



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0085464
(43) 공개일자 2010년07월29일

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01) *A61P 1/14* (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0004754

(22) 출원일자 2009년01월20일

심사청구일자 2009년01월20일

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산 남구 무거2동 산29

(72) 발명자

김민선

서울 송파구 오륜동 올림픽선수촌아파트 301동 1502호

(74) 대리인

특허법인태백

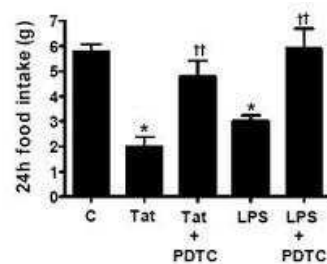
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) NF- κ B 억제제 및/또는 멜라노코틴 억제제를 포함하는 식욕부진 및 체중감소 치료 및 개선용 약학조성물

(57) 요약

본 발명은 NF- κ B 억제제 또는 멜라노코틴 억제제 중에서 선택된 어느 하나 또는 하나 이상의 물질을 포함하는 식욕부진 및 체중감소 치료 및 개선용 약학조성물과 이러한 약물의 스크리닝 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 질병 상태에서 식욕 조절 중추인 시상하부에서 NF- κ B가 활성화되고, 이를 통하여 식욕 억제 물질인 멜라노코틴의 생산이 증가함으로써 식욕 부진 및 체중 감소가 유발되므로, NF- κ B 억제제를 단독 혹은 멜라노코틴 억제제와 병용 투여함으로써 감염, 염증성 질환 및 암에 동반된 식욕부진 및 체중감소를 치료할 수 있다.

대표도 - 도4a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A062363

부처명 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료기술연구개발사업

연구과제명 감염증 혹은 암에 동반된 식욕부진 및 악액질의 기전 규명을 통한 치료법 개발(2)

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2008년 04월 01일 ~ 2009년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

NF- κ B 억제제 또는 멜라노코틴 억제제 중에서 선택된 어느 하나 또는 하나 이상의 물질 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 식욕부진 및 체중감소 치료 및 개선용 약학조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 NF- κ B 억제제는 NF- κ B 자체 억제제; NF- κ B의 발현을 억제할 수 있는 siRNA; NF- κ B에 특이적으로 결합하여 NF- κ B 활성을 억제하는 중화 항체; NF- κ B의 DNA 결합을 억제하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드; 및 I- κ B 카이네이즈(IKK) 억제제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 식욕부진 및 체중감소 치료 및 개선용 약학조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 멜라노코틴 억제제는 AGRP, SHU9119, JKC-363 및 멜라노코틴-4 수용체 길항제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 식욕부진 및 체중감소 치료 및 개선용 약학조성물.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항에 있어서, 상기 식욕부진 및 체중감소는 감염성 질환, 염증성 질환 및 암질환으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 질환에 의해 동반된 것을 특징으로 하는 식욕부진 및 체중감소 치료 및 개선용 약학조성물.

청구항 5

NF- κ B 결합부위를 포함한 인간 POMC 유전자의 프로모터 영역을 루시페레이스 리포터 유전자에 라이게이션시켜 얻은 유전자로 세포를 형질감염 시키는 단계; 및 상기 형질감염된 세포에 테스트 화합물을 투여한 후, 루시페레이스 활성을 분석하는 단계를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 식욕부진 및 체중감소 치료 및 개선용 약물의 스크리닝 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 NF- κ B 억제제 또는 멜라노코틴 억제제 중에서 선택된 어느 하나 또는 하나 이상의 물질을 포함하는 식욕부진 및 체중감소 치료 및 개선용 약학조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 식욕부진은 감염성 질환, 염증 질환 및 암질환에 동반된 흔한 증상 중 하나로서, 식욕부진은 단순히 열이나 진신쇠약에 의하여 2차적으로 발생하는 것이 아니라, 식욕의 변화로 인한 것으로 알려져 있다(Aubert et al., Am J Clin Nutr., 40: 310-316, 1984). 식욕 부진으로 인한 영양 결핍은 세균이나 바이러스와 같은 감염원이나 암세포의 증식을 제한할 수 있기 때문에 감염원에 대한 숙주의 방어기전으로 해석될 수도 있으나(Murray and Murray, Am. J. Clin. Nutr., 32: 593-596, 1979), 식욕 부진이 장기화 될 경우 영양 결핍 및 숙주의 면역 기능 저하를 야기함으로써 치료에 대한 반응성을 약화시키고, 궁극적으로 사망률을 증가시킨다(Grinspoon and Mulligan, Clin. Infect. Dis., 36: S69-S7, 2003). 따라서, 질환에 동반된 식욕부진 및 체중 감소의 기전을 이해하고, 이를 적절히 치료함으로써 환자들의 삶의 질을 향상시키고, 면역력을 증가시킬 수 있다.

[0003] NF- κ B는 염증 및 면역과 관련된 유전자의 전사를 조절하는 중요한 전사 조절 인자로 알려져 있다(Barnes and Karin, N. Engl. J. Med., 336: 1066-1071, 1997). 비활성화 상태에서 NF- κ B는 세포질에서 I κ B- α 단백질과 결합한 상태로 존재하다가, 염증성 신호가 전달되면, I κ B 카이네이즈(I κ B kinase, 이하 IKK)가 활성화되어 I

κB 를 인산화시키고, 그 결과 $I\kappa B$ 는 유비퀴틴화되어서 리소조솜에서 파괴된다. $I\kappa B$ 파괴는 유리형 NF- κB 의 핵으로 이동을 가능케 하여, 그 결과 NF- κB 가 염증, 감염, 암 등 다양한 질환의 발생과 관련된 다양한 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다.

- [0004] 한편, 시상하부에서 생산되는 멜라노코틴인 알파-멜라노사이트 자극 호르몬(alpha-melanocyte stimulating hormone, 이하 α -MSH)는 전구물질인 프로오피오멜라노코틴(proopiomelanocortin, 이하 POMC)으로부터 만들어지며, 멜라노코틴 수용체(melanocortin receptor)-3,4에 작용하여 강력한 식욕억제 및 체중 감소 작용을 가진다(Elacott and Cone, Biol. Sci., 361: 1265-1274, 2006).

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0005] 본 발명자는 감염 질환, 염증성 질환 및 암질환에 동반되는 식욕 부진 및 체중감소의 분자생물학적 기전으로서 식욕 및 체중 조절의 중추인 시상하부에서 NF- κB 가 활성화되고, 활성화된 NF- κB 가 시상하부 내에서 염증성 사이토카인의 생산을 증가시키고, 식욕 억제 인자인 α -MSH의 전구체인 POMC의 국소적인 생성을 자극함으로써 식욕부진 및 체중감소를 야기하는 것을 발견하였다. 또한 시상하부 POMC를 생산하는 뉴런에서 NF- κB 활성을 차단함으로써 식욕 부진과 체중 감소가 억제되는 것을 증명함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0006] 따라서, 본 발명의 목적은 감염 질환, 염증성 질환 및 암질환 등에서 식욕부진 및 체중감소의 치료를 목적으로 NF- κB 억제제 또는 멜라노코틴 억제제에서 선택된 어느 하나 또는 하나 이상의 물질을 포함하는 식욕부진 및 체중감소 치료 및 개선용 약학조성물을 제공하는 데에 있다.
- [0007] 또한, 본 발명의 다른 목적은 식욕부진 및 체중감소 치료 및 개선용 약물의 스크리닝 방법을 제공하는 데에 있다.

과제 해결수단

- [0008] 본 발명은 NF- κB 억제제 또는 멜라노코틴 억제제 중에서 선택된 어느 하나 또는 하나 이상의 물질 및 약제학적 으로 허용가능한 담체를 포함하는 식욕부진 및 체중감소 치료 및 개선용 약학조성물을 제공한다.
- [0009] 상기 NF- κB 억제제로는 NF- κB 자체 억제제; NF- κB (p50, p65)의 발현을 억제할 수 있는 siRNA; NF- κB (p50, p65)에 특이적으로 결합하여 NF- κB 활성을 억제하는 중화 항체; NF- κB 의 DNA 결합을 억제하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드; 및 $I\kappa B$ 카이네이즈(IKK) 억제제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 하나 이상을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0010] 본 발명에서 이용되는 NF- κB 자체 억제제로는 피롤리딘 디치오카바메이트(pyrrolidine dithiocarbamate; PDTTC), Bay 11-7085, Bay 11-7082 등을 사용하며, 또한 $I\kappa B$ 를 억제함으로써 NF- κB 활성화를 유발하는 상위 카이네이즈인 IKK 활성 억제제를 사용할 수 있다.
- [0011] 본 발명에서 이용되는 NF- κB 의 발현을 억제할 수 있는 siRNA 분자는 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥 사이에 짧은 뉴클레오타이드 서열(예컨대, 약 5-15 nt)이 삽입된 형태를 가질 수 있으며, 이 경우 뉴클레오타이드 서열의 발현에 의해 형성된 siRNA 분자는 분자내 혼성화에 의하여 헤어핀 구조를 형성하게 되며, 전체적으로는 스템-앤드-루프 구조를 형성하게 된다. 이러한 스템-앤드-루프 구조는 인비트로(in vitro) 또는 인비보(in vivo)에서 프로세싱되어 RNAi를 매개할 수 있는 활성의 siRNA 분자를 생성한다.
- [0012] 본 발명에서 이용되는 NF- κB 에 특이적으로 결합하는 중화 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다. 이러한 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, European Journal of Immunology, 6:511-519(1976)), 재조합 DNA 방법(미국 특허 제 4,816,56호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, Nature, 352:624-628(1991) 및 Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다.
- [0013] 본 발명에서 이용되는 IKK 억제제로는 NF- κB 활성을 유도하는 상위 키나아제인 $I\kappa B$ 카이네이즈(IKK)의 활성을 억제하는 화합물, 예를 들면 파르테놀리드(Parthenolide), 데스메틸안하이드로이카르틴(desmethylanhydroicartin), IMD-1560, 타우토미세틴(tautomycetin), 미야베놀A(miyabenol A), [5-(p-디플루오로페닐)-2-우레이도]-티오펜-3-카르복사미드([5-(p-difluorophenyl)-2-ureido]-thiophene-3-carboxamide, TPCA-1), IKK- β 발현을 억제할 수 있는 siRNA 및 IKK- β 에 특이적으로 결합하여 IKK 활성화를 억제하는 중화

항체로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 하나 이상을 사용할 수 있다.

- [0014] 또한 상기 멜라노코틴 억제제로는 AGRP, SHU9119, JKC-363 및 멜라노코틴-4 수용체 길항제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 하나 이상을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0015] 상기 식욕부진 및 체중감소는 바람직하게는 감염성 질환, 염증성 질환 및 암질환으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 질환에 의해 동반된 것이다.
- [0016] 또한, 본 발명은 NF- κ B 결합부위를 포함한 인간 POMC 유전자의 프로모터 영역을 루시페레이스 리포터 유전자에 라이게이션시켜 얻은 유전자로 세포를 형질감염 시키는 단계; 및 상기 형질감염된 세포에 테스트 화합물을 투여한 후, 루시페레이스 활성을 분석하는 단계를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 식욕부진 및 체중감소 치료 및 개선용 약물의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0017] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0018] 본 발명에 따르면, 감염성 산물인 리포폴리사카라이드(Lipopolysaccharide; LPS) 및 인간 면역결핍 바이러스-1의 트랜스활성화 단백질(Transactivator protein of human immunodeficiency virus-1; Tat)(1-72)을 마우스에 투여하면 식욕 증추인 시상하부에서 NF- κ B 활성화를 유도하였다. LPS 투여 1시간 후 시상하부에서 NF- κ B 활성화를 야기하는 것을 EMSA 실험을 통해 확인하였고(도 1a), 또한 EMSA 실험에서 LPS 투여에 의하여 유도된 NF- κ B의 핵 내로 이동과 DNA 결합이 p50 및 p65 항체를 미리 처리하면 억제되는 것으로 보아 NF- κ B 아형 중에서 특히 p50과 p65가 관여함을 알 수 있었다(도 1b). 또한 이중 면역형광 염색 분석에서 LPS를 복강(IP)으로 투여 후 시상하부 신경세포에서 NF- κ B 아형인 p50의 핵 전좌가 유의하게 증가하였음을 증명하였다(도 1c).
- [0019] Tat는 HIV-1 바이러스에 의하여 생산되는 바이러스 단백질로서, AIDS(adult immunodeficiency syndrome) 환자에서 발생하는 신경세포 변성에 관여하는 것으로 알려져 있다. LPS와 유사하게, 생물학적 활성형인 Tat(1-72)의 투여는 일차 배양한 시상하부 신경에서 I κ B 인산화와 NF- κ B의 핵 전좌를 증가시켰다(도 1d 및 도 1e).
- [0020] 또한, LPS 및 Tat는 NF- κ B 활성화를 통하여 시상하부에서 염증성 사이토카인(IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 등)의 생산을 증가시켰다. 즉 LPS 및 Tat를 IP 투여하면 시상하부의 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α mRNA 발현이 증가하는데, LPS 또는 Tat 투여 30분 전에 NF- κ B 저해제인 피롤리딘 디치오카바메이트(pyrrolidine dithiocarbamate; PDTC)를 시상하부에 인접한 제3 뇌실 내로 투여하면 LPS나 Tat에 의하여 유도된 시상하부 사이토카인 생산의 증가가 유의하게 억제되었다(도 2a 및 도 2b).
- [0021] 한편으로 Tat의 IP 투여 후 시상하부에서 생성되는 식욕억제인자인 α -MSH 전구물질인 POMC mRNA의 발현을 증가하였다(도 3a). 도 3a에서는 인간 POMC 유전자상의 가능한 NF- κ B 결합 부위(κ B-1, κ B-2)를 보여 주며, EMSA에서 κ B-2가 κ B-1 보다 NF- κ B의 더 좋은 결합 부위임을 알 수 있었다(도 3b).
- [0022] 또한, NF- κ B가 POMC의 전사 활성을 직접적으로 조절하는지 알아보기 위하여 κ B-1(뉴클레오타이드 -1147 내지 +94, POMC-luc1)와 κ B-2(뉴클레오타이드 +1436 내지 +3865, POMC-luc2)를 각각 포함하는 루시페레이스 리포터 컨스트럭트를 제작하였다. POMC를 생산하는 AtT-20 세포에서 POMC-luc1 또는 POMC-luc2를 다양한 양의 p50, p65와 발현을 시켰을 때, p50의 발현은 농도 의존적으로 최고 8배 정도까지 POMC-luc2 활성을 증가시켰다. p65의 발현은 단독으로는 POMC-luc2 활성을 증가시키지 않았지만, p50과 함께 발현시킨 경우에는 농도 의존적으로 POMC-luc2 활성을 증가시켰다(도 3c). 한편 p50 발현은 POMC-luc1 발현을 약 2배 정도 증가시켰고, 이러한 효과는 POMC-luc2에 비하여 미약하였다(도 3d).
- [0023] LPS, Tat 및 염증성 사이토카인이 POMC 전사활성에 미치는 효과를 실험한 결과, AtT-20 세포에 이러한 물질들의 처리는 POMC-luc2 전사 활성을 유의하게 증가시켰고, NF- κ B 저해제인 PDTC를 전처리할 경우 이러한 효과가 차단되었다(도 3e). 게다가, 인간 p50 유전자-특이성 siRNA를 이용한 p50 발현을 억제하였을 때(도 3f), POMC-luc2 활성에 대한 LPS 및 Tat의 효과가 완전히 상쇄되었다(도 3g). 이상의 결과는 NF- κ B가 LPS, Tat, 염증성 사이토카인에 의한 POMC 생산 촉진 작용을 매개하는 전사 인자임을 시사한다.
- [0024] 마지막으로 NF- κ B 억제제 또는 멜라노코틴 억제제가 LPS 및 Tat에 의하여 유도된 식욕 부진 및 체중 감소에 미치는 효과를 연구하였다. LPS 및 Tat(1-72)에 의하여 유도된 먹이섭취 억제 효과 및 체중 감소 효과가 NF- κ B 억제제인 PDTC를 제3 뇌실 내로 미리 투여할 경우 차단되었다(도 4a 및 도 4b). 또한 p50 siRNA를 시상하부에 발현시킨 마우스에 LPS를 투여할 경우 LPS 투여에 의한 섭식 억제 및 체중 감소 효과가 유의하게 억제되었다(도 4c 및 도 4d). 한편 내인성 멜라노코틴 길항체인 Agouti 관련 단백질(AGRP)을 제3 뇌실 내로 미리 투여할 경우

에도 LPS나 Tat(1-72)에 의한 식욕부진 및 체중감소의 효과가 억제되었다(도 5a 및 도 5b).

- [0025] IKK 복합체의 활성화는 NF- κ B 활성화를 이끄는 주요한 업스트림 경로로서, IKK 복합체의 구성 성분인 I κ k β 의 결핍은 염증 신호에 대한 NF- κ B 활성화를 차단할 수 있다고 알려져 있다. 식욕부진 발생에 있어서 시상하부 POMC를 생산하는 신경세포에서 NF- κ B의 역할을 최종적으로 규명하기 위하여, POMC-생산 세포에서 I κ k β 유전자의 발현이 억제된 $Ikk\beta^{\Delta POMC}$ 마우스를 제작하였다. $Ikk\beta^{\Delta POMC}$ 마우스에서는 LPS 및 Tat의 시상하부 내 투여 후 먹이섭취 및 체중 감소 효과가 대조군인 $Ikk\beta^{F/F}$ 마우스에서 비하여 현저히 감소하였다(도 5c 내지 도 5f). 이는 시상하부 POMC 세포에서 I κ k β 발현 저하 및 NF- κ B 활성화의 차단이 각종 질환에 동반된 식욕 부진 및 체중 저하를 막을 수 있음을 의미한다.
- [0026] 또한, 본 발명에 따른 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0027] 본 발명에서 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 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 또는 광물유 등을 들 수 있다.
- [0028] 상기 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0029] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물은 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제한다.
- [0030] 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0031] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 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, 글리세로세라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0032] 상기 조성물의 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 0.001 내지 10,000 μ g/kg의 양을 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다. 또한, NF- κ B 억제제와 멜라노코틴 억제제의 중량 비율은 0.001:1~1:0.001 범위에 해당할 수 있다.
- [0033] 또한, 이러한 조성물의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0034] 상기 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 비강흡입, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular)주사에 의해 투여될 수 있다.

효 과

- [0035] 본 발명에 따르면, NF- κ B 억제제 또는 멜라노코틴(melanocortin) 억제제를 단독 또는 병용 투여함으로써 감염성 질환, 염증 질환 및 암질환에서 관찰되는 식욕부진 및 체중감소를 개선할 수 있고, 더 나아가 식욕부진 및 체중감소를 개선할 수 있는 약물을 스크리닝할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0036] 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 하기에 제시한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 본 발명이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0037] <실시예 1> LPS 투여 후 시상하부 NF- κ B 활성 측정

- [0038] 본 실험에서는 수컷 C57BL/6J 마우스(8-10주령)를 오리엔트 바이오사(서울)로부터 구입하여 사용하였다. 실험 전 후 마우스를 조절된 온도(23℃)와 12시간 명암주기 하에서 사육하였고, 특별한 언급이 없는 한 표준식이(standard chow diet)를 자유롭게 섭취하도록 하였다.
- [0039] LPS(200 μ g/kg, Sigma)를 8-10 주령의 수컷 C57BL/6J 마우스의 복강으로 투여 하고 1시간 후에 시상하부를 종래 알려진 방법(Kim MS, et al., Nat.Neurosci., 9:901-906, 2006)에 따라 채취하였다. 시상하부로부터 핵단백질(10 μ g)을 추출한 뒤, 40mM Tris-HCl(pH 7.5), 5mM MgCl₂, 0.1mM EDTA, 1mM 디치오프레이톨(dithiothreitol), 50mM KCl, 10% 글리세롤, 0.1% 소혈청알부민(bovine serum albumin), 1g poly(dG/dC)를 20 μ l 결합 버퍼(binding buffer)에 녹인 다음 ³²P를 표지한 일반적으로 알려진 κ B 탐침(서열번호 1)(50,000cpm)과 4℃에서 15분간 반응을 시킨 뒤 전기영동(100 V, 2시간)을 시행하였다. 억제 EMSA를 위하여, 10배 과량의 ³²P를 표지하지 않은 쿨드 탐침 혹은 NF- κ B 서브유닛인 p50 및 p65에 대한 항체(각각 20 μ g, Santa Cruz)를 ³²P-표식 κ B 탐침을 첨가 전에 첨가하였다.
- [0040] 그 결과, 도 1a와 같이 LPS 투여는 시상하부에서 NF- κ B의 핵 전좌 및 DNA(κ B 탐침)에 결합을 증가시켰다. 한편 도 1b에서 보여주는 바와 같이 쿨드 탐침 혹은 p50 및 p65에 특이적인 항체의 존재 하에서 NF- κ B의 κ B 탐침에 대한 결합이 억제되었다.
- [0041] 또한 일반적으로 알려진 κ B 탐침 대신 인간 POMC 유전자의 NF- κ B 결합 부위(도 3a)를 포함시킨 POMC-특이적 κ B1 탐침(서열번호 2) 또는 POMC-특이적 κ B2 탐침(서열번호 3)을 동량 사용하여 EMSA를 시행하였다. 도 3b에서 보여 주는 바와 같이 POMC-특이적 탐침 중 κ B1 탐침 보다 κ B2 탐침을 사용할 때 시상하부 NF- κ B 활성을 더 잘 측정할 수 있어서 κ B2부위가 NF- κ B의 유력한 결합 부위임을 알 수 있었다.
- [0042] <실시예 2> Tat 투여 후 시상하부 신경세포에서 NF- κ B 활성 측정
- [0043] 실험에 사용한 시상하부 신경세포를 배양하기 위하여 보고된 방법(Canick JA, et al., Brain Res. 372: 277-282, 1986)에 따라 임신 18일째 된 랫트의 태아로부터 시상하부를 채취하여 5 μ g/ml 인슐린, 100 μ g/ml 철 프리 인간 트랜스페린(iron-free human transferrin), 100 μ M 푸트레신(putrescin), 30nM 소듐 세레나이트(sodium selenite) 및 20nM 프로게스테론(progesterone)을 함유한 신경세포 특이적 배양매질(neurobasal medium; Invitrogen, Carlsbad, CA)에서 7~8일 동안 배양하였다.
- [0044] 상기 방법으로 일차 배양한 시상하부 신경세포를 2시간 동안 FBS를 포함하지 않은 배지에서 배양한 뒤, 다양한 농도의 Tat(1-72) (10⁻⁴~10⁻²nM), TNF- α (200 ng/ml), PDTC(100 μ M)를 30분 (Western 블롯팅 실험) 또는 4 시간 (EMSA 실험) 동안 처리하였다. 사용된 재조합 Tat 단백질은 Tat(아미노산 서열 1-72번)에 해당하는 cDNA를 클로닝한 뒤 pGex4T3 벡터(Pharmacia, Piscataway, NJ)에 재조합시킨 다음, *E.coli* BL21에서 과발현시켰다. 이렇게 얻어진 재조합 GST-Tat는 글루타치온 아가로오스 4B(Sigma, St. Louis, MO)를 이용하여 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다.
- [0045] EMSA는 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하였고, I κ B- α 인산화를 보기 위한 Western 블롯팅 실험은 기존에 보고된 방법(Kim MS, et al., Mol. Endocrinol., 18: 2291-301, 2004)에 따라 시행하였으며, 일차 항체는 P-I κ B- α (Ser 32)(Cell Signaling Technology, Beverly, MA)를 사용하였다. 도 1d 및 도 1e에서 나타난 바와 같이 Tat(1-72) 처리는 시상하부 신경에서 I κ B 인산화와 NF- κ B의 핵 전좌를 증가시켰다.
- [0046] <실시예 3> 이중 면역형광 분석을 통한 시상하부 NF- κ B 활성
- [0047] C57BL/6J 마우스의 복강으로 200 μ l 생리식염수 또는 200 μ l의 생리 식염수에 녹인 LPS(200 μ g)를 투여 하고, 45분 후에 경추 탈골로 마우스를 희생시켜 뇌를 채취한 다음 이소펜텐-에네 액체 질소에 넣어서 재빨리 동결한 후 -70℃에서 냉동고에 보관하였다. Cryostat(Leica, Wetzlar, Germany)를 사용하여 10 μ m 두께의 뇌 절편을 유리 슬라이드 위에 올려 놓은 다음 4% 포름알데히드에 담가서 실온에서 15분 동안 고정시켰다. 이중 면역염색을 위한 뇌절편을 NF- κ B 서브유닛인 p50에 대한 토끼 일차항체(1:500 희석, Santa Cruz)와 신경세포 마커인 MAP2에 대한 마우스 일차항체(1:500 희석, Sigma)에 4℃에서 48시간 동안 반응시켰다. 세정 후, 뇌절편을 알렉사-플루오로-546-접합 염소 항-토끼 항체 또는 알렉사-플루오로-488-접합 당나귀 항-마우스 항체(Molecular Probes, Eugene, OR, 각각 1:100)에 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 슬라이드를 마운트 하기 전에 핵을 염색하기 위하여 DAPI 용액(1:20000, Invitrogen)에 10분간 처리하였다. 이중 면역형광은 공초점현미경(Leica)을 사용하여 관찰하였다.

- [0048] 도 1c에 나타난 바와 같이, LPS 처리하면 생리 식염수를 처리한 대조군에 비하여 시상하부 신경세포에서 p50의 핵 내로의 이동이 증가하였다. 따라서 LPS 처리 후 시상하부 신경세포에서 NF- κ B 활성이 증가함을 알 수 있었다.
- [0049] <실시예 4> LPS 또는 Tat 투여 후 시상하부 염증성 사이토카인 및 POMC mRNA 발현 분석
- [0050] 생리식염수(대조군, C), LPS(200 μ g/kg, Sigma) 또는 Tat(1-72)(4mg/kg)를 8-10 주령의 수컷 C57BL/6J 마우스 (오리엔트 바이오)의 복강으로 투여하였다. 일부 동물에는 LPS 및 Tat(1-72)를 복강으로 주사하기 30분 전에 NF- κ B 저해제인 피롤리딘 디치오카바메이트(pyrrolidine dithiocarbamate; 이하 PDTC, 500nM)를 3 μ l DMSO에 녹여서 제3 뇌실로 투여하였고, PDTC를 투여하지 않은 동물에게는 동량의 0.9% 생리식염수를 제3 뇌실로 투여하였다. 복강 주사 후 3시간 뒤에 실시예 1의 방법에 따라 시상하부를 채취하여 총 RNA를 트리졸 시약 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)을 사용하여 추출하였다. 염증성 사이토카인, 신경펩타이드 발현을 서열번호 4 내지 21을 갖는 프라이머를 이용하여 반정량 RT-PCR 또는 리얼타임 PCR 분석에 의해 결정하였다. 각 mRNA의 발현을 GAPDH mRNA 발현량으로 보정하였다.
- [0051] 그 결과, LPS 또는 Tat를 IP 투여하면 시상하부의 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α mRNA 발현이 증가하는데, LPS 또는 Tat 투여 30분 전에 NF- κ B 저해제인 피롤리딘 디치오카바메이트(pyrrolidine dithiocarbamate; PDTC)를 시상하부에 인접한 제3 뇌실 내로 투여하면 LPS나 Tat에 의하여 유도된 시상하부 사이토카인 생산의 증가가 유의하게 억제되었다(도 2a 및 도 2b).
- [0052] <실시예 5> NF- κ B에 의한 POMC 전사 활성 조절
- [0053] 먼저, 본 발명자는 인간 POMC 유전자의 코딩 서열로부터 1kb 뉴클레오타이드(κ B-1) 업스트림 부위와 첫 번째 인트론 부위에서 도 3a와 같은 NF- κ B 결합 모티프를 발견하였다. 따라서 NF- κ B가 POMC 전사 활성을 조절하는 지 측정하기 위하여 인간 POMC 유전자의 1kb 프로모터 영역(뉴클레오타이드 -1147 내지 +94) 및 첫 번째 인트론(+1436 내지 +3865)을 클로닝하여 루시페레이스 리포터 유전자를 가진 pGL2-basic 벡터(Promega Corp., Madison, WI)에 라이게이션하였다. 그리고 이를 임의로 각각 POMC-luc1, POMC-luc2라고 명명하였다.
- [0054] POMC를 생산하는 세포인 AtT20 세포를 10% FBS가 함유된 Dulbecco's Eagle Modified Medium(이하, DMEM)에 배양을 하다가 6웰 플레이트에 분주하고 24시간 뒤 POMC 리포터 유전자(200ng)와 다양한 양의 p50(10~100ng) 또는 p65(10~100ng) 유전자를 Lipopectamin(Invitrogen)을 사용하여 형질 감염(transfection)시켰다. 공벡터 유전자를 사용하여 형질 감염 시킨 전체 유전자 양이 동일하도록 보정을 하였고, 형질 감염 성공률을 일치시키기 위하여 CMV- β -gal(20ng)를 함께 형질 감염시켰다. 형질감염 48시간 후, 세포를 수거하여 루시페레이스 활성과 β -갈라토시데이즈 활성으로 알려진 방법에 따라 각각 측정하여 루시페레이스 활성을 β -갈라토시데이즈 활성으로 보정하였다. 형질감염은 같은 조건에서 2번 수행되었고, 각 실험은 최소 3회 이상 반복하여 결과를 얻었다.
- [0055] 그 결과, AtT-20 세포에서 p50의 발현은 약 8배 정도 POMC-luc2 활성을 증가시켰지만(도 3b), POMC-luc1 활성은 약 2배 정도 증가시켰다(도 3c 및 도 3d). 또한 p65 단독 발현은 POMC-luc2 활성을 증가시키지 않았지만, p65를 p50과 함께 발현한 경우에는 농도-의존적으로 POMC-luc2 활성을 증가시켰다(도 3c). 따라서 p50이 POMC-luc2 활성을 강력하게 증가시킴을 알 수 있었다.
- [0056] 도 3d 실험에서는 형질감염 48시간 후, 세포를 PDTC(100 μ M)를 함유하거나 함유하지 않은 LPS(10ng/ml), IL-1 β (20ng/ml), TNF- α (200ng/ml)로 4시간 동안 처리한 뒤 세포를 수거하였다. AtT20 세포에서 LPS, Tat(1-72) 및 염증성 사이토카인의 처리는 POMC-luc2 전사활성을 유의성있게 자극하였고, 이러한 자극 효과는 PDTC 전처리에 의해 차단되었다(도 3e).
- [0057] <실시예 6> 시상하부 인접 제3 뇌실내 NF- κ B 저해제 또는 멜라노코틴 억제제 투여 효과
- [0058] 종래 알려진 방법(Kim KS, et al., J.Clin.Invest., 105: 1005-1011, 2000)에 따라 8~10주령 C57BL/6J 마우스의 제3뇌실 내(수술 좌표: 시상 봉합과 관상 봉합의 접합점(bregma)으로 부터 후방 0.8mm, 측방 0mm, 깊이 5.5mm) 또는 시상하부 내 (수술 좌표: 시상 봉합과 관상 봉합의 접합점으로부터 후방 1.8mm, 정중선으로 부터 측방 0.3mm, 깊이 5.8mm)에 캐놀라 삽관하는 수술을 하고, 1주일간 회복 기간을 가진 다음 약물을 투여하였다. LPS(10ng) 및 Tat(1-72)(1nmol)을 캐놀라를 통하여 밤사이 금식시킨 마우스에 오전 8-10경에 투여하였다. LPS 나 Tat(1-72) 투여 직전에 0.9% 생리식염수에 녹여서 마우스 당 0.5 μ l(시상하부 내 주입) 또는 2 μ l (뇌실 내 주입의 경우)의 부피로 투여하였다.
- [0059] 또한, 일부 동물에서는 LPS 또는 Tat(1-72) 투여 30분 전에 AGRP(3 μ g) (0.9% 생리식염수 용해) 및 PDTC

(500nM, 2% DMSO)에 녹여서 투여하였다. LPS 또는 Tat₁₋₇₂ 투여 후 마우스는 다시 원래의 케이지로 돌아가서 자유롭게 먹이를 섭취하도록 하고, 24시간 동안 먹이섭취량과 체중 변화를 측정하였다.

[0060] 도 4a 및 도 4b와 도 5a 및 도 5b에 나타난 바와 같이 LPS 또는 Tat₁₋₇₂를 투여한 동물군에서는 생리식염수를 투여한 대조군에 비하여 먹이섭취와 체중이 감소하였고, AGRP나 PDTC를 미리 투여 받은 군에서는 이러한 효과가 상실되었다.

[0061] <실시예 7> p50 siRNA를 이용한 NF-κB 활성 억제

[0062] 마우스 p50의 뉴클레오타이드 염기 서열(2624-2643)을 표적으로 하는 small inhibitory RNA(이하, siRNA)를 제작하였다. p50에 특이적인 siRNA가 효과적으로 p50 발현을 억제하는지 확인하기 위하여 AtT20 세포에 p50 siRNA (100~200 nM)를 Lipopectamine을 사용하여 형질 감염시키고, 대조군에는 알려진 유전자 염기 서열과도 일치하지 않은 대조 스크램블 siRNA(Dharmacon, Lafayette, CO)를 동량 처리하였다. 24시간 뒤에 세포를 수거하여 p50 mRNA 발현을 RT-PCR 이용하여 측정하였고, GAPDH로 mRNA 양을 보정하였다.

[0063] 도 3f에 나타난 바와 같이 p50 siRNA 처리는 효과적으로 p50 발현을 감소시켰다. 도 3g에서는 AtT20 세포에 p50 siRNA(200nM), POMC-luc2(200ng) 및 CMV-β-gal(20ng)을 형질 감염시키고, 36시간 뒤에 Tat(1-72)(1nM) 또는 LPS(10ng/ml)를 4시간 동안 처리한 다음 세포를 수거하여 루시페레이스 활성과 β-갈라토시데이즈 활성을 측정하였다.

[0064] 한편 p50 siRNA 파티클(0.5mmol)을 0.5μl RNAase 제거 증류수에 녹여 마우스의 양측 시상하부 내로 이미 보고된 방법(Kim MS, et al., Nat.Neurosci., 9: 901-906, 2006)에 따라 투여하였다. 대조군 동물은 동일량의 대조 스크램블 siRNA를 투여하였다. siRNA 주입 2일 후, 밤사이 공복 상태에서 오전 9-10시 사이에 생리식염수 또는 LPS(3 ng)를 마우스의 시상하부 내로 주입하고 24시간 동안 먹이섭취 및 체중 변화를 관찰하였다. 실험 마지막에 시상하부를 모아 p50 mRNA 발현을 RT-PCR로 측정하였다. 시상하부 p50 mRNA 발현량이 대조군의 평균치의 70% 이상의 감소를 보이는 마우스를 성공적으로 p50 발현이 억제된 것으로 평가하고 데이터 분석에 포함시켰다.

[0065] 도 4c 및 도 4d와 같이 p50 siRNA로 처리된 마우스에서 유의성있게 LPS에 의한 음식물 섭취 억제 및 체중감소 효과를 억제하였다.

[0066] <실시예 8> POMC 신경세포 특이적 IKKβ 결핍 마우스의 제작

[0067] 본 발명에서는 cre-lox 시스템(Sauer B, Methods.14: 381-394, 1998)을 이용하여 *Ikkβ-flox/flox* (*Ikkβ*^{F/F}) 마우스(University of California, M. Karin 교수로부터 제공 받음)와 Cre-리콤비네이즈의 발현이 POMC 전사 활성화에 의하여 조절을 받는 POMC-Cre 형질 전환 마우스(University of Texas의 JK Elmquist 교수로부터 제공 받음)와 교배하여 POMC를 생산하는 신경세포에 선택적으로 *Ikkβ* 유전자의 발현을 억제시킨 마우스(*Ikkβ*^{ΔPOMC}, cre+, flox/flox)를 제작하였다. 대조군으로 *Ikkβ*^{F/F} (cre-, flox/flox) 마우스를 사용하였다. 각각의 마우스의 실시예 6에서 기술한 방법대로 시상하부 내에 캐놀라를 삽입하였다. 1주일 뒤 밤사이 공복을 시킨 뒤 오전 9-10시 사이에 캐놀라를 통하여 1μl의 생리식염수 또는 1μl의 생리식염수에 녹인 LPS(10 ng), Tat(1-72)(1 nmol)을 투여하고, 24시간 동안 먹이섭취와 체중을 측정하였다.

[0068] 도 5c 내지 도 5f에 나타난 바와 같이, *Ikkβ*^{ΔPOMC} 마우스에서는 LPS 및 Tat의 시상하부 내 투여 후 먹이섭취 및 체중 감소 효과가 대조군인 *Ikkβ*^{F/F} 마우스에서 비하여 현저히 감소하였다. 이는 시상하부 POMC 세포에서 *Ikkβ* 발현 저하 및 NF-κB 활성화의 차단이 질환에 동반된 식욕 부진 및 체중 저하를 막을 수 있음을 의미한다. 이러한 결과는 POMC 신경세포에서 NF-κB 활성화가 질환 관련 식욕부진 및 체중감소에 중요한 역할을 수행한다는 가설을 뒷받침한다.

도면의 간단한 설명

[0069] 도 1a, 도 1b 및 도 1c는 LPS 투여에 따른 시상하부 NF-κB 활성화 수준을 EMSA로 나타낸 것이고,

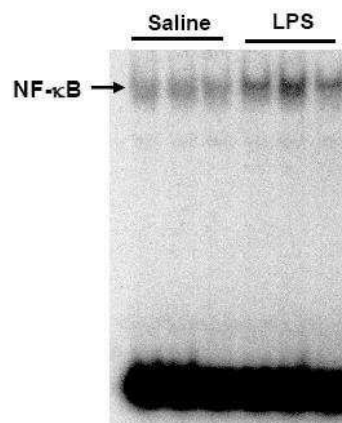
[0070] 도 1d 및 도 1e는 Tat 투여에 따른 시상하부 신경세포의 NF-κB 활성화 수준을 EMSA로 나타낸 것이고,

[0071] 도 2a 및 도 2b는 LPS 및 Tat 투여에 따른 시상하부 염증성 사이토카인 mRNA 발현량을 나타낸 것이고,

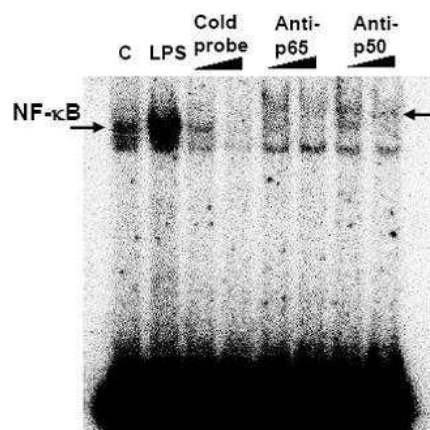
- [0072] 도 2c는 Tat 투여에 따른 시상하부 POMC mRNA 발현양을 나타낸 것이고,
- [0073] 도 3a는 인간 POMC 유전자에서 잠재적 κ B 결합 부위를 나타낸 것이고,
- [0074] 도 3b는 κ B-1 및 κ B-2를 포함한 올리고뉴클레오타이드를 이용한 EMSA 결과를 나타낸 것이고,
- [0075] 도 3c, 도 3d 및 도 3f는 LPS, Tat 및 사이토카인 처리가 POMC 전사활성 증가시키고, NF- κ B 억제제가 이를 억제함을 나타낸 것이고,
- [0076] 도 3e는 AtT20 세포에서 p50 siRNA 처리 후 p50 유전자 발현 저하를 나타내는 것이고,
- [0077] 도 4a 내지 도 4b는 NF- κ B 억제제 또는 p50 특이적 siRNA 투여 후 LPS 및 Tat 유도성 식욕부진 및 체중감소의 차단 효과를 나타낸 것이고,
- [0078] 도 5a 내지 도 5b는 멜라노코틴 억제제인 AGRP 투여 후 LPS 및 Tat 유도성 식욕부진 및 체중감소의 차단 효과를 나타낸 것이고,
- [0079] 도 5c부터 도 5f까지는 시상하부 POMC 신경세포에서 NF- κ B 상위 키나아제인 IKK 발현을 차단시킨 마우스 모델을 이용한 시상하부 POMC 세포에서 NF- κ B 활성을 차단할 경우 LPS 및 Tat 유도성 식욕 부진 및 체중 감소의 차단 효과를 나타낸 것이다.

도면

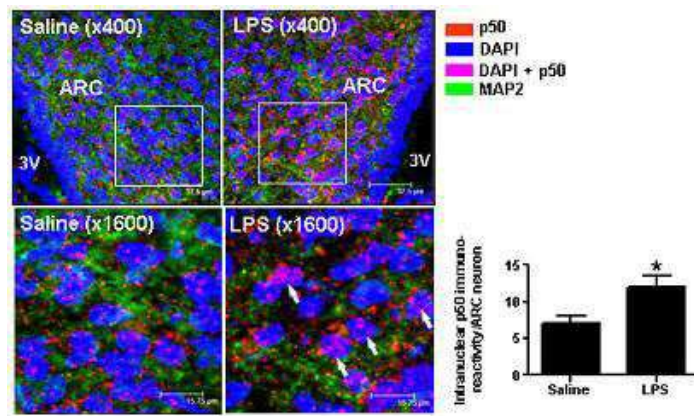
도면1a



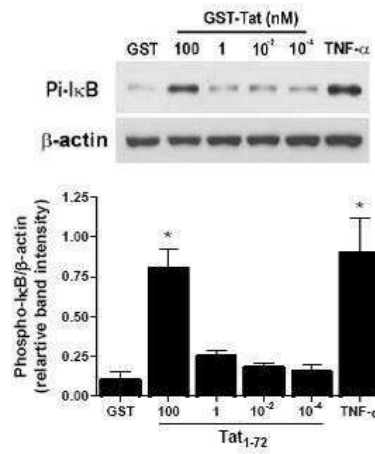
도면1b



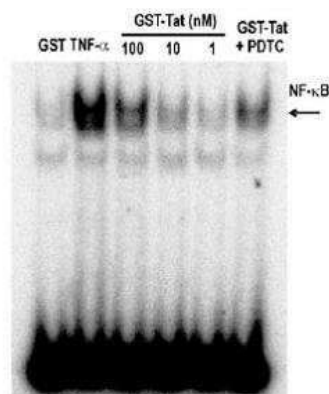
도면1c



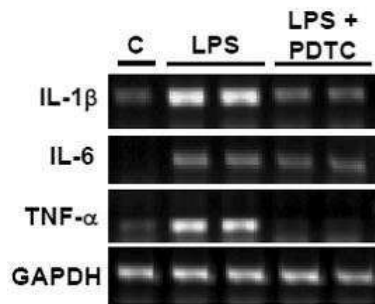
도면1d



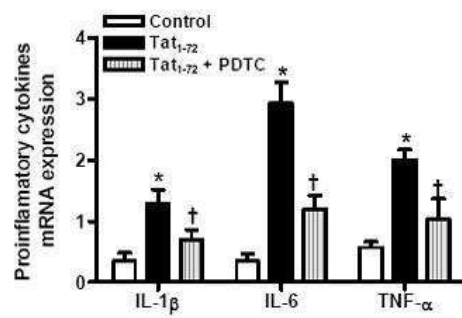
도면1e



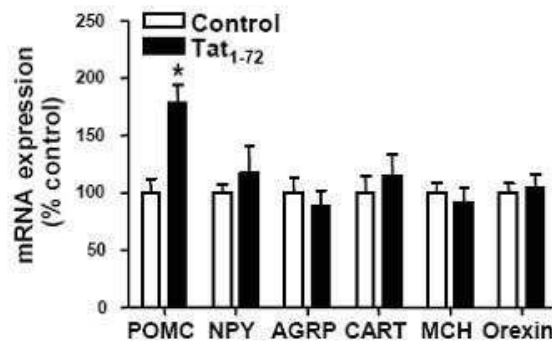
도면2a



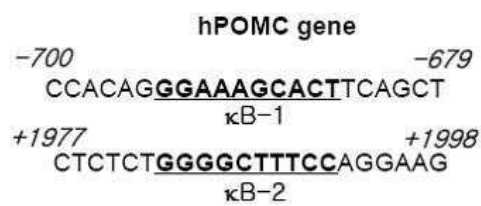
도면2b



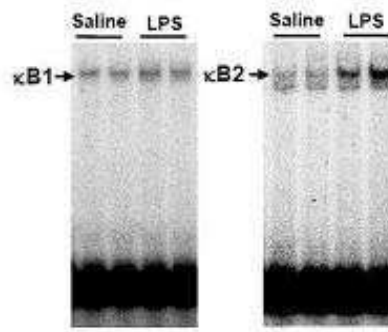
도면2c



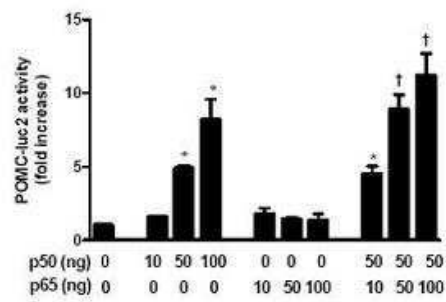
도면3a



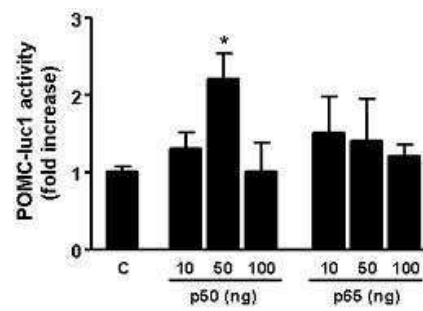
도면3b



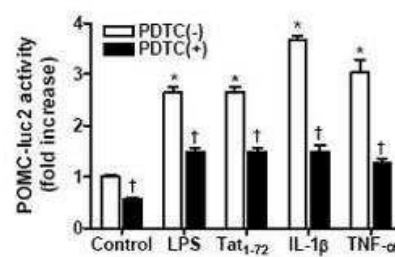
도면3c



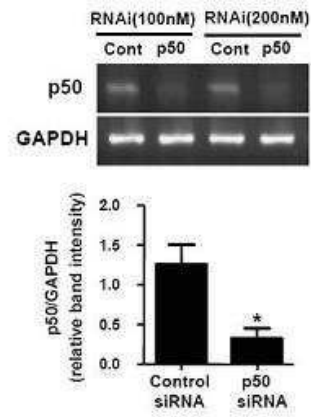
도면3d



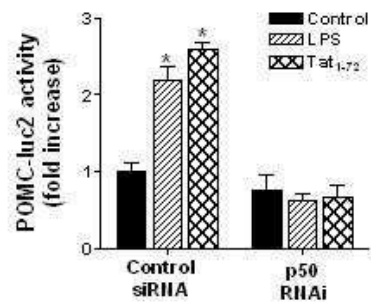
도면3e



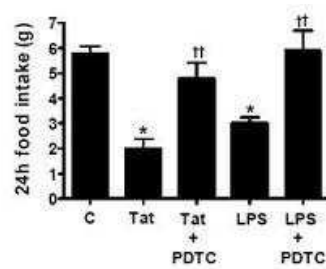
도면3f



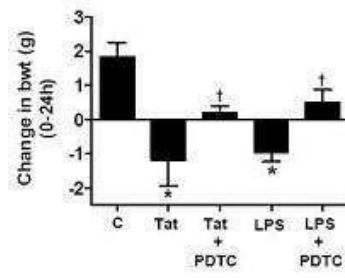
도면3g



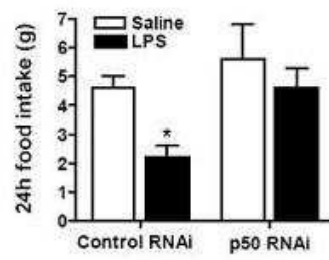
도면4a



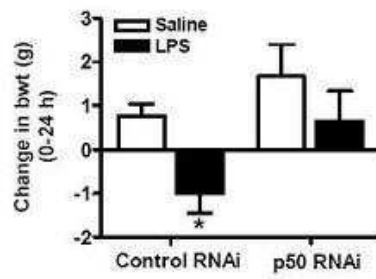
도면4b



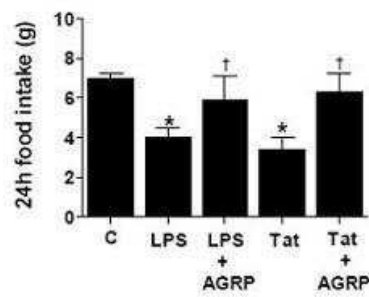
도면4c



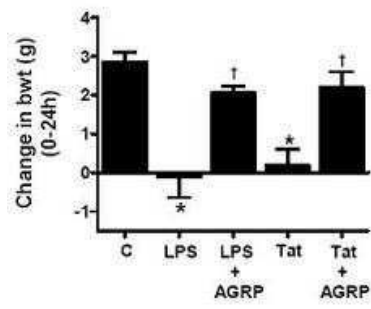
도면4d



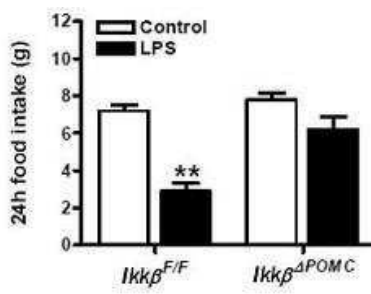
도면5a



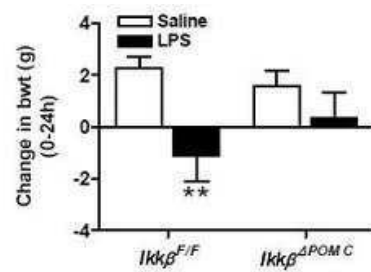
도면5b



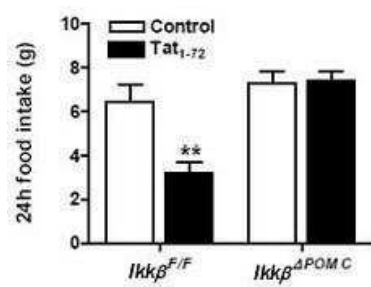
도면5c



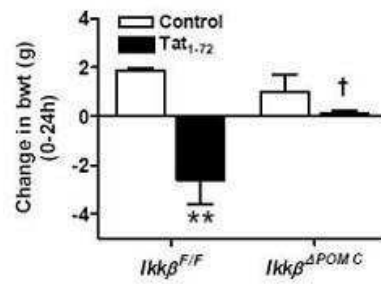
도면5d



도면5e



도면5f



서열목록

<110> UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION
 <120> Pharmaceutical composition for the treatment of anorexia and wasting syndrome comprising nuclear factor-κB inhibitor and/or melanocortin inhibitor

<130> dp-2008-0280

<160> 23

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> General κB probe

<400> 1

agttgagggg actttccag gc

22

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> POMC-specific κB1 probe

<400> 2
gccacagggg aagcacttca gctg 24

<210> 3
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> POMC-specific kB2 probe

<400> 3
gctctctggg gctttccagg aag 23

<210> 4
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer for IL-1beta

<400> 4
ctgttctttg aagttgacgg acc 23

<210> 5
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer for IL-1beta

<400> 5
ctatcttggt gaagacaaac cgc 23

<210> 6

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Forward primer for IL-6

<400> 6
 acggccttcc ctacttcaca a 21

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Reverse primer for IL-6

<400> 7
 gcattggaaa ttggggtagg a 21

<210> 8
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Forward primer for TNF-alpha

<400> 8
 tcattcttctc aaaattcgag tg 22

<210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Reverse primer for TNF-alpha

<400> 9
gaagactcct cccaggtata tg 22

<210> 10
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer for POMC

<400> 10
caggtcctgg agtccgac 18

<210> 11
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer for POMC

<400> 11
catgaagcca ccgtaacg 18

<210> 12
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer for NPY

<400> 12
atgctaggta acaagcgaat ggg 23

<210> 13
<211> 23

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer for NPY

<400> 13
ggctggatct cttgcatat etc 23

<210> 14
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer for AGRP

<400> 14
acaactgcag accgagca 18

<210> 15
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer for AGRP

<400> 15
gacgcggaga acgagact 18

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer for CART

<400> 16
ctgctgctac tgctaccttt 20

<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer for CART

<400> 17
aagcattca agaggaaaga a 21

<210> 18
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer for p50

<400> 18
atgaggaggt ggtgccaggt a 21

<210> 19
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer for p50

<400> 19
taaccgtggg gcattttgtt c 21

<210> 20
<211> 20
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer for GAPDH

<400> 20

accacagtcc atgcatcac

20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer for GAPDH

<400> 21

tccaccaccc tgttgctgta

20

<210> 22

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer for first intron region of human POMC gene

<400> 22

acaggatagt tttaaggga gtggaa

26

<210> 23

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer for first intron region of human POMC gene

<400> 23

cacatagctt ctaagttcac tgcct

25