



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0167513
(43) 공개일자 2024년11월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) A61P 21/00 (2006.01)
C12Q 1/6883 (2018.01) G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/177 (2013.01)
A61P 21/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2023-0064539
(22) 출원일자 2023년05월18일
심사청구일자 2023년05월18일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
김유리
서울특별시 양천구 목동동로12길 60, 103동 1405호 (신정동, 목동현대아파트)
이수민
경기도 성남시 분당구 중앙공원로 17, 325동 3001호 (서현동, 한양아파트)
(74) 대리인
리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 13 항

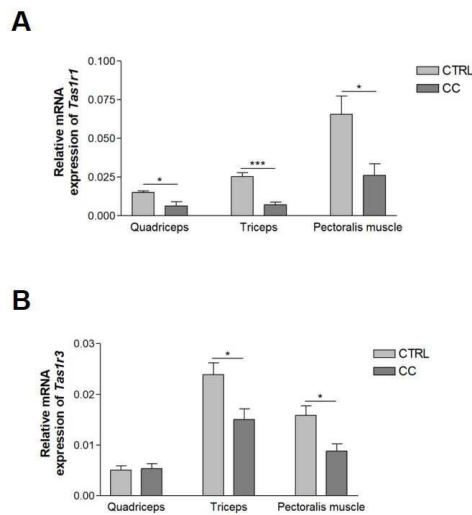
(54) 발명의 명칭 근육 위축 진단 및 치료를 위한 인간 감칠맛 수용체 TAS1R1/TAS1R3의 용도

(57) 요약

본 발명은 인간 감칠맛 수용체 TAS1R1/TAS1R3를 이용한 근육 위축 진단 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

본 발명은 근육 위축증 증상을 나타내는 암 악액질 모델에서 감칠맛 수용체인 TAS1R1 및 TAS1R3의 발현 수준이 감소되는 것을 확인하였으며, TAS1R1의 발현 수준을 향상시키는 경우 근육 위축 관련 마커의 발현 수준이 감소되는 것을 확인하였다. 또한 TAS1R1의 발현 수준을 저하시키는 경우 근육 위축 관련 마커의 발현 수준은 증가하는 것을 확인하였다. 따라서, 인간 감칠맛 수용체인 TAS1R1 및/또는 TAS1R3를 이용하여 근육 위축을 효과적으로 진단하거나 치료할 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

C12Q 1/6883 (2022.01)

G01N 33/6872 (2013.01)

C12Q 2600/118 (2013.01)

C12Q 2600/136 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2333/4719 (2013.01)

G01N 2500/04 (2013.01)

G01N 2800/52 (2021.08)

명세서

청구범위

청구항 1

감칠맛 수용체의 발현 또는 활성을 촉진하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 근육 위축증(muscle atrophy) 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 감칠맛 수용체는 TAS1R1 및 TAS1R3으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 제제는 TAS1R1 단백질을, TAS1R1 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, TAS1R3 단백질 및 TAS1R3 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 근육 위축증은 악액질(cachexia), 근감소증(Sarcopenia), 불용성 근위축증(Disuse atrophy), 기계적 자극 부재에 의한 근위축증, 신경지배 상실성 근위축증 (Denervational atrophy), 약물유인성 근위축증 (Drug induced atrophy), 영양결핍성 근위축증 (Malnutritional atrophy), 근육퇴행위축증, 긴장감퇴증, 근육 퇴화증, 근무력증 및 근이영양증(Muscular dystrophy)으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 Atrogin-1 및 MuRF1로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 유전자의 발현 또는 활성을 감소시키는 것인, 약학적 조성물.

청구항 6

1) 감칠맛 수용체가 발현되거나 또는 활성을 갖는 시험관 내 모델에 후보물질을 처리하는 단계; 및
2) 상기 감칠맛 수용체의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계
를 포함하는, 근육 위축증(muscle atrophy) 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 시험관 내 모델은 TAS1R1 및 TAS1R3으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 발현 또는 활성이 음성 대조군 또는 정상군에 비해 감소된 것인, 방법.

청구항 8

청구항 6에 있어서, 상기 방법은

3) 상기 후보물질 처리에 따라 상기 모델에서의 감칠맛 수용체의 발현 또는 활성이 증가되는 경우, 상기 후보물질을 근육 위축증 치료제로 판단하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 9

감칠맛 수용체 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는, 근육 위축증(muscle atrophy) 진단 또는 예후 분석용 바이오마커 조성물.

청구항 10

감칠맛 수용체 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 근육 위축증(muscle atrophy) 진단 또는 예후 분석용 조성물.

청구항 11

청구항 10의 조성물을 포함하는, 근육 위축증(muscle atrophy) 진단 또는 예후 분석용 키트.

청구항 12

개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 감칠맛 수용체 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 근육 위축증(muscle atrophy) 진단 또는 예후를 분석하기 위한 정보제공 방법.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 방법은 상기 측정된 개체의 발현 수준을 대조군의 발현 수준과 비교하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 감칠맛 수용체 TAS1R1/TAS1R3를 이용한 근육 위축 진단 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 근위축증 (Muscular atrophy)이란 근육량의 점진적 감소에 의하여 발생하는 것으로, 근육의 약화 및 퇴행을 일컫는다. 근육 위축은 비활동, 산화적 스트레스, 만성 염증에 의해 촉진되며 근육 기능과 운동 능력을 약화시킨다. 근육기능을 결정짓는 가장 중요한 요소는 근육량이며, 이는 단백질 합성과 분해의 균형에 의해 유지된다. 근육 위축증은 단백질 분해가 합성보다 더 일어날 때 발생한다. 근육크기는 근육 내에서 일어나는 동화작용(anabolism)이나 이화작용(catabolism)을 유도하는 세포 내 신호전달 과정(signaling pathways)에 의해 조절되며, 근육 단백질의 분해보다 합성을 유도하는 신호전달 반응이 많이 일어날 경우 근육 단백질 합성이 증가 되는데, 이는 근육 단백질 증가에 따른 근육 크기 증가나 근섬유 수 증가로 나타난다.

[0003] 현재 근육 위축증 치료제의 일례로서 WO 2007/088123에는 니트록시 유도체를 유효성분으로 포함하는 근위축증 치료제가 개시되어 있고, WO 2006/081997에는 아트라릭산 또는 그의 유도체를 유효성분으로 포함하는 근위축증 치료제가 개시되어 있다. 그러나 화합물을 유효성분으로 포함하는 이들 치료제는 근육 위축증이 발병된 골격근 뿐만 아니라, 근육 위축증과 관련되지 않은 내장근 또는 심근에도 작용하기 때문에, 크고 작은 다양한 부작용이 유발될 수 있어, 실질적인 치료에 사용되지 못하고 있다.

[0004] 근육 위축증에 의한 운동 기능의 저하는, 골절 또는 낙상을 초래하여 장기간 비활동 상태를 초래하므로 추가적인 근육 위축과 운동 기능 저하라는 악순환을 초래하고, 또한, 대사 장애나 감염증의 합병 빈도를 높이는 등, 삶의 질(QOL)뿐만 아니라 원 질환의 예후까지도 악화시키는 점에서 근육 위축증을 효과적으로 진단하고 치료하는 기술의 개발이 절실하게 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 일 양상은 감칠맛 수용체의 발현 또는 활성을 촉진하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 근육 위축증(muscle atrophy) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0006] 다른 양상은 상기 근육 위축증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 근육 위축증의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.

[0007] 또 다른 양상은 1) 감칠맛 수용체가 발현되거나 또는 활성을 갖는 시험관 내 모델에 후보물질을 처리하는 단계; 및 2) 상기 감칠맛 수용체의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 근육 위축증(muscle atrophy) 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

- [0008] 또 다른 양상은 감칠맛 수용체 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는, 근육 위축증(muscle atrophy) 진단 또는 예후 분석용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0009] 또 다른 양상은 감칠맛 수용체 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 근육 위축증(muscle atrophy) 진단 또는 예후 분석용 조성물을 제공한다.
- [0010] 또 다른 양상은 상기 근육 위축증 진단 또는 예후 분석용 조성물을 포함하는, 근육 위축증(muscle atrophy) 진단 또는 예후 분석용 키트를 제공한다.
- [0011] 또 다른 양상은 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 감칠맛 수용체 단백질, 이의 단편 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 근육 위축증(muscle atrophy) 진단 또는 예후를 분석하기 위한 정보제공 방법을 제공한다.
- 과제의 해결 수단**
- [0012] 일 양상은 감칠맛 수용체의 발현 또는 활성을 촉진하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 근육 위축증(muscle atrophy) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 명세서에서의 용어 "감칠맛 수용체"는 단맛, 감칠맛, 신맛, 짠맛 및 쓴맛을 포함하는 인간의 5가지 기본 맛 수용체의 하나로서, 그 중 감칠맛을 나타내는 물질에 대한 수용체로, G-단백질 결합 수용체(G-protein coupled receptor) 군에 속하는 것으로 알려져 있다.
- [0014] 상기 감칠맛 수용체는 TAS1R1 및 TAS1R3으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 TAS1R1을 포함하는 것일 수 있다.
- [0015] 본 명세서에서의 용어 "TAS1R1" 및 TAS1R3"는 G 단백질 결합 수용체 (GPCR)에 속하는 기본 미각 수용체 중 하나로서, 수용체의 리간드가 결합하면 세포 안쪽에 존재하는 G-단백질의 활성을 유도해 신호전달을 일으킨다. 상기 TAS1R1은 TAS1R3와 이형이성복합체를 이루어 감칠맛 수용체를 구성한다. 상기 TAS1R1은 인간에서 Uniprot 번호 Q7RTX1의 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 마우스에서 Uniprot 번호 Q99PG6의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 TAS1R3은 인간에서 Uniprot 번호 Q7RTX0의 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 마우스에서 Uniprot 번호 Q925D8의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0016] 상기 감칠맛 수용체의 발현 또는 활성을 촉진하는 제제는 감칠맛 수용체 단백질 및/또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 및/또는 활성 수준을 증진시키는 제제일 수 있다. 구체적으로, 상기 제제는 감칠맛 수용체 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하여 이의 발현 및/또는 활성을 촉진을 유도하는 모든 화합물, 탄수화물, 펩티드, 앵타머, 프라이머, 프로브 및 항체로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [0017] 상기 감칠맛 수용체의 발현 또는 활성을 촉진하는 제제는 상기 감칠맛 수용체 단백질 또는 이의 활성 단편을 포함하는 펩타이드 및/또는 상기 감칠맛 수용체 단백질 또는 이의 활성 단편을 암호화하는 유전자를 포함하는 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 구체적으로, 상기 제제는 TAS1R1 단백질(서열번호 29), TAS1R1 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, TAS1R3 단백질(서열번호 31), TAS1R3 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 32) 및 이들의 단편으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다. 또한, 상기 TAS1R1 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 30의 서열을 포함할 수 있으며, 상기 TAS1R3 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 32의 서열을 포함할 수 있다.
- [0018] 본 명세서에서의 용어 "치료"는, 본 발명의 조성물의 투여에 의해 근육 위축증의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [0019] 본 명세서에서의 용어 "예방"은, 본 발명의 조성물의 투여에 의해 근육 위축증의 발병 가능성이 억제되거나 지연되는 모든 행위를 의미한다.
- [0020] 본 명세서에서의 용어 "근육 위축증(muscle atrophy)"은 사지의 근육이 좌우 대칭적으로 점점 위축되어 가는 질환을 의미하는데, 암, 신장 질환, 유전성 질환, 다양한 만성질환의 유발 시에 수반될 수 있으며, 근위축성 측삭경화증(루게릭병), 척수성 진행성 근위축증 등으로 대표된다.
- [0021] 상기 근육 위축증은 근육 질량의 손실 및/또는 점진적인 근육 약화 및 퇴화를 의미한다. 일부 경우에, 근육 질량의 손실 및/또는 점진적인 근육 약화 및 퇴화는 높은 단백질 분해 속도, 낮은 단백질 합성 속도, 또는 이 둘

의 조합으로 인해 발생한다. 일부 경우에, 높은 근육 단백질 분해 속도는 근육 단백질 이화 작용(즉, 아미노산을 포도당 신생 합성의 기질로서 사용하기 위한 근육 단백질의 분해)에 기인한다.

[0022] 또한, 상기 근육 위축증은 근육의 현저한 손실을 의미한다. 근육의 현저한 손실은 대조군 대상체에서 동일한 근육 조직에 비해 대상체에서 질환, 부상 또는 미사용 근육 조직에서의 힘의 감소를 의미한다. 상기 근육 위축증은 대조군 대상체에서 동일한 근육 조직에 비해 대상체에서 질환, 부상 또는 미사용 근육 조직에서의 근육 부피의 감소를 의미한다.

[0023] 상기 근육 위축증은 Atrogin-1 및 MuRF1(muscle RING-finger protein-1)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 및/또는 유전자의 발현 또는 활성이 증가된 것일 수 있다.

[0024] 상기 근육 위축증은 악액질(cachexia), 근감소증(Sarcopenia), 불용성 근위축증(Disuse atrophy), 기계적 자극 부재에 의한 근위축증, 신경지배 상실성 근위축증 (Denervational atrophy), 약물유인성 근위축증 (Drug induced atrophy), 영양결핍성 근위축증 (Malnutritional atrophy), 근육퇴행위축증, 긴장감퇴증, 근육 퇴화증, 근무력증 및 근이영양증(Muscular dystrophy)으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.

[0025] 본 명세서에서의 용어 "악액질(cachexia)"은 체중 감소, 근육 위축, 피로감, 약화, 식욕의 감소 등을 특징으로 하며, 가역적이지 않은 체지방의 손실을 동반할 수 있다. 상기 악액질은 암, 에이즈, 만성폐쇄성 폐질환, 다발성 경화증, 및/또는 울혈성 심부전 등에 의해 유발되는 것일 수 있다.

[0026] 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 근육 위축 특성을 나타내는 암 악액질 모델에서 근육 위축 관련 마커인 Atrogin-1 및 MuRF1의 발현 수준을 감소시킬 수 있음을 확인하였는 바, 상기 조성물은 근육 위축을 회복시켜 암 악액질을 효과적으로 치료하거나 예방할 수 있음을 알 수 있다.

[0027] 상기 조성물은 Atrogin-1 및 MuRF1로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 유전자의 발현 또는 활성을 감소시키는 것일 수 있다.

[0028] 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 상기 "약학적으로 허용 가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않으면서, 주입되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 의미할 수 있다. 여기서 "약학적으로 허용되는"의 의미는 유효성분의 활성을 억제하지 않으면서 적용(처방) 대상이 적응 가능한 이상의 독성을 지니지 않는다는 의미이다. 상기 약학적 조성물에 사용 가능한 상기 담체의 종류는 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되고 약학적으로 허용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 락토스, 텍스트로스, 말토 텍스트린, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 글리세롤, 에탄올, 전분, 아카시아 고무, 알기네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 또는 광물유 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다. 상기 약학적 조성물은 유효성분 이외에 약학적으로 허용되는 담체를 포함하여 당업계에 공지된 통상의 방법으로 투여 경로에 따라 경구용 제형 또는 비경구용 제형으로 제조될 수 있다. 상기 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제제화하여 사용될 수 있다.

[0029] 상기 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제제화하여 사용될 수 있다. 상기 약학 조성물을 제제화할 경우, 일반적으로 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 또는 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 추가하여 조제될 수 있다.

[0030] 상기 약학 조성물이 경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 현탁액, 웨이퍼 등의 제형으로 제조될 수 있다. 이때 약학적으로 허용되는 적합한 담체의 예로서는 락토스, 글루코스, 슈크로스, 텍스트로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨 등의 당류, 옥수수 전분, 감자 전분, 밀 전분 등의 전분류, 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스 등의 셀룰로오스류, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 마그네슘 스테아레이트, 광물유, 맥아, 젤라틴, 탈크, 폴리올, 식물성유 등을 들 수 있다. 제제화할 경우 필요에 따라 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 및/또는 부형제를 포함하여 제제화할 수 있다.

- [0031] 상기 약학 조성물이 비경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 주사제, 경피 투여제, 비강 흡입제 및 좌제의 형태로 제제화될 수 있다. 주사제로 제제화할 경우 적합한 담체로서는 멸균수, 에탄올, 글리세롤이나 프로필렌 글리콜 등의 폴리올 또는 이들의 혼합물을 들 수 있으며, 바람직하게는 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline)나 주사용 멸균수, 5% 텍스트로스 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 경피 투여제로 제제화할 경우 연고제, 크림제, 로션제, 겔제, 외용액제, 파스타제, 리니먼트제, 에어로졸제 등의 형태로 제제화될 수 있다. 비강 흡입제의 경우 디클로로폴루오로메탄, 트리클로로폴루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 등의 적합한 추진제를 사용하여 에어로졸 스프레이 형태로 제제화될 수 있으며, 좌제로 제제화할 경우 그 기제로는 위텡솔(witepsol), 트윈(tween) 61, 폴리에틸렌 글리콜류, 카카오지, 라우린지, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르류, 폴리옥시에틸렌 스테아레이트류, 소르비탄 지방산 에스테르류 등이 사용될 수 있다.
- [0032] 상기 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있는데, 상기 용어 "약학적으로 유효한 양"이란 의학 적 치료 또는 예방에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 예방하기에 충분한 양을 의미하 며, 유효 용량 수준은 질환의 중증도, 약물의 활성, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 사용된 본 발명 조성물의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율 치료기간, 사용된 본 발명 조성물과 배합 또 는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 상기 약학 조성물은 단독으로 투여하거나 공지된 근육 위축증에 대한 치료 효과를 나타내는 것으로 알려진 성분과 병용하 여 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하다.
- [0033] 상기 약학 조성물의 투여량은 사용목적, 질환의 중증도, 환자의 연령, 체중, 성별, 기왕력, 또는 유효성분으로 서 사용되는 물질의 종류 등을 고려하여 당업자가 결정할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학 조성물은 성인 1 인당 약 0.1 ng 내지 약 1,000 mg/kg, 바람직하게는 1 ng 내지 약 100 mg/kg로 투여할 수 있고, 본 발명의 조 성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있 다. 상기 투여량 또는 투여횟수는 어떠한 면으로든 본원의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0035] 다른 양상은 상기 근육 위축증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 근육 위축증 의 치료 또는 예방 방법을 제공하는 것이다. 상기에서 설명한 내용과 동일한 부분은 상기 방법에도 공히 적용된 다.
- [0036] 본 명세서에서 사용되는 용어 "개체"는 근육 위축증이 발병되거나 발병할 위험이 있는 쥐, 가축, 인간 등을 포 함하는 포유동물, 조류, 파충류, 양식어류 등을 제한 없이 포함할 수 있다. 또한, 상기 개체는 인간을 제외하는 것일 수 있다.
- [0037] 상기 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 이때, 조성물은 액제, 산제, 에 어로졸, 주사제, 수액제(링겔), 캡슐제, 환제, 정제, 좌제 또는 패치의 형태로 제형화되어 투여할 수 있다. 상 기 근육 위축증 예방 또는 치료용 약학 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여도 투여될 수 있다.
- [0038] 상기 약학 조성물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 목적하는 바에 따라 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경피패치투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 등의 경로를 통해 투여 될 수 있다. 다만, 경구 투여 시에는 제형화되지 않은 형태로도 투여할 수 있고, 위산에 의하여 상기 약학 조성물의 유효성분이 변성 또는 분해될 수 있기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해 로부터 보호되도록 제형화된 형태 또는 경구용 패치형태로 구강내에 투여할 수도 있다. 또한, 상기 조성물은 활 성 물질이 표적세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0040] 또 다른 양상은 1) 감칠맛 수용체가 발현되거나 또는 활성을 갖는 시험관 내 모델에 후보물질을 처리하는 단계; 및 2) 상기 모델 또는 이로부터 수득한 시료의 감칠맛 수용체 발현 또는 활성 수준을 확인하는 단계를 포함하는, 근육 위축증(muscle atrophy) 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다. 상기에서 설명한 내용과 동일한 부분은 상기 방법에도 공히 적용된다.
- [0041] 상기 감칠맛 수용체는 TAS1R1 및 TAS1R3으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으며, 구체

적으로 TAS1R1을 포함하는 것일 수 있다.

- [0042] 상기 시험관 내 모델은 감칠맛 수용체(구체적으로, TAS1R1 및/또는 TAS1R3)를 발현하는 조직, 기관, 또는 세포를 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로, TAS1R1 및/또는 TAS1R3을 발현하는 근육 세포, 조직 또는 기관일 수 있다.
- [0043] 상기 시험관 내 모델은 상기 감칠맛 수용체의 발현 또는 활성이 감소된 것일 수 있으며, 상기 감칠맛 수용체의 발현 또는 활성이 감소된 시험관 내 모델은 TAS1R1 및/또는 TAS1R3의 발현 또는 활성이 감소된 모델일 수 있다. 구체적으로 상기 모델은 음성 대조군 또는 정상군에 비해 TAS1R1 및/또는 TAS1R3의 발현 또는 활성이 감소된 것일 수 있다.
- [0044] 상기 감칠맛 수용체의 발현 또는 활성이 감소된 시험관 내 모델은 TAS1R1 및/또는 TAS1R3의 발현 또는 활성이 감소된 개체로부터 수득하거나, 정상 개체로부터 수득한 조직, 기관, 또는 세포에 TAS1R1 및/또는 TAS1R3의 발현 또는 활성을 억제시킴으로서 수득할 수 있다.
- [0045] 상기 시료는 상기 시험관 내 모델로부터 유래한 물질을 의미하며, 구체적으로 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 소변, 세포 배양액 등을 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 이들 시료로부터 유전자 및/또는 단백질 시료를 얻을 수 있으며, 유전자 시료는 핵산, 예를 들어, DNA, mRNA, 또는 mRNA로부터 합성되는 cDNA 등을 포함할 수 있으며, 이로부터 특정 유전자/단백질의 발현 수준을 확인할 수 있는 한, 그 종류는 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 상기 후보물질은 감칠맛 수용체의 발현 또는 활성에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 후보물질은 화합물, 펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 항체, 안티센스-RNA, siRNA(small interference RNA) 및 천연물 추출물 중 하나 이상을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 상기 방법에 있어서, 2) 상기 모델 또는 이로부터 수득한 시료의 감칠맛 수용체의 발현 또는 활성 수준을 확인하는 단계는 감칠맛 수용체의 DNA, mRNA 및/또는 단백질의 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.
- [0048] 상기 감칠맛 수용체의 DNA 및/또는 mRNA 발현 수준은 역전사효소 중합반응 (RT-PCR), 정량적 또는 반정량적 RT-PCR (Quantitative or semi-Quantitative RT-PCR), 정량적 또는 반정량적 리얼 타임 RT-PCR (Quantitative or semi-Quantitative real-time RT-PCR), 경쟁적 역전사효소 중합효소반응 (competitive RT-PCR), RNase 보호 분석법 (RNase protection method), 노던 블랏팅 (Northern blotting), DNA 칩 및 RNA 칩 (chip)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법으로 측정하는 것일 수 있다.
- [0049] 상기 감칠맛 수용체의 단백질 발현 수준은 웨스턴 블랏팅 (Western blotting), ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석 (RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법 (radical immunodiffusion), 오우크테로니면역 확산법 (Ouchterlony immunodiffusion), 로케트 면역전기영동 (rocket immunoelectrophoresis), 면역조직화학염색법 (immunohistochemical staining), 면역침전분석법 (immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법 (complement Fixation Assay), 면역형광법 (immunofluorescence), 면역크로마토그래피법 (immunochromatography), FACS 분석법 (fluorescenceactivated cell sorter analysis) 및 단백질 칩 방법 (protein chip technology)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법으로 측정하는 것일 수 있다.
- [0050] 상기 방법은, 3) 상기 후보물질 처리에 따라 상기 모델에서의 감칠맛 수용체의 발현 또는 활성이 증가되는 경우, 상기 후보물질을 근육 위축증 치료제로 판단하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0051] 상기 후보물질 처리에 따라 감칠맛 수용체의 발현 또는 활성 수준이 증가되는 것은 감칠맛 수용체의 발현 또는 활성 수준이 후보물질 무처리 대조군에 비해 증가된 것을 의미하는 것일 수 있으며, 구체적으로 대조군에 비하여 활성 또는 발현량이 20% 이상 증가한 상태, 보다 구체적으로는 40% 이상 증가한 상태, 더욱 구체적으로는 60% 이상 증가한 상태를 의미할 수 있다.
- [0053] 또 다른 양상은 감칠맛 수용체 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는, 근육 위축증(muscle atrophy) 진단 또는 예후 분석용 바이오마커 조성물을 제공하는 것이다. 상기에서 설명한 내용과 동일한 부분은 상기 조성물에도 공히 적용된다.
- [0054] 상기 감칠맛 수용체는 TAS1R1 및 TAS1R3으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으며, 구체

적으로 TAS1R1을 포함하는 것일 수 있다.

- [0055] 상기 바이오마커 조성물은 TAS1R1 단백질(서열번호 21), TAS1R1 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 22), TAS1R3 단백질(서열번호 23) 및 TAS1R3 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 24)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [0056] 본 명세서에서의 용어 "바이오마커(biomarker)"는 일반적으로 단백질, 핵산(DNA 및 mRNA 등), 대사물질(지질, 당지질, 당단백질 및 당 등) 등의 유기생체분자를 이용해 몸 안의 변화를 알아 낼 수 있는 지표를 의미하는 것으로서, 구체적으로 특정 질병에서 정상이나 병적인 상태를 구분할 수 있거나 치료 반응을 예측할 수 있고 객관적으로 측정할 수 있는 표지자를 의미한다. 바이오마커는 그 활용에 따라, 약물 타겟의 존재를 확인하는 타겟마커, 병의 유무를 진단하는 진단마커, 특정 약물에 대한 반응군과 비반응군을 구별할 수 있는 예상마커, 약물 치료효과를 모니터링할 수 있는 대리표지자마커, 질병의 예후를 알려주는 예후 바이오마커 등이 있다.
- [0057] 본 명세서에서 용어 "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인 또는 예측하는 것을 의미하며, 특정 질병 또는 질환에 대한 한 개체의 감수성 (susceptibility)을 판정하는 것, 한 개체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 개체의 예후를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics) (예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)를 포함한다.
- [0058] 본 명세서에서의 용어 "예후"는 병세의 진행, 회복에 관한 예측을 의미하는 것으로, 전망 내지는 예비적 평가를 말한다. 본 발명의 목적상, 예후란 근육 위축증의 치료 후 해당 개체에서 치료 성공 여부, 생존, 재발, 전이, 약물반응성, 내성 등과 같은 여부를 판단하는 것을 의미한다. 즉, 의학적 귀추(예컨대, 장기 생존 가능성, 무병 생존율 등)에 대한 예상을 의미하며, 양성적 예후(긍정적 예후) 또는 음성적 예후(부정적 예후)를 포함한다.
- [0059] 본 명세서에서의 용어 "예측"은 의학적 귀추에 대하여 미리 헤아려 짐작하는 것을 의미하며, 본 발명의 목적상 근육 위축증으로 진단받은 환자의 병의 경과(병의 진행, 개선, 약 저항성)를 미리 짐작하는 것을 의미하는 것일 수 있다.
- [0061] 또 다른 양상은 감칠맛 수용체 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 근육 위축증(muscle atrophy) 진단 또는 예후 분석용 조성물을 제공하는 것이다. 상기에서 설명한 내용과 동일한 부분은 상기 조성물에도 공히 적용된다.
- [0062] 본 명세서에서 용어, "발현 수준의 측정"은 특정 단백질(펩타이드) 또는 이의 단편, 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 여부 또는 발현 정도를 측정하는 것을 의미한다. 상기 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준은 상기 단백질 또는 이의 단편의 상대적 양 또는 절대적인 양일 수 있다.
- [0063] 구체적으로, 상기 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 것은 상기 단백질 또는 이의 단편의 양을 측정하는 것일 수 있다. 상기 유전자의 발현 수준은 상기 단백질들을 암호화하는 mRNA의 발현 수준일 수 있다. mRNA의 발현 수준은 mRNA의 상대적 양 또는 절대적인 양일 수 있다. 상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 것은 mRNA의 양을 측정하는 것일 수 있다.
- [0064] 상기 mRNA 또는 유전자(DNA)의 발현 수준을 측정하는 방법은 역전사효소 중합반응 (RT-PCR), 정량적 또는 반정량적 RT-PCR (Quantitative or semi-Quantitative RT-PCR), 정량적 또는 반정량적 리얼 타임 RT-PCR (Quantitative or semi-Quantitative real-time RT-PCR), 경쟁적 역전사효소 중합효소반응 (competitive RT-PCR), RNase 보호 분석법 (RNase protection method), 노던 블랏팅 (Northern blotting), DNA 칩 및 RNA 칩 (chip)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법으로 측정하는 것일 수 있다.
- [0065] 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 방법은 웨스턴 블랏팅 (Western blotting), ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석 (RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법 (radical immunodiffusion), 오우크테로니면역 확산법 (Ouchterlony immunodiffusion), 로켓 면역전기영동 (rocket immunoelectrophoresis), 면역조직화학염색법 (immunohistochemical staining), 면역침전분석법 (immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법 (complement Fixation Assay), 면역형광법 (immunofluorescence), 면역크로마토그래피법 (immunochromatography), FACS 분석법 (fluorescenceactivated cell sorter analysis) 및 단백질 칩 방법 (protein chip technology)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법으로 측정하는 것일 수 있다.

- [0066] 본 명세서에서 용어, "발현 수준을 측정하는 제제"는 특정 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 확인하기 위하여 사용될 수 있는 분자를 의미하며, 구체적으로 상기 단백질 또는 상기 유전자를 검출 및/또는 증폭할 수 있는 제제를 포함하는 것일 수 있다.
- [0067] 상기 "특정 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 검출할 수 있는 제제"는 상기 특정 유전자 또는 단백질에 특이적으로 결합하여 인식할 수 있도록 하거나, 검출하여 증폭시킬 수 있는 제제를 의미하고, "특정 유전자 또는 단백질을 증폭할 수 있는 제제"는 상기 특정 유전자 또는 단백질의 복제를 반복하여 그 수를 증가시킬 수 있는 제제를 의미하며, 예를 들어 상기 유전자를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 또는 특이적으로 결합할 수 있는 프로브를 의미하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0068] 상기 감칠맛 수용체는 TAS1R1 및 TAS1R3으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 TAS1R1을 포함하는 것일 수 있다.
- [0069] 따라서, 상기 근육 위축증 진단 또는 예후 분석용 조성물은 TAS1R1 및 TAS1R3으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 mRNA 또는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브, 뉴클레오티드, 항체, 항체 단편 또는 이의 항원 결합 단편, 리간드, 수용체, 단백질 또는 그 조합을 포함하는 것일 수 있다.
- [0070] 본 명세서에서의 용어 "프라이머(primer)"는 자유 3'-말단 수산화기 (free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 특정 염기 서열에 대해 상보적인 주형 (template)과 염기쌍을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 작용하는 핵산 서열을 말한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약 (즉, DNA 폴리머라제 또는 역전사효소) 및 상이한 4가지의 뉴클레오티드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 예를 들어 TAS1R1 및 TAS1R3으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 단백질을 암호화하는 유전자 또는 mRNA에 대한 특이적인 프라이머로서 7개 내지 50개의 뉴클레오티드 서열을 가진 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성량의 측정을 통해 개체의 근육 위축증 발병 여부 등을 진단할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다. 상기 프라이머는 10 내지 100, 15 내지 100, 10 내지 80, 10 내지 50, 10 내지 30, 10 내지 20, 15 내지 80, 15 내지 50, 15 내지 30, 15 내지 20, 20 내지 100, 20 내지 80, 20 내지 50, 또는 20 내지 30 nt를 갖는 것일 수 있다.
- [0071] 본 명세서에서의 용어 "프로브(probe)"는 표적 핵산 예를 들면, mRNA와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 특정 mRNA의 존재 유무, 함량 및 발현량을 확인할 수 있도록 라벨링 (labeling)되어 있을 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide) 프로브, 단일가닥 DNA (single strand DNA) 프로브, 이중가닥 DNA(double strand DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 예를 들어 TAS1R1 및 TAS1R3으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 단백질을 암호화하는 유전자 또는 mRNA와 상보적인 핵산 서열을 갖는 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 정도를 통해 mRNA의 발현량을 측정함으로써 개체의 근육 위축증 발병 여부 등을 진단할 수 있다. 적절한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당해 기술분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다. 상기 프로브는 10 내지 100, 15 내지 100, 10 내지 80, 10 내지 50, 10 내지 30, 10 내지 20, 15 내지 80, 15 내지 50, 15 내지 30, 15 내지 20, 20 내지 100, 20 내지 80, 20 내지 50, 또는 20 내지 30 nt를 갖는 것일 수 있다.
- [0072] 상기 프라이머 또는 프로브는 포스포아미다이트 (phosphoramidite) 고체 지지체 합성법이나 기타 널리 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 또한 이러한 핵산 서열은 당해 기술분야에 공지된 다양한 방법을 통해 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 예는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오티드 하나 이상의 동족체로의 치환, 또는 뉴클레오티드 간의 변형, 예를 들면 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체 (예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등) 로의 변형을 포함할 수 있다. 또한 프라이머 또는 프로브는 검출 가능한 신호를 직접적으로 또는 간접적으로 제공할 수 있는 표지를 이용하여 변형될 수 있다. 상기 표지의 예는 방사성 동위원소, 형광성 분자, 화학발광물질 (chemiluminescent) 또는 바이오틴을 포함할 수 있다.
- [0073] 본 명세서에서의 용어 "항체 (antibody)"는 당해 기술분야에 공지된 용어로서 항원성 부위에 대하여 지시되는 특이적인 면역 글로불린을 의미한다. 예를 들어 상기 항체는 TAS1R1 및 TAS1R3으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 단편에 대해 특이적으로 결합할 수 있다. 상기 단편은 상기 단백질에 대한 항체에 의해 인식될 수 있는 하나 이상의 에피토프 (epitope)를 가지고 있는 단백질 단편을 의미하며, 예를 들어 면역원성 단편일 수 있다. 상기 항체의 형태는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 또는 재조합 항체를 포함하며, 모

든 면역글로불린 항체가 포함된다. 또한, 상기 항체는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다.

- [0074] 이러한 항체들을 이용하여 당해 기술분야에 공지된 효소 면역측정법 (enzyme linked immunosorbent assay; ELISA), 방사선면역 측정법 (radioimmunoassay; RIA), 샌드위치 측정법 (sandwich assay), 폴리아크릴 겔상의 웨스턴 블롯팅 또는 면역 블롯팅 등의 방법에 의해 생물학적 샘플 중에 상기 단백질이 발현되었는지를 확인할 수 있다.
- [0075] 본 명세서에서의 용어 "항체 단편"은 온전한 항체, 펩티드 또는 단백질의 구조를 갖지는 않지만, 항원성 부위에 대해 지시되는 특이적인 항원결합부위 또는 결합 도메인을 갖는 폴리펩티드를 의미한다. 상기 단편은 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄를 갖는 완전한 형태의 항체가 아닌 항체 분자의 기능적 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 또는 Fv일 수 있다. 상기 결합 단편은 최소한 7개 이상의 아미노산, 예를 들면 9 개 이상의 아미노산, 12개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0077] 또 다른 양상은 상기 근육 위축증 진단 또는 예후 분석용 조성물을 포함하는, 근육 위축증(muscle atrophy) 진단 또는 예후 분석용 키트를 제공하는 것이다. 상기에서 설명한 내용과 동일한 부분은 상기 키트에도 공히 적용된다.
- [0078] 상기 감칠맛 수용체는 TAS1R1 및 TAS1R3으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 TAS1R1을 포함하는 것일 수 있다.
- [0079] 상기 키트는 상기 바이오마커의 발현 수준을 측정함으로써, 근육 위축증의 발병 가능성 및 예후 등을 진단 또는 예측할 수 있는 효과가 있다. 상기 키트는 근육 위축증의 발병을 예측하는데 필요한 시료를 더 포함할 수 있다. 상기 키트는 고체 지지체, 항체 또는 항원 결합 단편의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적합한 완충용액, 발색 효소, 형광물질로 표지된 2 차 항체, 또는 발색 기질을 포함할 수 있다. 상기 키트는 핵산 검출을 위하여, 중합 효소, 완충제, 핵산, 조효소, 형광물질, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 상기 중합 효소는 예를 들어 Taq 중합효소이다.
- [0081] 또 다른 양상은 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 감칠맛 수용체 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 근육 위축증(muscle atrophy) 진단 또는 예후를 분석하기 위한 정보제공 방법을 제공하는 것이다. 상기에서 설명한 내용과 동일한 부분은 상기 방법에도 공히 적용된다.
- [0082] 상기 감칠맛 수용체는 TAS1R1 및 TAS1R3으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 TAS1R1을 포함하는 것일 수 있다.
- [0083] 본 명세서에서 용어, "개체"는 근육 위축증이 발병되거나 발병될 가능성이 있는 모든 생물체를 의미하며, 구체적인 예로, 포유동물, 예를 들면, 인간, 소, 말, 돼지, 개, 양, 염소, 또는 고양이일 수 있다.
- [0084] 본 명세서에서의 용어 "생물학적 시료"는 상기 개체로부터 유래한 물질을 의미하며, 구체적으로 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 소변 등을 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 이들 시료로부터 유전자 및/또는 단백질 시료를 얻을 수 있으며, 유전자 시료는 핵산, 예를 들어, DNA, mRNA, 또는 mRNA로부터 합성되는 cDNA 등을 포함할 수 있으며, 이로부터 특정 유전자/단백질의 발현 수준을 확인할 수 있는 한, 그 종류는 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 생물학적 시료는 시료로부터 수득된 단백질 시료 또는 핵산(유전자) 시료를 포함한다.
- [0085] 상기 발현 수준을 측정하는 단계는 상기 생물학적 시료와, 상기 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 앵타머를 인큐베이션시키는 단계를 포함할 수 있다. 상기 측정하는 단계는 전기영동, 면역블로팅, 효소 결합 면역흡착 분석법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA), 단백질 칩, 면역침강, 마이크로어레이, 전자현미경법(electron microscopy), 또는 이들의 조합으로 수행될 수 있다. 상기 전기영동은 SDS-PAGE, 등전점 전기영동, 2차원 전기영동, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0086] 상기 발현 수준을 측정하는 단계는 상기 생물학적 시료와, 상기 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드와 동일하거나 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드와 인큐베이션시키는 단계를 포함할 수 있다. 상기 측정하는 단계는 노던 블로팅(Northern blotting) 또는 폴리머라제 증폭 반응(polymerase chain reaction:

PCR)으로 수행될 수 있다. 상기 PCR은 실시간 PCR 또는 역전사 PCR일 수 있다.

[0087] 상기 방법은 상기 측정된 개체의 발현 수준을 대조군의 감칠맛 수용체 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준과 비교하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0088] 본 명세서에서의 용어 "대조군"은 근육 위축증이 발병되지 않은 일반 개체, 비-근육 위축증 환자군, 비환자군 등을 의미하는 것일 수 있다.

[0089] 상기 방법은 상기 개체에서 측정된 감칠맛 수용체 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준이 대조군의 발현 수준과 비교하여 감소된 경우, 상기 개체를 근육 위축증이 발병한 것으로 판정하거나 발병 위험을 높은 수준으로 예측하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0090] 본 발명은 근육 위축증 증상을 나타내는 암 악액질 모델에서 감칠맛 수용체인 TAS1R1 및 TAS1R3의 발현 수준이 감소되는 것을 확인하였으며, TAS1R1의 발현 수준을 향상시키는 경우 근육 위축 관련 마커의 발현 수준이 감소되는 것을 확인하였다. 또한 TAS1R1의 발현 수준을 저하시키는 경우 근육 위축 관련 마커의 발현 수준은 증가하는 것을 확인하였다. 따라서, 인간 감칠맛 수용체인 TAS1R1 및/또는 TAS1R3를 이용하여 근육 위축을 효과적으로 진단하거나 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0091] 도 1의 A는 Ctrl 그룹 및 CC 그룹의 종양 부피를 나타내고, B는 Ctrl 그룹 및 CC 그룹의 종양을 제거한 후의 도체 중량을 나타내고, C는 Ctrl 그룹 및 CC 그룹의 악력 수준을 나타내는 도면이다 (n=6/group).

도 2의 A는 Ctrl 그룹 및 CC 그룹의 대퇴사두근 H&E 염색 결과를 나타낸 도면이고(배율 100x, 스케일바 100 mm), B는 Ctrl 그룹 및 CC 그룹의 근섬유 크기를 정량화한 결과를 나타낸 도면이다 (n=3/group).

도 3은 암 악액질 마우스 모델에서 Ctrl 그룹 및 CC 그룹의 대퇴사두근, 삼두근 및 비복근에서의 Atrogin-1(A) 및 MuRF1(B)의 mRNA 발현 수준을 나타낸 도면이다 (n=6/group).

도 4는 Ctrl 그룹 마우스의 혀, 시상하부, 간, 십이지장, 대퇴사두근, 삼두근, 대흉근, 비복근 및 전경골근에서의 Tas1r1 (A) 및 Tas1r3 (B)의 mRNA 발현 수준을 나타낸 도면이다 (n=6/group).

도 5는 암 악액질 마우스 모델에서 Ctrl 그룹 및 CC 그룹의 대퇴사두근, 삼두근 및 대흉근에서의 Tas1r1 (A) 및 Tas1r3 (B)의 mRNA 발현 수준을 나타낸 도면이다 (n=6/group).

도 6의 A는 C2C12 세포에서 Ctrl 그룹 및 CC 그룹의 분화 수준을 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 도면이고, B는 Ctrl 그룹 및 CC 그룹에서의 근관세포 길이를 나타낸 도면이고, C 및 D는 Ctrl 그룹 및 CC 그룹에서의 MYH 단백질의 발현수준을 나타낸 도면이다.

도 7의 A 및 B는 C2C12 세포에서 Ctrl 그룹 및 CC 그룹의 Atrogin-1(A) 및 MuRF1(B) mRNA 발현 수준을 나타낸 도면이고, C 내지 E는 Ctrl 그룹 및 CC 그룹에서 Atrogin-1 및 MuRF1의 단백질 발현 수준을 나타낸 도면이다.

도 8의 A 내지 C는 C2C12 세포에서 Ctrl 그룹 및 CC 그룹에서 PI3K/Akt 신호전달 경로와 관련된 단백질들의 발현 수준을 나타낸 도면이다.

도 9는 C2C12 세포에서 Ctrl 그룹 및 CC 그룹에서 Tas1r1 (A) 및 Tas1r3 (B)의 mRNA 발현 수준을 나타낸 도면이다.

도 10은 인간 1차 세포 모델에서 Ctrl 그룹 및 CC 그룹의 Tas1r1 (A) 및 Tas1r3 (B)의 mRNA 발현 수준을 나타낸 도면이다.

도 11은 인간 1차 세포 모델의 Ctrl 그룹 및 CC 그룹에 pCMV6 빈 벡터(EV) 또는 TAS1R1를 포함하는 pCMV6 벡터(TAS1R1)를 형질도입한 후의 TAS1R1(A), Atrogin-1(B) 및 MuRF1(C)의 mRNA 발현 수준을 나타낸 도면이다.

도 12는 인간 1차 세포 모델의 Ctrl 그룹 및 CC 그룹에 대조군 siRNA (non) 또는 TAS1R1 siRNA (siTAS1R1)를 형질도입한 후의 TAS1R1(A), Atrogin-1(B) 및 MuRF1(C)의 mRNA 발현 수준을 나타낸 도면이다.

한편, 상기 도면에 기재된 모든 데이터는 평균±표준편차로 표현되고, 독립표본 양측 스튜던트 t-테스트로 분석되며, $p < 0.05$ 는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다 (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0092] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0094] **실시예 1: 암 악액질(Cancer cachexia) 마우스 모델 구축 및 관리**
- [0095] 5주령 C57BL/6J 수컷 마우스를 중앙실험동물(Seoul, Korea)에서 입수하였다. 1주일간의 순응 기간 후 마우스를 무작위로 두 그룹으로 나누었다: 정상 대조군 마우스 그룹(CTRL; n=6) 및 루이스 폐 암종(Lewis lung carcinoma, LLC)으로 유발된 암 악액질 마우스 그룹(CC; n=6). 암 악액질은 100 μ L PBS에 현탁된 LLC 세포(1×10^6)를 마우스의 오른쪽 뒷다리 부위에 피하 주사하여 유도하였다.
- [0096] 종양 부피는 2일마다 모니터링되었고, 악력은 실험기간동안 매주 측정하였다. 각 종양의 부피는 디지털 캘리퍼를 사용하여 측정하였으며, [폭(mm) X 길이 X 0.5^2]의 공식으로 계산하였다. 악력은 악력측정기(Jeungdo Bio & Plant, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였다. 뒷다리 및 앞다리의 악력의 조합을 측정하기 위해, 마우스가 체중을 지탱하는 네 발 모두로 그리드를 잡을 수 있게 한 다음 그림이 풀릴 때까지 꼬리로 마우스를 부드럽게 잡아당겼다. 각 마우스는 1분 간격으로 3번 시행하여 평균을 계산하였다.
- [0097] 종양 접종 21일 후, 마우스를 이소플루란(Piramal Critical Care, Bethlehem, PA, USA)으로 마취시켰다. 허, 시상하부, 간, 십이지장, 대퇴사두근, 삼두근, 대흉근, 비복근, 전경골근을 각각 해부하고 무게를 측정한 후 추가 PCR 실험을 위해 -80° C에 보관했다.
- [0098] 모든 마우스의 사용은 이화여자대학교 동물실험관리위원회(IACUC No: 21-003-01)의 승인을 받았으며, 모든 절차는 ARRIVE 가이드라인 및 National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals에 따라 수행하였다.
- [0100] **실시예 2: 조직학적 분석**
- [0101] 조직학적 분석은 하기와 같은 실험을 통해 수행하였다. 구체적으로, 대퇴사두근 조직을 10% 포름알데히드로 고정시켰다. 파라핀으로 포매된 조직을 5 μ m 절편으로 절단하고, 헤마톡실린 및 에오신(hematoxylin and eosin, H&E)으로 염색하였다. 근육 절편을 광학현미경(Nikon, Tokyo, Japan)으로 관찰하고 근섬유 단면적(μm^2)을 측정하였다.
- [0103] **실시예 3: 세포 배양**
- [0104] C2C12 근육모세포 및 LLC 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, 인간 골격근모세포(HSKM)는 Gibco(Thermo Fisher Scientific, Seoul, Korea)에서 구입하였다. 세포는 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(100 U/mL 및 100 μ g/mL)이 보충된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle) 배지에서 배양하였으며, 37° C 및 5% CO_2 의 가습 배양기에서 유지되었다.
- [0106] **실시예 4: LLC 조건 배지(conditioned medium) 제조**
- [0107] LLC 세포가 >90% 포화도에 도달했을 때, 성장 배지를 제거했다. 조건 배지(Conditioned medium, CM)는 무혈청 DMEM에서 48시간 배양한 후, 수집하고 원심분리하여 세포 파편을 제거한 다음, 0.2 μ m 주사기 필터를 사용하여 여과했다.
- [0109] **실시예 5: 근육모세포 분화 및 암 악액질 유도**
- [0110] C2C12 및 HSKM 세포를 85~90% 포화도까지 성장시키고, 2% 말 혈청 및 1% 페니실린이 첨가된 DMEM에서 96시간(C2C12) 또는 48시간(HSKM) 동안 세포를 배양하여 근관세포(myotube)로 분화시켰다.

[0111] 시험관 내에서 암 악액질 조건을 확립하기 위해, 완전히 분화된 근육모세포를 LLC CM과 2% 말 혈청 및 1% 페니실린이 첨가된 DMEM 배지를 1:2 비율로 혼합하여 48시간 동안 배양하였고, 매 24시간마다 배지를 교체했다. 완전히 분화된 세포를 대조군(CTRL)으로 설정하였고, LLC CM으로 처리한 완전히 분화된 세포를 LLC-유도 암 악액질군(CC)로 설정하였다.

[0113] **실시예 6: 일시적 형질감염 (Transient transfection)**

[0114] HSkM을 완전히 분화시키고, 일시적인 형질감염 전에 CTRL 그룹의 경우 2% 말 혈청이 첨가된 DMEM으로 교체하였고, CC 그룹의 경우 2% 말 혈청이 첨가된 LLC CM으로 교체하였다. 제조사의 프로토콜에 따라 Opti-MEM(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)과 혼합된 Lipofectamine3000(Invitrogen)을 사용하여 인간 TAS1R1을 포함하는 포유동물 발현 벡터 pCMV6-ENTRY를 세포로 형질감염시켰다. 형질감염된 세포는 48시간 동안 배양하였다. pCMV6 (빈 벡터)을 대조군으로 사용하였다.

[0116] **실시예 7: RNA 간섭(RNA interference)**

[0117] 풀링된 siRNA(ON TARGETplus Human TAS1R1 siRNA) 및 대조군 siRNA(ON-TARGETplus 비표적 대조군 풀)는 Dharmacon(Lafayette, CO, USA)에서 구입했다. 제조사가 제공한 프로토콜에 따라 DharmaFECT1 시약(Dharmacon)을 사용하여 HSkM에서 siRNA 형질감염을 수행하였다. HSkM을 완전히 분화시킨 후, siRNA 형질감염 전에 CTRL 그룹의 경우 2% 말 혈청이 첨가된 DMEM으로 대체하고, CC 그룹의 경우 2% 말 혈청이 첨가된 LLC CM으로 대체되었다. 형질감염된 세포는 48시간 동안 배양하였다.

[0118] 상기에서 사용한 siRNA의 서열정보는 하기 표에 기재하였다.

표 1

siRNA	염기서열 (5' to 3')		서열번호
ON TARGETplus Human TAS1R1 siRNA	#1	GCCUGCAGCUUCUUAUUUC	1
	#2	UGACAGGUCUUGUAGCUUC	2
	#3	GUAAGGACUUGCCAGAGAA	3
	#4	CCACAUAGAGCUCCAAGGA	4
ON-TARGETplus 비표적 대조군 풀	#1	UGGUUUACAUGUCGACUAA	5
	#2	UGGUUUACAUGUUGUGUGA	6
	#3	UGGUUUACAUGUUUCUGA	7
	#4	UGGUUUACAUGUUUCCUA	8

[0121] **실시예 8: RNA 분리 및 RT-qPCR (reverse transcription quantitative real-time) 분석**

[0122] TRIzol 시약(Invitrogen)을 사용하여 RNA 분리를 수행하고, Nanodrop(Thermo Scientific)을 사용하여 RNA 농도 및 순도를 확인했다. RevertAid 역전사 효소(Thermo Scientific)로 DNA를 합성하고, Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 정량적 실시간 PCR(qPCR)을 수행했다. β -actin은 in vitro 및 in vivo 연구 모두에서 로딩 컨트롤로 사용되었다. qPCR은 하기 표에 기재된 정방향(F) 및 역방향(R) 프라이머 이용하여 수행하였다.

표 2

유전자 이름	염기서열 (5' to 3')		서열번호
Mouse Tas1r1	F	CATCTGGTGATTCTTGAGTG	9
	R	AGGATACGAAGTGGAGGAG	10
Mouse Tas1r3	F	CAGGCAGTTGTGACTCTGTTG	11
	R	TGCGATGCAGATACCTCGTG	12
Mouse Atrogin-1	F	AGTGAGGACCGGCTACTGTG	13
	R	GATCAAACGCTTGCGAATCT	14
Mouse MuRF1	F	TGACATCTACAAGCAGGAGTGC	15

	R	TCGTCTTCGTGTTTCCTTGC	16
Mouse	F	CGCCACCAGTTCCGCATGGA	17
β -actin	R	TACAGCCCGGGGAGCATAGT	18
Human	F	GTTCTGCCTACAACGCATAC	19
TAS1R1	R	GTGTAGAAGGAAATGCACCTT	20
Human	F	GACAGAGCGCCTGAAGAT	21
TAS1R3	R	AGTCCACACAGTCGTAGCAG	22
Human	F	TCACAGCTCACATCCCTGAG	23
Atrogin-1	R	AGACTTGCCGACTCTTTGGA	24
Human	F	TGGACTTCTTTACTTTGGATTAG	25
MuRF1	R	CTTCTCTTCTCTGATCTTCTTC	26
Human	F	GATCATTGCTCCTCCTGAGC	27
β -actin	R	ACTCTGCTTGCTGATCCAC	28

[0125] 실시예 9: 웨스턴 블랏 어세이 (Western blot assay)

[0126] 전세포 단백질은 프로테아제 억제제 cocktail(Sigma-Aldrich)이 첨가된 RIPA 용해 완충액(50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.5% sodium deoxycholate, 1% Nonidet P40, 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄ and 1 mM PMSF)으로 추출하였다. 단백질 농도를 정량화하기 위해 protein assay kit(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하였고, 시료는 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 분리하였다. 분리된 단백질을 PVDF (polyvinylidene difluoride) 막 (Millipore, Billerica, MA, USA)으로 트랜스퍼하고, Tween 20(TBS-T)을 함유하고, 중 5% 탈지유 또는 소 혈청 알부민(BSA)이 첨가된 트리스 완충 식염수(Tris-buffered saline)으로 블락킹했다. 이 후, 다음의 희석된 1차 항체로 표지하였다: MYH, atrogin-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), MuRF1 (Invitrogen), Akt (phospho Ser473), Akt, PI3K p85 (phospho Tyr458)/p55 (Tyr199), PI3K (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), and α -tubulin (Abcam, Cambridge, England). 그런 다음 PVDF 막을 TBS-T로 세척하고 항-마우스 또는 항-토끼 2차 항체(Santa Cruz Biotechnology)와 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 밴드는 화학 발광 키트(Advansta, Menlo Park, CA, USA)로 가시화되었고 밴드의 강도는 ImageJ 소프트웨어(NIH, Bethesda, Maryland, USA)로 정량화되었다.

[0128] 실시예 10: 통계적 분석

[0129] 모든 데이터는 최소 세 번의 독립적인 실험에서 얻은 평균 $\pm$ 표준편차(SEM)로 표시된다. 단방향 분산 분석 (ANOVA)에 이어 Newman-Keuls의 사후 테스트가 3개 이상의 샘플을 비교하는 데 사용되었다. 다른 모든 통계 분석에는 양측 스튜던트 t-검정(two-tailed Student's t-test)이 사용되었습니다. 0.05 미만의 p-값은 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다. GraphPad PRISM (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)을 통계 분석에 사용했다.

[0131] 실험예 1: LLC-유도 암 악액질 in vivo 마우스 모델의 근육 위축 특성 분석

[0132] 상기 실시예 1에서 제작한, LLC-유도 암 악액질 마우스 모델(CC 그룹)의 근육 위축과 관련된 특성을 분석하였다.

[0133] 먼저, 종양 부피의 경우, LLC 세포 접종 후 점진적으로 증가하였고 주입 후 12일째부터 CTRL 그룹과 유의한 차이를 보였다(도 1A). 종양 제거 후에는, CTRL 그룹에 비해 CC 그룹에서 도체 중량이 13% 수준으로 유의미하게 감소했다 (도 1B). 또한, CTRL 그룹에 비해 CC 그룹의 대퇴사두근, 삼두근 및 대흉근 중량이 현저하게 감소되었다(표 2). 특히, CC 그룹의 대퇴사두근의 무게는 CTRL 그룹보다 20% 감소되었다. 또한, 근육 기능을 평가하기 위해 악력을 테스트하나 결과, LLC 세포 접종 후 1주일부터 CC 그룹에서 악력이 상당히 감소하였음을 확인하였다 (도 1C).

[0134] 다음으로, 암 악액질 모델에서 근육 위축이 충분히 유발되었는지 확인하기 위해, CTRL 그룹 및 CC 그룹간의 대

퇴사두근의 단면적 및 근섬유 크기를 비교하였다. 그 결과, 대퇴사두근의 근섬유 크기는 CC 그룹에서 CTRL 그룹보다 유의하게 작았으며, 이는 근육 위축이 발생했음을 나타낸다(도 2A 및 2B). 또한, 근육 위축 관련 마커인 Atrogin-1과 MuRF1의 mRNA 수준은 대퇴사두근, 삼두근 및 대흉근에서 CTRL 그룹과 비교하여 CC 그룹에서 상향 조절되었다(도 3A 및 3B).

표 3

	CTRL	CC
대퇴사두근 (Quadriceps) (g)	0.18±0.01	0.11±0.02**
삼두근 (Triceps) (g)	0.10±0.01	0.06±0.01*
대흉근(Pectoralis muscle) (g)	0.06±0.01	0.04±0.00*
비복근(Gastrocnemius muscle) (g)	0.20±0.02	0.17±0.02
전경골근(Tibialis anterior) (g)	0.06±0.01	0.04±0.01

상기 결과를 토대로, 상기 실시예 1에서 제작한 in vivo 암 약액질 모델에서는 근육 위축이 충분히 유도되었음을 알 수 있다.

실험예 2: 골격근에서의 감칠맛 수용체 발현 수준 평가

골격근에서의 감칠맛 수용체의 발현 양상을 분석하기 위해, 골격근을 포함하는 다양한 기관에서의 감칠맛 수용체 발현 수준을 확인하였다.

구체적으로, CTRL 그룹 마우스의 혀, 시상하부, 간, 십이지장, 대퇴사두근, 삼두근, 가슴근, 비복근에서 Tas1r1 및 Tas1r3의 mRNA 발현을 분석하였다.

그 결과, Tas1r1 및 Tas1r3의 발현 수준은 혀, 십이지장 및 간보다 근육 조직들에서 더 높은 것을 확인하였다(도 4A 및 4B). 미각 수용체가 주로 혀에서 발현된다는 사실과 달리, 상기 실험결과에서는 Tas1r1 발현이 혀에서보다 삼두근($p < 0.05$)과 대흉근($p < 0.001$)에서 유의하게 높았고, Tas1r3 발현이 혀에서보다 삼두근($p < 0.001$), 대흉근($p < 0.001$), 비복근($p < 0.05$)에서 유의하게 높은 것을 확인하였는 바, 미각 수용체가 골격근에서 생리학적 역할을 하는 것을 알 수 있다.

실험예 3: In vivo 암 약액질 모델에서의 감칠맛 수용체 발현 수준 평가

암 약액질 상태에서의 감칠맛 수용체의 발현 수준 변화 여부를 확인하기 위해, CTRL과 CC 그룹 간의 수용체 발현 수준의 차이를 세 가지 유형의 근육에서 분석하였다.

그 결과, 대퇴사두근, 삼두근, 대흉근에서의 Tas1r1 발현은 CTRL 그룹에 비해 CC 그룹에서 각각 57%($p < 0.05$), 72%($p < 0.001$), 42%($p < 0.05$) 감소했다(도 5A). Tas1r3 발현은 CTRL 그룹과 비교하여 CC 그룹에서 삼두근 및 대흉근에서 각각 37%($p < 0.05$) 및 35%($p < 0.05$) 감소했다(도 5B).

상기 결과를 토대로, 감칠맛 수용체가 골격근에서 내생적으로 높게 발현되고, 암 약액질 조건에서는 그 발현 수준이 하향 조절됨을 알 수 있다.

실험예 4: In vitro 암 약액질 모델에서 감칠맛 수용체의 발현 수준 평가

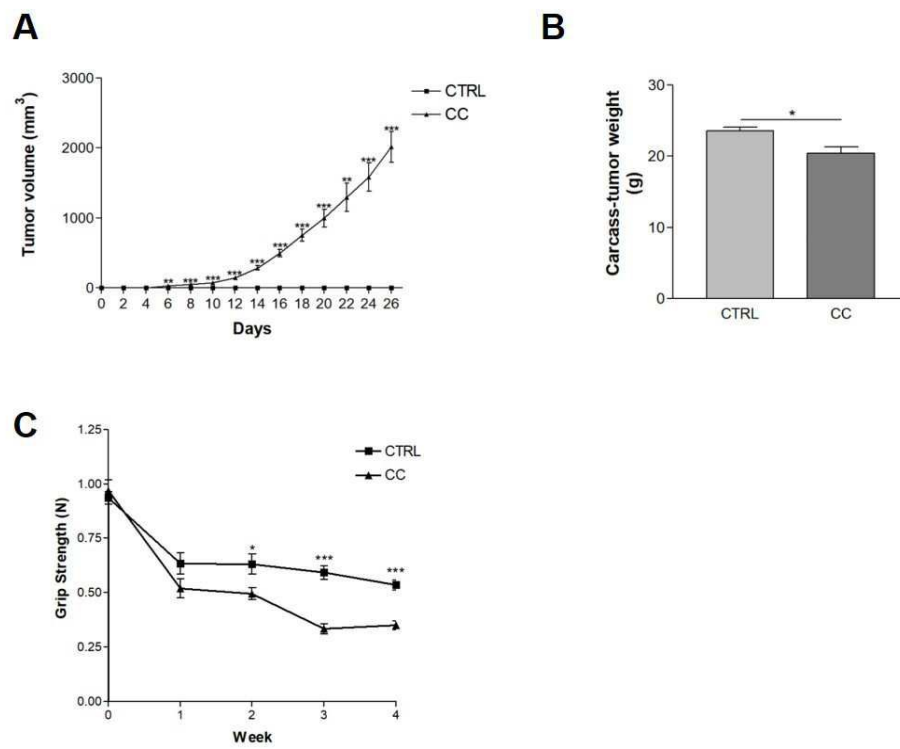
상기 실시예 5에서 제작한, in vitro 암 약액질 모델에서의 감칠맛 수용체의 발현 수준을 평가하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

먼저, 상기에서 제작한 in vitro 모델의 암 약액질 유도 여부를 확인하기 위해, C2C12 세포에서 근관세포의 길이와 MYH (myosin heavy chain) 수준을 측정하여 분화 및 암 약액질의 유도 효율을 확인했다(도 6A 내지 6D).

- [0152] 또한, CC 그룹에서 근육 위축이 적절하게 유도되었는지 확인하기 위해, 근육 위축 마커인 atrogen-1과 MuRF1의 mRNA와 단백질 발현 수준을 확인하였다. 그 결과, Atrogen-1과 MuRF1의 mRNA와 단백질 발현 수준은 둘 다 CTRL 그룹에 비해 CC 그룹에서 유의하게 상향조절되었다(도 7A 내지 7E).
- [0153] 또한, 상기 in vitro 모델에서 근육 위축과 관련된 PI3K/Akt 경로의 발현 수준을 알아보기 위해, PI3K와 Akt의 인산화 단백질 수준을 웨스턴 블랏팅으로 확인하였다. 그 결과, PI3K와 Akt의 인산화 수준은 CTRL 그룹에 비해 CC 그룹에서 유의하게 감소하였음을 확인하였다 (도 8A 내지 8C).
- [0154] 다음으로, 상기 in vitro 암 악액질 모델에서의 감칠맛 수용체 발현의 하향조절을 확인하기 위해, CTRL 및 CC 그룹에서 Tas1r1 및 Tas1r3의 mRNA 수준을 비교분석하였다. 그 결과, Tas1r1 발현은 CTRL 그룹과 비교하여 CC 그룹에서 41%($p < 0.01$) 정도 유의하게 하향조절되었으며, Tas1r3 발현은 감소하는 경향이 보이기는 하나, Tas1r1 보다는 통계적으로 크게 유의성을 보이지는 않았다 (도 9A 및 9B). 이러한 결과는 CTRL 그룹에 비해 CC 그룹에서 감소된 Tas1r1 발현 수준을 나타내는 in vivo 결과와 일치하였다.
- [0156] **실험예 5: 감칠맛 수용체의 발현 수준에 따른 근육 위축 여부 평가**
- [0157] 감칠맛 수용체의 발현 수준에 따라 근육 위축 특성이 조절될 수 있는 지 확인하기 위해, 인간 1차(primary) 세포 모델을 기반으로 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [0158] 먼저, 인간 1차(primary) 세포 모델은 인간 골격근세포(HSKM)를 이용하여 실시예 5에 기재된 바와 같이 제작하였으며, 상기 세포 모델의 CTRL 그룹과 CC 그룹에서 TAS1R1 및 TAS1R3의 mRNA 수준을 측정하였다. 그 결과, TAS1R1 발현 수준의 경우, CTRL 그룹과 비교하여 CC 그룹에서 53%($p < 0.01$)까지 유의하게 하향조절된 반면, TAS1R3 발현은 감소하는 경향이 보이기는 하나, TAS1R1보다는 통계적으로 크게 유의성을 보이지는 않았다(도 10A 및 10B). 이러한 결과는 상기 실험예에서 확인한 마우스의 in vitro 및 in vivo 모델과 일치했으며, 이는 감칠맛 수용체가 암 악액질 조건에서 하향 조절되고, 특히 TAS1R1은 골격근이 암 악액질에서 근육 위축을 조절하는 데 중요한 역할을 할 수 있음을 시사한다.
- [0159] 다음으로, 과발현된 TAS1R1에 의해 근육 위축이 회복될 수 있는지 여부를 확인하기 위해, 완전히 분화된 HSKM 세포에 TAS1R1을 일시적으로 형질감염시켰다. TAS1R1의 과발현 효율은 RT-qPCR로 확인하였다(도 11A). 그 결과, CC+EV 그룹과 비교하여 TAS1R1이 과발현된 CC+TAS1R1 그룹에서 Atrogen-1 및 Murf1을 각각 39%($p < 0.05$) 및 49%($p < 0.01$) 수준으로 하향조절을 유도하였으며, 이는 TAS1R1이 근육 소모 상태에서 근육 위축을 예방할 수 있음을 알 수 있다 (도 11B 및 11C). 또한, CTRL+EV 그룹과 CTRL+TAS1R1 그룹 사이에서는 Atrogen-1 및 Murf1 유전자의 발현 수준에서 유의한 차이가 관찰되지 않았다.
- [0160] 다음으로, TAS1R1의 knockdown이 근육 위축을 악화시키는지 여부를 확인하기 위해, 완전히 분화된 HSKM 세포를 대조군 siRNA 또는 TAS1R1 siRNA로 48시간 동안 형질감염시켰다. 상기 siRNA의 knockdown 효율은 RT-qPCR에 의해 확인되었다(도 12A). 그 결과, Atrogen-1 및 MuRF1의 mRNA 발현 수준은 CTRL+non 그룹에 비해 CTRL+siTAS1R1 그룹에서 89%($p < 0.05$) 및 54%($p < 0.05$)까지 상향 조절되었으며, CC+non 그룹과 비교하여 CC+siTAS1R1 그룹에서는 Atrogen-1 및 MuRF1의 mRNA 발현 수준이 각각 49%($p < 0.05$) 및 30%($p < 0.01$) 상향조절되었다 (도 12B 및 12C).
- [0161] 상기 결과를 토대로, TAS1R1이 암 악액질 조건 하에서 골격근의 근육 위축을 방지할 수 있음을 알 수 있다.
- [0163] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

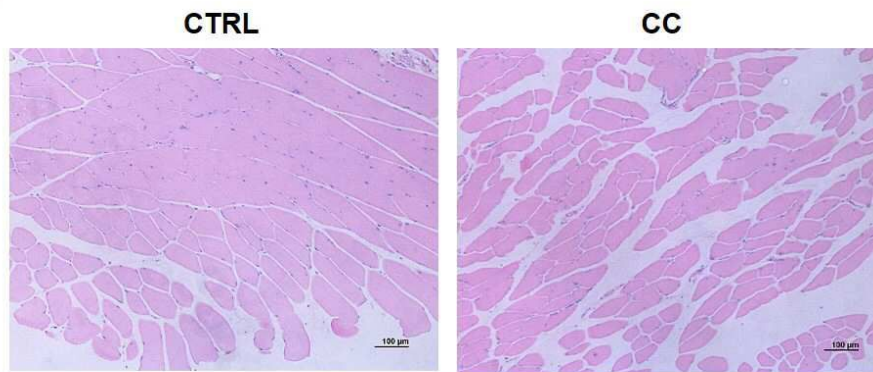
도면

도면1

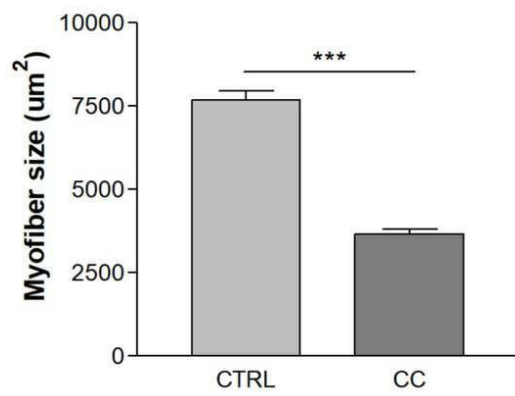


도면2

A

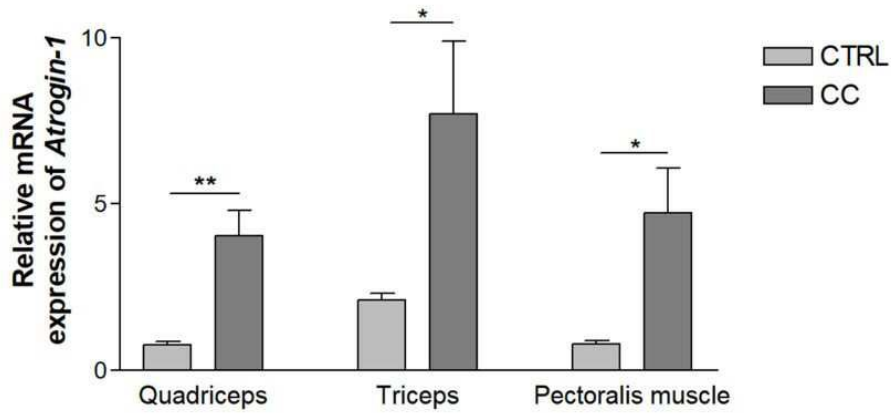


B

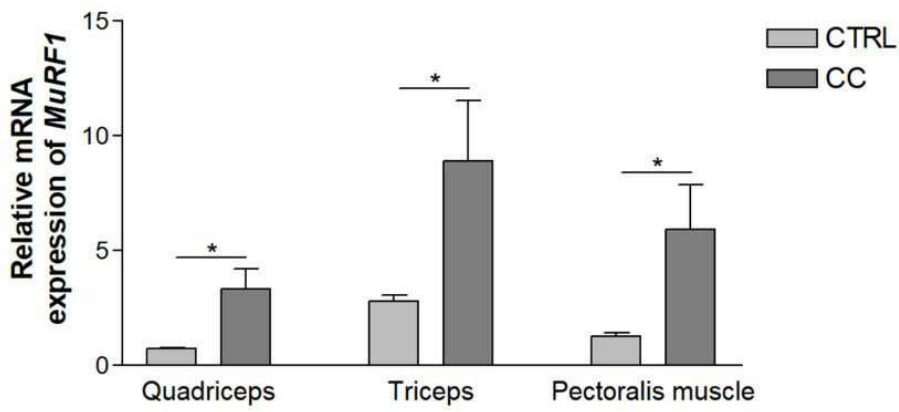


도면3

A

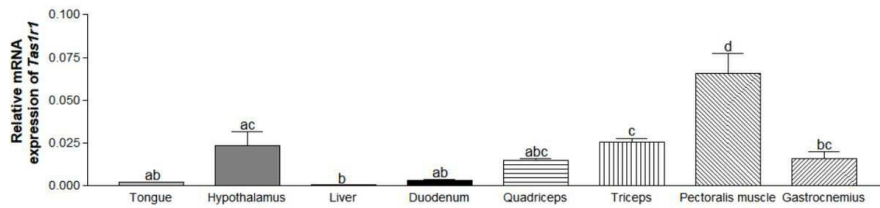


B

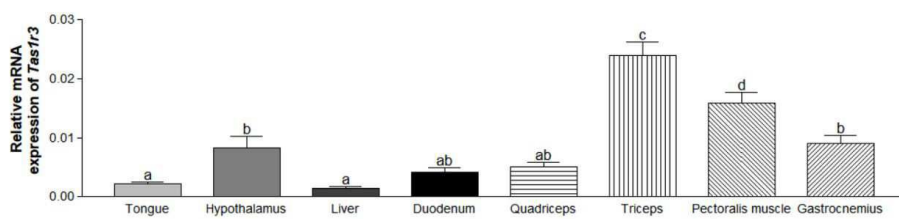


도면4

A

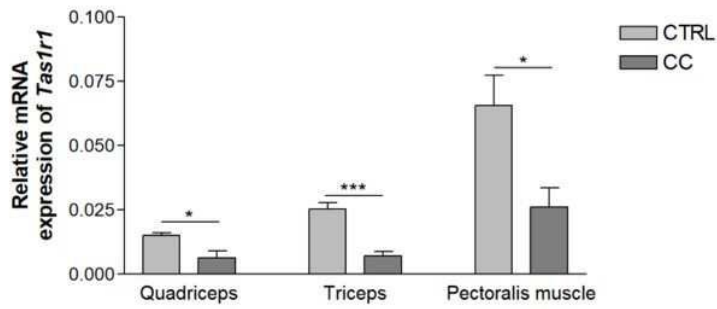


B

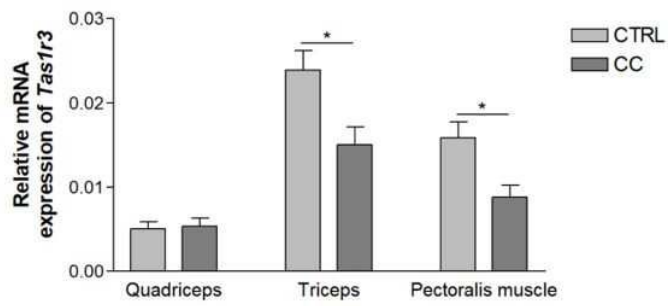


도면5

A

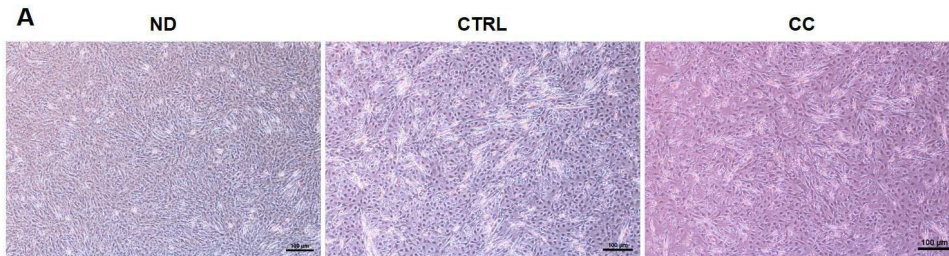


B

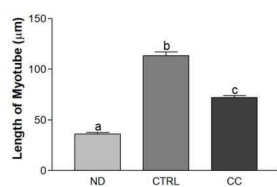


도면6

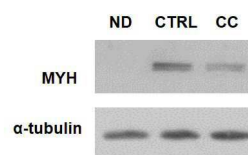
A



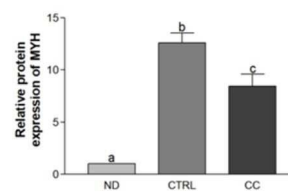
B



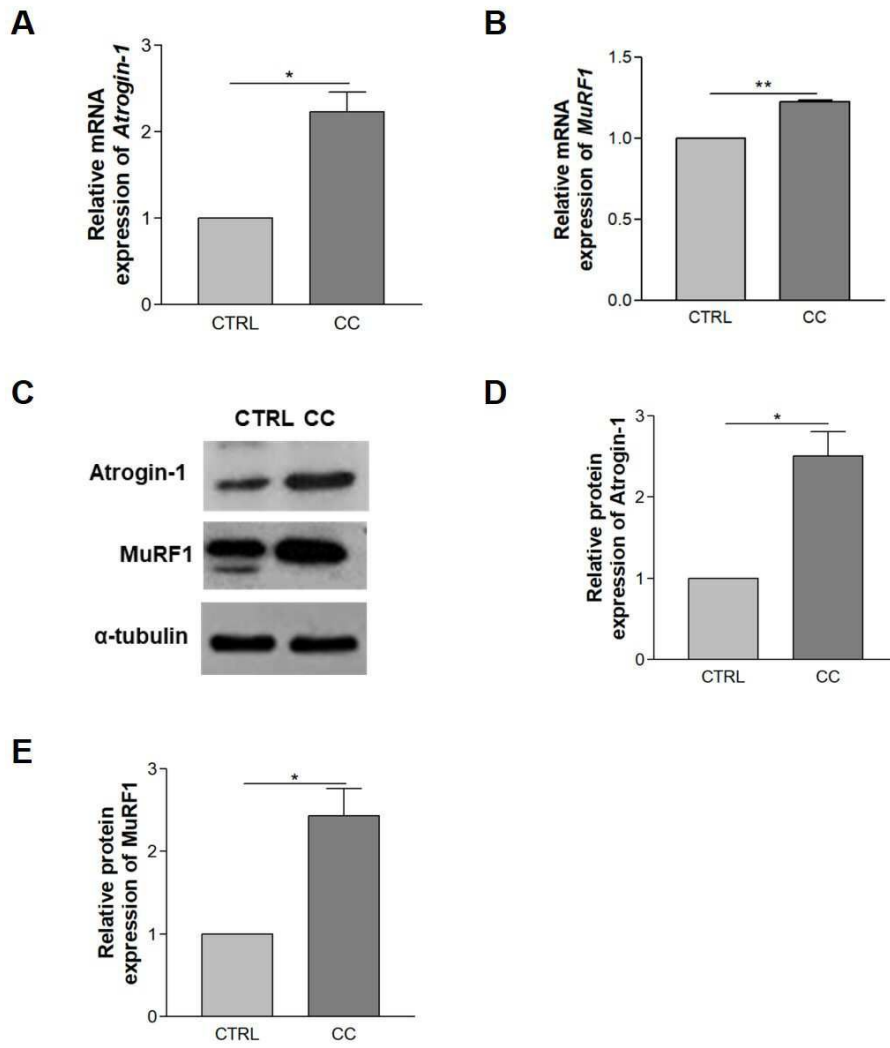
C



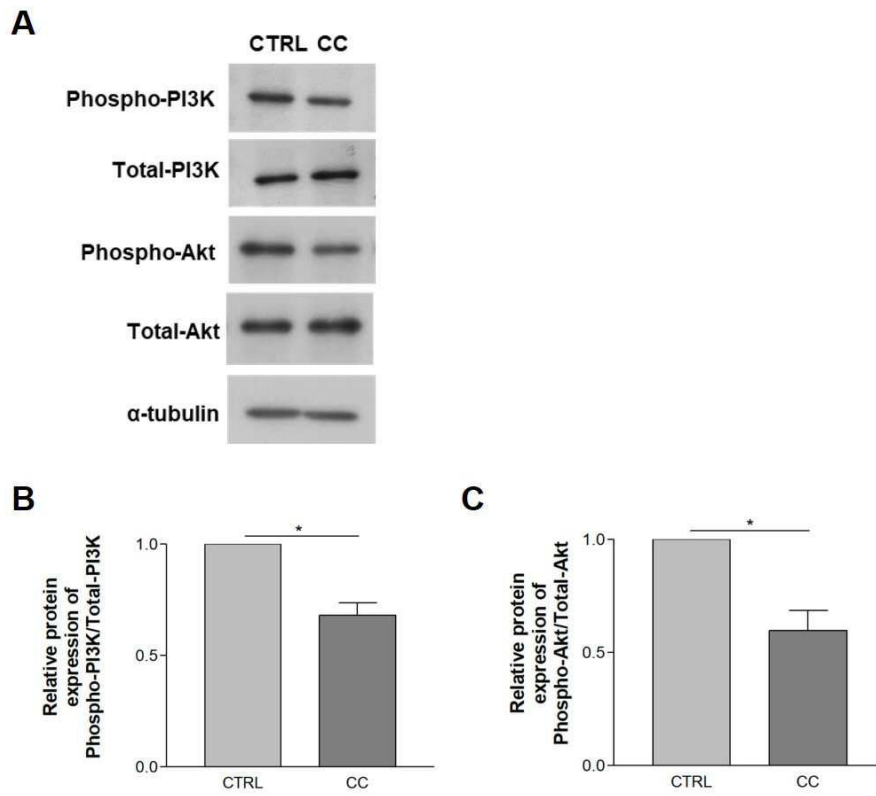
D



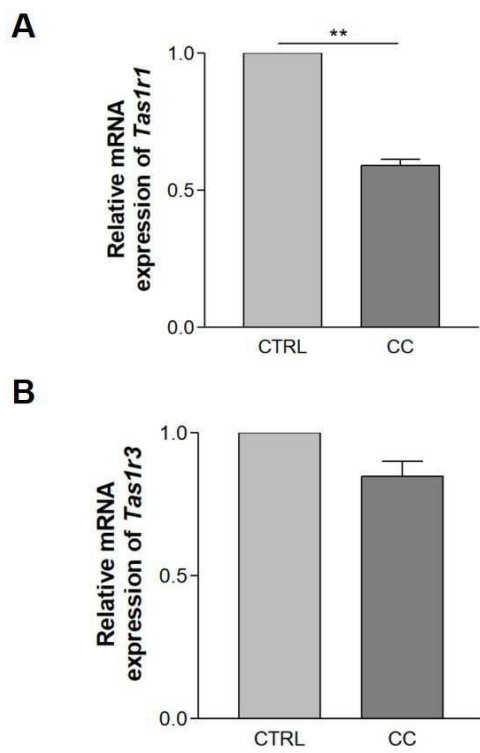
도면7



도면8

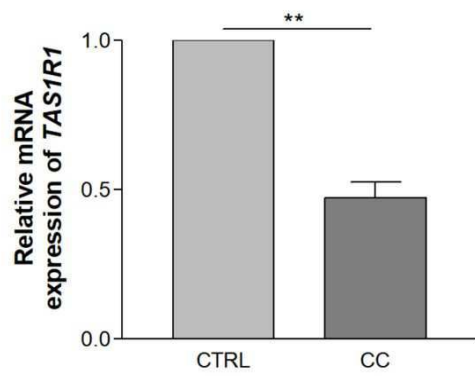


도면9

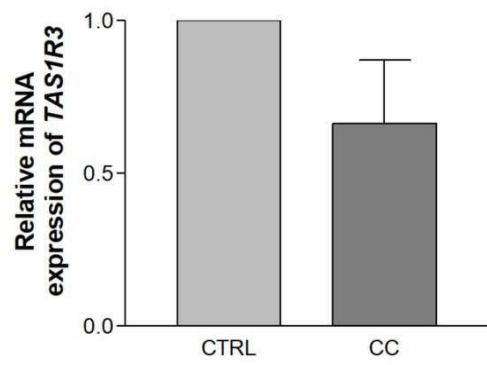


도면10

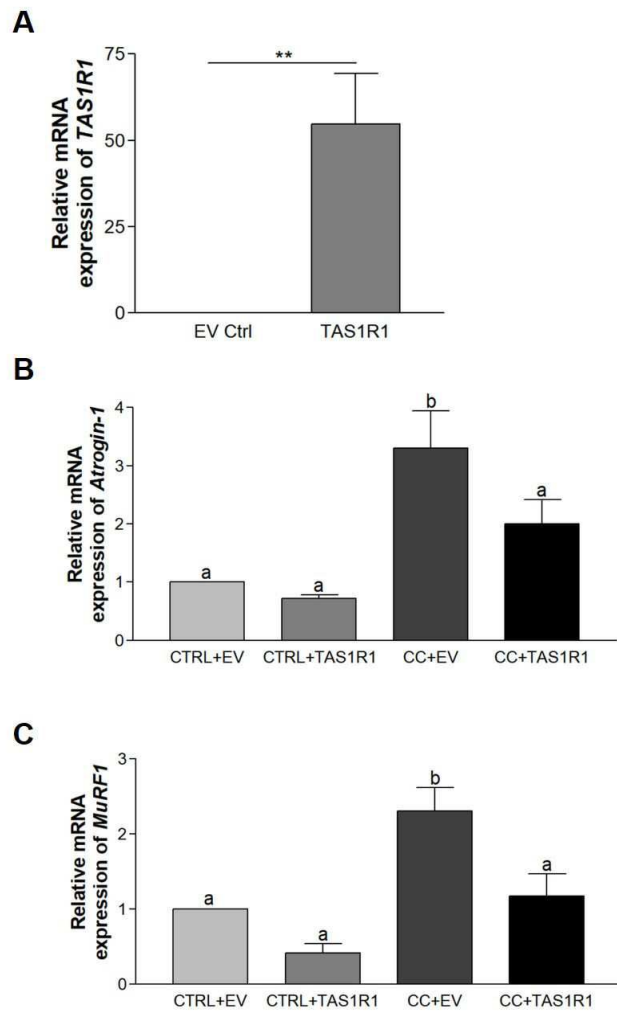
A



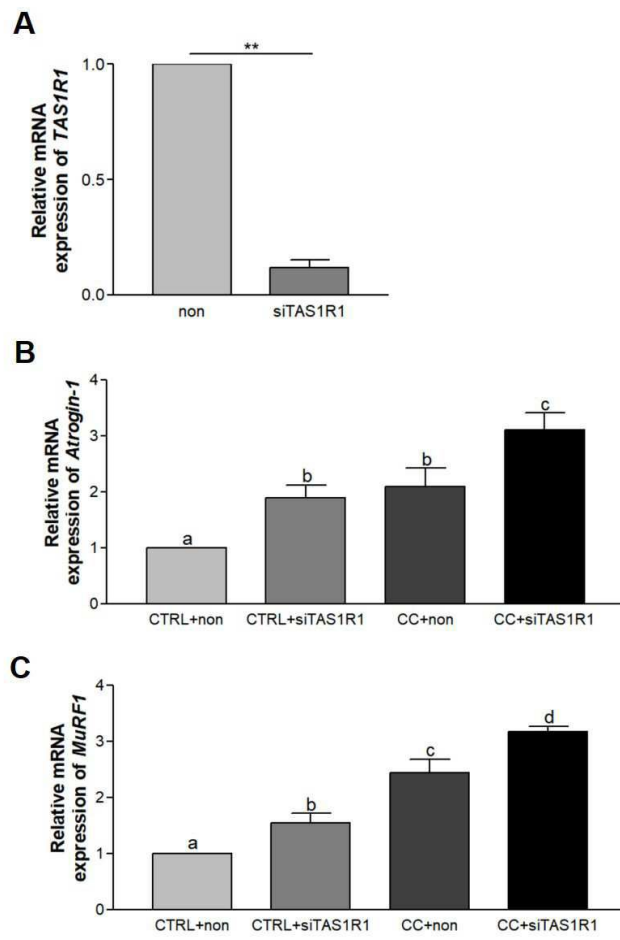
B



도면11



도면12



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.