



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0025115
(43) 공개일자 2016년03월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/395 (2006.01) A61P 3/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0111401

(22) 출원일자 2014년08월26일

심사청구일자 2015년08월25일

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93

(72) 발명자

강상욱

서울 송파구 양재대로 1218, 126동 702호 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트)

최일호

서울특별시 송파구 토성로7길 9, 옥탑

박중열

경기 구리시 장자호수길 77, 505동 204호 (수택동, 장자마을금호베스트빌아파트)

(74) 대리인

특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 5 항

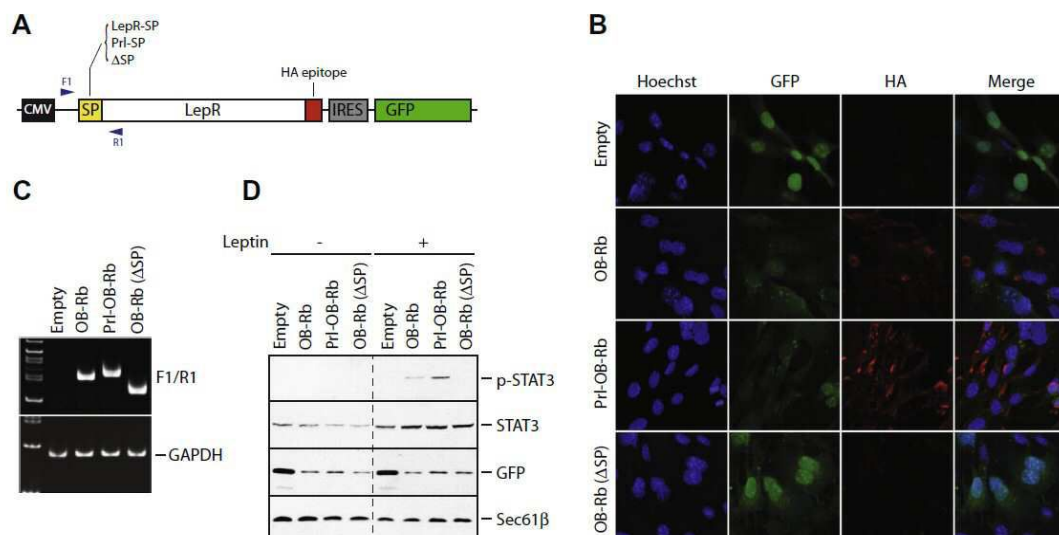
(54) 발명의 명칭 렙틴 수용체 신호 서열 발현 촉진제 또는 활성화제를 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 약학조성물

(57) 요약

본 발명은 렙틴 수용체 신호 서열(signal sequence) 발현 촉진제 또는 활성화제를 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 약학조성물 및 이의 스크리닝 방법에 관한 것으로, 렙틴 수용체 신호 서열(signal sequence) 발현 촉진제 또는 활성화제는 렙틴 수용체 신호 서열의 발현 또는 활성화를 촉진시킴으로써, 렙틴작용을 증가시켜 비만을 예방하거나, 치료하는 약학조성물로 사용할 수 있다.

또한 지방세포에서 렙틴 수용체 신호 서열(signal sequence) 발현 촉진제 또는 활성화제의 스크리닝 방법을 이용하면 렙틴 수용체 신호 서열(signal sequence)발현을 촉진 또는 활성화하는 약물을 특이적으로 선별할 수 있어, 비만 치료제를 효과적으로 개발할 수 있다.

대표도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF2013R1A1A2059008

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기본연구지원사업

연구과제명 랩틴 수용체 단백질의 소포체 유입 활성 조절 기전의 확립을 통한 신 개념 대사성 질환 치료 전략 도출 및 타당성 평가

기 여 율 1/1

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2013.11.01 ~ 2014.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

렙틴 수용체 신호 서열(signal sequence) 발현 촉진제 또는 활성화제를 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 렙틴 수용체 신호 서열(signal sequence) 발현 촉진제 또는 활성화제는 렙틴 수용체 신호 서열(signal sequence)에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩타이드, 앵타머 및 항체로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 비만 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 렙틴 수용체 신호 서열(signal sequence) 발현 촉진제 또는 활성화제는 약학조성물 총 100 중량부에 대하여 0.01 내지 10 중량부로 함유되는 것을 특징으로 하는 비만 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 4

지방 세포주에 시험물질을 처리하는 단계;

상기 시험물질이 처리된 지방 세포주에 렙틴 수용체 신호 서열 발현 또는 활성화 정도를 측정하는 단계; 및

대조구 시료와 비교하여 상기 렙틴 수용체 신호 서열 발현 또는 활성화 정도가 증가된 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 비만 치료제 스크리닝 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 렙틴 수용체 신호 서열 발현 또는 활성화 정도는 역전사 중합효소 연쇄반응((Reverse Transcription-Polymerase chain Reaction, RT-PCR), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학, 웨스턴 블랏(Western Blotting) 및 유세포분석법(FACS)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정하는 것을 특징으로 하는 비만 치료제 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 렙틴 수용체 신호 서열 발현 촉진제 또는 활성화제를 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 약학조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 비만은 고혈당, 고염류, 고탄수화물의 음식 섭취와 도시화에 따른 운동 부족에 의한 섭취 열량과 소모 열량의 불균형을 그 근본적인 원인으로 판단할 수 있다.

[0003] 비만은 당뇨병의 44%, 심혈관 질환의 23%, 그리고 기타 비만 관련 암질환의 7-40%의 발병원인으로 보고되고 있는데, 이는 특히 비만에 의한 간세포 및 다른 말초조직의 인슐린 저항성 증가 및 염증 반응을 일으키는 사이토카인들의 혈중 및 세포 내 농도의 증가에 의해 기인되는 것으로 판단된다.

[0004] 렙틴은 지방세포에서 합성되어 렙틴 수용체에 작용함으로써, 섭식과 체중 감소를 유도하는 호르몬으로, 이러한 렙틴과 결합하는 렙틴 수용체는 싸이토카인 수용체 패밀리의 타입 I 싱글-막전위 수용체로 긴 세포질 꼬리를 갖

는 동형 단백질이며, 대부분 시상하부에서 풍부하게 발현된다.

[0005] 렙틴 수용체는 뇌에서 JAK-STAT 신호 변환자 및 STAT 전사 경로 활성화를 통하여 렙틴 신호 전달에 중요한 역할을 하는데, 순환하던 렙틴이 렙틴 수용체와 결합하면, 티로신 키나아제 JAK2와 렙틴 수용체가 결합되어 STAT3가 인산화되고 인산화된 2량체 STAT3가 핵으로 들어가 식욕, 대사 및 에너지를 제어하는 목적 유전자의 전사를 조절한다.

[0006] 따라서, 렙틴 저항성을 나타내는 비만의 경우, 렙틴 및 렙틴 수용체의 결합에 의한 신호 전달 경로에 문제가 야기될 경우 발생되므로, 렙틴 저항성을 나타내는 비만 치료에 있어서, 렙틴 수용체에 의해 유도되는 신호 전달 경로는 매우 중요한 연구 대상이다.

[0007] 그러나, 기능적 활성을 나타내는 세포 표면의 렙틴 수용체 발현 양은 극히 낮으며, 전사 수준의 조절 기전에 의존적이라기보다는, 전사 후 번역되는 과정에서 렙틴 수용체 고유의 신호 서열에 의존적으로 그 발현 양이 결정된다. 따라서, 렙틴 수용체의 세포 표면 발현 수준을 증가시킬 수 있는 세포 내 특이적 단백질 수송 기전에 대한 연구 및 렙틴 수용체를 증가시킬 수 있는 기술의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2013-0010191호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 렙틴 수용체 신호 서열(signal sequence)의 발현 촉진제 또는 활성화제를 유효성분으로 함유하는 약학조성물을 개발하여, 렙틴 수용체 발현 장애에 기인한 렙틴 저항성이 원인이 되는 비만 또는 대사성 질환의 예방 또는 치료에 있어서, 효과적인 약학조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 렙틴 수용체 신호 서열(signal sequence) 발현 촉진제 또는 활성화제를 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0011] 보다 상세하게는, 상기 렙틴 수용체 신호 서열(signal sequence) 발현 촉진제 또는 활성화제는 렙틴 수용체 신호 서열(signal sequence)에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩타이드, 앵타머 및 항체로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다.

[0012] 또한 본 발명은 지방 세포주에 시험물질을 처리하는 단계; 상기 시험물질이 처리된 지방 세포주에 렙틴 수용체 신호 서열 발현 또는 활성화 정도를 측정하는 단계; 및 대조군 시료와 비교하여 상기 렙틴 수용체 신호 서열 발현 또는 활성화 정도가 증가된 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 비만 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 조성물은 렙틴 수용체 신호 서열(signal sequence)의 발현 및 활성을 촉진시킴으로써, 렙틴의 작용을 증가시켜 비만을 예방하거나, 치료하는 약학조성물로 사용할 수 있다.

[0014] 또한 지방세포에서 렙틴 수용체 신호 서열(signal sequence) 발현 촉진제 또는 활성화제의 스크리닝 방법을 이용하면, 렙틴 수용체 신호 서열(signal sequence) 발현을 촉진 또는 활성화하는 약물을 특이적으로 선별할 수 있어, 비만 치료제 개발에 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 렙틴 수용체의 전사 독립적 억제를 확인한 결과로, 도 1A는 HA 에피토프가 C-말단 결합된 렙틴 수용체, VCAM-1 및 프로락틴 (Pr1) 서열구조를 나타내는 모식도이고, 'SP' 는 신호 서열(signal sequence); 'CMV' 는 CMV 프로모터(promoter); 'TM' 은 소수성 막관통 도메인(hydrophobic transmembrane domain)을 나타내며, 도

1B는 C-말단에 HA 에피토프가 결합된 야생형 랩틴 수용체, VCAM-1 및 프로락틴 (Pr1)의 과발현 유전자로 형질 전환 후 안정화된 세포에 독시사이클린(Dox)을 처리하여 과발현을 유도한 후, 합성된 mRNA양을 확인한 RT-PCR 결과로, 발현된 랩틴 수용체, VCAM-1 및 프로락틴 (Pr1) 전사활성에는 차이가 없음을 보여주는 결과이며, 도 1C는 형질 전환된 세포에서 과발현된 랩틴 수용체, VCAM-1 및 프로락틴 (Pr1) 단백질의 합성을 항-HA 항체를 이용하여 확인한 웨스턴 블롯팅 분석 결과로, 랩틴 수용체 단백질의 합성이 VCAM-1 및 프로락틴 (Pr1)에 비해 현저히 감소되어 있음을 보여주는 결과로, 이때, Sec61 β 및 TRAP α 를 통하여 동량의 단백질이 로딩되었는지 확인하였다. 도 1D는 랩틴 수용체, VCAM-1 및 프로락틴 (Pr1)의 발현을 유도한 후, 100 μ Ci/ml [³⁵S]-메티오닌 (Methionine)을 첨가하여 새롭게 합성된 단백질의 양을 항-HA 항체를 이용하여 면역침강법으로 확인한 결과로, 새롭게 합성된 랩틴 수용체 단백질의 양이 VCAM-1 및 프로락틴 (Pr1)에 비해 현저히 감소되어 있음을 확인한 결과이다.

도 2는 랩틴 수용체의 N-말단의 신호 서열로써의 기능적 활성을 분석한 결과로, 도 2A는 SignalP 4.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)를 통하여, 랩틴 수용체, VCAM-1 및 프로락틴(Pr1)의 N-말단 지역의 신호서열 개연성(Mean S) 및 신호 절단 부위(Max.C)를 예측한 결과로, 랩틴 수용체 단백질의 N-말단의 신호 서열로써의 개연성이 VCAM-1 및 프로락틴(Pr1)에 비해 현저히 감소한 것을 나타내는 결과로, 밑줄로 표시된 부분이 단백질 신호 서열이며, 적색 바는 잠재적 신호 절단 부위를 나타낸다. 또한, 도 2B는 야생형 프리온(PrP) 단백질의 신호 서열이 프로락틴(Pr1) 또는 랩틴 수용체(OB-Rb)의 신호서열로 치환된 돌연변이 프리온(PrP) 단백질의 아미노산 서열을 나타낸 모식도로, 적색 구두점(punctuation marks)은 DSS 가교제와 반응한 라이신 잔기를 나타내며, 굵게 표시된 M은 신호서열(DSP)이 결여된 PrP에 삽입된 첫 번째 개시 코돈을 나타낸다. 도 2C는 야생형 및 돌연변이 프리온(PrP) 단백질의 합성 중간체 사슬(RNC)의 신호서열과, 이들 단백질이 합성되는 세포소기관인 소포체로의 특이적 이동에 필수적인 신호서열 인식인자(SRP)와의 결합능을 면역침강법을 통하여 분석한 결과로, 프리온(PrP), 프로락틴(Pr1) 및 랩틴 수용체(OB-Rb)의 신호서열과 신호서열 인식인자(SRP)와의 특이적 결합능은 동일함을 확인한 결과이다. 도 2D는 RM의 존재 또는 비 존재하에서 야생형 및 돌연변이 프리온(PrP)들의 단백질 합성 중간체 사슬과 단백질 분비 기전의 가장 첫 단계인 소포체(RM)과의 결합능을 자당(sucrose)의 10 내지 50% 밀도 구배를 이용하여 분석한 결과로, 랩틴 수용체(OB-Rb)의 신호서열을 보유한 돌연변이 프리온(PrP)의 단백질 합성 중간체 사슬과 소포체(RM)과의 결합능이 야생형 및 프로락틴(Pr1)의 신호서열을 보유한 돌연변이에 보다 현저히 감소되었음을 확인한 결과로, 신호 절단 및 비 절단된 PrP 초기 사슬은 -SP 및 +SP로 나타내었다.

도 3은 랩틴 수용체 신호 서열이 프로락틴(Pr1)의 소포체 유입 활성에 미치는 영향을 분석한 결과로, 도 3A는 야생형 또는 프로락틴(Pr1)의 신호 서열을 랩틴 수용체의 신호서열로 치환하거나, 신호서열을 제거한(Δ SP) 돌연변이 프로락틴(Pr1)의 신호서열 및 신호 전달 부위 구조를 나타낸 모식도이며, 도 3B는 야생형 및 돌연변이 프로락틴(Pr1)의 소포체 유입 활성을 확인한 결과로, 랩틴 수용체 신호서열을 보유한 돌연변이 프로락틴(Pr1)의 소포체 유입 활성(-SP의 양)이 ~30%로 야생형 프로락틴(~75%)보다 현저히 감소한 것을 확인하였으며, 소포체로 유입되어 PK 소화 효소에 의해 보호된 돌연변이 프로락틴(Pr1)의 양이 야생형에 비해 현저히 감소함을 보여주는 도 3C 및 도 3D 결과를 통해, 랩틴 수용체 단백질의 저효율 신호 서열이 프로락틴(Pr1) 단백질의 소포체 유입 활성 저해의 원인을 확인한 결과이다.

도 4는 신호 서열의 기능적 활성 증대가 랩틴 수용체의 발현에 미치는 영향을 확인한 결과로, 도 4A는 야생형 또는 랩틴 수용체(OB-Rb)의 신호서열을 고효율의 프로락틴(Pr1)의 신호서열로 치환하거나, 신호서열을 제거한(Δ SP) 돌연변이 랩틴 수용체(OB-Rb)의 신호서열 및 신호 전달 부위 구조를 나타낸 모식도이며, 도 4B는 PK 소화효소에 의해서 짧은 세포질 꼬리로 절단된 랩틴 수용체양(Δ C) 분석을 통하여 랩틴 수용체(OB-Rb)의 소포체 유입 활성의 효율성을 분석한 결과로, 야생형 랩틴 수용체(OB-Rb)의 신호서열을 프로락틴(Pr1)의 신호서열로 치환하였을 때, 소포체 유입 활성이 증가함을 보여주며, 도 4C 및 4D와 같이 세포에서도 동일한 결과가 확인되었다. - CHO는 비당화된 랩틴 수용체(unglycosylated OB-Rb)이며, + CHO는 당화된 랩틴 수용체(glycosylated OB-Rb)를 나타낸다. 도 4E는 세포막 랩틴 수용체에 바이오틴을 특이적으로 표식하여 기능적 활성을 가지는 랩틴 수용체의 양을 분석한 결과로, 야생형 랩틴 수용체(OB-Rb)의 신호서열을 프로락틴(Pr1)의 신호서열로 치환하여 소포체 유입 활성을 증가시켰을 때, 기능적 활성을 가지는 세포막 랩틴 수용체의 양이 증가됨을 확인한 결과이다.

도 5는 랩틴 수용체의 향상된 소포체 유입 활성이 랩틴 신호전달계의 활성에 미치는 영향을 분석한 결과로, 도 5A는 C-말단 HA 에피토프가 결합된 야생형 및 돌연변이 랩틴 수용체의 과발현을 위한 pMX-IRES-GFP 레트로바이러스 벡터의 구조를 나타내는 모식도이며, 도 5B는 mHypoE-N1세포에서 야생형 및 돌연변이 랩틴 수용체를 감염

시킨 후, 과발현된 랩틴 수용체 발현을 면역 형광 현미경으로 확인한 결과로, 고효성 프로락틴(Pr1) 신호서열로 치환하였을 때, 랩틴 수용체의 발현이 현저히 증가함을 나타내는 결과이며, 도 5C는 세포에서 합성된 mRNA양을 측정된 RT-PCR 결과이며, 도 5D는 상기 도 5B와 같이 준비된 세포에 20ng/ml 랩틴을 10분간 투여한 후 신호전달계의 활성화를 반영하는 STAT3 인산화를 분석한 결과로, 야생형 랩틴 수용체 신호서열을 고효성 프로락틴(Pr1) 신호서열로 치환하였을 때, STAT3 인산화가 증가함을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 발명은 랩틴 수용체 신호 서열(signal sequence) 발현 촉진제 또는 활성화제를 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [0017] 보다 상세하게는 상기 랩틴 수용체 신호 서열(signal sequence) 발현 촉진제 또는 활성화제는 랩틴 수용체 신호 서열(signal sequence)에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩타이드, 앵타머 및 항체로 이루어진 군에서 선택되지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0018] 상기 랩틴 수용체 신호 서열(signal sequence) 발현 촉진제 또는 활성화제는 약학조성물 총 100 중량부에 대하여 0.01 내지 10 중량부로 함유될 수 있다.
- [0019] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 랩틴 수용체 신호 서열(signal sequence) 발현 촉진제 또는 활성화제를 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 약학조성물은 통상적인 방법에 따라 주사제, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형을 사용할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 다른 구체예에서, 랩틴 수용체 신호 서열(signal sequence) 발현 촉진제 또는 활성화제를 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0021] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.
- [0023] 본 발명에 따른 약학조성물의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 200 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 200 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] 또한 본 발명은 지방 세포주에 시험물질을 처리하는 단계; 상기 시험물질이 처리된 지방 세포주에 랩틴 수용체 신호 서열 발현 또는 활성화 정도를 측정하는 단계; 및 대조군 시료와 비교하여 상기 랩틴 수용체 신호 서열 발현 또는 활성화 정도가 증가된 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 비만 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

- [0026] 상기 랩틴 수용체 신호 서열 발현 또는 활성 정도는 역전사 중합효소 연쇄반응((Reverse Transcription-Polymerase chain Reaction, RT-PCR), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학, 웨스턴 블랏(Western Blotting) 및 유세포분석법(FACS)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정되지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0027] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0028] 하기의 참고예는 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 참고예를 제공하기 위한 것이다.
- [0029] <참고예 1> 항체
- [0030] 본 발명의 하기 실시예에서 사용된 항체는 항-HA는 Roche Diagnostics(Indianapolis, IN)에서 구입하였으며, 항-SRP54는 BD Biosciences(San Jose, CA)에서 구입하였으며, 항-STAT3 및 pSTAT3 Cell Signaling Technology(Boston, MA)에서 구입하여 사용하였으며, 항-PrP, Sec61 β , TRAP α 및 GFP 는 Dr. R. Hegde, (University of Cambridge, UK)에게서 제공받았다.
- [0031] <실험예 1> 분자 생물학
- [0032] 본 발명의 하기 실시예의 모든 cDNAs는 특이적 프라이머로 PCR 증폭하였으며, 생화학 연구는 표준 방법에 따라 DNA-FRT/TO 또는 -HA에 서브클로닝 하였다.
- [0033] 모든 구성물들은 DNA 시퀀싱(Cosmogenetech, Seoul, Korea)을 통하여 확인되었다.
- [0034] <실험예 2> 세포배양 분석
- [0035] HeLa 및 Flp-In T-Rex 293 세포를 American Type Culture Collection (Manassas, VA) 및 Invitrogen 에서 구입하였다. 각각의 Flp-In inducible systems (Invitrogen)으로 구입처의 설명서에 따라 각각의 세포를 유지시켰다.
- [0036] Hypothalamic N1 cells (mHypoE-N1)은 M. Kim (University of Ulsan, Korea)으로부터 제공받았다. SDS-PAGE, 웨스턴 블롯팅(Western blotting), 면역침강법(immunoprecipitation) 및 pulse-labeling 실험은 앞서 공개된 문헌(Kim, J., Choi, I., Park, J.Y. and Kang, S.W. (2013). Specific inhibition of hamster prion protein translocation by the dodecadepsipeptide valinomycin. Exp Cell Res 319, 2049-57.; Choi, I., Kim, J., Park, J.Y. and Kang, S.W. (2013). Cotransin induces accumulation of a cytotoxic clusterin variant that cotranslationally rerouted to the cytosol. Exp Cell Res 319, 1073-82.)에 따라 수행하였다.
- [0037] 세포 표면의 랩틴 수용체(OB-Rb) 발현량을 분석하기 위해, 전체 세포 표면 단백질과 Sulfo-NHS-Biotin (Pierce, Rockford, IL)을 제조사의 설명서에 따라, 첫 번째로 결합시킨 후 고정화된 아비딘(immobilized Avidin; GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA)으로 포획하였다. 바이오티ن결합된 세포 표면 랩틴수용체(OB-Rb)를 항-HA 항체로 웨스턴 블롯팅하였다.
- [0038] 레트로바이러스 감염을 위해, 타겟 유전자가 클론된 pMX-IRES-GFP (Addgene, Cambridge, MA)를 Platinum-E cells (Cell Biolabs, San Diego, CA)에 형질주입하고 배양 배지를 수거하여 마우스 배아 시상하부의 mHypoE-N1 세포 (Cedarlane, Burlington, NC)에 감염시켰다.
- [0039] 레트로바이러스 감염된 세포를 실온에서 4% PFA가 포함된 PBS로 30분 동안 고정시킨 후 PBS로 세척하였다. 고정된 세포와 항-HA 항체(1:1000 dilution)를 인큐베이션한 후 5% 소혈청알부민(BSA) 및 0.2% Triton X-100가 포함된 PBS 버퍼로 블로킹(blocking) 하였다.
- [0040] 그 후 블로킹 버퍼에 donkey 항-랫 IgG (1:400)를 첨가하여 세포와 30분 동안 추가로 인큐베이션하고 일반적인 방법에 따라 고정시킨 후 TCS-SP2 confocal laser-scanning 현미경(Leica, Wetzlar, Germany)을 이용하여 현미경 분석을 수행하였다.
- [0041] <실시예 1> 랩틴 수용체(OB-Rb) 발현 정도 확인
- [0042] 혈관세포접착분자-1(vascular endothelial cell adhesion molecule-1; VCAM-1)및 프로락틴(prolactin; Prl)단

백질과 랩틴 수용체(OB-Rb)의 상대적 발현량을 확인하였다. 다른 단백질의 전사 조절 가능성을 제외시키기 위해, 도 1A와 같이 독시사이클린(doxycycline; Dox) 존재하에서 CMV 프로모터에 의해 발현이 조절되는 랩틴 수용체(OB-Rb), VCAM-1 및 Pr1 과발현 벡터를 제작하였으며, 검출에 용이하도록 C-말단 HA 에피토프를 연결하였다. 각각의 과발현 벡터는 Flp-In 293 TRex 세포에 도입한 후, 안정화하였다.

[0043] 그 결과, 도 1B와 같이 독시사이클린(doxycycline; Dox) 처리에 의해, VCAM-1, Pr1 및 랩틴 수용체(OB-Rb)의 전사된 mRNA의 양이 유사한 수준이었음에도 불구하고, 도 1C와 같이 랩틴 수용체(OB-Rb)의 발현량이 VCAM-1 및 Pr1 발현량보다 현저하게 낮았다.

[0044] 그러나, 새로 합성되는 랩틴 수용체(OB-Rb)는 빠르게 세포 표면에 내재화되는 것을 감안할 때 상기 결과는 놀라운 것이 아니다.

[0045] 다만, 도 1D와 같이 새로 합성된 랩틴 수용체(OB-Rb)는 펄스 발생 후 30분간 검출되지 않음에 따라, 랩틴 수용체(OB-Rb) 발현이 전사 후 억제된다는 새로운 사실을 확인할 수 있었다.

[0046] <실시예 2> 랩틴 수용체(OB-Rb) 특징 분석

[0047] ER에서 합성된 단백질의 N-말단 영역 및 내부 막관통 도메인(internal transmembrane domain; TMD)의 소수성 아미노산 연장은 초기분비 경로에서 신호인식입자(signal recognition particle; SRP)에 의해 인식된다. 랩틴 수용체(OB-Rb)는 도 4와 같이, 소수성 아미노산 연장 과정이 N-말단 영역에서 완료되는 것으로 보이나, N-말단 영역이 결여된 랩틴 수용체(OB-Rb)는 전위 실패에 따라 TMD에서 완료되었다.

[0048] 그러나 PrP 및 Pr1와 비교해 볼 때, 도 2A와 같이 랩틴 수용체(OB-Rb)는 소수성이 적은 N-말단 영역 및 확인되지 않은 신호 절단 부위를 포함하는 것으로 예상된다.

[0049] 그럼에도 불구하고, 도 2D와 같이 랩틴 수용체(OB-Rb)의 리보솜이 결합된 초기 사슬 복합체(RNC)는 OB-Rb-PrP의 절단된 mRNA로부터 합성되어 ER 막으로 전달되었으며, 야생형 PrP 및 Pr1 신호를 포함하는 PrP (Pr1-PrP)의 RNC와 유사한 수준으로 발현되었다.

[0050] 상기 OB-Rb-PrP는 도 2B와 같이 PrP 본래의 신호 서열의 SRP와 랩틴 수용체(OB-Rb)의 상호결합을 통하여 연결되어 합성하였으며, SRP와 랩틴 수용체(OB-Rb)의 상호결합 여부는 도 2C와 같이 확인되었다. 이러한 상호결합은 특정 상호작용을 입증하는 것으로, N-말단이 결여된 PrP(Δ SP)의 RNC는 SRP와 상호결합하지 못한 것으로 확인되었다.

[0051] 상기 결과로부터 랩틴 수용체(OB-Rb)의 N-말단 지역은 적은 소수성을 나타냄에도 불구하고 기능적으로 활성화된 신호서열임이 확인되었다.

[0052] <실시예 3> 랩틴 수용체(OB-Rb) 신호 서열의 효율성 확인

[0053] ER 막으로 RNC가 전달된 후 RNC는 인접한 트랜스로콘(translocon)의 전위채널로 이동되며, 초기 사슬(NCs)은 트랜스로콘을 통하여 ER 막을 관통하여 삽입된다. 이 과정 동안 신호 서열은 트랜스로콘과 상호작용하고 ER 초기 단백질을 안정화시킨다. 신호 펩타이드의 서열 다양성은 트랜스로콘과의 상호작용에 영향을 미치며, 그 결과 전위 효율성에 차이를 나타낸다.

[0054] 따라서, 랩틴 수용체(OB-Rb) 신호 서열의 전위 효율성을 확인하기 위해서, 도 3A와 같은 성숙 도메인 측면으로 랩틴 수용체(OB-Rb) 신호 서열 및 3개의 아미노산을 포함한 돌연변이 Pr1 구조체(OB-Rb-Pr1)를 제작하였다.

[0055] *in vitro*에서 조면 과립체(rough microsome; RM)의 존재 또는 비 존재 조건에서 야생형 Pr1(wtPr1) 및 OB-Rb-Pr1의 전위시켰다.

[0056] 그 결과, 도 3B와 같이 25kDa 생성물이 합성된 것을 확인할 수 있었다.

[0057] 상기 생성물들은 절단되지 않은 Pr1 전구체 신호와 유사하였으며, 신호 서열이 결여된 Pr1보다 약간 큰 질량을 갖는 것이 확인되었다. 또한 조면 과립체(RM) 존재시 야생형 Pr1(wtPr1)으로부터 합성된 대다수의 생성물은 도 3B의 레인 4와 같이 약간 작은 크기인 것으로 확인되었으며, 도 3C와 같이 단백질 분해효소로부터 대부분 보호되었다.

[0058] 상기 결과로부터 야생형 Pr1은 효율적으로 전위된 것을 확인할 수 있었다.

[0059] 반면, 도 3B의 레인 5를 참고하면, 소량의 OB-Rb-Pr1만이 성공적으로 조면 과립체(RM)속으로 전위되었으며, 이는 OB-Rb-Pr1의 생성물 대부분이 조면 과립체(RM) 존재시 절단되지 않은 형태의 신호로 존재하기 때문이다. 또

한 OB-Rb-Pr1는 조면 과립체(RM) 존재 또는 비 존재시의 질량이 동일한 것으로 확인되었으며, 도 3D와 같이 단백질 분해효소 K(PK)에 의해 완벽하게 소화되었다.

[0060] 상기 결과로부터 렙틴 수용체(OB-Rb)의 전위 약화는 효율성이 낮은 신호 서열이 원인이 되며, 이는 렙틴 수용체(OB-Rb)의 낮은 발현량의 원인이 되는 것으로 확인되었다.

[0061] <실시예 4> 향상된 신호 서열을 통한 렙틴 수용체(OB-Rb) 발현 수준 확인

[0062] 효율성이 향상된 신호 서열이 렙틴 수용체 발현을 증가시킬 수 있는지 확인하였다.

[0063] 먼저, 도 4A와 같이 야생형 렙틴 수용체(wtOB-Rb)의 N-말단에 Pr1 신호 서열을 결합시킨 돌연변이 렙틴 수용체(OB-Rb)를 제작하고, 야생형 렙틴 수용체(wtOB-Rb) 및 N-말단이 결합된 야생형 렙틴 수용체(OB-Rb Δ S)와 단백질 분해효소 K(PK)로 각각 렙틴 수용체를 소화작용시킨 후 합성된 생성물로 전위 분석을 수행하였다.

[0064] 그 결과, 도 4B와 같이 야생형 렙틴 수용체(wtOB-Rb) 전구체보다 작은 생성물이 확인되었으며, 이 생성물은 단백질 분해효소 K에 의해 렙틴 수용체(OB-Rb)에서 소화되어진 렙틴 수용체(OB-Rb)의 짧은 세포질 꼬리(Δ C)로 확인되었다. 상기 짧은 세포질 꼬리(Δ C)의 정량적 값은 렙틴 수용체(OB-Rb)의 전위 효율성을 나타내며, 도 4B를 참고하면, 렙틴 수용체(OB-Rb)의 짧은 세포질 꼬리(Δ C)량은 OB-Rb-Pr1에서 2.0 ± 0.41 배 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0065] 또한 도 4C를 참고하면, OB-Rb-Pr1를 발현하는 세포에서 새로 합성된 렙틴 수용체(OB-Rb) 양은 *in vitro* 실험과 동일한 수준(2배)으로 증가하였으며, 도 4D를 참고하면, 전체 렙틴 수용체(OB-Rb) 양은 11.7 ± 2.57 배로 매우 증가하였다.

[0066] 또한 도 4E를 참고하면, 신호 서열 의존적 단백질 발현량 변화는 돌연변이 Pr1를 발현하는 세포에서 확인되었는데, 바이오틴과 특이적 결합된 세포 표면 렙틴 수용체(OB-Rb)의 양이 OB-Rb를 발현하는 세포보다 Pr1-OB-Rb를 발현하는 세포에서 3.1 ± 0.45 배 증가 되어 있었다.

[0067] 상기 결과로부터 효율성이 낮은 N-말단 신호 서열이 렙틴 수용체(OB-Rb)의 낮은 발현 수준의 주요 원인은 것이 확인되었다. 따라서, 렙틴 수용체의 신호 서열의 효율성을 향상시키면, 렙틴 수용체 발현을 증가시킬 수 있음이 제안될 수 있다.

[0068] <실시예 5> 효율성이 향상된 신호 서열에 의한 렙틴 신호 증가 확인

[0069] 실시예 4에서 제안된 바와 같이, 향상된 렙틴 수용체의 신호 서열 효율이 렙틴에 의해 유도되는 신호를 증가시킬 수 있을지 확인하였다.

[0070] 도 5A와 같은 구조로 제작된 레트로바이러스를 감염시켜, C-말단에 HA 에피토프가 결합된 키메라 렙틴 수용체(OB-Rb) 및 야생형 렙틴 수용체를 지속적으로 발현시킬 수 있는 시상하부(hypothalamic) N1 cells (mHypoE-N1)을 제작하였다. 그 다음 각각의 mHypoE-N1 세포에서 각각의 렙틴 수용체 발현량을 면역형광현미경으로 확인하였으며, 각각의 렙틴 수용체 mRNA를 RT-PCR로 확인하였다.

[0071] 그 결과, 도 5C와 같이 세포에서 발현된 렙틴 수용체(OB-Rb)의 mRNA 전사량은 동일하였으나, 도 5B를 참고하면, 야생형 렙틴 수용체(OB-Rb)를 발현시키는 세포에서는 렙틴 수용체(OB-Rb) 염색이 약하게 나타난 반면, 렙틴 수용체(OB-Rb)에 Pr1의 신호서열이 결합된 키메라 렙틴 수용체(Pr1-OB-Rb)에서는 렙틴 수용체(OB-Rb) 염색이 매우 강하게 나타났다.

[0072] 특히, 주목할 만한 것은 도 5D와 같이 렙틴 처리는 야생형 렙틴 수용체(OB-Rb)를 발현시키는 세포와 비교하여 Pr1-OB-Rb를 발현시키는 세포에서 p-STAT3의 양을 4.5 ± 0.32 배 증가시켰다는 것이다.

[0073] 상기 결과로부터 향상된 신호 서열 효율은 일반적인 STAT3 인산화에 의한 렙틴 신호 활성화와 동일한 방법으로 렙틴 신호 전달을 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

[0074] 이 연구의 가장 중요한 목적은 렙틴 수용체(OB-Rb)의 낮은 발현 수준의 원인을 분석한 것으로, 본 발명에 따르면, 렙틴 수용체(OB-Rb)는 소수성이 적은 N-말단 지역을 포함하고 있는 기능적으로 활성화된 신호 서열을 가지고 있으나, 생리학적으로 렙틴 수용체(OB-Rb)의 신호 서열은 낮은 효율성을 나타내어 전위 약화의 원인이 되고, 이는 낮은 수준의 렙틴 수용체(OB-Rb) 발현의 원인이 되는 것으로 확인되었다.

[0075] 따라서, 이 연구는 사람에게 있어서, 렙틴 신호 전달 장애로 인하여 발병되는 질병치료를 위한 렙틴 수용체(OB-Rb) 발현을 조절하는 신호 서열을 목적으로 하는 새로운 치료 개발을 위한 신규한 방법으로 제공될 수 있다.

[0076] 이하, 본 발명의 약학조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0077] <제제예 1> 주사제의 제조

[0078] 탭시펩타이드 10 mg, 소듐 메타비설파이트 3.0 mg, 메틸파라벤 0.8 mg, 프로필파라벤 0.1 mg 및 주사용 멸균 증류수 적량을 혼합하고 통상의 방법으로 최종 부피가 2 ml이 되도록 제조한 후, 2 ml 용량의 앰플에 충전하고 멸균하여 주사제를 제조하였다.

[0079] <제제예 2> 정제의 제조

[0080] 탭시펩타이드 10 mg, 유당 100 mg, 전분 100 mg 및 스테아린산 마그네슘 적량을 혼합하고 통상의 정제 제조방법에 따라 타정하여 정제를 제조하였다.

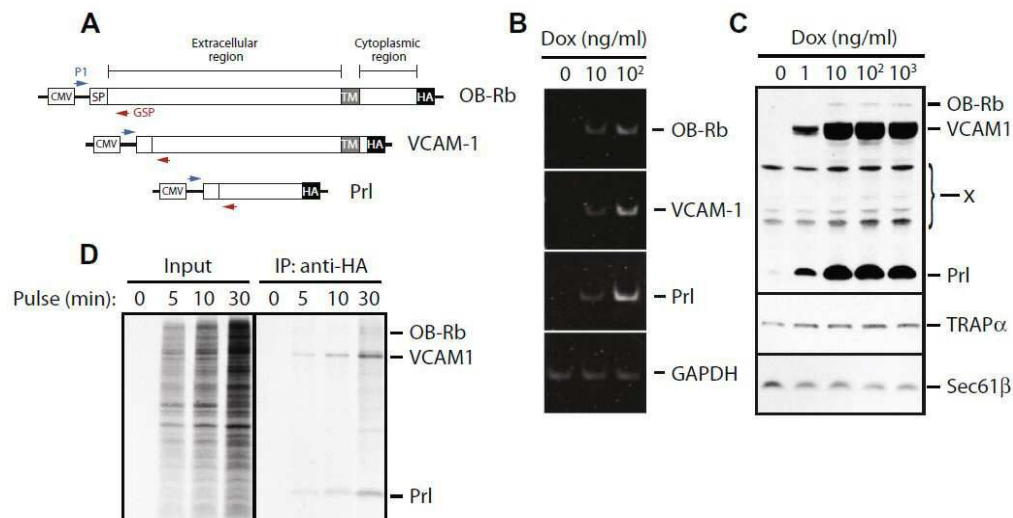
[0081] <제제예 3> 캡슐제의 제조

[0082] 탭시펩타이드 10 mg, 유당 50 mg, 전분 50 mg, 탈크 2 mg 및 스테아린산 마그네슘 적량을 혼합하고 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

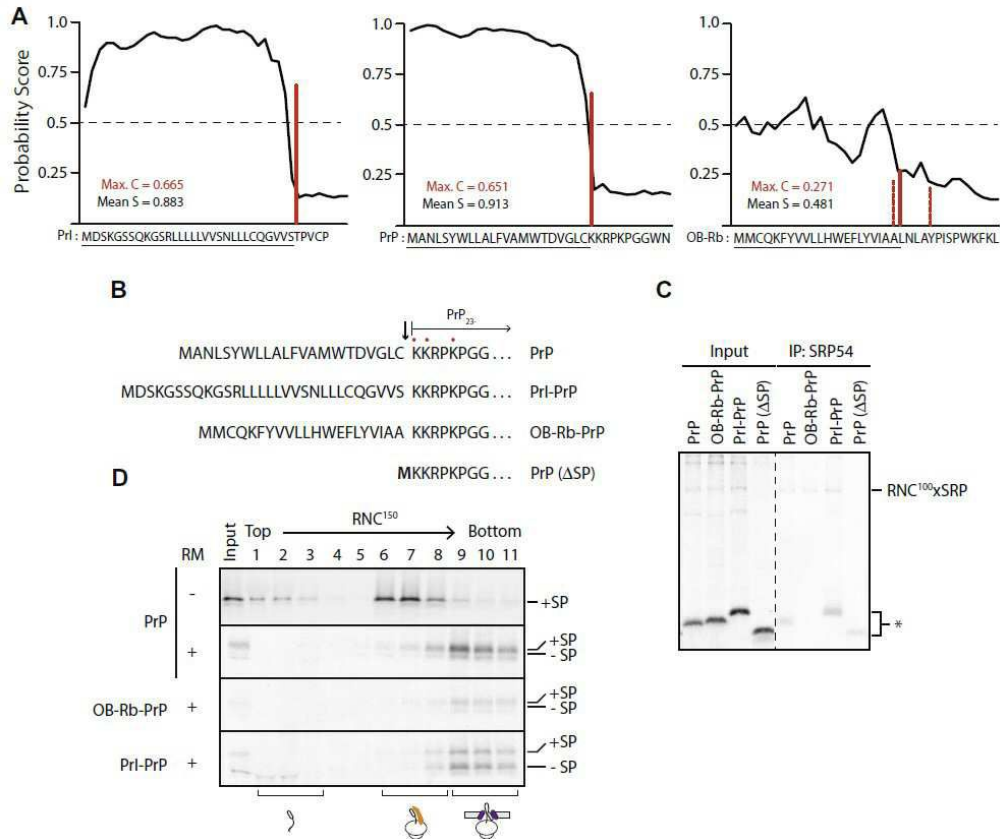
[0083] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

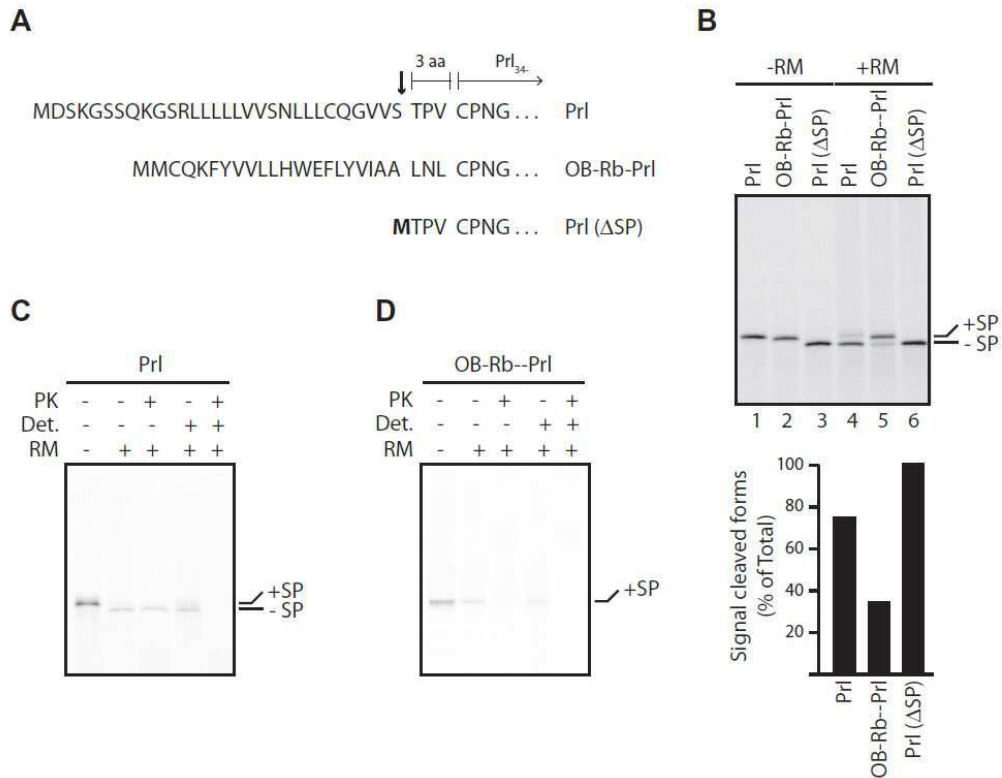
도면1



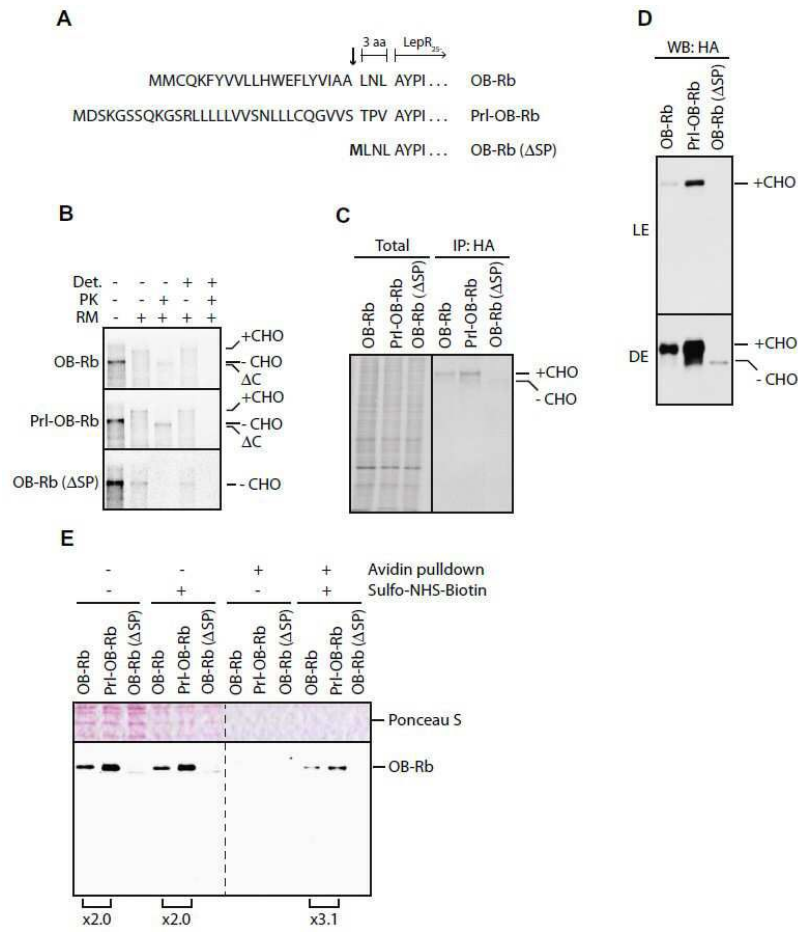
도면2



도면3



도면4



도면5

