaat ggatcatga caacatcatc gattccatcg aaaagagcca caaaactgtg	2100
ttcgtgcttt ctgagaactt cgtacggagc gactgggtga agtacgaact ggacttctcc	2160
cacttcaggc tctttgacga gaacaacgac gcggccatcc ttgttttgct ggagcccatt	2220

gagaggaaag ccattcccca gcgcttctgc aaactgcgca agataatgaa caccaagacc 2280

tacctggagt ggcccttgga tgaaggccag caggaagtgt tttgggtaaa tctgagaact 2340

gcaataaagt cctag 2355