(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0017353
(43) 공개일자 2017년02월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 31/18* (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/395 (2013.01)
A61K 31/18 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0111155
(22) 출원일자 2015년08월06일
심사청구일자 2015년08월06일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김은철
서울특별시 강남구 영동대로128길 15, 1동 802호 (삼성동, 홍실아파트)
윤형문
서울특별시 성북구 월곡로14길 26, 109동 1603호 (하월곡동, 월곡래미안루나밸리아파트)
박경란
서울특별시 성북구 월곡로14길 26, 109동 1603호 (하월곡동, 월곡래미안루나밸리아파트)
(74) 대리인
특허법인 하나

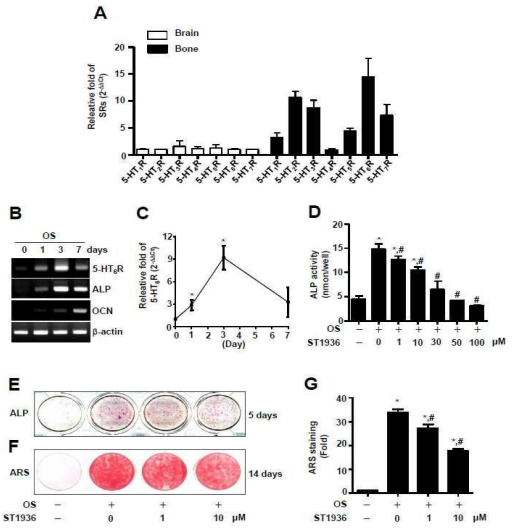
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **세로토닌 6 수용체 활성 저해제를 포함하는 골 형성 촉진용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 세로토닌 6 수용체(serotonin 6 receptor)의 활성을 억제하여 BMP 신호 전달 경로를 활성화 하는 방법에 관한 것으로, 상기 BMP 신호 전달 경로(BMP signaling pathway)를 활성화하여 골 질환을 예방 또는 치료하는 방법이 제공된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 31/496 (2013.01)
A61K 48/00 (2013.01)
G01N 33/5008 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012R1A5A2051384
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 선도연구센터지원사업
연구과제명 치아와 치주질환 병리기전 규명 및 제어기술 연구
기 여 율 1/1
주관기관 경희대학교
연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

세로토닌 6 수용체의 활성을 억제하여 골 형성을 촉진하는 방법.

청구항 2

세로토닌 6 수용체 활성 저해제를 유효 성분으로 포함하는 골 형성 촉진용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

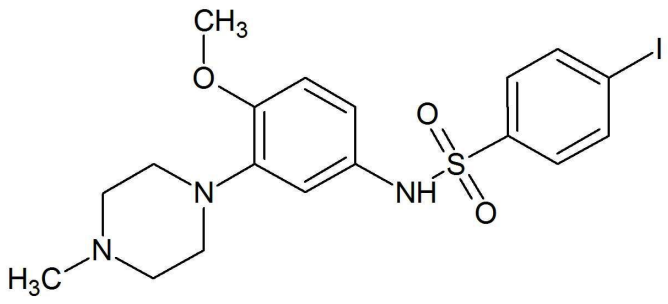
상기 세로토닌 6 수용체 활성 저해제는 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 압타머, siRNA, shRNA, microRNA, 저해 화합물 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 골 형성 촉진용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 저해 화합물은 하기 화학식 1의 화합물인 골 형성 촉진용 조성물.

[화학식 1]



청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

골 질환 예방 또는 치료용인 골 형성 촉진용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 골 질환은 대사성 골 질환 또는 정형외과적 골 질환인 골 형성 촉진용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 골 질환은 골다공증, 골 형성 부전증, 골연화증, 골량 감소증, 골절, 골 결손 및 고관절 감소증으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 골 형성 촉진용 조성물.

청구항 8

(a) 세로토닌 6 수용체를 발현하는 세포 및 시험 제제를 접촉시키는 단계;

(b) 상기 시험 제제의 세로토닌 6 수용체에 대한 억제 효과를 결정하는 단계; 및

(c) 상기 시험물질과 접촉되지 않은 대조군과 시험물질과 접촉된 세포에서 세로토닌 6 수용체의 활성 억제 정도를 비교하는 단계를 포함하는 골 질환 예방 또는 치료제 스크리닝 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 시험 제제는 폴리펩티드, 소 유기 물질(Small organic molecule), 다당류(Polysaccharide), 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 골 질환 예방 또는 치료제 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 본 발명은 세로토닌 6 수용체(serotonin 6 receptor)의 활성을 조절하여 BMP 신호 전달 경로를 활성화하는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 상기 BMP 신호 전달 경로(BMP signaling pathway)를 활성화하여 골 질환을 예방 또는 치료하는 방법이 제공된다.

배 경 기 술

[0003] 뼈는 일생동안 지속적으로 변화하는 활동적인 조직이다. 뼈는 육안으로 외부의 피질골(치밀골)과 내부의 소주골(해면골, 스폰지뼈)로 구분하는데, 피질골은 물리적인 강도가 강하여 신체를 보호하고 지지하는 역할을 하고, 소주골은 충격을 흡수하거나 칼슘의 변화를 일정하게 유지하는 역할을 한다.

[0004] 뼈의 성장이 중단된 후에도 오래된 뼈는 파괴되어 없어지고(골 흡수), 새로운 뼈가 없어진 곳을 메우는 고정(골형성)이 일생동안 반복되는, 이러한 현상을 뼈의 재형성(remodeling)이라 한다. 조골 세포와 파골세포 사이의 상호작용이 균형을 이루어 골 흡수와 골 형성이 균형을 이루어야 뼈의 항상성이 유지되고 혈액 속의 칼슘 농도가 일정하게 유지되는데, 혈액에 칼슘이 부족하게 되면 이를 보충하기 위하여 골 흡수가 증가되어 뼈의 칼슘을 혈액으로 방출하게 되며, 골 흡수가 지속되면 뼈가 약해져 골다공증과 같은 질환이 발생할 수 있다.

[0005] 특히, 골다공증은 폐경에 따른 급격한 호르몬의 변화에 의한 파골세포(osteoclast)의 활성화에 따른 골흡수 증가로 나타나는 폐경 후 골다공증과, 노화가 되면서 조골 세포(osteoblast)의 기능이 감소하여 골형성이 감소하는 노인성 골다공증으로 분류할 수 있다. 이러한 골다공증으로 인한 골절은 심각한 활동 제한에 이르게 되고, 고관절 골절의 경우 약 15-35%의 높은 사망률과 관련되어 있기 때문에, 골다공증성 골절이 발생하기 이전에 골다공증의 진단과 치료가 중요하다.

[0006] 미국에서 폐경기 이후 여성의 약 30%가 골다공증에 걸려있으며, 약 50%가 골감소증의 현상을 보이고 있고, 약 2,600만 명이 골다공증에 의한 골절 위험성을 내재하고 있는 것으로 세계보건기구(WHO)가 보고하고 있다. 또한, 미국에서 이들 골다공증 환자는 매년 약 2%씩 증가할 것으로 예상되고 급속한 노령화가 진행되는 국내에서도 골다공증 환자가 급증하고 있다.

[0007] 그럼에도 불구하고, 현재까지 개발된 골다공증 치료제들은 부갑상선 호르몬제를 제외하고는 골 형성 작용이 미

미하여 치료효과보다는 증상의 진행을 예방하는 효과에 그치고 있다. 또한, 골 형성 효과를 갖는 부갑상선 호르몬제의 경우는 골 형성을 촉진하여 치료효과를 얻을 수 있지만 장기 사용에 대한 안전성이 확립되지 않아 그 사용이 제한되고 있다. 따라서 골다공증의 효과적인 치료를 위해서는 골 형성의 기작에 대한 명확한 이해와 이를 기반으로 한 근본적인 치료 대책이 요구된다.

[0008] 한편, 인간 5-하이드록시트립타민(이하 '세로토닌'이라 함) 수용체(5-HTR)는 5-HT_1R부터 5-HT_7R 외에 그들의 아형까지 포함하여 현재까지 총 15 종이 알려져 있으며, 우울증, 정신 분열증, 불안증(anxiety), 수면장애 등의 정신질환 및 알츠하이머 질환 등에 관련되어 있는 것으로 알려져 있다(Martin, Neuropharm, 36(4/5):637-647, 1997). 또한, 스트레스 상황에서 5-HT_1R을 과 발현시킨 쥐는 항우울제를 복용한 것처럼 활동적으로 행동한다는 연구 결과가 보고된 바 있다(Heisler et al., PNAS 95:15049-15054, 1998).

[0009] 상기 세로토닌 수용체 중에서도, 5-HT_6R은 가장 최근에 염기서열이 밝혀진 5-HTR로서 아직까지 정확한 기전이 밝혀지지 않았으나, 우울증과 알츠하이머 질환과 같은 퇴행성 뇌질환과 정신질환 등에 관련되어 있다고 알려져 있다. 상기 5-HT_6R은 우울증 치료제의 작용점으로 연구되고 있을 뿐만 아니라 5-HT_6R의 억제제가 알츠하이머 환자의 인지 기능 개선효과를 보여 퇴행성 뇌질환 치료제로의 사용 가능성이 제기되었다.

[0010] 그러나, 상기 세로토닌 수용체는 중추신경계 관련 연구만이 집중되어 있으므로, 골 형성에 있어서 상기 세로토닌 수용체의 역할은 아직까지 명확하게 밝혀진 바 없으며 여러 연구 결과가 상반되고 있다.

[0011] 따라서, 본 발명자들은 세로토닌 수용체의 분자적 기작에 대해 명확하게 이해하고, 상기 이해를 바탕으로 골 형성 관련 질환에 대한 근본적인 예방 및 치료 방법을 고안하고자 하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명은 전술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여 골 형성과 관련된 세로토닌 수용체의 역할을 명확하게 규명하고, 골 질환의 근본적인 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

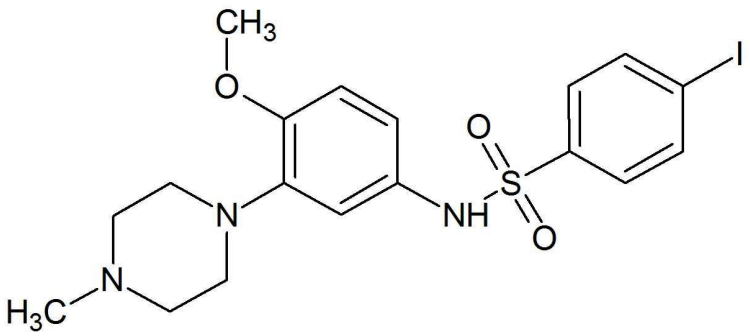
[0015] 본 발명의 일 측면에 따르면, 세로토닌 6 수용체의 활성을 억제하여 골 형성을 촉진하는 방법이 제공된다.

[0016] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 세로토닌 6 수용체 활성 저해제를 유효 성분으로 포함하는 골 형성 촉진용 조성물이 제공된다.

[0017] 일 실시예에 따르면, 상기 세로토닌 6 수용체 활성 저해제는 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 압타머, siRNA, shRNA, microRNA, 저해 화합물 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있다.

[0018] 일 실시예에 따르면, 상기 저해 화합물은 하기 화학식 1의 화합물일 수 있다.

[0019] [화학식 1]

[0020] 

[0021] 일 실시예에 따르면, 상기 골 형성 촉진용 조성물은 골 질환 예방 또는 치료용일 수 있다.

[0022] 일 실시예에 따르면, 상기 골 질환은 대사성 골 질환 또는 정형외과적 골 질환일 수 있다.

[0023] 일 실시예에 따르면, 상기 골 질환은 골다공증, 골 형성 부전증, 골연화증, 골량 감소증, 골절, 골 결손 및 고관절 감소증으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0024] 본 발명의 다른 측면에 따르면, (a) 세로토닌 6 수용체를 발현하는 세포 및 시험 제제를 접촉시키는 단계; (b) 상기 시험 제제의 세로토닌 6 수용체에 대한 억제 효과를 결정하는 단계; 및 (c) 상기 시험물질과 접촉되지 않은 대조군과 시험물질과 접촉된 세포에서 세로토닌 6 수용체의 활성 억제 정도를 비교하는 단계를 포함하는 골 질환 예방 또는 치료제 스크리닝 방법이 제공된다.

[0025] 일 실시예에 따르면, 상기 시험 제제는 폴리펩티드, 소 유기 물질(Small organic molecule), 다당류(Polysaccharide), 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있다.

발명의 효과

[0027] 본 발명은 세로토닌 6 수용체의 분자적 기작에 대한 명확한 이해를 바탕으로 효과적으로 골 형성을 촉진하는 방법을 제공하며, 다양한 골 관련 질환에 대한 치료, 예방, 진단 또는 그 연구 등에 유용하게 활용될 수 있다.

[0028] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 특허청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 조골 세포 분화에 따른 5-HT_6R의 발현 정도를 나타낸 것이다. (A) 내지 (C)는 뇌, 골 조직, *in vitro* 조골 세포 분화에 따른 5-HT_6R의 발현 정도를 측정하였으며, (D) 내지 (G)는 5-HT_6R가 배양된 조골 세포의 분화에 미치는 영향을 측정하였다.

도 2는 두개골 결손 부위의 5-HT_6R의 발현 정도를 나타낸 것이다. (A)는 ICR 생쥐의 두개골 결손 부위에서 5-HT_6R의 mRNA 발현 수준을 측정한 것이다. (B)는 두개골 결손 모델의 분석 개요를 도식화한 것이다. (C)는 ST1936 처리된 군과 대조군의 3D micro CT(μCT) 영상을 나타낸 것이다. (D)는 μCT 영상에 따라 신생골 형성의 상대적인 비율을 정량적으로 분석한 것이다. (E)는 H&E 염색된 두개골의 영상을 나타낸 것이다. 오른쪽은 확대 영상이며, 화살표는 골 조직의 두께를 의미한다.

도 3은 5-HT_6R의 미발달 뼈의 발생(embryonic bone development) 동안 두개골 형성에 미치는 영향을 분석한 것이다. (A)는 SR6에 의한 두개골 발생 분석 개요를 도식화 한 것이다. (B) 및 (C)는 작용제 또는 길항제 처리에 따른 P1 생쥐의 변화를 나타낸 것이다. (D)는 P1 생쥐를 알시안 블루(Alcian Blue) 및 알리자린 레드(Alizarin Red)를 이용하여 염색한 것이다. 가장 오른쪽은 두개골의 영상을 확대한 것이다. (E) 내지 (G)는 각각 P1 생쥐의 두개골에서 Runx2, OCN, BSP의 mRNA 발현 수준을 측정한 것이다.

도 4는 5-HT_6R가 조골 세포의 분화에 따른 BMP2-Smad-Runx2 신호 전달 경로에 미치는 영향을 분석한 것이다. (A)는 웨스턴 블랏을 통해 인산화-Smad1/5/8 및 Smad1/5/8 단백질을 측정한 것이다. (B)는 웨스턴 블랏을 통해 Runx2 단백질을 측정한 것이다. (C) 내지 (F)는 ST1936의 존재 하에 rh-BMP2와 함께 세포를 배양하고 그 결과를 분석한 것이다. (C) 및 (D)는 3일간 배양한 것이고, (E) 및 (F)는 7일간 더 배양한 것이다. (C) 내지 (F)는 각각 ALP staining, ALP 활성, Alizarin Red staining 에 의한 광화 결절 형성, 광학 농도를 측정하였다.

도 5는 5-HT_6R에 의해 억제된 BMP2-Smad-Runx2 신호 전달 경로와 Jab1 단백질의 연관성을 분석한 것이다. (A)는 ST1936와 함께 두개관 조골 세포를 3일간 배양한 후 항-생쥐 항체 및 항-Jab1 항체로 면역침전 분석한 것이다. (B)는 ST1936와 함께 두개관 조골 세포를 3일간 배양한 후 면역염색 분석한 것이다. Smad1/5/8(녹색)은 토끼의 항-Smad1/5/8 항체로 면역염색 되었으며, Jab1(빨간색)은 쥐의 항- Jab1 항체에 의해 면역염색 되었다. (C)는 형질감염된 세포를 배양한 후 rh-BMP2을 처리하고 웨스턴 블랏을 통해 인산화-Smad1/5/8, Smad1/5/8, Jab1, 및 β-actin의 단백질 수준을 분석한 것이다. (D) 및 (E)는 형질감염된 세포를 배양한 후 ST1936을 처리하고 웨스

턴 블랏을 통해 Runx2, Jab1, 및 β-actin의 단백질 수준을 분석한 것이다. (E)는 Runx2의 mRNA 수준을 정량화 하였다.

도 6은 5-HT_6R에 의해 억제된 조골 세포의 분화와 Jab1 단백질의 연관성을 분석한 것이다. (A)는 형질감염된 세포에 ST1936을 처리하여 배양한 후 OCN의 mRNA 수준을 분석한 것이다. (B)는 형질감염된 세포에 ST1936을 처리하여 배양한 후 BSP의 mRNA 수준을 분석한 것이다. (C) 내지 (F)는 형질감염된 세포에 ST1936을 처리하여 배양한 후 그 결과를 분석한 것이다. (C) 및 (D)는 5일간 배양한 것이고, (E) 및 (F)는 14일간 더 배양한 것이다. (C) 내지 (F)는 각각 ALP staining, ALP 활성, Alizarin Red staining 에 의한 광화 결절 형성, 광학 농도를 측정하였다.

도 7은 5-HT_6R에 의해 억제된 조골 세포 분화와 Gs-단백질 신호 전달 간의 연관성을 분석한 것이다. (A)는 두개관 조골 세포를 ST1936로 처리한 후 웨스턴 블랏을 통해 인산화-ERK1/2 및 ERK1/2 단백질을 측정한 것이다. (B)는 세포에 H89 (1 μM) 또는 U0126 (1 μM) 전처리 후, ST1936를 처리하여 웨스턴 블랏을 통해 인산화-ERK1/2 및 ERK1/2 단백질을 측정한 것이다. (C) 내지 (F)는 H89 또는 U0126를 전처리한 세포를 ST1936와 함께 배양한 후 그 결과를 분석한 것이다. (C) 및 (D)는 5일간 배양한 것이고, (E) 및 (F)는 14일간 더 배양한 것이다. (C) 내지 (F)는 각각 ALP staining, ALP 활성, Alizarin Red staining 에 의한 광화 결절 형성, 광학 농도를 측정하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 본 발명의 이점들과 특징들 및 이를 수행하는 방법들은 하기 실시예들에 대한 상세한 설명 및 첨부된 도면들을 참조함으로써 더욱 용이하게 이해될 수 있을 것이다. 그러나, 본 발명은 많은 다양한 형태로 실시될 수 있으며, 여기서 언급한 실시예들로만 한정되어 구성되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명에서 사용된 용어는 별도의 언급이 없다면 하기와 같은 의미를 갖는다. 다르게 표시되지 않는 한, 본 발명의 방법 및 기술들은 일반적으로 업계에 잘 알려져 있는 통상적인 방법에 따라, 그리고 다르게 표시되지 않는 한 본 명세서 전체에 걸쳐 인용 및 논의되는 다양한 일반적이면서도 구체적인 참고문헌들에 기술되어 있는 바와 같이 수행될 수 있다.

[0033] 또한, 여기에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 명세서에서 별도의 언급이 없다면 당업자에게 통상적으로 이해되는 의미를 갖는다.

[0035] 본 발명의 일 측면에 따르면, 세로토닌 6 수용체의 활성을 억제하여 BMP 신호 전달 경로(BMP signaling pathway)를 활성화하는 방법이 제공된다. 구체적으로, 상기 세로토닌 6 수용체의 활성의 억제를 통해 BMP 신호 전달 경로를 활성화하여 골 형성을 촉진할 수 있다.

[0036] 상기 “골 형성”은 뼈가 발생되는 과정을 의미하는 것으로, 조골 세포에 의한 골기질 형성 및 그것의 석회화 현상을 포함할 수 있으며, 상기 "골 형성의 촉진"은 빠른시간 내 골 형성이 일어나도록 하는 것은 물론, 골 형성을 유도하는 것을 포함할 수 있다.

[0037] 상기 “BMP(bone morphogenetic protein)”는 TGFβ 슈퍼패밀리의 구성원으로, 인체에는 대략 15-20개의 BMPs 유전자, 3개의 BMP 수용체, 및 BMP 길항제로서 작용하는 다수의 BMP 결합 단백질이 존재한다(Yamashita et al. 1996). 상기 BMPs는 BMPR-I 및 BMPR-II로 구성된 BMP 수용체 컴플렉스를 통해 신호를 전달할 수 있다. 슈퍼패밀리 구성원 TGFβ 및 TGFβR(Agarwal et al. 1997; Lambert et al. 1997) 및 GDNF 및 GDNFR(Wordinger et al. 1999; Liu et al. 1999) 은 HTM 및 ONH 세포 모두에 의해 발현된다고 보고된 바 있다. 상기 BMP 이합체는 세린/트레오닌 키나제이며, BMP 수용체 1 및 2로 구성된 막 컴플렉스에 결합할 수 있다.

[0038] 상기 BMP 수용체 1 및 2는 상기 BMP 이합체와 결합되어 인산화되고, 조절 Smads(Smad1/Smad5)는 상기 BMP 수용체와 상호 작용하여 인산화되며 공-Smad(Smad 4)와 결합할 수 있다. 상기 결합에 의해 형성된 Smad 컴플렉스는 핵 내로 들어가 전사인자(TF)와 결합하고 유전자 발현을 조절할 수 있다. 상기 BMP-결합 단백질은 BMP에 결합하고 BMP 수용체 및 BMP의 상호작용을 저해하여 BMP 길항제로서 작용할 수 있다.

[0039] 현재까지 세로토닌 6 수용체에 의한 조골 세포 분화 및 골 형성 기작에 대한 이해는 명확하지 않았으나, 본원의 발명자들은 조골 세포에 대한 세로토닌 6 수용체 작용제(agonist) 처리에 의해 BMP 신호의 중심분자인 Smad1/5/8의 인산화가 약화되었으며, BMP 신호 전달의 다운스트림 표적 유전자인 Runx2의 발현이 감소되었음을

확인하였다.

[0040] 따라서, 상기 세로토닌 6 수용체의 활성을 조절하여 BMP 신호 경로를 활성화할 수 있으며, 궁극적으로 상기 세로토닌 6 수용체의 활성을 제어하여 골 형성을 촉진 또는 억제할 수 있다.

[0041] 일 실시예에 따르면, 상기 세로토닌 6 수용체 활성 저해제를 투여하여 골 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0042] 즉, 상기 세로토닌 6 수용체는 골 형성 관련 신호 경로의 상위에 위치하거나 상기 BMP 신호 경로에 영향을 미치므로, 상기 세로토닌 6 수용체의 활성을 조절하여 궁극적으로 골 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0043] 상기 "예방"은 본 발명의 골 형성 촉진용 조성물의 투여에 의해 골 질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 포함하고, 상기 "치료"는 골 질환에 의한 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 포함할 수 있다.

[0044] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 세로토닌 6 수용체 활성 저해제를 유효 성분으로 포함하는 골 형성 촉진용 조성물이 제공된다.

[0045] 일 실시예에 따르면, 상기 세로토닌 6 수용체 활성 저해제는 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 압타머, siRNA, shRNA, microRNA, 저해 화합물 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있다.

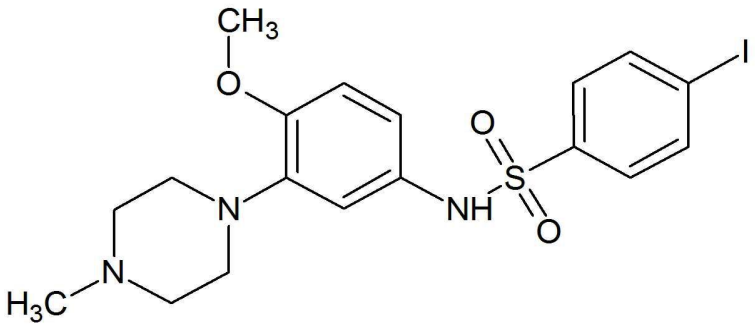
[0046] 상기 “항체”는 단일클론항체 및 이에 대한 카이메릭 항체, 인간화 항체 및 인간 항체를 모두 포함하는 것이고, 신규한 항체 외에 이미 당해 기술분야에서 공지된 항체들도 포함될 수 있다. 상기 항체는 세로토닌 6 수용체를 특이적으로 인식하는 결합의 특성을 갖는 한, 2개의 중쇄와 2개의 경쇄의 전체 길이를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체의 분자의 기능적인 단편이란, 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')2 및 Fv 등이 있다.

[0047] 상기 “siRNA”는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 표적 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 넉다운 방법 또는 유전자 치료 방법으로 제공될 수 있다. 상기 siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 더욱 바람직하게는 20 내지 70염기이다. siRNA 말단 구조는 표적 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의해 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 또는 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3' 말단 돌출한 구조와 5' 말단 쪽이 돌출한 구조 모두 가능하다. 돌출하는 염기 수는 한정되지 않는다. 또한 siRNA는 표적 유전자의 발현 억제 효과를 유지할 수 있는 범위에서 한쪽 말단의 돌출 부분에 저분자 RNA(예컨대, tRNA, rRNA, 바이러스 RNA와 같은 천연의 RNA 분자 또는 인공의 RNA 분자)를 포함할 수 있다. siRNA 말단 구조는 양측 모두 절단 구조를 가질 필요는 없고, 이중 사슬 RNA 일반의 말단 부위가 링커 RNA에 의하여 접속된 스템 루프형 구조일 수도 있다. 본 발명에 따른 siRNA는 그 자체로 폴리뉴클레오타이드 페어링을 갖는 완전한 형태, 즉 시험관 내에서 siRNA를 직접 합성한 두 형질전환 과정을 거쳐 세포 안으로 도입되는 형태이거나, 생체 내에 투여된 후 이러한 형태 를 갖도록 하나의 단일쇄 올리고뉴클레오타이드 단편과 이의 역방향(reverse) 상보물이 스페이서에 의해 분리된 단일쇄 폴리뉴클레오타이드로부터 유도될 수 있는 형태, 예를 들면 siRNA가 세포 안에서 발현되도록 제조된 siRNA 발현 벡터 또는 PCR-유도된 siRNA 발현 카세트를 형질전환 또는 감염(infection) 과정을 거쳐 세포 안으로 도입되는 형태일 수 있다. siRNA를 제조하고 세포 또는 동물로 도입하는 방법의 결정은 목적 및 표적 유전자 산물의 세포 생물학적 기능에 따라 상이해질 수 있다.

[0048] 상기 “shRNA”는 siRNA의 고가의 생합성 비용, 낮은 세포 형질감염 효율로 인한 RNA 간섭 효과의 단시간 유지 등의 단점을 극복하기 위한 것으로 RNA 중합효소 Ⅲ의 프로모터로부터 아데노 바이러스, 렌티 바이러스 및 플라스미드 발현 벡터 시스템을 이용하여 이를 세포 내로 도입하여 발현시킬 수 있으며, 이러한 shRNA는 세포 내에 존재하는 siRNA 프로세싱 효소(Dicer or Rnase Ⅲ)에 의해 정확한 구조를 갖는 siRNA로 전환되어 목적 유전자의 사일런싱을 유도함이 널리 알려져 있다.

[0049] 일 실시예에 따르면, 상기 저해 화합물은 하기 화학식 1의 화합물일 수 있다.

[0050] [화학식 1]

[0051] 

[0052] 상기 화학식 1의 화합물은 세로토닌 6 수용체의 길항제(antagonist)로서, 4-아이오도-N-[4-메톡시-3-(4-메틸피페라진-1-일)페닐]벤젠술폰아미드(4-iodo-N-[4-methoxy-3-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl]benzenesulfonamide) 로 명명될 수 있다. 상기 화학식 1의 화합물은 통상적으로 "SB258585"으로 지칭되며, 동물 실험에서 항치매, 항우울, 항불안 효과가 검증된 바 있다.

[0053] 일 실시예에 따르면, 상기 골 형성 촉진용 조성물은 골 질환 예방 또는 치료용일 수 있다. 상기 골 질환은 대사성 골 질환 또는 정형외과적 골 질환일 수 있다.

[0054] 상기 "대사성 골 질환"은 파골 세포의 과다한 생성 또는 활성으로 인해 나타나는 상태 또는 질병을 의미하는 것으로, 골량 저하 질환을 포함할 수 있다. 상기 골량 저하 질환이란 골밀도의 저하, 골조직의 연화 등의 증상을 수반하는 골량의 저하가 나타나는 상태 또는 질환을 의미한다.

[0055] 상기 골 질환은 골다공증, 골 형성 부전증, 골연화증, 골량 감소증, 골절, 골 결손 및 고관절 감소증으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0056] 일 실시예에 따르면, 상기 조성물은 치주질환 예방 및 치료용으로 사용될 수 있다.

[0057] 상기 Runx2 유전자의 활성은 골 형성의 촉진뿐만 아니라, 치주질환과도 밀접한 관련이 있다고 알려진바 있으며, Runx2 유전자가 치조골의 리모델링을 조절하고 치주인대 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 보고된 바 있다(Camilleri, S. et al., Eur J Oral Sci. 114(5):361-373, 2006). 따라서, 상기 세로토닌 6 수용체의 활성을 조절하여 Runx2를 활성화함으로써 골 질환 치료뿐만 아니라, 치주 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0058] 상기 "치주질환"은 치조골 또는 상기 치조골을 치은에 지지 및 결합시키는 치조골 주변조직에 영향을 미치는 질환을 포괄적으로 의미하며, 더욱 구체적으로, 상기 치조골 또는 치조골 주변조직에 감염된 치주균에 의하여 분비되는 병독성 대사산물에 의하여 치아의 구조와 치은의 세포조직이 손상되고, 치은조직의 면역력을 약화시키는 병변이 발생되며, 치주균이 증식하여 병변 부위가 반복적으로 확장되는 질환을 의미할 수 있다.

[0059] 상기 치주질환은 상기 병변부위의 영역에 따라 치은염(gingivitis)과 치주염(periodontitis)으로 구분될 수 있으며, 예컨대, 상기 치은염은 상기 병변부위가 연조직에 발생하는 증상을 나타내는 질환을 의미하고, 치주염은 상기 병변부위가 잇몸과 잇몸뼈 주변까지 확장된 부위에서 나타나는 질환을 의미할 수 있다.

[0060] 일 실시예에 따르면, 상기 골 형성 촉진용 조성물은 경구적 전달, 비경구적 전달의 형태로 투여될 수 있다. 상기 골 형성 촉진용 조성물은 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 예컨대, 경구 투여, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여, 강내 투여, 복강 내 투여, 경막 내 투여가 이루어질 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0061] 상기 골 형성 촉진용 조성물의 유효 투여량은 성별, 체표면적, 질환의 종류 및 중증도, 연령, 약물에 대한 민감도, 투여경로 및 배출비율, 투여시간, 치료기간, 표적세포, 발현 수준 등 기타 의학 분야에 잘 알려진 다양한 요인에 따라 달라질 수 있으며, 당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0062] 상기 골 형성 촉진용 조성물은 적절한 투여 형태를 제공하도록 적합한 양의 약학적으로 허용되는 비히클 또는 담체와 함께 제형화될 수 있으며, 약학 조성물의 제조에 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0063] 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 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 광물유를 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0064] 또한, 상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화 하여 사용할 수 있다.

[0065] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 적소두 추출물과 이의 분획물들에 적어도 하나 이상의 부형제, 예컨대, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스, 락토오스, 또는 젤라틴 등을 혼합하여 조제할 수 있다. 또한, 상기 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제가 사용될 수 있다.

[0066] 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 사용될 수 있으며, 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0067] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 사용될 수 있다. 상기 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르가 사용될 수 있다. 상기 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴이 사용될 수 있다.

[0068] 본 발명의 다른 측면에 따르면, (a) 세로토닌 6 수용체를 발현하는 세포 및 시험 제제를 접촉시키는 단계; (b) 상기 시험 제제의 세로토닌 6 수용체에 대한 억제 효과를 결정하는 단계; 및 (c) 상기 시험물질과 접촉되지 않은 대조군과 시험물질과 접촉된 세포에서 세로토닌 6 수용체의 활성 억제 정도를 비교하는 단계를 포함하는 골질환 예방 또는 치료제 스크리닝 방법이 제공된다.

[0069] 일 실시예에 따르면, 상기 시험 제제는 폴리펩티드, 소 유기 물질(Small organic molecule), 다당류(Polysaccharide), 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있다.

[0070] 상기 “접촉”은 통상적인 의미로서, 2개 이상의 제제(예: 2개의 폴리펩티드)를 결합(combine)시키거나, 제제와 세포(예; 단백질과 세포)를 결합시키는 것을 의미할 수 있다. 예컨대, 시험관(test tube) 또는 다른 컨테이너(container)에서 2개 이상의 제제를 결합시키거나 시험 제제와 세포 또는 세포 용해물과 시험 제제를 결합시킬 수 있으며, 2개의 폴리펩티드를 암호화하는 재조합 폴리뉴클레오티드를 세포 내에서 공동발현(coexpresion)시킴으로써 세포 또는 세포 용해물에서 2개의 폴리펩티드를 접촉시킬 수 있다.

[0071] 상기 "제제(agent)" 또는 "시험 제제(test agent)"는 임의의 물질(substance), 분자(molecule), 원소(element), 화합물(compound), 실재물(entity) 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 예컨대, 단백질, 폴리펩티드, 소 유기 물질(small organic molecule), 다당류(polysaccharide), 폴리뉴클레오티드 등을 포함할 수 있으며, 자연 산물(natural product), 합성 화합물 또는 화학 화합물 또는 2개 이상의 물질의 조합일 수 있다. 달리 정의되지 않는 한, 상기 제제, 물질 및 화합물은 호환성 있게(interchangeably) 사용할 수 있다.

[0072] 상기 스크리닝 방법은 당업계에 공지된 다양한 생화학적 및 분자생물학적 기술을 이용할 수 있으며 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y., Second(1998) and Third(2000) Editions; and Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York(1987-1999)], 예컨대, 시험관 내 단백질-단백질 결합 어세이(시험관 내 풀-다운 어세이), EMSA, 단백질 결합을 위한 면역어세이, 기능적 어세이(인산화 어세이 등), 효모-2 하이브리드 어세이, 비면역침전 어세이, 면역침전 웨스턴 블랏 어세이, 면역-공동-위치화 어세이 등 당업계에 공지된 다양한 방법으로 수행될 수 있다.

[0073] 상기 스크리닝에 사용되는 화합물은 치료효과를 보유한 저분자량의 화합물일 수 있다. 예컨대, 상기 저분자량의 화합물은 중량이 400 Da, 600 Da 또는 800 Da과 같이 약 1000 Da 내외일 수 있다. 목적에 따라 상기 화합물은 화합물 라이브러리의 일부를 구성할 수 있으며, 라이브러리를 구성하는 화합물의 개수도 수십개부터 수백만개까지 상이할 수 있다. 상기 화합물 라이브러리는 펩타이드, 펩토이드 및 기타 환형 또는 선형의 올리고머성 화합물, 및 주형을 기본으로 하는 저분자 화합물, 예컨대 벤조디아제핀, 하이단토인, 바이아릴, 카보 사이클 및 폴리사이클 화합물(예컨대 나프탈렌, 페노티아진, 아크리딘, 스테로이드 등), 카보하이드레이트 및 아미노산 유도체, 디하이드로피리딘, 벤즈하이드릴 및 헤테로사이클(예컨대 트리아진, 인돌, 티아졸리딘 등)을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0074] 또한, 상기 스크리닝 방법에는 바이올로직스가 사용될 수 있다. 상기 바이올로직스는 세포 또는 바이오 분자를

일컫는 것으로, 단백질, 핵산, 탄수화물, 지질 또는 생체내 및 생체외에서 세포 시스템 등을 이용하여 생산된 물질을 의미한다. 상기 바이오분자는 단독으로 또는 다른 바이오분자 또는 세포와 조합되어 사용될 수 있다. 상기 바이오분자는 예컨대, 폴리뉴클레오타이드, 펩타이드, 항체, 또는 기타 혈장에서 발견되는 단백질 또는 생물학적 유기물질을 포함할 수 있다.

[0075] 상기 스크리닝 방법에 사용되는 세포의 종류 및 농도와 시험물질의 양 및 종류 등은 사용하는 구체적인 실험 방법 및 시험 제제의 종류에 따라 상이해질 수 있으며, 당업자라면 적절한 양을 선택할 수 있을 것이다. 실험결과 시험 제제와 접촉되지 않은 대조군과 비교하여 시험물질의 존재하에서 세로토닌 6 수용체 활성을 증가 또는 억제시키는 물질을 후보 물질로 선별할 수 있다. 상기 대조군과 비교하여 약 99% 이하 감소, 약 95% 이하 감소, 약 90% 감소, 약 85% 감소, 약 80%감소, 약 75% 감소, 약 70% 감소, 약 65% 이하 감소, 약 60% 이하 감소, 약 55% 감소, 약 50% 이하 감소, 45% 이하 감소를 의미하나, 이를 벗어나는 범위를 제외하는 것은 아니다.

[0076] 일 실시예에 따르면, 1차적으로 상기 시험 제제가 세로토닌 6 수용체의 생물학적 활성을 조절하는 능력이 있는지 어세이할 수 있다. 구체적으로, 상기 1차 어세이는 시험 제제의 존재 하에서 분리된 세로토닌 6 수용체의 생물학적 활성을 분석하여 상기 폴리펩티드의 생물학적 활성을 조절하는 조절 제제(modulating agent)를 규명할 수 있다.

[0077] 상기 1차 어세이는 세로토닌 6 수용체의 여러 생물학적 활성에 대한 조절이 어세이될 수 있다. 예컨대, 시험 제제는 세로토닌 6 수용체의 발현 수준, 예컨대, 전사 또는 번역을 조절하는 활성이 있는지 어세이될 수 있다. 또한 상기 시험 제제는 세로토닌 6 수용체의 세포 내 수준 또는 안정성, 예컨대 번역 후 수식(post-translational modification) 또는 가수분해를 조절하는 활성이 있는지 어세이될 수 있다.

[0078] 상기 1차 어세이를 통해 세로토닌 6 수용체의 생물학적 활성과 관련된 조절 제제를 규명한 후, 상기 시험 제제가 BMP(bone morphogenetic protein)과 상호 작용하는지 세로토닌 6 수용체의 존재 하에서 2차적으로 시험할 수 있다 예컨대, 상기 시험 제제는 세로토닌 6 수용체 매개 질환의 예방 또는 치료 활성이 있는지 더욱 시험될 수 있다.

[0079] 상기 1차 및 2차 어세이는 변하지 않은(intact) 세로토닌 6 수용체 및 이의 단편, 아날로그, 또는 기능적 동등물을 사용할 수 있다. 이들 어세이에 사용될 수 있는 단편은 일반적으로 세로토닌 6 수용체의 생물학적 활성을 하나 이상 보유할 수 있다. 또한, 상기 단편 또는 아날로그를 포함하는 융합 단백질이 시험 제제를 위한 스크리닝에 사용될 수 있다. 상기 세로토닌 6 수용체의 기능적 동등물은 아미노산 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함하나 세로토닌 6 수용체와 동일한 생체활성을 보유하는 것이므로 본 발명의 스크리닝 방법을 실시하는데 사용될 수 있다.

[0080] 당업계에 통상적으로 실시되고 있는 다양한 어세이들이 세로토닌 6 수용체를 조절하는 제제를 확인하는데 사용될 수 있다. 바람직하게, 상기 제제는 세포 기반 어세이 시스템(cell based assay system)으로 스크리닝될 수 있다. 예컨대, 스크리닝하기 위한 전형적인 세포 기반 어세이에서(즉, 2차 어세이), 시험 제제의 존재 하에서 리포터 유전자 활성(예: 효소 활성)을 측정하고, 이를 시험 제제의 부재 하에서의 리포터 유전자의 활성과 비교할 수 있다.

[0081] 상기 리포터 유전자는 당업계에 공지된 임의의 검출 가능한 폴리펩티드(반응 또는 리포터 폴리펩티드), 예컨대, 형광 또는 인광(phosphorescence)에 의해 검출가능한 폴리펩티드나 그것이 보유하고 있는 효소 활성에 의해 검출 가능한 폴리펩티드를 암호화할 수 있다. 검출 가능한 반응 폴리펩티드(detectable reponse polypeptide)는, 예컨대, 루시퍼라제, 알파-글루쿠로니다제(glucuronidase), 알파-갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸 전이효소, 녹색 형광 단백질, 강화된 녹색 형광 단백질 및 인간 분비된 알칼린 인산화 효소일 수 있다.

[0082] 상기 세포 기반 어세이에서, 시험 제제(예: 펩티드 또는 폴리펩티드)는 숙주세포 내에 존재하는 다른 벡터에 의해 발현될 수 있다. 어떤 방법에서는, 시험 제제의 라이브러리가 상기 벡터의 라이브러리(예: cDNA 라이브러리)에 의해 암호화될 수 있다. 상기 라이브러리는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제조할 수 있으며(Sambrook et al. and Ausubel et al., supra), 또는 다양한 상업적인 출처로부터 얻어질 수 있다.

[0083] 상기 세포-기반 어세이 이외에, 비-세포 기반 방법에 의해서도 스크리닝될 수 있다. 상기 방법은, 예컨대, 모빌리티 쉬프트 DNA 결합 어세이(mobility shift DNA-binding assays), 메틸화 및 우라실 간섭 어세이(methylation and uracil interference assays), DNase 및 히드록시 라디칼 풋프린팅 분석(DNase and hydroxyl radical footprinting analysis), 형광 편광(fluorescence polarization) 및 UV 교차결합(crosslinking) 또는 화학적 가교제(cross-linkers)를 포함할 수 있다. 일반적인 개요는 Ausubel 등의 문헌에 개시되어 있다(Ausubel

et al., supra, chapter 12, DNA-Protein Interaction). 핵산 및 DNA/RNA 결합 단백질을 포함하는 공동-결합된 단백질(co-associating protein)을 분리하는 기술은 절단가능한 가교제 디티오비스(dithiobis)(succinimidylpropionate) 및 3,3'-디티오비스(sulfosuccinimidyl-propionate)를 포함하는 UV 교차결합 또는 화학적 가교제를 포함할 수 있다(McLaughlin, Am. J. Hum. Genet., 59:561-569, 1996; Tang, Biochemistry, 35:8216-8225, 1996; Lingner, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 93:10712, 1996; and Chodosh, Mol. Cell. Biol., 6:4723-4733, 1986).

[0084] 이하에서는 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 실시예는 발명의 이해를 쉽게하기 위해 제공되는 것 일뿐 발명의 보호범위가 하기의 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0086] 실험예 1: 5-HTR 유전자의 발현 측정

[0087] 7종의 세로토닌 리셉터(5-HT_1R 내지 5-HT_7R) 단백질이 뇌와 골 조직에서 발현되는지 확인하고자 실시간 PCR(real-time PCR) 분석을 통해, 태어난 지 2 내지 3주된 생쥐를 분석하였다(도 1A).

[0088] 상기 7종의 세로토닌 리셉터는 뇌와 골 조직에서 발현되었다. 5-HT_4R을 제외한 대부분의 5-HTR은 뇌 세포와 비교하여 뼈에서 더욱 높게 발현되었다. 특히, 5-HT_6R은 7종의 5-HTR 중 가장 높은 수준으로 발현되었다. 상기 결과는 5-HT_6R이 골 대사를 매개하는 가장 유력한 요인임을 시사한다.

[0089] 따라서, *In vitro*에서 조골 세포의 분화 및 기능이 5-HT_6R의 활성화에 의해 손상되는지 분석하였으며, 본 발명자들은 정상정인 생쥐의 두개골(mOBs)에서 5-HT_6R의 발현 수준을 분석하였다. 상기 5-HT_6R의 두개골 분화에 따른 mRNA 수준은 골 형성 유도 3일 경과 후 현저하게 증가하였으며, 그 후 감소하였다(도 1B, 1C).

[0090] 상기 조골 세포로의 분화 여부를 확인하기 위하여 초기 조골 세포의 마커는 알칼리 포스파타아제(ALP)를 사용하였으며, 말기 조골 세포의 마커는 오스테오칼신(OCN)을 사용하였다.

[0091] 조골 세포의 분화에 있어서 5-HT_6R의 역할을 검증하기 위해 상기 5-HT_6R에 특이적인 작용제(2-methyl-5-chloro-*N*,*N*-dimethyltryptamine, ST1936)가 5-HT_6R의 활성에 어떠한 영향을 미치는지 분석하였다. 상기 5-HT_6R의 활성은 초기 ALP 활성 및 광화 골 결절(bone nodule)의 형성 여부에 따라 결정되었다(도 1D-1G).

[0092] Alizarin red staining에 의해 측정된 ALP 활성, ALP staining, 및 광화(mineralization) 정도는 ST1936의 처리에 따라 농도에 비례하여 감소하였으며, 이는 5-HT_6R이 조골 세포의 골 형성에 필수적임을 시사한다.

[0094] 실험예 2: 5-HT_6R 활성화에 의한 골 형성 및 미발달 뼈의 발생 저해

[0095] 생쥐를 대상으로 5-HT_6R이 현저한 두개안면골 결손의 회복에 영향을 미치는지 분석하였다.

[0096] 중대한 크기의 두개안면골 결손 이후, 5-HT_6R의 발현 수준은 초기 1일에 현저하게 증가하였으며, 3주차에 회복되었다(도 2A).

[0097] 상기 ST1936(10 mg/kg)을 적신 생흡수성 콜라겐 스펀지를 6주간 결손 부위에 위치시켰다(도 2B).

[0098] μCT(Micro-computed tomography)에 의해 시각화된 신생골 형성 정도는 상기 ST1936의 처리에 의해 현저히 감소하였다(도 2C).

[0099] ST1936를 처리한 군에서 신생골 형성량은 대조군과 비교하여 현저하게 낮은 수준으로 확인되었다(P <0.05) (도 2D).

[0100] 또한, 조직학적 평가는 대조군의 결손 부위에서 신생골이 관찰된 것과 달리, ST1936를 처리한 군에서 골이 형성되지 않은 상기 실험을 더욱 뒷받침한다(도 2E).

[0101] 미발달 뼈의 발생에 있어서 5-HT_6R의 기능적 역할을 더욱 규명하기 위해, 배아기 동안 ST1936, 또는 ST1936 및 SB258585(4-iodo-N-[4-methoxy-3-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl]benzenesulfonamide)을 함께 처리하였으며,

생쥐에서 골의 표현형을 분석하였다(도 3A).

[0102] ST1936 및 SB258585을 함께 처리한 생쥐는 ST1936을 처리한 군과 비교하여 몸무게가 현저히 회복되었다(도 3B, 3C).

[0103] 알시안 블루(Alcian Blue) 및 알리자린 레드(Alizarin Red)를 통해 생쥐의 뼈대를 연속적으로 염색하고 관찰한 결과, ST1936를 처리한 두개골(전두골, 두정골 두정간골)에서 광화 조직 대비 연골 조직의 비율이 현저히 증가된 것으로 분석되었다. 조골 세포 분화 및 신생골 형성의 중심부인 두개봉합(cranial sutures)에서 뼈의 기형이 주로 관찰되었다 또한, ST1936에 의해 유도된 두개골의 기형은 ST1936 및 SB258585을 함께 처리한 생쥐에서 상반된 결과를 나타냈다(도 3D).

[0104] 두개관에서 추출된 총 RNA를 이용한 실시간 PCR 분석 결과, ST1936을 처리한 생쥐의 Runx2(runt-related transcription factor 2), OCN(osteocalcin), BSP(bone sialoprotein) mRNA의 발현은 대조군과 비교하여 현저히 낮은 수준이었다(도 3E-3G).

[0105] 반면, 5-HT_6R 길항제는 ST1936과는 상반된 결과를 야기하였다.

[0106] 즉, 상기 결과는 5-HT_6R가 정상적인 미발달 뼈의 발생과 골 형성을 유지하는데 필수적임을 시사하며, 상기 5-HT_6R를 억제시켜 골 형성을 촉진할 수 있다.

[0108] 실험예 3: 5-HT_6R에 의한 조골 세포 분화의 저해

[0109] 5-HT_6R 및 조골 세포 분화의 상호 연관성에 대한 기작을 이해하고자, 두개골의 1차 조골 세포에서 5-HT_6R 작용제(ST1936)가 BMP(bone morphogenetic protein) 신호전달에 미치는 영향을 분석하였다. ST1936는 조골 세포가 분화하는 동안 Smad1/5/8 단백질뿐만 아니라 Runx2의 인산화를 현저히 억제하였다(도 4A, 4B).

[0110] 또한, BMP 신호 전달 경로가 ST1936에 의해 매개된 조골 세포의 분화와 관련되었는지 확인하고자, 정제된 재조합 인간 BMP-2(rh-BMP-2)의 영향을 분석하였다.

[0111] 상기 정제된 rh-BMP-2의 처리에 의해 ST1936에 의해 현저히 감소한 ALP 활성(도 4D), ALP staining(도 4C), Alizarin Red staining(도 4E, 4F)에 의한 광화가 증가되었다.

[0112] 즉, 상기 BMP 신호 전달 경로는 5-HT_6R가 조골 세포의 분화에 미치는 영향과 관련이 있는 것으로 분석할 수 있다.

[0114] 실험예 4: 5-HT6R에 의한 BMP 신호 억제

[0115] 1차 조골 세포에서 Jab1이 물리적으로 Smad1/5/8와 상호작용하는지 확인하고자, 공면역침전법(co-Immunoprecipitation)을 수행하였다. 내인성 Jab1 단백질과 Smad1/5/8 단백질은 비활성 상태에서 상호 작용하였으며, ST1936 자극에 의해 증가하였다(도 5A).

[0116] 또한, 면역형광법(immunofluorescence)을 수행한 결과, 핵 내에서 Jab1 단백질 및 Smad1/5/8 단백질이 colocalization 하였으며, ST1936의 처리 이후 Smad1/5/8의 세포질 전위가 증가하였다(도 5B). 이는 5-HT_6R가 조골 세포에서 Jab1 및 Smad1/5/8 사이의 상호 작용을 제어한다는 것을 의미한다.

[0117] Smad1/5/8-Runx2 신호 전달 및 조골 세포 분화에 있어서 Jab1 단백질의 역할을 규명하기 위해, siRNA를 이용하여 내인성 Jab1을 넉다운(knockdown) 시키고 그 결과를 분석하였다. Jab1 siRNA은 rh-BMP-2에 의해 유도된 Smad1/5/8의 인산화를 시간에 비례하여 현저히 증가시켰다(도 5C).

[0118] 웨스턴 블랏(Western blot) 및 실시간 PCR 분석 결과, Jab1의 넉다운은 ST1936이 Runx2 단백질 및 mRNA의 발현을 억제한 것과 상반된 결과를 야기하였다(도 5D, 5E).

[0119] Jab1 siRNA는 ST1936에 의해 억제된 ALP 활성, 조골 세포의 마커 유전자 발현(예컨대, OCN 및 BSP mRNA), 및 ALP staining 또는 Alizarin Red staining에 의한 광화 결절 형성(mineralized nodule formation)을 회복시켰다(도 6A-6F).

[0120] 즉, 상기 결과는 Jab1 단백질이 5-HT_6R에 의해 억제된 조골 세포의 분화에 있어서 중요한 매개체임을 시사한다.

[0122] 실험예 5: $5HT_6$R 및 Gas 단백질의 연관성 분석

[0123] $5HT_6$R는 GTP가 결합된 Gs 단백질의 방출을 통해 cAMP을 증가시켰으며, PKA(cAMP-dependent protein kinase), Ras-Raf-MEK-ERK(extracellular signal-regulated protein kinase) 신호 전달 경로를 활성화시켰으므로, Gs와 연관된 5-HT_6R 신호가 조골 세포의 분화를 매개하는지 분석하였다.

[0124] 조골 세포에 대한 ST1936의 처리는 ERK의 인산화를 야기하였다(도 7A).

[0125] 또한, PKA 저해제(H89) 및 ERK 저해제(U0126)의 전처리는 ST1936에 의한 ERK 활성화와 상반된 결과를 야기하였다(도 7B).

[0126] 그러나, PKA 저해제(H89) 및 ERK 저해제(U0126)의 전처리는 ST1936에 의해 증가된 ALP 활성, 및 ALP staining 또는 ALP staining에 의한 광화 정도에 현저한 영향을 미치지 않았다(도 7C-7F).

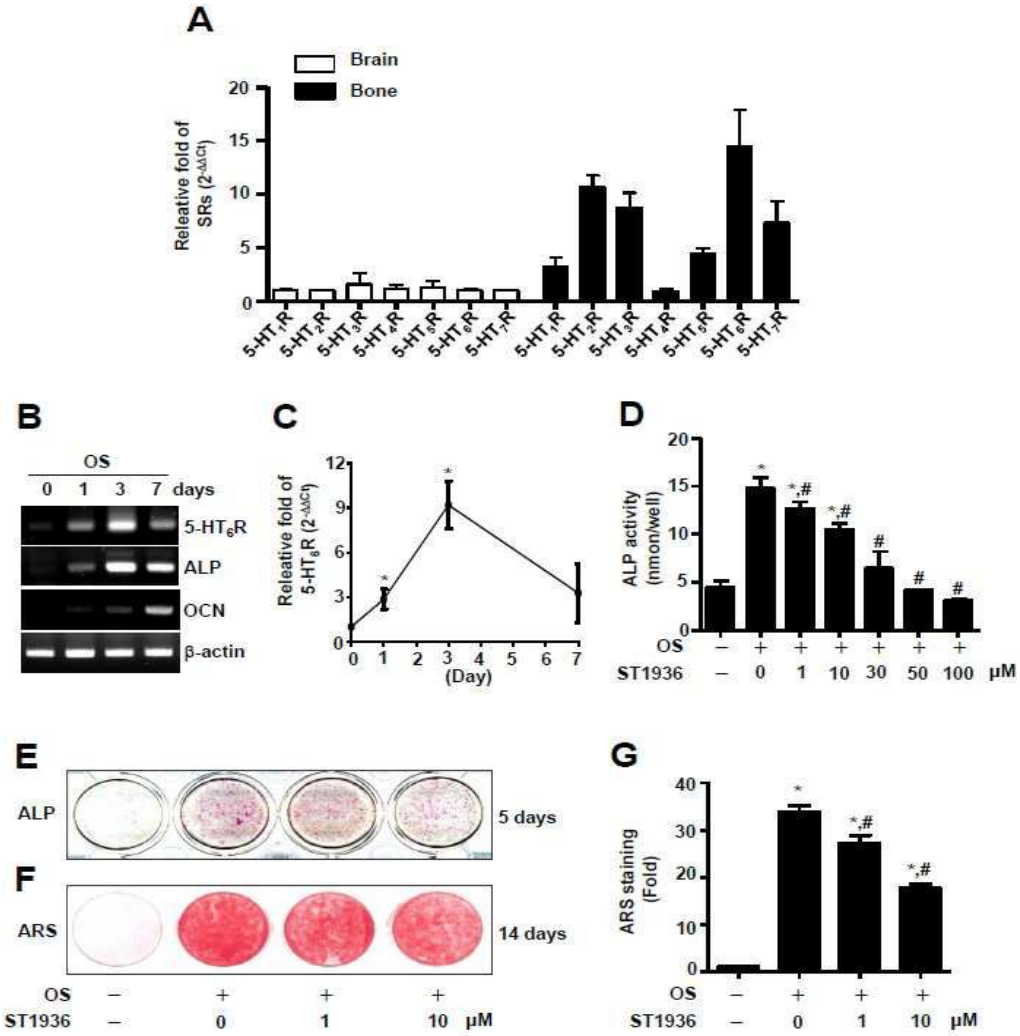
[0127] 상기 결과는 Gs와 연관된 5-HT_6R 신호는 조골 세포의 분화와 관련이 없음을 시사한다.

[0129] 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. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

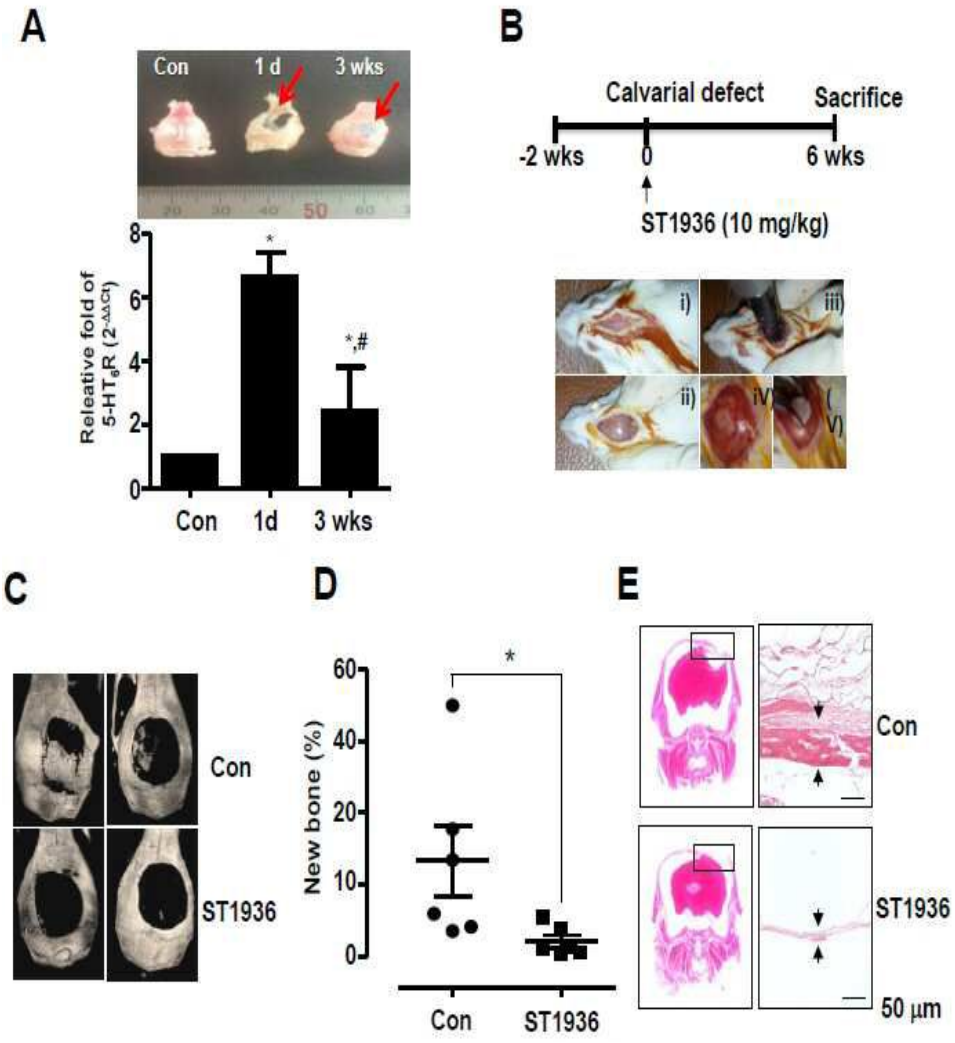
[0130] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

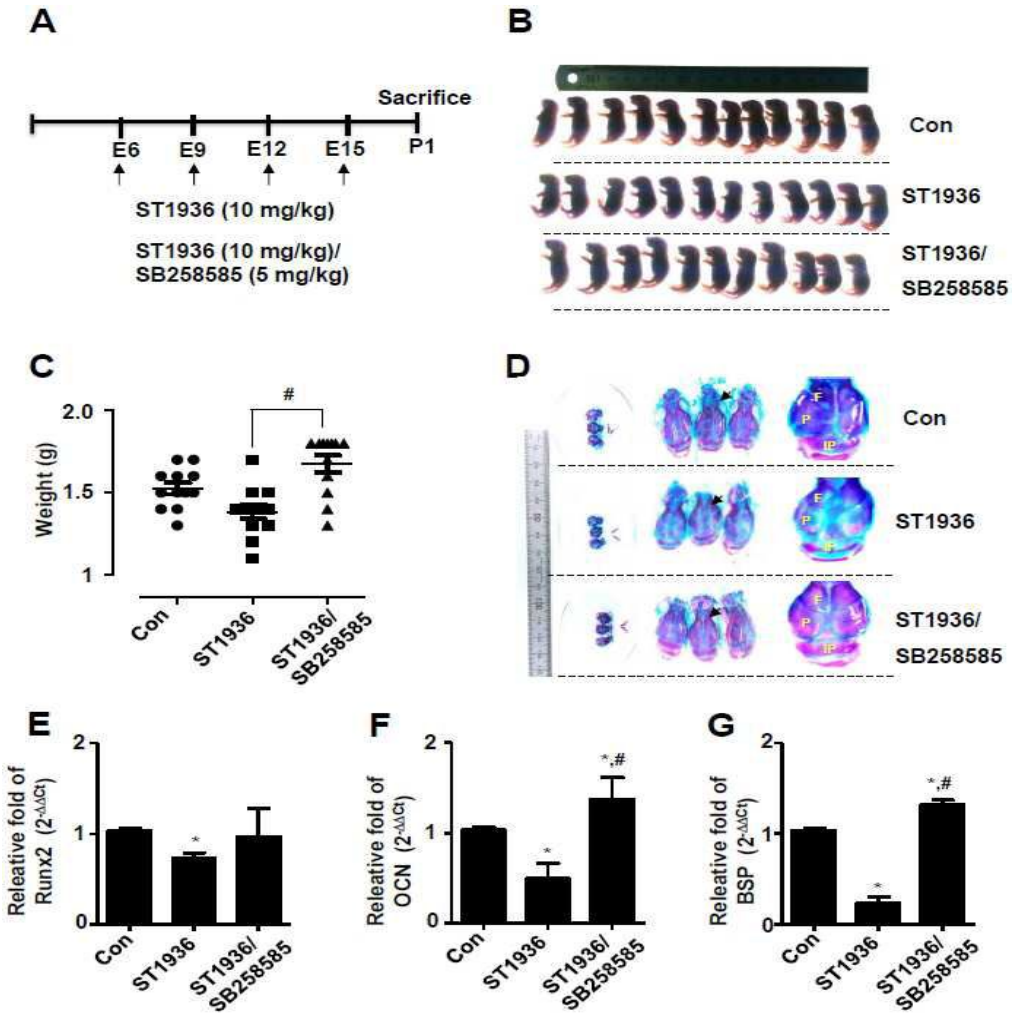
도면1


A
Brain
Bone
Releative fold of SRs ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
20
15
10
5
0
5-HT1R
5-HT2R
5-HT3R
5-HT4R
5-HT5R
5-HT6R
5-HT7R
B
OS
0 1 3 7 days
5-HT6R
ALP
OCN
β-actin
C
Releative fold of 5-HT6R ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
12
9
6
3
0
0 1 2 3 4 5 6 7
(Day)
D
ALP activity (nmon/well)
20
15
10
5
0
OS – + + + + + +
ST1936 – 0 1 10 30 50 100 μM
E
ALP
5 days
F
ARS
14 days
OS – + + +
ST1936 – 0 1 10 μM
G
ARS staining (Fold)
40
30
20
10
0
OS – + + +
ST1936 – 0 1 10 μM

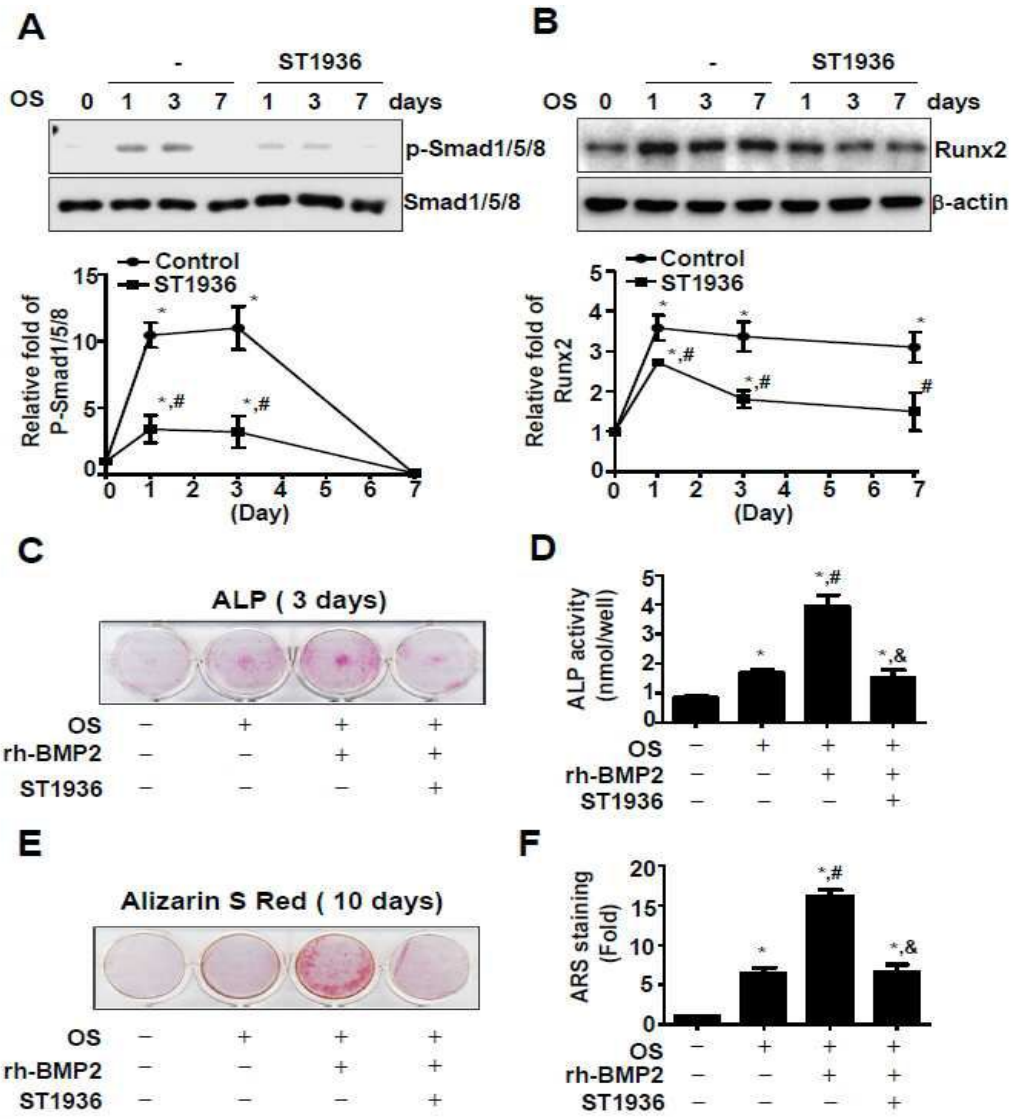
도면2


A
Con
1 d
3 wks
Releative fold of 5-HT6R (2-ΔΔCt)
*
*,#
Con
1d
3 wks
B
Calvarial defect
Sacrifice
-2 wks
0
6 wks
ST1936 (10 mg/kg)
i)
iii)
ii)
iV)
V)
C
Con
ST1936
D
New bone (%)
*
Con
ST1936
E
Con
ST1936
50 μm

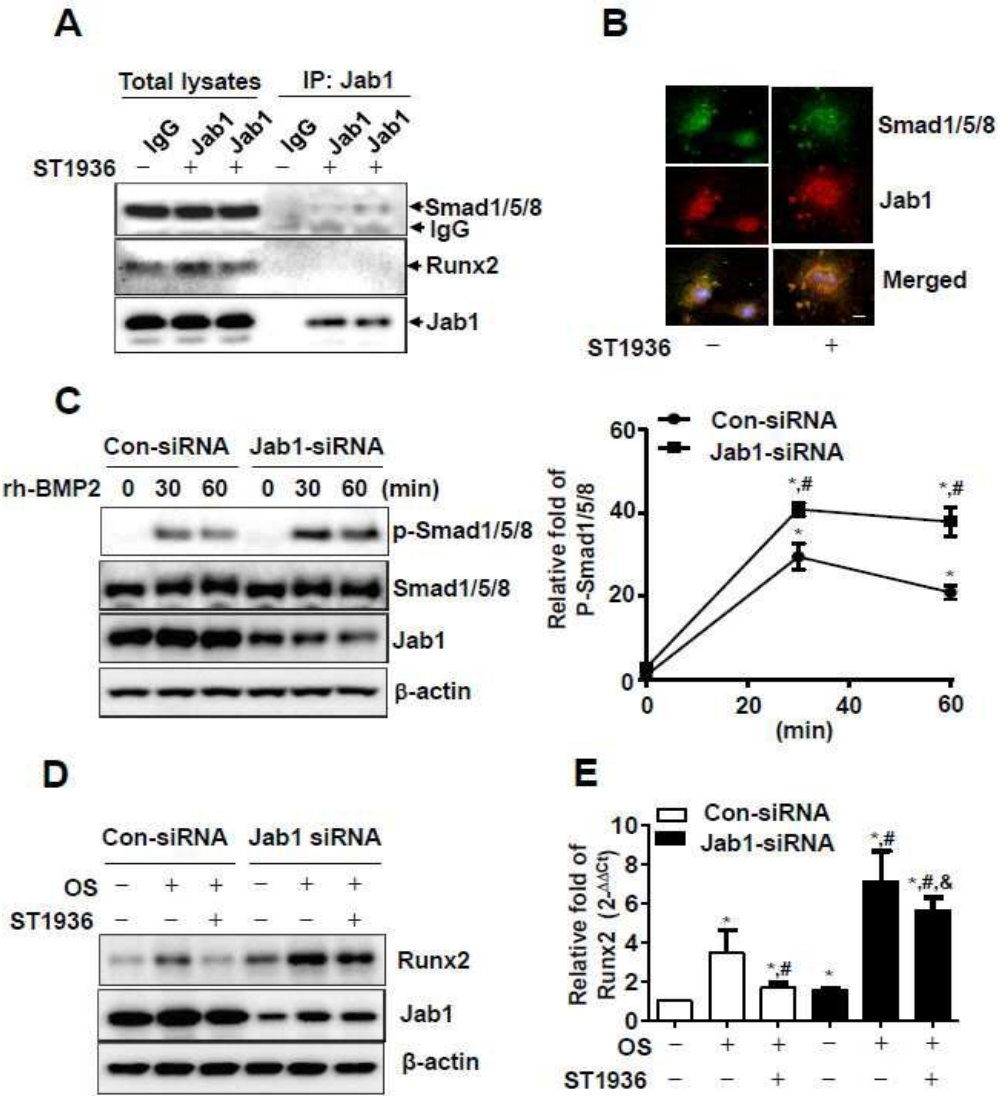
도면3


A
Sacrifice
E6
E9
E12
E15
P1
ST1936 (10 mg/kg)
ST1936 (10 mg/kg)/
SB258585 (5 mg/kg)
B
Con
ST1936
ST1936/
SB258585
C
Weight (g)
2.0
1.5
1
#
Con
ST1936
ST1936/
SB258585
D
Con
ST1936
ST1936/
SB258585
E
Releative fold of
Runx2 (2-ΔΔCt)
2
1
0
*
Con
ST1936
ST1936/
SB258585
F
Releative fold of
OCN (2-ΔΔCt)
2
1
0
*
*,#
Con
ST1936
ST1936/
SB258585
G
Releative fold of
BSP (2-ΔΔCt)
2
1
0
*
*,#
Con
ST1936
ST1936/
SB258585

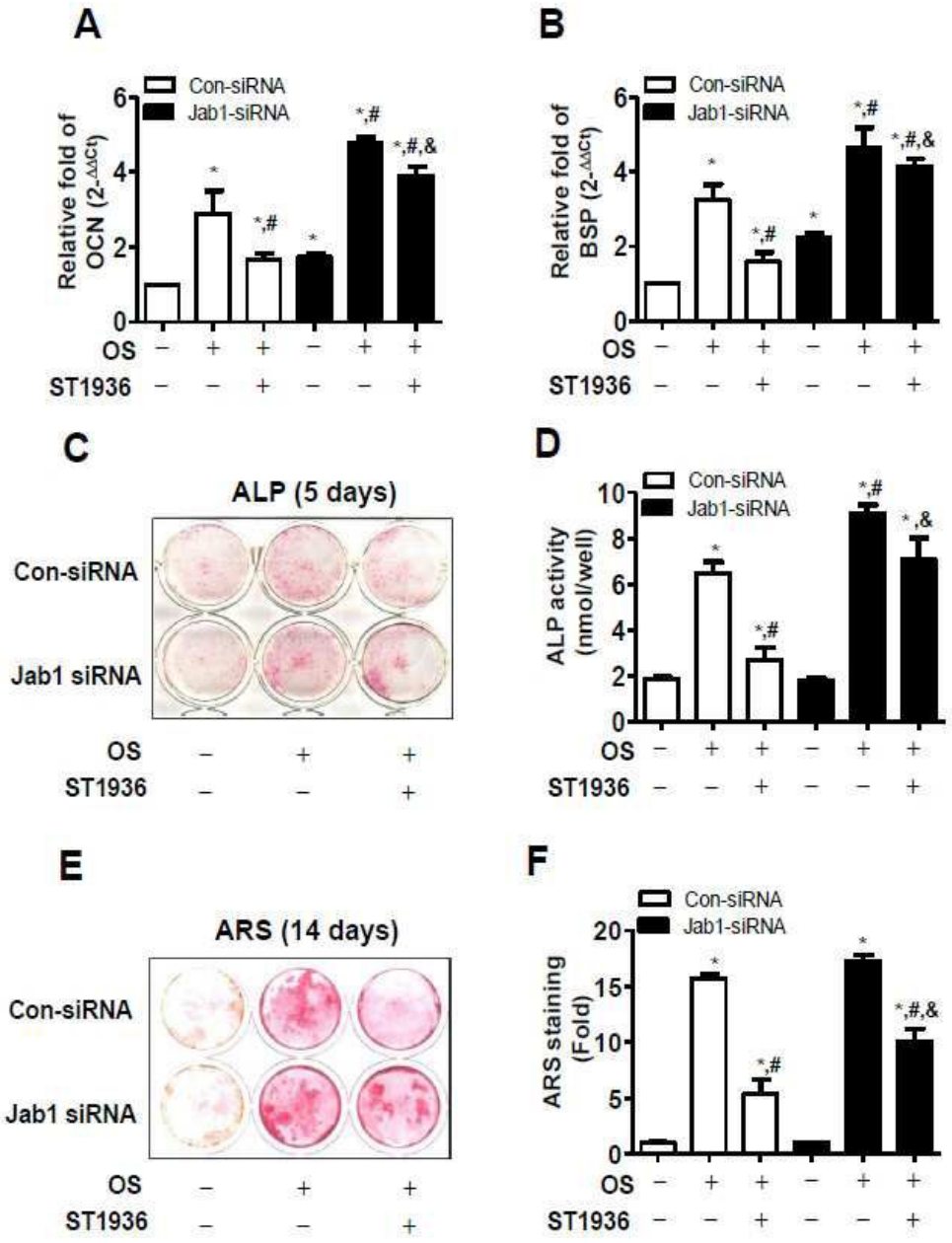
도면4


A
-
ST1936
OS 0 1 3 7 1 3 7 days
p-Smad1/5/8
Smad1/5/8
Control
ST1936
Relative fold of P-Smad1/5/8
(Day)
B
-
ST1936
OS 0 1 3 7 1 3 7 days
Runx2
β-actin
Control
ST1936
Relative fold of Runx2
(Day)
C
ALP (3 days)
OS
rh-BMP2
ST1936
D
ALP activity (nmol/well)
OS
rh-BMP2
ST1936
E
Alizarin S Red (10 days)
OS
rh-BMP2
ST1936
F
ARS staining (Fold)
OS
rh-BMP2
ST1936

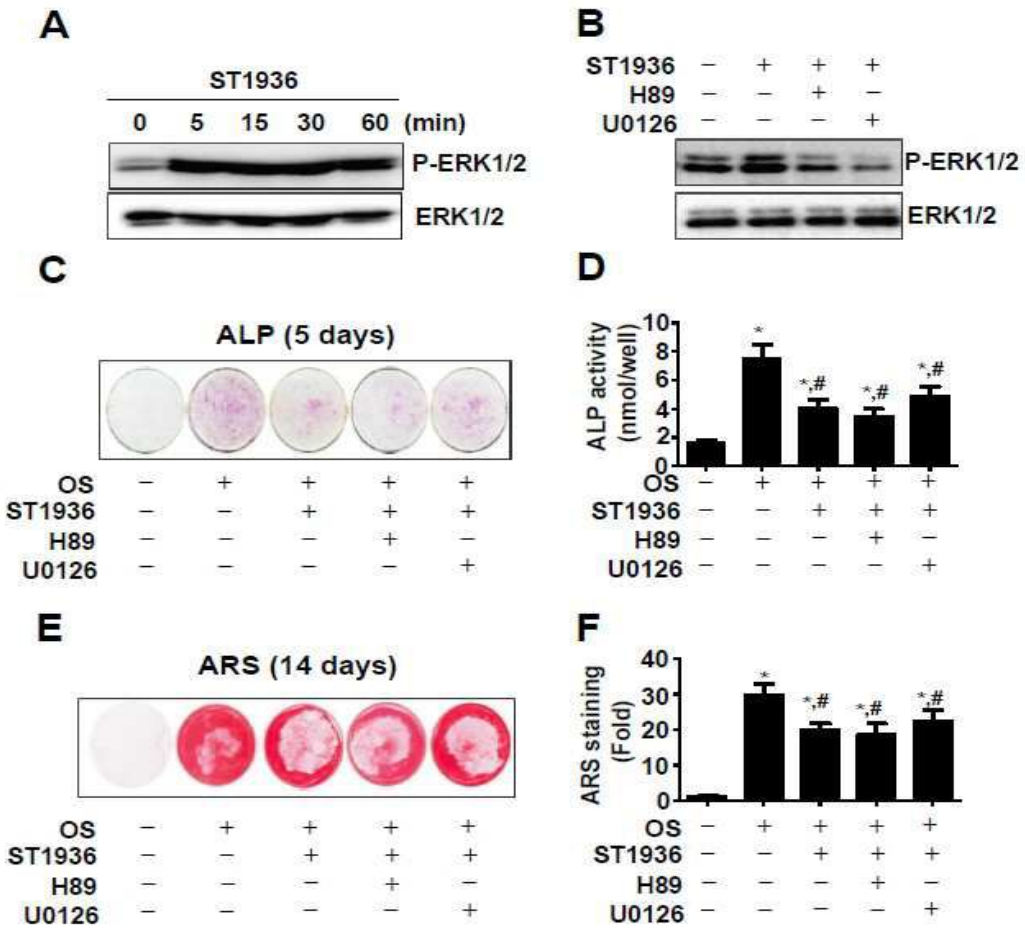
도면5


A
Total lysates
IP: Jab1
IgG
Jab1
Jab1
IgG
Jab1
Jab1
ST1936 − + + − + +
Smad1/5/8
IgG
Runx2
Jab1
B
Smad1/5/8
Jab1
Merged
ST1936 − +
C
Con-siRNA
Jab1-siRNA
rh-BMP2 0 30 60 0 30 60 (min)
p-Smad1/5/8
Smad1/5/8
Jab1
β-actin
Con-siRNA
Jab1-siRNA
Relative fold of P-Smad1/5/8
60
40
20
0
0 20 40 60
(min)
D
Con-siRNA
Jab1 siRNA
OS − + + − + +
ST1936 − − + − − +
Runx2
Jab1
β-actin
E
Con-siRNA
Jab1-siRNA
Relative fold of Runx2 (2-ΔΔCt)
10
8
6
4
2
0
OS − + + − + +
ST1936 − − + − − +

도면6


A
Con-siRNA
Jab1-siRNA
Relative fold of OCN (2-ΔΔCt)
OS
ST1936
B
Relative fold of BSP (2-ΔΔCt)
C
ALP (5 days)
Con-siRNA
Jab1 siRNA
D
ALP activity (nmol/well)
E
ARS (14 days)
F
ARS staining (Fold)

도면7


A
ST1936
0 5 15 30 60 (min)
P-ERK1/2
ERK1/2
B
ST1936 − + + +
H89 − − + −
U0126 − − − +
P-ERK1/2
ERK1/2
C
ALP (5 days)
OS − + + + +
ST1936 − − + + +
H89 − − − + −
U0126 − − − − +
D
ALP activity (nmol/well)
10
8
6
4
2
0
*
*,#
*,#
*,#
OS − + + + +
ST1936 − − + + +
H89 − − − + −
U0126 − − − − +
E
ARS (14 days)
OS − + + + +
ST1936 − − + + +
H89 − − − + −
U0126 − − − − +
F
ARS staining (Fold)
40
30
20
10
0
*
*,#
*,#
*,#
OS − + + + +
ST1936 − − + + +
H89 − − − + −
U0126 − − − − +