



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0067190
(43) 공개일자 2012년06월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/395 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01) A61P 3/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0128650

(22) 출원일자 2010년12월15일

심사청구일자 2010년12월15일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

배윤수

경기도 고양시 일산동구 호수로 606, 코오롱레이크폴리스 1차 A동 412호 (장항동)

신선미

경기도 안양시 동안구 관악대로 135, 삼삼래미안아파트 133동 901호 (비산동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

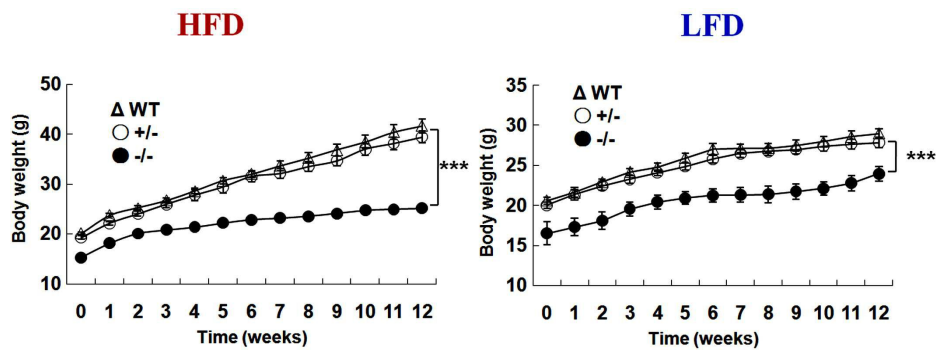
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 A h n a k을 억제하는 물질을 포함하는 비만 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 Ahnak 유전자의 발현을 억제하는 물질을 포함하는 비만 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 자세하게는 상기 유전자의 발현을 억제하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, RNA 앵타머, 항체를 포함하는 조성물, 상기 조성물을 이용하여 비만을 예방 또는 치료하는 방법, 상기 조성물을 포함하는 비만 개선용 식품 조성물 및 비만 치료용 후보물질을 처리한 후 Ahnak 유전자의 발현수준을 비교하는 단계를 포함하는 비만 치료제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

성제경

서울특별시 양천구 목동동로 430, 목동6단지아파트 602동 702호 (목동)

김일용

서울특별시 관악구 문성로 93 (신림동)

신재훈

서울특별시 관악구 인현2길 9-5, 플러스홈 502호 (봉천동)

김요나

서울특별시 관악구 남부순환로246가길 3, 106호 (봉천동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2009-0093987
부처명	교육과학기술부
연구사업명	신약타겟검증사업
연구과제명	비만세포분화에서 Ahnak단백질의 새로운 기능과 신약타겟으로써의 검증
주관기관	이화여자대학교
연구기간	2009.11.01 ~ 2012.10.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	A084614
부처명	교육과학기술부
연구사업명	신약타겟발굴연구사업
연구과제명	Ahnak KO 마우스를 이용한 폐암 치료제 신규약물 taregt 개발
주관기관	서울대학교
연구기간	2008.10.01 ~ 2011.07.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	20100020468
부처명	보건복지부
연구사업명	보건의료기술연구개발사업
연구과제명	Ahnak에 의한 혈관평활근 세포의 이동기전 연구
주관기관	이화여자대학교
연구기간	2008.11.01 ~ 2010.10.31

특허청구의 범위

청구항 1

Ahnak 유전자의 발현을 억제하는 물질을 포함하는 비만 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 물질은 Ahnak 유전자에 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA 또는 앵타머인 것인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 물질은 Ahnak 단백질에 결합하는 항체인 것인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 5

제1항의 조성물을 포함하는 비만 개선용 식품 조성물.

청구항 6

- (a) 비만 의심 검체에 비만 치료용 후보물질을 처리하는 단계; 및
- (b) 대조군과 Ahnak 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현수준을 비교하는 단계를 포함하는 비만 치료제를 스크리닝하는 방법.

명세서

기술 분야

[0001]

본 발명은 Ahnak 유전자의 발현을 억제하는 물질을 포함하는 비만 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 자세하게는 상기 유전자의 발현을 억제하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, 앵타머, 항체를 포함하는 조성물, 상기 조성물을 이용하여 비만을 예방 또는 치료하는 방법, 상기 조성물을 포함하는 비만 개선용 식품 조성물 및 비만 치료용 후보물질을 처리한 후 Ahnak 유전자의 발현수준을 비교하는 단계를 포함하는 비만 치료제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

최근 경제성장과 서구적인 생활방식의 변화에 따라 식습관에도 많은 변화가 있다. 특히, 바쁜 현대인들은 패스트푸드 등의 고열량 식이와 적은 운동량으로 인하여 과체중 및 비만이 증가하고 있다. 비만은 에너지 발란스 조절기능의 이상 혹은 과영양(hypernutrition)으로 지방조직이 과다하게 축적되어 각종질병의 이환율과 사망률을 높이는 만성 질환이다. 비만 및 이와 관련된 질병은 미국 및 전세계적으로 공통적이고 매우 심각한 공중 보건 문제이며 국제보건기구(World Health Organisation, WHO)에 따르면, 전세계적으로 10억 이상의 성

인이 과체중이고, 그 중 적어도 300만 이상이 임상적으로 비만으로 보고 있다. 또한 이는 미국과 유럽에서 두드러지게 증가하고 있으며, 특히 유럽에서 매년 250,000명, 전세계에서 2만 오천명 이상이 과체중과 관련되어 사망하였다고 평가한다 (World Health Organisation, Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health, 2004).

[0003] 과체중 및 비만은 혈압과 콜레스테롤 수치를 높여 심장 질환, 당뇨, 관절염 등 각종 질환의 원인이 되기도 하고, 각종 성인병의 발병률을 증가시키고 있다. 뿐만 아니라, 과체중 및 비만은 성인뿐만 아니라 어린이나 청소년들에서도 동맥경화, 고혈압, 고지혈증 또는 심장질환 등의 각종 성인병의 발병률을 증가시키는 한 요인이 되고 있다.

[0004] 이와 같이, 비만은 전세계적인 질병으로서 각종 질환의 원인이 되기도 하는 심각한 질병이지만 쉽게 치료할 수 없는 질병이다. 의학 전문가들 사이에서는 비만의 원인은 복잡하며 다양한 요소에 기인하며, 비만은 단순한 자제력의 문제가 아니라 식욕의 조절과 에너지 대사가 관련된 복잡한 질환이라는 인식 또한 확산되고 있다. 그러나, 비만의 일반적인 원인으로는 섭취 에너지가 소비 에너지에 비해 지속적으로 과도하게 되는 것이므로, 비만을 예방 또는 치료하기 위한 장기적 관점에서 식이요법, 운동과 병행하여 사용될 수 있는 효과적이고 안전한 의약품이 요구되고 있는 실정이다.

[0005] Ahnak (Ahnak nucleoprotein)은 700kDa의 크기를 가진 핵단백질로서, 중심부에 있는 반복 단위 (central repeated unit, CRU)가 PLC- γ 1 및 PKC (protein kinase C)에 결합하여 이를 활성화 하여 종양의 증식에 영향이 있다는 결과나 (JBC 279:26645-53, 2004; JBC 283:6312-20, 2008; Tuberculosis and Respiratory Disease, 47(3) 1999), 면역과 관련된 T 세포 활성화에 관련된 칼슘 신호전달에 역할을 한다는 (Immunity 28; 64, 2008) 것에 대해서 알려져 있을 뿐 비만과의 연관성에 대해서는 전혀 개시된 바가 없다.

[0006] 이러한 배경하에 본 발명자들은 비만의 예방 또는 치료제로서 신체에 영향이 없는 안전한 물질을 찾기 위해 예의 노력한 결과, Ahnak 유전자를 녹아웃 시킨 마우스가 고지방 식이로 유도한 비만에서 체중의 증가가 없으며, 지방조직 및 세포의 크기도 감소하지만, 호흡량, 에너지 소모, 활동량에 변화가 없는 것을 관찰하고, Ahnak이 비만 치료의 타겟으로 이용될 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 하나의 목적은 Ahnak 유전자의 발현을 억제하는 물질을 포함하는 비만 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 비만을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 비만 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 비만 의심 검체에 비만 치료용 후보물질을 처리하는 단계; 및 (b) 대조구와 Ahnak 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현수준을 비교하는 단계를 포함하는 비만 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 Ahnak 유전자의 발현을 억제하는 물질을 포함하는 비만 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0012] 본 발명에서 사용되는 용어, "Ahnak 유전자"(NCBI Gene ID: 79026)는 700 kDa의 핵단백질을 코딩하는 유전자이다. 상기 단백질은 신경 조직의 Tau처럼 신경조직에서 AA(arachidonic acid)의 존재하에 PLC γ 를 활성화시키는 단백질이다. PLC γ -1(phospholipase C)의 활성인자로 PKC(protein kinase C)에 의해 인산화된 Ahnak은 인산화되지 않은 Ahnak 보다 PLC- γ 의 활성을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 폐 조직에서 정제된 Ahnak 단

백질은 70 kDa에서 130 kDa까지 크기의 차이가 매우 심한 것으로 보이는데 이것은 Ahnak 단백질의 특성상 단백질 분해효소에 매우 불안정하기 때문이다. 일반적으로 128개의 아미노산이 하나의 단위(unit)로 30회 정도 반복되는데 이중 1 단위(unit)만 존재하여도 PLC γ 를 활성화시킬 수 있으며, 최대 4 단위(unit)의 Ahnak 단백질이 존재할 수 있다. Ahnak의 기능에 대해서는 현재까지도 많은 연구가 되고 있는 분야로 PLC- γ 1 및 PKC (protein kinase C)에 결합하여 이를 활성화 하여 종양의 증식에 영향이 있다는 결과나, 면역과 관련된 T 세포 활성화에 관련된 칼슘 신호전달에 역할을 한다는 개시가 있으나, 상기 유전자와 비만과의 연관성에 대해서는 현재까지 전혀 개시된 바가 없는 사실로 본 발명자들은 상기 유전자를 억제할 경우 비만을 치료할 수 있다는 사실을 최초로 규명하였다.

[0013] 본 발명에서 사용된 용어, "Ahnak 유전자의 발현을 억제하는 물질"이란 세포 내에서 Ahnak 유전자의 발현 또는 활성을 감소시키는 물질을 의미하는 것으로서, 구체적으로는 Ahnak 유전자에 직접적으로 작용하거나 또는 Ahnak 유전자의 상위 조절자에 간접적으로 작용하여 Ahnak 유전자의 발현을 전사 수준에서 감소시키거나, 발현된 Ahnak 유전자의 분해를 증가시키거나, 그 활성을 방해함으로써, Ahnak 유전자의 발현 수준 또는 그 활성을 감소시키는 물질을 의미한다. 이는 상기 유전자를 억제할 수 있는 당업계에 공지된 표준 기법을 통해 세포에 처리될 수 있는 핵산 또는 폴리펩타이드 같은 생물학적 분자, 화합물, 세균이나 식물 또는 동물로부터 분리된 추출물 등을 제한 없이 포함하나, 그 예로 Ahnak 유전자에 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, 앵타머, Ahnak 단백질에 결합하는 항체일 수 있다. 본 발명의 Ahnak 유전자의 서열은 공지된 데이터베이스인 GenBank 등에서 당업자가 손쉽게 얻을 수 있으므로 이를 이용하여 상기 유전자를 억제할 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, 앵타머, 항체를 공지의 표준 기법에 의해 제조할 수 있다.

[0014] 본 발명에서 사용된 용어, "안티센스 올리고뉴클레오타이드"란 자연 발생적인 염기, 당 및 당간(intersugar) 연결로 이루어진 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오시드 단량체의 올리고머 또는 중합체를 지칭한다. 또한, 이 용어는 유사하게 기능하는 비-자연 발생적인 단량체 또는 그의 부분을 포함하는 변형된 또는 치환된 올리고머를 포함한다. 치환된 올리고머의 혼입은 세포 흡수 증대 또는 뉴클레아제 내성 증가를 비롯한 인자에 기초하며, 당업계에 공지된 바와 같이 선택된다. 전체 올리고뉴클레오타이드 또는 그의 일부분이 치환된 올리고머를 함유할 수 있다. 또한, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 이들의 표적에 대한 친화성을 증가시키고 표적 서열의 미스매치 (mismatch)에 대한 내성을 제공하도록 당업계에 공지된 방법으로 변형된 올리고머 모방체, 예를 들어 펩티드 핵산 (PNA) 및 고정 (locked) 핵산 (LNA)을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 천연형 올리고뉴클레오타이드, 포스포로티오에이트형 올리고데옥시리보뉴클레오타이드, 포스포로디티오에이트형 올리고데옥시리보뉴클레오타이드, 메틸포스포네이트형 올리고데옥시리보뉴클레오타이드, 포스포라미데이트형 올리고데옥시리보뉴클레오타이드, H-포스포네이트형 올리고데옥시리보뉴클레오타이드, 트리에스테르형 올리고데옥시리보뉴클레오타이드, 알파-아노머형 올리고데옥시리보뉴클레오타이드, 펩타이드 핵산, 그의 인조 핵산 및 핵산-변형된 화합물을 포함한, 변형된 올리고뉴클레오타이드 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 Ahnak 염기서열에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자는 표준 분자 생물학 기술, 예를 들어 화학적 합성 방법 또는 재조합 방법을 이용하여 분리 또는 제조하거나, 시판되는 것을 사용할 수 있다.

[0015] 본 발명에서 사용된 용어 "siRNA"는 Ahnak 유전자에 특이적으로 작용하여 Ahnak RNA를 절단(cleavage)하여 RNA 간섭 (RNAi: RNA interference)현상을 유도할 수 있는 이중사슬 RNA를 말한다. 본 발명의 siRNA는 Ahnak 유전자의 핵산 서열의 일부 또는 전부와 상동인 서열을 포함하는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 RNA 가닥으로 구성되어 세포 내에서 Ahnak RNA에 혼성화될 수 있는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것이 바람직하다.

[0016] 본 발명에서 사용된 용어 "앵타머"는 특정의 3차원 입체형태를 채택하는 능력에 의해 Ahnak 유전자와 결합하여 이에 대해 길항 효과를 갖는 핵산 리간드 분자를 의미한다. 전형적으로 앵타머는 규정된 이차 및 삼차 구조, 예컨대 스템-루프구조로 접혀지는 15-50 염기 길이의 작은 핵산일 수 있다. 앵타머는 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} , 또는 10^{-12} 보다 적은 kd로 표적 분자와 결합하는 것이 바람직하다. 앵타머는 매우 고도의 특이성을 가지는 표적 분자와 결합할 수 있다. 또한, 앵타머는 다수의 리보뉴클레오타이드 단위, 데옥시리보뉴클레오타이드 단위, 또는 두 가지 유형의 뉴클레오타이드 잔기의 혼합물로 구성될 수 있다. 앵타머는 하나 이상의 변형된 염기, 당 또는 포스페이트 주쇄 단위를 추가로 포함할 수 있다.

[0017] 본 발명에서 사용된 용어 "항체"는 Ahnak 단백질에 결합하여 Ahnak의 활성을 억제할 수 있는 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 Ahnak 단백질에 대해 특이적

으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 상기한 바와 같이 비만 치료용 타겟으로서 Ahnak 단백질이 규명되었으므로, 이를 이용하여 항체를 생성하는 것은 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다. 다클론 항체는 상기한 Ahnak 단백질 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소 개 등의 임의의 동물 종 숙주로부터 제조 가능하다.

[0018] 단클론 항체는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method)(European Journal of Immunology 6:511-519, 1976), 또는 파지 항체 라이브러리(Nature, 352:624-628, 1991; J. Mol. Biol., 222:58, 1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정제할 수 있다. 또한 본 발명의 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.

[0019] 본 발명에서 사용되는 용어 "비만"이란 일반적으로 체중이 많이 나가지만, 비만이 아니더라도 근육이 많은 개체는 체중이 많이 나갈 수 있기 때문에 체내에 지방조직이 과다한 상태를 의미한다. 이와 같은 비만은 체중의 증가뿐만 아니라 과식, 과음 및 과식증, 고혈압, 당뇨, 증가된 혈장 인슐린 농도, 인슐린 내성, 고지혈증, 대사 증후군, 인슐린 내성 증후군, 비만관련 위식도 역류, 동맥경화증, 과콜레스테롤혈증, 요산과다혈증, 허부등 통증, 심장비대 및 좌심실 비대, 지방이영양증, 비알콜성 지방간염, 심혈관 질환 또는 다낭성 난소 증후군과 같은 비만 관련 질환을 유발할 수 있으므로 본 발명의 조성물을 이용할 경우 상기 질환의 치료도 동시에 이루어질 수 있을 것이다. 또한 이러한 비만 관련 질환의 치료 대상은 체중을 줄이려는 욕구가 있는 대상도 포함된다.

[0020] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는 본 발명에 따른 조성물의 투여로 비만 또는 비만 관련 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 말한다. 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여로 비만의 발생을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.

[0021] 본 발명의 일 구현예에 따르면 본 발명자들은 상기 Ahnak 유전자를 녹아웃시킨 마우스가 고지방 식이에 의해 유도된 비만에서 체중의 증가가 없으며 (도 3 및 4), 지방조직의 크기가 감소하고 (도 5), 지방세포의 크기도 줄어드는 것 (도 6)을 확인하여 상기 유전자의 발현을 억제하는 물질을 포함하는 조성물이 비만을 예방 또는 치료할 수 있음을 규명하였다. 아울러, 상기 유전자를 녹아웃시켜도 식욕, 호흡량, 에너지 소모, 활동량이 억제되지 않는 야생형과 비교하여 큰 차이가 없는 것을 확인하여 (도 7), 본 발명의 조성물이 식욕 부진이나 활동 부진과 같은 부작용이 없음을 규명하였다.

[0022] 한편, 본 발명의 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있으며, 담체와 함께 제제화될 수 있다.

[0023] 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용되는 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

[0024] 본 발명의 Ahnak 유전자의 발현을 억제하는 물질 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물은 이를 유효성분으로 포함하는 어떠한 제형으로도 적용가능하며, 경구용 또는 비경구용 제형으로 제조할 수 있으며, 투여의 용이성과 투여량의 균일화를 위해 단위 투여 형태로 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학적 제형은 구강(oral), 직장(rectal), 비강(nasal), 국소(topical; 붙 및 혀 밑을 포함), 피하, 질(vaginal) 또는 비경구(parenteral; 근육내, 피하 및 정맥 내를 포함) 투여에 적당한 것 또는 흡입(inhalation) 또는 주입(insufflation)에 의한 투여에 적당한 형태를 포함한다.

[0025] 본 발명의 조성물을 유효성분으로 포함하는 경구 투여용 제형으로는, 예를 들어 정제, 트로키제, 로렌지, 수용성 또는 유성현탁액, 조제분말 또는 과립, 에멀전, 하드 또는 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제로 제제화할 수 있다. 정제 및 캡슐 등의 제형으로 제제화하기 위해, 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분,

아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제, 디칼슘 포스페이트와 같은 부형제, 옥수수 전분 또는 고구마 전분과 같은 붕괴제, 스테아르산 마스네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아릴푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌 글리콜 왁스와 같은 윤활유를 포함할 수 있으며, 캡슐제형의 경우 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체를 더 함유할 수 있다.

[0026] 본 발명의 조성물을 유효성분으로 포함하는 비경구 투여용 제형으로는, 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사 등의 주사용 형태, 좌제 주입방식 또는 호흡기를 통하여 흡입이 가능하도록 하는 에어로졸제 등 스프레이용으로 제제화할 수 있다. 주사용 제형으로 제제화하기 위해서는 본 발명의 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여용으로 제제화할 수 있다. 좌제로 주입하기 위해서는, 코코아버터 또는 다른 글리세라이드 등 통상의 좌약 베이스를 포함하는 좌약 또는 재료 관장제와 같은 직장투여용 조성물로 제제화할 수 있다. 에어로졸제 등의 스프레이용으로 제제화하는 경우, 수분산된 농축물 또는 습윤 분말이 분산되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합될 수 있다.

[0027] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 Ahnak 유전자의 발현을 억제하는 물질을 포함하는 비만 예방 또는 치료용 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 비만을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0028] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 약제학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물이 개체 내로 도입되면, 체중 증가의 변동이 없으며, 지방조직의 크기 감소, 지방세포 크기 감소에 의해 비만을 예방 또는 치료하게 된다.

[0029] 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 구체적으로, 구강, 직장, 국소, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 경피, 비측내, 흡입, 안구 내 또는 피내경로를 통해 통상적인 방식으로 투여될 수 있다.

[0030] 본 발명의 예방 또는 치료 방법은 본 발명의 조성물을 치료적 유효량으로 투여하는 것을 포함한다. 상기 치료적 유효량은 체중 감소 또는 지방세포의 크기 감소 효과를 증진시키는 양을 의미한다. 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 일이다. 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 및 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다. 따라서 본 발명의 목적에 적합한 비만 예방 또는 치료용 조성물의 유효량은 전술한 사항을 고려하여 결정하는 것이 바람직하다. 또한, 경우에 따라, 본 발명의 조성물과 함께 공지의 비만 관련 질환 치료제를 병용 투여하여 비만 억제 효과를 포함한 비만 관련 질환의 치료 효과를 증대시킬 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명의 치료 방법은 비만을 예방 또는 억제할 수 있는 임의의 동물에 적용가능하며, 동물은 인간 및 영장류뿐만 아니라, 소, 돼지, 양, 말, 개 및 고양이 등의 가축을 포함한다.

[0032] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 Ahnak 유전자의 발현을 억제하는 물질을 포함하는 조성물을 포함하는 비만 개선용 식품 조성물에 관한 것이다. Ahnak 유전자의 발현을 억제하는 물질은 상기에서 설명한 바와 같다.

[0033] 본 발명의 비만 개선용 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있다. 본 발명의 조성물은 식욕 또는 활동량의 감소 등의 부작용이 적어 식품첨가물로 이용될 수 있다. 상기 비만 개선용 식품 조성물에서 포함할 수 있는 필수 성분으로 상기 Ahnak 유전자의 발현을 억제하는 물질을 포함하는 조성물을 포함하는 외에는 다른 성분에는 특별히 제한이 없으며 통상의 식품과 같이 여러가지 생약추출물, 식품보조첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 또한, 상기 언급한 바와 같이 식품보조첨가제를 추가로 첨가할 수도 있는바 식품보조첨가제는 당업계에 통상적인 식품보조첨가제, 예를 들어 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 향미제, 풍미제, 착색제, 충전제, 안정화제 등을 포함한다. 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제 (타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르트암 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 그밖에 천연 과일주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육

을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 상기 비만 개선용 식품 조성물은 건강기능식품의 형태로 제공될 수 있다.

[0034] 본 발명에서의 용어 "건강기능식품"이란, 건강보조의 목적으로 특정성분을 원료로 하거나 식품 원료에 들어있는 특정성분을 추출, 농축, 정제, 혼합 등의 방법으로 제조, 가공한 식품을 말하며, 상기 성분에 의해 생체방어, 생체리듬의 조절, 질병의 방지와 회복 등 생체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발휘할 수 있도록 설계되고 가공된 식품을 말하는 것으로서, 상기 건강식품용 조성물은 비만의 예방 및 비만 관련 질환의 회복 등과 관련된 기능을 수행할 수 있다.

[0035] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 비만 의심 검체에 비만 치료용 후보물질을 처리하는 단계; 및 (b) 대조구와 Ahnak 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현수준을 비교하는 단계를 포함하는 비만 치료제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

[0036] 본 발명에서 사용된 용어, "비만 의심 검체"란 비만 치료용 후보물질을 스크리닝하기 위해 사용되는 개체 또는 시료를 의미하며, 이는 개, 소, 돼지, 토끼, 닭, 마우스, 인간을 포함한 포유동물을 제한 없이 포함하며, 상기 개체로부터 분리된 전혈, 혈청, 혈액, 혈장, 타액, 뇨, 객담, 림프액, 세포와 같은 시료 등을 포함한다.

[0037] 본 발명에서 사용된 용어, "대조구"는 비만 치료용 후보물질을 처리하지 않은 검체를 의미한다. 또한 본 발명에서 사용된 용어, "후보물질"이란 Ahnak의 발현 변화 활성을 테스트할 약제를 의미하며, Ahnak의 발현 수준을 직접 또는 간접적으로 변화시킴으로써 비만을 예방 또는 치료할 수 있는 능력을 측정하는 대상으로서, 예컨대 단백질, 올리고펩타이드, 소형 유기 분자, 다당류, 폴리뉴클레오타이드 및 광범위한 화합물 등 임의 분자를 포함한다. 이런 후보 물질은 또한 천연 물질 뿐 아니라 합성 물질을 모두 포함한다.

[0038] 본 발명에서 용어, "비만 치료제"란 체중 감소, 지방조직 크기 감소, 지방세포 크기를 감소시키는 기능 등을 통해 비만을 예방 또는 치료하는 물질을 의미한다.

[0039] 본 발명의 스크리닝 방법은 비만 의심 개체에 치료용 후보물질을 처리한 후 후보물질을 처리하지 않은 대조구와 Ahnak 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준을 비교하여, 대조구에 비해 Ahnak 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현을 감소시키는 물질을 비만 치료제라고 판단하여 수행될 수 있다.

[0040] mRNA 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는 역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅, DNA 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

[0041] 단백질 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는, 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS, 단백질 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0042] 본 발명은 비만 치료용 타겟으로서의 Ahnak 유전자를 새롭게 규명한 것으로, 본 발명의 조성물을 사용할 경우 에너지 소모 및 활동량에는 이상이 없는 동시에 체중의 증가를 막으면서 지방세포의 크기가 줄어들어서 비만을 예방 또는 치료할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 비만 치료용 타겟으로서 Ahnak 유전자를 새롭게 제시하여 상기 유전자를 억제하는 물질을 스크리닝할 경우 신규한 비만 예방 또는 치료제를 손쉽게 얻을 수 있을 것으로 기대된다. 아울러, 상기 물질은 비만 예방 또는 개선용 식품으로도 다양하게 이용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 본 발명에 사용된 Ahnak 유전자의 단백질을 모식화한 것이다.

도 2는 Ahnak 녹아웃 마우스의 제작 및 체중을 나타낸 것이다. A는 Ahnak 녹아웃 마우스 제작용 벡터를 나타낸 것이다. B는 야생형 및 녹아웃 마우스의 Ahnak 유전자에 대한 RT-PCR 결과를 나타낸 것이다. C는 야생형 및 녹아웃 마우스의 Ahnak 유전자에 대한 웨스턴 블랏팅 결과를 나타낸 것이다. D는 야생형 및 녹아웃 마우스의 주령에 따른 체중의 weight-matched group을 나타낸 것이다.

도 3은 고지방 식이 및 저지방 식이에 따른 야생형 및 Ahnak 넉아웃 마우스의 체중 변화를 시간에 따라 그래프로 나타낸 것이다. Ahnak 넉아웃 마우스는 고지방 식이에 의해 유도된 비만에 저항성을 갖는 결과를 확인할 수 있다.

도 4는 고지방 식이 (A 및 C) 및 저지방 식이 (B 및 D)에 따른 야생형 및 Ahnak 넉아웃 마우스의 체중 증가량 (A 및 B) 및 상대적 체중 증가량 (C 및 D)을 시간에 따라 그래프로 나타낸 것이다. Ahnak 넉아웃 마우스는 고지방 식이에 의해 유도된 비만에 저항성을 갖는 결과를 확인할 수 있다.

도 5는 고지방 식이 (A) 및 저지방 식이 (B)에 따른 야생형 및 Ahnak 넉아웃 마우스의 부고환의 크기를 나타낸 것이다. C는 고지방 식이 및 저지방 식이에 따른 야생형 및 Ahnak 넉아웃 마우스의 부고환의 백색 지방조직 (epididymal white adipose tissue, EWAT)의 무게를 그래프로 나타낸 것이고, D는 고지방 식이 및 저지방 식이에 따른 야생형 및 Ahnak 넉아웃 마우스의 체중당 부고환의 백색 지방조직 (epididymal white adipose tissue, EWAT)의 무게 백분율 (%)를 그래프로 나타낸 것이다. Ahnak 넉아웃 마우스는 고지방 식이에 의해 유도된 비만에서 지방 조직이 감소하는 결과를 확인할 수 있다.

도 6은 저지방 식이 (A) 및 고지방 식이 (B)에 따른 야생형 및 Ahnak 넉아웃 마우스의 지방세포의 크기를 나타낸 것이다. C 및 D는 지방세포의 평균 영역 및 빈도수를 나타낸 것이다. Ahnak 넉아웃 마우스는 야생형에 비해 고지방 식이에 의해 유도된 비만에서 지방세포의 크기가 감소하는 결과를 확인할 수 있다.

도 7은 야생형 및 Ahnak 넉아웃 마우스의 음식 섭취 (A), 호흡량 (B), 에너지 소모 (C) 및 활동량 (D)을 그래프로 나타낸 것이다. Ahnak 넉아웃 마우스는 식욕, 호흡량, 에너지 섭취 및 활동량에 변화가 없다는 것을 확인할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 이하, 하기 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0045] 실시예 1: Ahnak 넉아웃 마우스 제조

[0046] Ahnak의 N-말단 영역에 해당하는 502bp 게놈 단편을 pPNT 벡터에 클로닝하고, 이 타겟팅 벡터 (targeting vector)를 129/SvJ 마우스 배아줄기세포 (embryonic stem cell, ES)에 절러 넣어서 상동 재조합 (homologous recombination)을 통한 유전자 결손을 유도하고 이들 양성 클론을 서던 블롯팅으로 확인하였다. 252개 클론 중 8개의 양성 ES 클론을 C57BL/6 배반포 (blastocyst)에 절러 넣어서 키메라 마우스 (chimeric mice)를 얻고 수컷 키메라 마우스와 C57BL/6의 교배로 이형접합체 (heterozygote) 마우스를 얻었다. 돌연변이 대립유전자 (allele)의 생식선 전이 (germ line transmission)를 F1 자손의 게놈 DNA의 서던 블롯팅을 통하여 확인하였다. 그 후 이형접합체의 상호교배를 통하여 동형접합체 (homozygote)를 얻으며 이 동형접합체의 혈액에서 유전자형 검사 (genotyping)와 웨스턴 블롯팅을 통하여 Ahnak 단백질의 결손을 확인하였다 (도 2B 및 2C).

[0047] 도 2A에 Ahnak 넉아웃 마우스 제작용 벡터 및 이를 통한 표적화된 대립유전자를 나타냈다.

[0048] 실시예 2: 실험 동물의 준비 및 저지방 식이 (Low Fat Diet, LFD) 및 고지방 식이 (High Fat Diet, HFD)

[0049] 각 실험 동물들을 실내 온도 $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 와 12시간의 빛-어둠 주기의 환경에서 pelleted standard chow diet (Lab Diets, IN, USA)를 수돗물과 함께 임의로 제공하며 유지하였다. 마우스가 6주령에 이르렀을 때에 수컷 Ahnak-/- 과 야생형 생쥐는 각각 weight-matched group을 형성하게 되고 이때부터 12주간 실험동물들에게 각각 LFD (low fat diet) (70% 탄수화물, 10% 지방, 20% 단백질 : D12450B : Research Diets)를 제공하거나 HFD (high fat diet) (20% 탄수화물, 60% 지방, 20% 단백질 : D12492: Research Diets Inc., New Brunswick, NJ)를 제공하였다.

[0050] 실시예 3: 저지방 식이 및 고지방 식이 마우스의 체중 변화 및 지방조직의 크기 분석

[0051] 각기 다른 저지방 식이와 고지방 식이를 12주간 제공한 마우스는 일주일에 한번씩 몸무게를 측정하였으며 실험

질적으로 측정되는 몸무게와 처음 시작할 때 측정한 몸무게를 기준으로 이후에 증가되는 몸무게를 상대적으로 비교한 수치를 모두 기록하였다. 그 후, 12주 동안 저지방 식이와 고지방 식이를 진행한 마우스를 부검하여 부고환의 백색 지방조직을 관찰하였으며, 이 지방조직만을 분리하여 지방조직의 무게와 이것이 전체 몸무게에서 차지하는 비율을 상대적 값으로 계산하였다.

[0052] 12주간의 기간 동안 HFD 및 LFD에 따른 야생형 및 넉아웃 마우스에 대한 체중 변화를 관찰한 결과를 도 3 및 4에 나타냈다. 그 결과, 야생형 또는 대립유전자 한쪽을 넉아웃시킨 마우스보다 대립유전자 양쪽을 모두 넉아웃시킨 마우스에서 지방식으로 유발시킨 비만에 따른 체중 증가가 없는 결과를 확인하였다 (도 3). 또한 이와 같은 결과는 저지방 식이로 유발된 비만보다 고지방 식이에 의해 유발된 비만에서 더욱 현저한 차이를 보이는 것을 확인하였으며 (도 3), 표준화를 통해 체중의 증가 여부를 확인한 결과, 고지방 식이로 유발된 비만에서 대립유전자 양쪽을 넉아웃시킨 마우스에서 현저하게 체중의 증가가 없다는 것을 확인하였다 (도 4C).

[0053] 또한 부고환의 백색 지방조직의 크기 변화를 도 5에 나타냈다. 그 결과, 고지방 식이에 의해 유도된 비만에서 부고환의 백색 지방조직의 크기가 Ahnak 대립유전자 양쪽을 모두 넉아웃시킨 마우스에서 현저하게 감소한 것을 확인하였다 (도 5).

[0054] 이와 같은 결과들은 Ahnak 유전자의 발현을 완전히 억제할 경우 비만 치료 효과가 크다는 것을 시사하는 것이다.

[0055] 실시예 4: 지방조직의 조직학 분석

[0056] 상기 실시예 2의 실험동물에서 얻은 부고환 지방 조직 (Epididymal adipose tissue)을 10% 중성 완충 포르말린 (neutral buffered formalin)에 고정시켰다. 연속적인 알콜 농도 구배(Graded alcohol series)와 세척을 통한 탈수화 (dehydration)를 수회 진행한 후에 조직을 파라핀에 포매시켰다. 조직 절편을 두께 4 μ m로 잘랐고, 헤마톡실린 (haematoxylin)과 에오신 (eosin)으로 염색을 진행하였다. 백색 지방세포 (White adipocyte)의 크기를 확인하기 위해 각 지방세포의 영역을 Opti Pro software(Olympus Co., USA) 로 각 절편을 측정하였다.

[0057] 그 결과를 도 6에 나타냈다. 도 6에 나타낸 바와 같이, 야생형에 비해, Ahnak 대립유전자 양쪽을 모두 넉아웃시킨 마우스에서 현저하게 지방세포의 크기가 줄어드는 것을 확인하였다.

[0058] 이와 같은 결과들은 Ahnak 유전자의 발현을 완전히 억제할 경우 지방 조직의 크기를 줄여서 비만의 치료 효과가 크다는 것을 시사하는 것이다.

[0059] 실시예 5: Ahnak 넉아웃 마우스의 식욕, 호흡량, 에너지 소비, 활동량 분석

[0060] Ahnak 야생형과 넉아웃 마우스는 Comprehensive animal metabolic monitoring system (CLAMS; Columbus Instruments, Columbus, OH)을 이용하여 고지방 식이를 하기 전과 후의 3주 동안 활동량과 식욕, 에너지 소모를 측정하였다. 에너지의 소모와 호흡량 (RER)은 Gas exchange data[Energy expenditure = (3.815+1.232x RER) x VO₂]를 통해 계산하였다. RER은 VCO₂와 VO₂의 비율을 나타내는 것으로 동물이 사용하는 에너지원에 따라 달라진다. 탄수화물이 산화되는 유일한 에너지원일 경우에 RQ (respiratory quotient)는 1.0이 되고, 지방만이 유일한 에너지원일 경우에는 RQ가 0.7이 된다. 활동량은 측정 시기 동안 infrared beam을 지나가는 횟수를 측정하여 x와 y축에 따른 데이터를 분석함으로써 측정하였다. 식욕은 먹이를 제공할 때와 제공된 이후의 무게를 측정하여 알 수 있었다. 이러한 실험은 한 그룹 당 5~6마리의 수컷 마우스를 이용해 진행되었다.

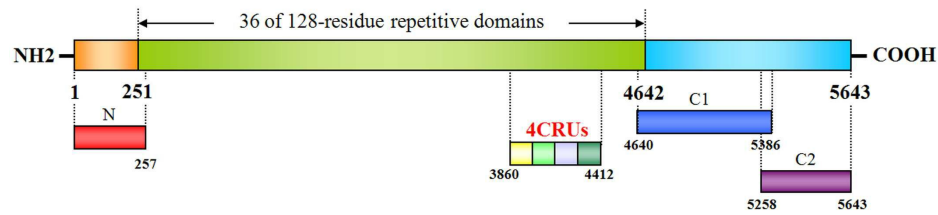
[0061] 그 결과를 도 7에 나타냈다. 도 7에 나타낸 바와 같이, Ahnak 넉아웃 마우스의 경우 야생형과 비교하여 식욕에 감소는 없으며 (도 7A), 호흡량 (7B), 에너지 소모 (7C), 활동량 (7D)에 큰 차이가 없는 것을 확인하였다.

[0062]

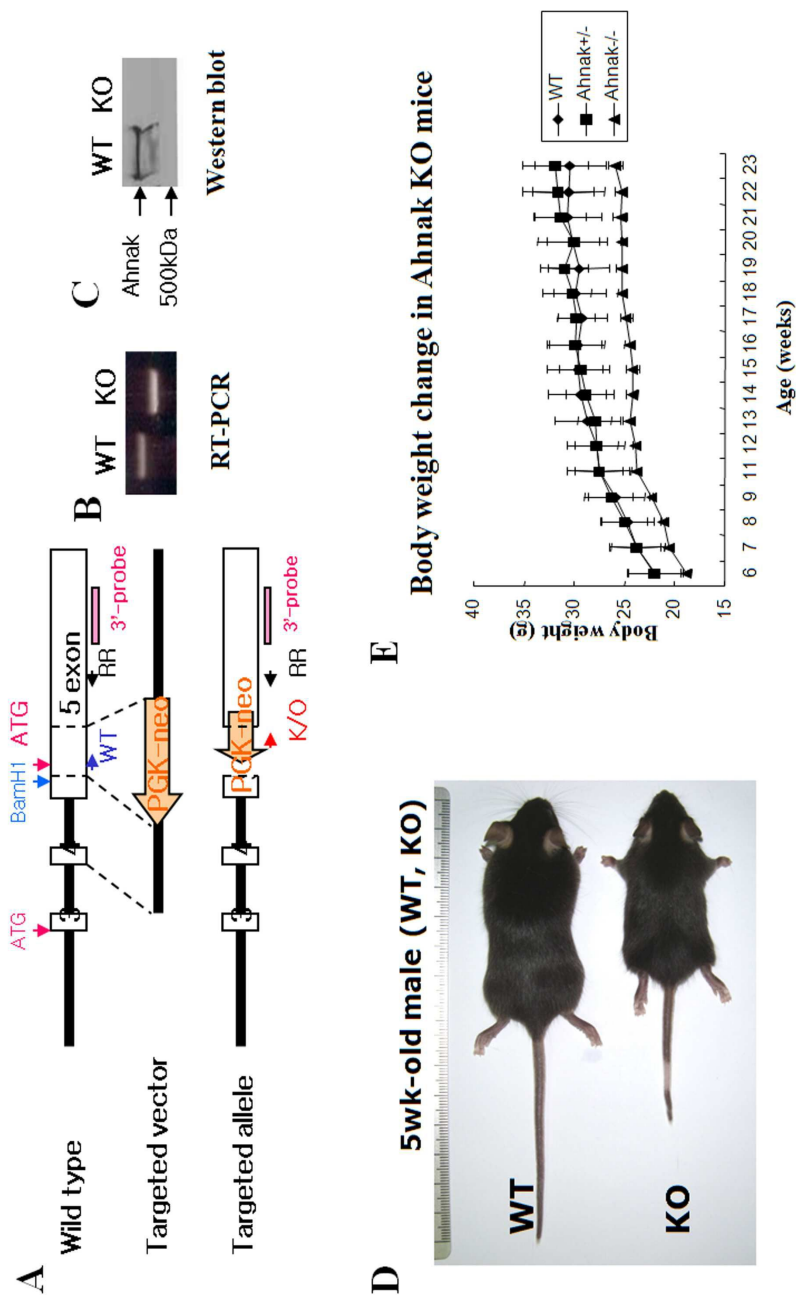
이러한 결과는 Ahnak 유전자의 발현을 억제하여도 개체의 건강 및 활동량에 영향을 주지 않는다는 것을 시사하는 것으로, 본 발명의 조성물의 안전성을 입증하는 것이다.

도면

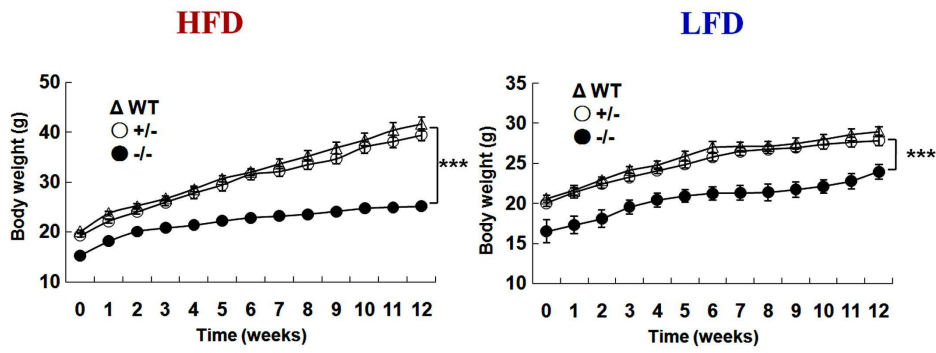
도면1



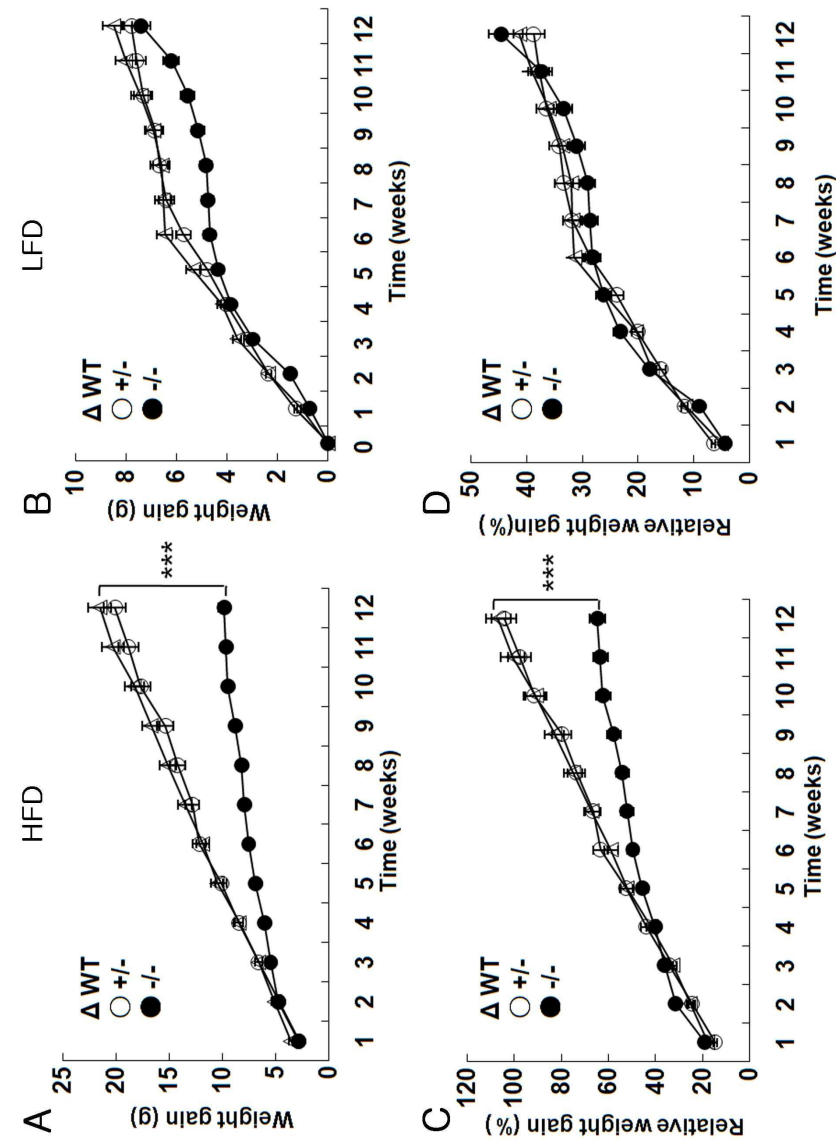
도면2



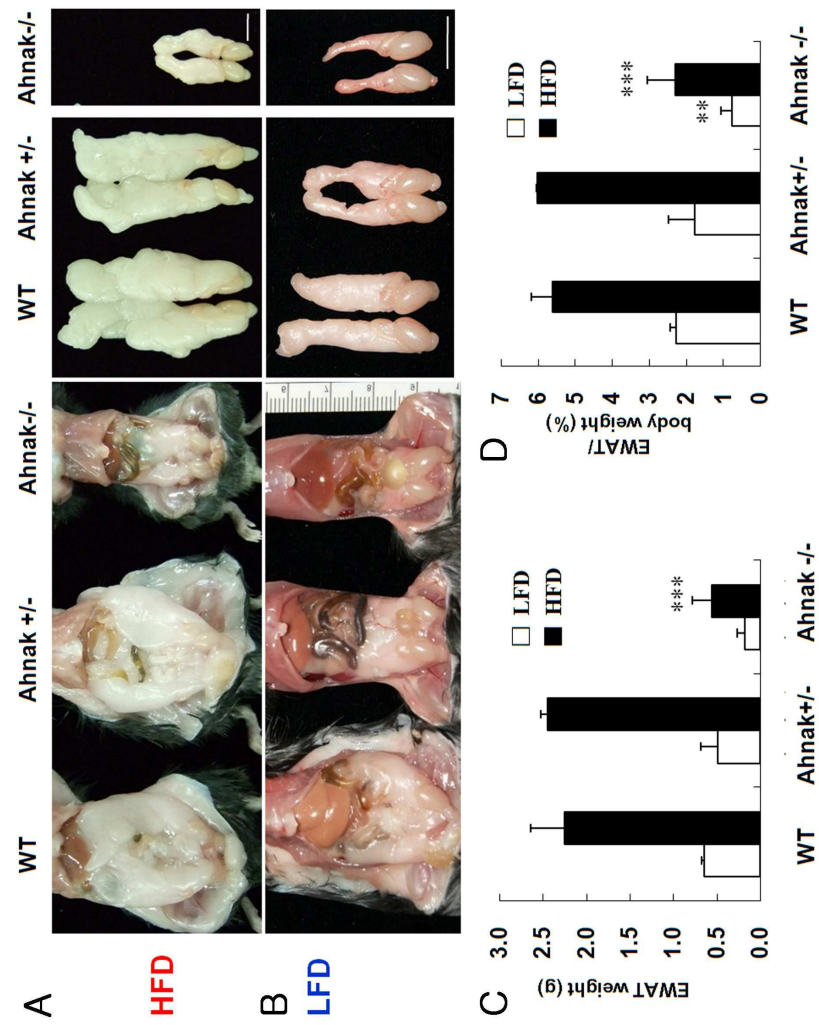
도면3



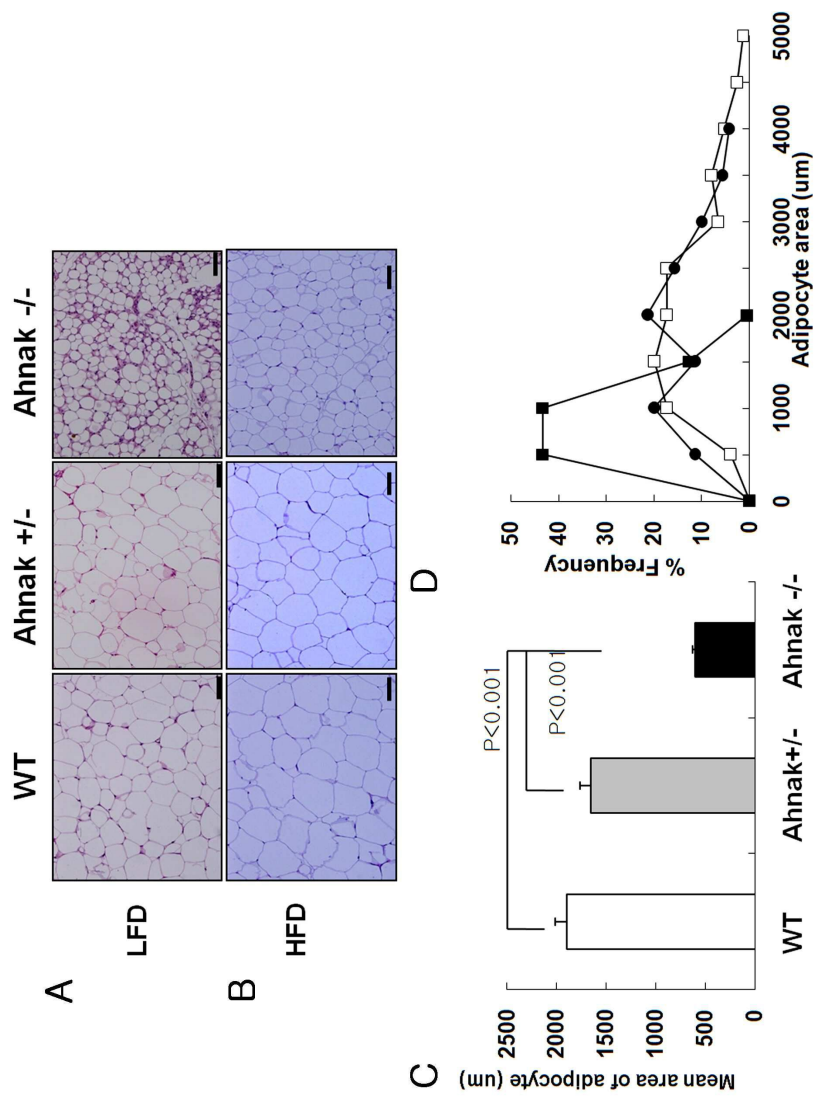
도면4



도면5



도면6



도면7

