



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0005531  
(43) 공개일자 2016년01월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/16 (2006.01) A61P 3/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0084569

(22) 출원일자 2014년07월07일

심사청구일자 2014년07월07일

(71) 출원인

계명대학교 산학협력단

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)

(72) 발명자

임승순

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095

이재호

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095

(74) 대리인

위병갑

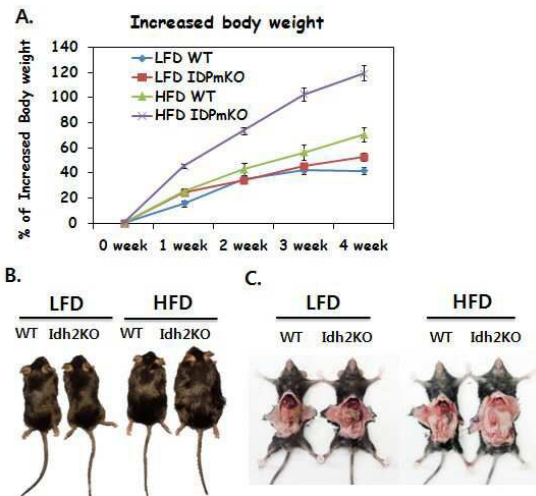
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 IDH2를 유효성분으로 함유하는 비만 또는 비만 매개 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물

### (57) 요약

본 발명은 IDH2를 표적으로 하는 비만 또는 비만 관련 치료 용도에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 IDH2를 유효성분으로 포함하는 비만 또는 비만 매개 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물; 및 IDH2를 이용한 비만 매개 대사성 질환의 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명의 IDH2 (Isocitrate dehydrogenase 2) 유전자는 고칼로리 식이에 따른 비만과 관련하여 지방축적 억제; 지방세포 크기 억제; 포도당 내성 조절; 및 비만세포 분화 억제와 밀접하게 관련되어 있는 것을 확인함에 따라, 비만 또는 비만 매개 대사성 질환을 효과적으로 치료할 수 있는 유전자/또는 단백질 치료제로서 의약품 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A120864

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 대사증후군에서 SREBP에 의한 비알콜성 지방간 질환 유발 조절기전

기 여 율 1/1

주관기관 계명대학교 산학협력단

연구기간 2012.11.01 ~ 2015.10.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

IDH2 단백질을 유효성분으로 함유하는 비만 또는 비만 매개 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 비만 매개 대사성 질환은 당뇨, 고지혈증, 동맥경화, 고혈압, 심혈관 질환, 지방간, 비만유래 염증질환, 비만 유래 자가면역질환 및 비만 유래 암 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 IDH2 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 IDH2 단백질은 지방축적 억제; 지방세포 크기 억제; 포도당 내성 조절; 및 비만세포 분화 억제 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

#### 청구항 5

IDH2 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 유효성분으로 포함하는 비만 또는 비만 매개 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

#### 청구항 6

제5항에 있어서,

상기 비만 매개 대사성 질환은 당뇨, 고지혈증, 동맥경화, 고혈압, 심혈관 질환, 지방간, 비만유래 염증질환, 비만 유래 자가면역질환 및 비만 유래 암 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

#### 청구항 7

제5항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

#### 청구항 8

제5항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드는 발현 벡터 내에 포함되는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

#### 청구항 9

제8항에 있어서,

상기 발현 벡터는 플라스미드 또는 바이러스성 벡터인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

#### 청구항 10

- (a) IDH2 단백질 또는 상기 단백질을 발현하는 재조합 세포와 후보물질을 배양하는 단계; 및
- (b) IDH2 단백질의 활성 또는 세포 내 수준 증가에 미치는 효과를 측정하는 단계를 포함하는, 비만 또는 비만 매개 대사성 질환의 치료제 스크리닝 방법.

#### 청구항 11

제10항에 있어서,

상기 후보물질은 천연화합물, 합성화합물, 추출물, 분획물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사산물 및 생활성 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 비만 또는 비만 매개 대사성 질환의 치료제 스크리닝 방법.

#### 청구항 12

제10항에 있어서,

상기 IDH2 단백질의 활성 또는 세포 내 수준은 면역침전법, 방사능면역분석법, 효소면역분석법, 면역조직화학, 웨스턴 블롯 또는 유세포 분석법으로 측정하는 것을 특징으로 비만 또는 비만 매개 대사성 질환의 치료제 스크리닝 방법.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 IDH2를 표적으로 하는 비만 또는 비만 관련 치료 용도에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 IDH2를 유효 성분으로 포함하는 비만 또는 비만 매개 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물; 및 IDH2를 이용한 비만 매개 대사성 질환의 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002] 비만에 대한 늘어나는 경각심과 비만의 원인을 이해하고 이에 대응하고자 하는 전 지구적 노력에도 불구하고, 비만은 가속적으로 증가하는 추세이다. 2007년 국민건강영양조사 결과에 의하면 최근 5년 동안 국내 비만 인구 비율이 해마다 3%씩 증가하여, 현재 비만자 비율이 전체 인구 중 32.7%(남 33.1%, 여 32.2%)이며, 연령별로는 중장년층이 평균 44%로 청년층(22%)의 두 배나 되고, 비만으로 인한 질환이 늘어나면서 2007년 기준으로 사회경제적 비용은 1조8239억 원에 이르는 것으로 추정되고 있다.

[0003] 비만 문제가 심각해짐에 따라 비만 자체가 곧 질병이라는 인식이 확산되고 있다. 비만 진행 여부의 판단은 대표적으로 과체중 여부로 판단할 수 있으며, 구체적으로 특정 부위에서의 체지방의 증가(예를 들어, 복부 비만 등)로 판단할 수 있다. 비만으로 분류된 경우 즉, 비만자는 다른 질병에 비해 유병률과 사망률이 높고 정상체중을 가진 사람과 비교하여 당뇨병 질환으로 인한 사망률은 4배, 간병경증 질환으로 인한 사망률은 2배, 뇌혈관질환으로 인한 사망률은 1.6배 및 관상동맥질환으로 인한 사망률은 1.8배 정도 높은 것으로 보고되고 있다.

[0004] 또한, 복부 비만은 동맥경화성 죽종형성(atheroma formation)의 원인으로 보고되었으며(Kunitomi M et al., Relationship between reduced serum IGF-I levels and accumulation of visceral fat in Japanese men. Int J Obes Relat Metab Disord. 2002;26:361-9), 기타 고혈압, 고지혈증, 면역체계의 이상 및 고인슐린증 등의 여러 질환의 원인으로 보고되고 있으며, 결과적으로 심혈관질환의 이환률(morbidity)과 사망률(mortality) 증가의 원인이 되는 것으로 보고되고 있다(Hida K, et al., Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102:10610-5).

[0005] 비만은 지방의 과다 축적으로 특징 지워지는 다양한 원인을 가진 심각한 만성 증후군이다. 비만 치료의 목표는 크게 두 가지로서, 첫 번째는 과량의 지방을 연소시켜 체중을 감소시키는 것이며, 두 번째는 대사성 불균형을 개선시키는 것이다. 복부 비만을 보이는 환자는 흔히 X-증후군(인슐린 저항성, 제 2형 당뇨병, 고혈압 및 지질 대사 이상)과 같은 병적인 상태와 관련되어 있으며, 조기 동맥경화, 허혈성 심질환 및 뇌혈관 질환의 강력한 위험인자로 작용한다.

[0006] 비만의 원인은 유전적인 소인이 70%이상으로 알려져 있고 그 외 환경요인으로 고 지방식의 섭취나 운동부족 등

이 알려져 있지만 최근 비만의 원인으로 면역계의 이상도 고려되고 있다.

[0007] 현재 사용되고 있는 비만치료제로는 스위스 로슈의 제니칼과 같은 지방흡수 억제제와 미국 애보트의 메리디아와 같은 식욕감퇴제가 많이 사용되고 있으나, 이러한 약제들에서 두통, 혈압상승, 설사 등의 부작용이 발생하는 문제점이 있다. 따라서 부작용이 없고 저렴하면서도 치료 효과가 우수한 새로운 비만 치료제의 개발이 필요한 실정이다.

[0008] 한편, 바이오의약품은 화학식에 의해 합성되는 물질이 아니라, 생명공학을 바탕으로 생물체의 기능 및 정보를 활용하여 만들어진 치료제를 의미한다. 자세하게는, 원하는 유전자를 미생물세포배양조직세포에 삽입하여 대량으로 순수하게 생산시킨 호르몬백신 등의 의약품을 말하며, 생체의약품이라고도 한다. 따라서 바이오의약품이라 함은 유전자재조합, 세포융합, 세포배양 등 생명공학기술을 이용하여 생산되는 호르몬제제, 혈액관련제제, 항암제, 유전자치료제, 성장인자 등의 치료제와 백신, 진단약 등을 총칭하는 개념이다.

[0009] 특히 유전자치료는 치료 유전자를 환자의 체내로 도입시켜 결손 유전자를 교정하거나 세포에 새로운 기능을 추가하여 암감염성 질환유전질환 등을 치료하거나 예방하는 방법을 말한다. 유전자치료는 일반적인 약물에 의한 치료에 비해서, 우수한 선택성을 가질 수 있고, 일반적인 치료법으로는 얻기 힘든 질병의 치료율 및 치료 속도를 가질 수 있다.

[0010] 이에 본 발명자들은, 비만 및 비만으로 매개되는 다양한 대사성 질환의 근본적인 치료를 목적으로 비만과 관련된 유전자들을 찾고자 다양한 유전자들을 대상으로 비만과의 관련성을 연구를 진행하였으며, 그 결과 미토콘드리아에 위치하여 TCA 사이클에서 이소시트레이트(isocitrate)를 산화적으로 탈탄산화시키는 기능을 갖는다고 알려진 IDH2 유전자를 표적으로 하여, 이 유전자를 녹아웃시킨 형질전환 마우스를 통해 고칼로리 식이에 따른 비만과 관련하여 IDH2 유전자의 기능을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

- [0011] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2004-0062832호  
(특허문헌 0002) 한국공개특허 제2006-0057337호  
(특허문헌 0003) 한국공개특허 제2014-0031614호

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0012] 따라서 본 발명의 목적은 IDH2를 이용하여 비만 또는 비만 매개된 다양한 대사성 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 IDH2를 이용하여 비만 또는 비만 매개된 다양한 대사성 질환의 치료제로서 유용한 화합물, 추출물, 분획물, 기타 단백질 등과 같은 의약품 소재(후보물질)를 스크리닝/또는 선별할 수 있는 방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0014] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 IDH2 단백질을 유효성분으로 함유하는 비만 또는 비만 매개 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 비만 매개 대사성 질환은 당뇨, 고지혈증, 동맥경화, 고혈압, 심혈관 질환, 지방간, 비만 유래 염증질환, 비만 유래 자가면역질환 및 비만 유래 암 질환으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 IDH2 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 IDH2 단백질은 지방축적 억제; 지방세포 크기 억제; 포도당 내성 조절; 및 비만세포 분화 억제 효과를 가질 수 있다.

- [0018] 본 발명은 또한, IDH2 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 유효성분으로 포함하는 비만 또는 비만 매개 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 비만 매개 대사성 질환은 당뇨, 고지혈증, 동맥경화, 고혈압, 심혈관 질환, 지방간, 비만 유래 염증질환, 비만 유래 자가면역질환 및 비만 유래 암 질환으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 발현 벡터 내에 포함될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 발현 벡터는 플라스미드 또는 바이러스성 벡터일 수 있다.
- [0023] 본 발명은 또한, (a) IDH2 단백질 또는 상기 단백질을 발현하는 재조합 세포와 후보물질을 배양하는 단계; 및 (b) IDH2 단백질의 활성 또는 세포 내 수준 증가에 미치는 효과를 측정하는 단계를 포함하는, 비만 또는 비만 매개 대사성 질환의 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 후보물질은 천연화합물, 합성화합물, 추출물, 분획물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사산물 및 생활성 분자로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 IDH2 단백질의 활성 또는 세포 내 수준은 면역침전법, 방사능면역분석법, 효소면역분석법, 면역조직화학, 웨스턴 블롯 또는 유세포 분석법으로 측정될 수 있다.

### 발명의 효과

- [0026] 본 발명의 IDH2(Isocitrate dehydrogenase 2) 유전자는 고칼로리 식이에 따른 비만과 관련하여 지방축적 억제; 지방세포 크기 억제; 포도당 내성 조절; 및 비만세포 분화 억제와 밀접하게 관련되어 있는 것을 확인함에 따라, 비만 또는 비만 매개 대사성 질환을 효과적으로 치료할 수 있는 유전자/또는 단백질 치료제로서 의약품 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1A는 야생형 정상마우스 및 IDH2 유전자를 녹아웃시킨 형질전환 마우스에 정상식이와 고지방식이를 각각 섭취시킨 총 4개의 실험군 마우스의 기간 경과별(1주일 단위로 4주 동안 측정) 체중 변화를 그래프로 나타낸 것이며, 도 1B는 상기 4개의 실험군 마우스의 4주간 사육 후 외형을 나타낸 사진이며, 도 1C는 상기 4개의 실험군 마우스의 복부 지방의 축적 정도를 보여주는 사진이다.
- 도 2A는 야생형 정상마우스 및 IDH2 유전자를 녹아웃시킨 형질전환 마우스에 정상식이와 고지방식이를 각각 섭취시킨 총 4개의 실험군 마우스의 백색지방 조직의 총량을 보여주는 사진이며, 도 2B는 상기 4개의 실험군 마우스의 지방세포 크기 및 대식세포 침윤정도를 측정하기 위해 F4/80 항체를 이용하여 지방세포를 염색시킨 후 전자현미경을 통해 지방조직의 관찰한 사진이다.
- 도 3A는 야생형 정상마우스 및 IDH2 유전자를 녹아웃시킨 형질전환 마우스에 정상식이와 고지방식이를 각각 섭취시킨 총 4개의 실험군 마우스의 간 조직 내에 존재하는 지방간의 양상을 나타낸 사진이며, 도 3B는 상기 4개의 실험군 마우스의 간 조직을 헤마톡실린&에오신 염색을 통해 조직 형태를 비교한 사진이며, 도 3C는 상기 4개의 실험군 마우스의 간 조직에서 대식세포 침윤정도를 측정하기 위해 F4/80 항체를 이용하여 간세포를 염색한 결과를 나타낸다.
- 도 4A는 야생형 정상마우스 및 IDH2 유전자를 녹아웃시킨 형질전환 마우스에 정상식이와 고지방식이를 각각 섭취시킨 총 4개의 실험군 마우스의 포도당 내성 테스트를 실시한 결과이며, 도 4B는 상기 4개의 실험군 마우스의 인슐린 내성 테스트를 실시한 결과이다.
- 도 5는 야생형 정상마우스 및 IDH2 유전자를 녹아웃시킨 형질전환 마우스에 정상식이와 고지방식이를 각각 섭취시킨 총 4개의 실험군 마우스에서 비만 지표 유전자로 알려진 IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-6, F4/80, MCP-1의 유전자 발현 정도를 RT-PCR로 측정한 결과이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 본 발명은 IDH2 단백질 또는 IDH2 유전자의 비만 또는 비만 매개 대사성 질환의 치료 용도를 제공함에 그 특징이 있다.
- [0029] 본 발명자들은 비만 또는 비만으로 매개되는 대사성 질환의 치료를 위한 새로운 비만 억제제를 개발하기 위하여 비만과 관련된 유전자들을 찾고자 노력하였으며, 유전자 후보군 중 IDH2 유전자에 주목하였다.
- [0030] IDH(NADP+ dependent isocitrate dehydrogenase)는 보조인자(cofactor)의 종류와 세포 내 존재 위치에 따라 IDH1, IDH2 및 IDH3 세 종류의 아이소자임(isozyme)들로 존재한다. 이 중 IDH2는 미토콘드리아에 위치하여 TCA 사이클에서 이소시트레이트(isocitrate)를 산화적 탈탄산화시키는 기능을 한다고 알려져 있으며 TCA 사이클 조절에 주요한 역할을 하고, 산화적 스트레스에 대해 방어 능력을 가지고 있다고 보고되어 있다.
- [0031] 그러나 IDH2와 관련하여 비만 또는 비만 매개 대사성 질환과의 관련성에 대해서는 전혀 알려진 바가 없다.
- [0032] 본 발명자들은 IDH2 유전자에 주목하였으며, 이들 유전자를 녹아웃시킨 형질전환 실험동물을 이용하여 고지방식이 섭취에 따라 비만을 유도한 경우, 대조군으로서 야생형인 정상마우스에 비해, 비만 정도가 더욱 두드러지게 증대되는 것을 실험을 통해 확인할 수 있었다. 자세하게는, IDH2 유전자를 녹아웃시킨 형질전환 실험동물에 고지방식이를 섭취시킨 실험군에서 야생형인 정상마우스 실험군에 비해, 체중 증가가 두드러지고; 복부 지방 축적이 증대되며; 지방세포 사이즈도 커지고; 백색지방 조직의 총량도 증대되며; 간 조직 내에서의 지방간이 증대되고; 지방세포와 간세포 내에서의 대식세포 침윤 정도가 증대되며; 포도당 내성이 증가할 뿐만 아니라; 비만지표 유전자인 IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-6, F4/80, MCP-1의 발현이 더욱 증대되는 것으로 나타났다.
- [0033] 따라서 본 발명에서는 IDH2 단백질/또는 IDH2 유전자가 비만 또는 비만 매개 대사성 질환의 예방 또는 치료를 위한 의약적 용도로서 유용하게 사용될 수 있다는 사실을 최초로 규명하였다.
- [0034] 먼저, 본 발명은 IDH2 단백질을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 비만 매개 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공할 수 있으며, 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 IDH2 단백질은 상기 단백질과 실질적으로 동등한 생리 활성을 갖는 단백질을 포함한다. 실질적으로 동등한 생리 활성을 갖는 IDH2 단백질에는 상기 단백질과 그 기능적 동등물(functional equivalent) 및 기능적 유도체(functional derivative)가 포함된다.
- [0035] 상기 "기능적 동등물"에는 천연형 단백질 아미노산 중 일부 또는 전부가 치환되거나, 아미노산의 일부가 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체로서 천연형 IDH2 단백질과 실질적으로 동등한 생리활성을 갖는 것을 말한다. "기능적 유도체"는 상기 IDH2 단백질의 물리 화학적 성질을 증가 또는 감소시키기 위한 변형을 가한 단백질로서 천연형 IDH2 단백질과 실질적으로 동등한 생리 활성을 갖는 것을 의미한다.
- [0036] 바람직하게 상기 IDH2 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열(NCBI accession number: P54071)을 가지는 단백질을 말한다.
- [0037] 본 발명에서 상기 '비만'은 과다한 체지방을 가진 상태를 의미하며, 남자는 체지방이 체중의 25%, 여자는 체중의 30% 이상일 때, 임상적으로는 BMI(Body Mass Index: 체질량지수)가 30.1 이상인 경우, 현재 체중이 이상체중을 20% 초과하는 경우로 정의된다. 비만의 원인으로는 유전적 요인, 환경적 요인, 에너지 대사의 이상 등이 있다. 비만의 종류에는 원인에 따라서 단순비만과 증후성 비만으로 분류할 수 있다. 단순 비만은 과식과 운동 부족이 그 원인이며, 증후성 비만은 내분비, 시상하부성, 유전, 전두엽 및 대사성 등으로 발생한다.
- [0038] 참고로 비만은 정상체중인 사람에 비해 지방세포의 크기가 매우 커져 있고, 지방세포의 생리학적, 물리적 성질과 성장이 정상체중인 사람들에서 보이는 특징과 달라 신체 특히 복강 내 혈액 및 림프구의 흐름에 장애를 일으킨다. 또한 거대 대식세포의 증식으로 지방세포 내에서 50여 종의 염증 물질이 과다 분비되는데, 이는 우리 몸에서 각종 염증 반응을 일으키고 대사장애 증후군을 유발하는 등 각종 합병증을 동반하게 된다. 따라서 비만이 유발하는 비만 유래 질환으로는 제 2형 당뇨병, 골관절염, 비알코올성 지방간증, 수면무호흡증, 폐색전증, 고혈압, 천식, 불임, 암, 우울증 등이 있다. 정상체중인 사람과 비교했을 때 비만인 사람은 당뇨병에 걸릴 위험이 2배, 고혈압이 생길 확률은 1.5배이며, 고도비만의 사람의 경우는 당뇨병 5배, 고혈압은 2.5배로 높은 편이다. 비만도가 높을수록 합병증의 위험도 그만큼 높다.
- [0039] 또한, 고도비만이 되면 지방세포의 크기가 400배까지 커질 수 있는데, 이렇게 커진 지방세포를 만져보면 크기만 큰 것이 아니라 굴 알갱이처럼 탱탱해서 잘 깨지지 않는다. 보통 크기의 지방세포는 85%의 지방과 15%의 수분으로 이루어져 있어 손가락 사이에 넣고 누르면 약해서 뭉그러진다. 그러나 고도비만이 되어 커져버린 지방세포는 표면이 탱탱할 뿐 아니라 단단해서 여간해서는 깨지지 않는다. 지방세포가 이렇게 변형되면 우리 몸의 대식세포

가 움직이기 시작한다. 원래 대식세포는 우리 몸에 병이 생겼을 때 나쁜 균들을 없애는 역할을 하는 좋은 세포이나 지방세포가 비정상적으로 커지면 대식세포는 몸 안에 이상한 변화가 일어났다고 판단하여 지방세포를 잡아먹기 위해 계속 증식한다. 그래서 커진 지방세포와 같은 크기인 400배까지 커져, 거대대식세포로 변하게 되는 것이다.

[0040] 한편, 일반적인 대식세포의 활동은 우리 몸이 가진 자체 정화장치이다. 나쁜 균들이 몸 안으로 들어오면 대식세포가 자기 몸에서 염증인자를 분비해 나쁜 균을 해치움으로써 우리 몸을 건강한 상태로 유지한다. 그러나 400배나 커져 버린 대식세포는 더 이상 정화장치로서의 역할을 못한다. 오히려 필요하지도 않은 각종 염증인자들을 과도하게 분비해 우리 몸을 위협한다. 염증 반응이 계속 일어나면 몸 안에 혈관이 늘어나고, 그로 인해 혈관 사이에 상처가 생기고 섬유화되어 몸속 곳곳의 혈액 순환에 문제가 생긴다. 혈액 순환이 잘 되지 않으면 대식세포는 더 많은 염증인자를 분비한다. 다시 염증인자는 불필요한 혈관들을 만들어 혈액순환을 방해한다. 이렇게 되면 인슐린이 작용해야 할 곳에 인슐린이 제대로 작용할 수 없어 당뇨가 생기고, 섬유화된 좁은 혈관을 뚫고 혈액이 들어가려고 하다 보니 압력이 강해져 고혈압이 생긴다. 비만으로 인한 합병증은 거대대식세포가 어느 위치에서 염증반응을 일으키느냐에 따라 달라지는데 관절에 가서 염증 반응을 일으키면 관절염, 폐에 가서 일으키면 폐색전증이 일어난다. 온몸에서 이런 염증 반응이 일어나고 있다면 비만인 사람은 면역체계 자체가 정상인보다 약해질수 밖에 없다.

[0041] 따라서 본 발명의 IDH2 단백질은 비만뿐만 아니라 비만으로 유도되는 대사성 질환으로 당뇨, 고지혈증, 동맥경화, 고혈압, 심혈관 질환, 지방간, 비만 유래 염증질환, 비만 유래 자가면역질환 및 비만 유래 암 질환과 같은 다양한 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.

[0042] 본 발명에서 상기 '치료'란, 달리 언급되지 않는 한, 상기 용어가 적용되는 질환 또는 질병, 또는 상기 질환 또는 질병의 하나 이상의 증상을 역전시키거나, 완화시키거나, 그 진행을 억제하거나, 또는 예방하는 것을 의미하며, 본원에서 사용된 상기 '치료'란 용어는 '치료하는'이 상기와 같이 정의될 때 치료하는 행위를 말한다.

[0043] 본 발명에 따른 비만 또는 비만 매개 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물은 약학적으로 유효한 양의 IDH2 단백질을 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기에서 약학적으로 유효한 양이란 비만 또는 비만 매개 대사성 질환의 증상을 예방, 개선 및 치료하기에 충분한 양을 말한다.

[0044] 본 발명에 따른 IDH2 단백질의 약학적으로 유효한 양은 0.5 ~ 100 mg/day/체중kg, 바람직하게는 0.5 ~ 5mg/day/체중kg이다. 그러나 상기 약학적으로 유효한 양은 비만 또는 비만 매개 대사성 질환 증상의 정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있다.

[0045] 또한, 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유효제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0046] 또한, 본 발명의 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡슐, 멸균 주사용액, 멸균 분말의 형태일 수 있다.

[0047] 또한, 본 발명에 따른 비만 또는 비만 매개 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 활성 성분의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있고, 본 발명에 따른 비만 또는 비만 매개 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 비만 또는 비만 매개 대사성 질환의 증상을 예방, 개선 또는 치료하는 효과를 가지는 공지의 화합물과 병행하여 투여할 수 있다.

[0048] 또한, 본 발명은 IDH2 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 비만 또는 비만 매개 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공할 수 있다.

[0049] 상기 IDH2 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 DNA 또는 RNA를 포함할 수 있으며, 바람직하게는 서열번호

2로 표시되는 DNA 서열을 갖는다.

[0050] 여기서 상기 폴리뉴클레오티드는 플라스미드 또는 바이러스 벡터와 같은 발현 벡터 내로 공지의 방법에 의해 도입시킨 후 상기 발현 벡터를 당업계에 공지된 다양한 방법으로 감염(infection) 또는 형질도입(transduction)에 의해 발현형으로 표적 세포 내에 도입시킬 수 있다.

[0051] 플라스미드 발현 벡터는 사람에게 사용할 수 있는 FDA의 승인된 유전자 전달방법으로 사람 세포에 직접적으로 플라스미드 DNA를 전달하는 방법이다(Nabel, E. G., et al., Science, 249:1285-1288, 1990). 플라스미드 DNA는 바이러스 벡터와는 달리 균질하게 정제될 수 있는 장점이 있다. 본 발명에서 사용할 수 있는 플라스미드 발현 벡터로는 당업계에 공지된 포유동물 발현 플라스미드를 사용할 수 있다. 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나 pRK5(유럽특허 제307,247호), pSV16B(국제특허공개 제91/08291호) 및 pVL1392(PharMingen) 등이 대표적이다.

[0052] 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드 발현 벡터(plasmid expression vector)는 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 이에 한정되지는 않으나, 일시적 형질감염(transient transfection), 미세주사, 형질도입(transduction), 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포좀 매개된 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 덱스트란-매개된 형질감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질감염(polybrene-mediated transfection), 전기침공법(electroporation), 유전자 건(gene gun) 및 세포 내로 DNA를 유입시키기 위한 다른 공지의 방법에 의해 세포 내로 도입할 수 있다(Wu et al., J. Bio. Chem., 267:963-967, 1992; Wu and Wu, J. Bio. Chem., 263:14621-14624, 1988).

[0053] 상기 IDH2를 발현시킬 수 있는 발현벡터는 공지의 방법에 의해 투여될 수 있다. 예를 들면, 국소적으로 비경구, 경구, 비강, 정맥, 근육 내, 피하 내 또는 다른 적절한 수단에 의해 투여될 수 있다.

[0054] 따라서 본 발명은 IDH2 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 유효성분으로 함유하는 비만 또는 비만 매개 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공할 수 있다.

[0055] 나아가 본 발명은, (a) IDH2 단백질 또는 상기 단백질을 발현하는 제조법 세포와 후보물질을 배양하는 단계; 및 (b) IDH2 단백질의 활성 또는 세포 내 수준 증가에 미치는 효과를 측정하는 단계를 포함하는, 비만 또는 비만 매개 대사성 질환 치료제 스크리닝 방법을 제공할 수 있으며, 이때 상기 IDH2 단백질의 활성 또는 세포 내 수준은 면역침전법(coimmunoprecipitation), 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학, 웨스턴 블롯(Western Blotting) 또는 유세포 분석법(FACS)으로 측정할 수 있다.

[0056] 특히 본 발명에 따른 비만 또는 비만 매개 대사성 질환의 치료제가 될 수 있는 후보물질은 상기과 같은 방법에서 IDH2 단백질의 활성 또는 세포 내 수준을 증가시키는 물질일 수 있으며, 여기서 상기 세포 내 수준 증가는 IDH2 유전자의 발현이 증가되어 IDH2 단백질의 농도가 증가되는 것을 말한다.

[0057] 본 발명에 실시예에 있어서, 상기 후보물질은 천연화합물, 합성화합물, 추출물, 분획물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사산물 및 생활성 분자로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0058] 본 발명의 다른 실시예에 있어서, 상기 IDH2 단백질의 활성 또는 세포 내 수준은 면역침전법, 방사능면역분석법, 효소면역분석법, 면역조직화학, 웨스턴 블롯 또는 유세포 분석법으로 측정될 수 있다.

[0059] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예들은 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0060] <실시예 1>

[0061] IDH2 유전자 녹아웃 형질전환마우스 준비

[0062] 본 실험에서 사용된 IDH2 유전자 녹아웃 형질전환마우스는 경북대학교 생명과학대학 박진우 교수에게서 분양받은 것을 사용하였다. 참고로 본 발명의 상기 형질전환마우스의 제조방법은 Biochimica et Biophysica Acta 1842 (2014) 135-143에 자세히 개시되어 있으며, 그 방법을 간략히 설명하면 다음과 같다.

[0063] 129/SvJ mouse J1 배아줄기세포로부터 게놈 DNA를 추출하여 PCR을 위한 주형 DNA로 이용하였다. 5' 7.3-kb long arm fragment 및 3' 2.4-kb short arm fragment가 삽입된 pPNT 벡터를 이용하여 IDH2 유전자의 N-말단 영역 부분을 포함하는 1170-bp 게놈 절편의 결실을 위한 타겟팅 벡터를 구축하였다. 네오마이신 유사체인 G418에 대한 저항성을 부여하는 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제 유전자(neo)를 양성 선별마커로 이용하였다. 구아닌 유사체인 간사이클로비르(ganciclovir)에 대한 감수성을 부여하는 헤르페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키네이스(Herpes simplex virus thymidine kinase: HSVtk)는 음성 선별 마커로 이용하였다. 상기 타겟팅 벡터는 제한효소 NotI로 절단하여 선형화하고 일렉트로포레이션(electroporation)을 통해 129/SvJ mouse J1 배아줄기세포에 도입하였다. G418 및 간사이클로비르에 대한 저항성을 갖는 클론을 선별하고, 서던 블랏팅을 통해 상동재조합 여부를 확인하였다. 그 결과 얻어진 35클론 중에서 5개가 IDH2 유전자가 성공적으로 변형된 것으로 나타났다. 키메릭 마우스를 생산하기 위하여 IDH2 유전자 돌연변이를 함유하는 배아줄기 클론들을 C57BL/6 blastocysts에 주입하였다. 결과물인 수컷 키메릭 마우스를 C57BL/6 암컷 마우스와 교배하여 이형접합(Heterozygous) IDH2 마우스를 얻었다. 돌연변이 대립유전자의 생식선 전이(germline transmission) 여부는 agouti coat 컬러를 가진 F1 자손으로부터 tail DNA의 서던 블랏 분석을 통해 확인하였다. 이후, 동형접합(homozygous) IDH2-결손 마우스를 생산하기 위하여 이형접합(Heterozygous) 마우스를 상호 교배하였다. 서던 블랏 분석을 위하여, 넥아웃 벡터의 3' short arm 바로 바깥에 위치된 1-kb 프로브는 2개 프라이머(forward primer, 5' -TGCCTCCACCTTCTTAGTAGG-3' ; reverse primer, 5' -ACTAACGGATGGCATCAGCAG-3')를 이용하여 준비하였다. 마우스 게놈 DNA를 마우스 테일 샘플로부터 분리하였으며, 제한효소 SphI로 절단하고, 프로브를 이용하여 혼성화하였다.

[0064] <실시예 2>

[0065] 식이 및 실험동물 준비

[0066] <2-1> 식이준비

[0067] 60% 지방을 함유하는 고지방식이와 10%의 지방을 함유하는 정상食이를 준비하였다. 본 실험에서 사용한 고지방식이와 정상食이는 각각 중앙실험동물에서 카탈로그 넘버 D12492(고지방식이) 및 D12450B(정상食이)로 구입하였다. 구입한 식이 조성물의 구성성분과 구성비율은 아래 표 1에서 나타내었으며, 이들 식이는 하기 실험을 위한 마우스에 공급하였다.

표 1

[0068] 식이 구성성분 및 구성비율

| 구성성분         | 정상食이(D12450B) |       | 고지방食이(D12492) |       |
|--------------|---------------|-------|---------------|-------|
|              | gm%           | kcal% | gm%           | kcal% |
| Protein      | 19.2          | 20    | 26            | 20    |
| Carbohydrate | 67.3          | 70    | 26            | 20    |
| Fat          | 4.3           | 10    | 35            | 60    |

[0069] ※ 중앙실험동물을 통해 구입.

[0070] <2-2> 실험동물의 준비

[0071] 4주령 C57BL/6 수컷 마우스 및 상기 실시예 1을 통해 준비된 형질전환마우스 IDH2 KO 마우스를 각각 12마리씩 준비한 후, 실험군에 따라 60% 지방을 함유하는 고지방食이군(high fat diet, HFD) 및 10% 지방을 함유하는 정상食이군(Low fat diet, HFD)으로 6마리씩 총 4그룹으로 나누었다. 총 4그룹의 실험군은 4주간 사육한 뒤 실험에 사용하였으며, 5번 반복실험을 실시하였다. 사육실 환경은 온도 23±2℃, 습도 55±5%로 일정하게 유지하고 12시간 주기로 명암을 자동조절 하였다. 사육기간 동안에 사료와 물은 자유섭취 방법으로 급식하였다.

**<실험예 1>**

**IDH2 유전자가 복부 지방 축적에 미치는 영향**

본 실험에서는 IDH2 유전자의 유·무에 따른 고지방식이 조건에서 체중 및 복부 지방 축적에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 상기 실시예 <2-2>를 통해 준비된 총 4그룹의 실험군 마우스들의 무게측정과 더불어 이들의 복부 지방의 축적 정도를 조사하였다.

먼저, 몸무게를 측정하기 위하여 수평상태의 저울에 마우스를 담은 용기를 준비하고 영점을 조절한 후 마우스의 움직임이 미미할 시점에 수치를 측정하였으며, 이때 체중은 1주일 간격으로 4주 동안 일정한 시간에 측정하였다. 한편, 마우스의 복부 지방 측정을 위해, 상기 체중 측정이 끝난 마우스들은 경추탈골의 방법으로 희생시킨 후 가위로 겹겹질과 내피를 절개하여 드러난 복부 지방의 축적 정도를 확인하였다.

그 결과, 도 1A에서 나타낸 바와 같이, IDH2 유전자를 녹아웃시킨 형질전환 마우스의 경우, 고지방식을 실시한 실험군에서 정상마우스에 비해 무게가 크게 증가되었음을 확인할 수 있었다. 또한 도 1C에서 나타낸 바와 같이, 고지방식을 섭취한 IDH2 유전자 녹아웃 형질전환마우스에서 복부 지방의 축적 정도가 매우 증가되어 있음을 확인하였다.

**<실험예 2>**

**IDH2 유전자가 지방조직 총량 및 지방세포 크기에 미치는 영향**

본 실험에서는 IDH2 유전자의 유·무에 따른 고지방식이 조건에서 생체 내 지방조직 형성 및 지방세포 크기에 어떠한 영향을 주는지 확인하기 위하여, 상기 실시예 <2-2>를 통해 준비된 총 4그룹의 실험군 마우스들의 복부 지방을 채취하여 지방조직학적 분석을 실시하였다.

4주간 고지방식이/또는 정상식을 진행한 형질전환 마우스와 정상마우스 각각 총 4그룹의 마우스들을 경추탈골의 방법으로 희생시킨 후 가위로 겹겹질과 내피를 절개하여 드러난 복부 지방을 채취하여 조직의 크기를 비교하였다. 그런 다음 분리한 지방조직을 포르말린에 넣어서 고정화시키고 마이크로톰(microtome)을 이용하여 10 $\mu$ m의 두께로 잘라 조직슬라이드를 만든 후 F4/80 항체를 이용하여 지방에서 염색을 통하여 조직에서의 발현을 비교해 보았다(F4/80은 대식세포의 표면 마커로서 대식세포의 침윤 여부를 확인할 수 있음). 자세하게는, 분리한 지방조직을 4% 파라포름알데하이드 내에서 고정시키고 냉동 마이크로톰(Thermo Scientific, Germany)을 사용하여 10  $\mu$ m 섹션으로 잘라 조직슬라이드를 만들었다. 면역조직화학 염색을 위해서, 상기 섹션을 F4/80(1:2000 희석; Abcam)에 대한 1차 항체와 함께 인큐베이션하였다. 그런 다음 PBS내에서 세척한 후에, 섹션을 비오틴닐화한 2차 항체내에서 인큐베이션하였다. 이어서 조직을 아비딘-퍼옥시다아제 복합체(ABC Elite Kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA)내에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 이후 PBS내에서 세척한 후에, 면역복합체는 PBS내의 0.08% 과산화수소를 포함하는 3,3'-디아미노벤지딘 용액을 사용하여 시각화하였다. 섹션을 농도 구배 알코올을 연속적으로 처리하여 탈수시키고, 크실렌으로 제거한 후 Permount (Sigma-Aldrich)를 사용하여 커버슬립상에 놓은 후 전자현미경을 통해 지방조직에서 F4/80의 발현 정도를 분석하였다.

그 결과 도 2A에서 나타낸 바와 같이, 고지방식을 섭취한 IDH2 유전자를 녹아웃시킨 형질전환 마우스에서 백색지방 조직의 총량이 정상마우스에 비해 현저하게 많이 얻어지는 것을 확인할 수 있었다. 참고로, 백색지방은 체내에서 과잉의 에너지를 중성지방으로 저장하는 역할을 하며, 따라서 운동부족이나 과식으로 에너지 과잉이 발생하게 되면 백색 지방세포의 크기와 수가 늘어나게 되고 결국 비만이 유도되어 살찌기 쉬운 체질로 되는 것으로 알려져 있다.

또한 도 2B에서 나타낸 바와 같이, 고지방식을 섭취한 IDH2 유전자를 녹아웃시킨 형질전환 마우스의 지방이 고지방식을 섭취한 정상마우스의 지방보다 지방세포의 사이즈가 커져 있음을 확인할 수 있었으며, 대식세포의 침윤이 증가되어 있음을 알 수 있었다.

**<실험예 3>**

**IDH2 유전자가 간조직에서의 지방간 및 대식세포 침윤에 미치는 영향**

- [0085] 본 실험에서는 IDH2 유전자의 유·무에 따른 고지방식이 조건에서 간 조직 내에서의 지방간 형성 및 대식세포 침윤에 어떠한 영향을 주는지 확인하기 위하여, 상기 실시예 <2-2>를 통해 준비된 총 4그룹의 실험군 마우스들의 간 조직을 채취하여 조직병리학적 분석 및 면역조직화학 분석을 실시하였다.
- [0086] 4주간 고지방식이/또는 정상식이를 진행한 형질전환 마우스와 정상마우스 각각 총 4그룹의 마우스들을 경추탈골의 방법으로 희생시킨 후 간을 절개하여 드러낸 후 간의 크기를 비교하였다. 그런 다음 분리한 간 조직을 포르말린에 넣어서 고정화시키고 마이크로톰(microtome)을 이용하여 10 $\mu$ m의 두께로 잘라 조직슬라이드를 만든 후 헤마톡실린 (Hematoxylin)과 에오신 (Eosin)으로 간 조직을 염색하여 형질전환 마우스와 정상마우스의 조직 형태를 비교하였다. 또한 F4/80 항체를 이용하여 간에 염색을 통하여 조직에서의 발현을 비교해 보았다. 자세하게는, 분리한 간 조직을 4% 파라포름알데하이드 내에서 고정시키고 냉동 마이크로톰(Thermo Scientific, Germany)을 사용하여 10 $\mu$ m 섹션으로 잘라 조직슬라이드를 만들었다. 상기 섹션은 먼저 조직병리학적 검사를 위해 H&E(hematoxylin and eosin) 염색을 실시하였다. 또한, 면역조직화학적 분석은 상기 실험예 2와 동일한 방식으로 진행하였다.
- [0087] 그 결과 도 3A에서 나타낸 바와 같이, 고지방식이를 섭취한 IDH2 유전자를 녹아웃시킨 형질전환 마우스의 간 조직에서는 지방간의 양상이 나타남을 확인할 수 있었다. 또한 도 3B에서 나타낸 바와 같이, 고지방식이를 섭취한 정상마우스의 간 조직과 비교하여 고지방식이를 섭취한 IDH2 유전자를 녹아웃시킨 형질전환 마우스의 간 조직에서 지방이 더욱 많이 차 있음을 알 수 있었다. 또한, 도 3C에서 나타낸 바와 같이, 고지방식이를 섭취한 IDH2 유전자를 녹아웃시킨 형질전환 마우스의 간 조직에서 대식세포의 침윤도 증가됨을 확인할 수 있었다.
- [0088] **<실험예 4>**
- [0089] **IDH2 유전자가 포도당 내성 및 인슐린 내성에 미치는 영향**
- [0090] 본 실험에서는 IDH2 유전자의 유·무에 따른 고지방식이 조건에서 포도당 내성 및 인슐린 내성에 어떠한 영향을 주는지 확인하기 위하여, 상기 실시예 <2-2>를 통해 준비된 총 4그룹의 실험군 마우스를 이용하여 포도당 내성 테스트 (GTT, glucose tolerance test)와 인슐린 내성 테스트 (ITT, Insulin tolerance test)를 실시하였다.
- [0091] 포도당 내성 테스트는 상기 실시예 <2-2>를 통해 준비된 총 4그룹의 실험군 마우스 각각을 12시간 절식시킨 후 꼬리부분에서 혈액을 채취하여 혈당측정기로 혈당을 측정한다. 이후, 상기 각 실험군의 마우스에 포도당 2.5g/kg body weight의 농도를 복강에 주입한 다음, 2시간 동안 30분 간격으로 혈당측정기(Accucheck performa, Roche Diagnostics GmbH, Germany)를 이용하여 혈당을 측정하였다.
- [0092] 한편, 인슐린 내성 테스트는 상기 실시예 <2-2>를 통해 준비된 총 4그룹의 실험군 마우스 각각을 5시간 동안 절식시킨 후 혈당측정기로 혈당을 측정한다. 이후, 상기 각 실험군의 마우스에 0.75U/kg body weight의 농도로 복강에 주입한 다음, 2시간 동안 30분 간격으로 혈당측정기를 이용하여 혈당을 측정하였다.
- [0093] 그 결과 도 4A에서 나타낸 바와 같이, 고지방식이를 섭취한 마우스는 정상식이를 섭취한 마우스에 비해 유의적으로 높은 혈당수치를 나타내었는데 이는 비만이 원인임을 알 수 있었다. 한편, 고지방식이를 섭취한 정상마우스와 비교하여, 고지방식이를 섭취한 IDH2 유전자를 녹아웃시킨 형질전환 마우스에서 당부하가 월등히 크게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.
- [0094] 또한, 도 4B에서 나타낸 바와 같이, 고지방식이 실험군에서 인슐린에 대한 내성이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이때 고지방식이를 섭취한 IDH2 유전자를 녹아웃시킨 형질전환 마우스에서는 인슐린의 내성이 증가하지 않는 작용이 나타남을 알 수 있는데, 이는 인슐린 내성에 장애가 나타났다는 것을 알 수 있다.
- [0095] **<실험예 5>**
- [0096] **IDH2 유전자가 비만 지표 유전자들의 발현에 미치는 영향**
- [0097] IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-6, F4/80, MCP-1은 비만 세포 분화도의 증가시 발현이 함께 증가된다고 알려진 비만 지표 유전자로 알려져 있다. 본 실험에서는 IDH2 유전자의 유·무에 따른 고지방식이 조건에서 상기 비만 지표 유전자들의 발현을 조사하기 위하여, RT-PCR을 통해 IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-6, F4/80, MCP-1 유전자의 발현을 측정하였다.

[0098]

상기 실시예 <2-2>를 통해 준비된 총 4그룹의 실험군 마우스를 경추탈골의 방법으로 희생시킨 후, 복부에서 지방조직을 1g 채취하여 이를 Tri-regent 200 $\mu$ l를 넣은 후, 분쇄기로 조직을 분쇄하였다. 그 후 Tri-regent 800 $\mu$ l를 더 첨가한 후, 클로로포름 200 $\mu$ l를 넣고 강하게 섞어주었다. 원심분리기 12000rpm, 10분간 돌린 후 상층부의 투명한 부분을 조심스럽게 채취한 후 이소프로판올 500 $\mu$ l와 약하게 섞어주었다. 약 15분 후, 원심분리기 12000rpm, 15분간 돌린 후 침전물만 남기고 버린다. 그 후 에탄올로 씻어낸 후 DEPC water로 침전물을 녹인 후 정량을 하고 1 $\mu$ g의 RNA로 cDNA를 합성한 후, 하기 표 2에서 나타내는 IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-6, F4/80, MCP-1 유전자들의 증폭을 위한 각각의 프라이머를 사용하여 95 $^{\circ}$ C 10초, 58 $^{\circ}$ C 10초, 72 $^{\circ}$ C 10초, 총 40 cycles 조건으로 정량 RT-PCR을 수행하였다.

표 2

[0099]

PCR 수행에 사용된 프라이머 서열

| 유전자           | 프라이머 서열(5' -3') |                          |
|---------------|-----------------|--------------------------|
| IL-10         | 포워드             | GCTCTTACTGACTGGCATGAG    |
|               | 리버스             | CGCAGCTCTAGGAGCATGTG     |
| TNF- $\alpha$ | 포워드             | CCCTCACACTCAGATCATCTTCT  |
|               | 리버스             | GCTACGACGTGGGCTACAG      |
| IL-6          | 포워드             | TCTATACCACTTCACAAGTCGGA  |
|               | 리버스             | GAATTGCCATTGCACAACCTCTTT |
| F4/80         | 포워드             | CCCAGCTTATGCCACCTGCA     |
|               | 리버스             | TCCAGGCCCTGGAACATTGG     |
| MCP-1         | 포워드             | ATGGTCAAGAGTTTGCAGCTT    |
|               | 리버스             | CCTGAATTTTGGGAGAGTGTGAT  |

[0100]

그 결과 도 5에서 나타낸 바와 같이, 고지방식이를 섭취한 정상마우스의 지방조직과 비교하여 고지방식이를 섭취한 IDH2 유전자를 녹아웃시킨 형질전환 마우스의 지방조직에서 상기 IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-6, F4/80, MCP-1의 유전자 발현이 현저하게 증가됨을 확인할 수 있었다.

[0101]

이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

## 부호의 설명

[0102]

IDH2: Isocitrate dehydrogenase 2

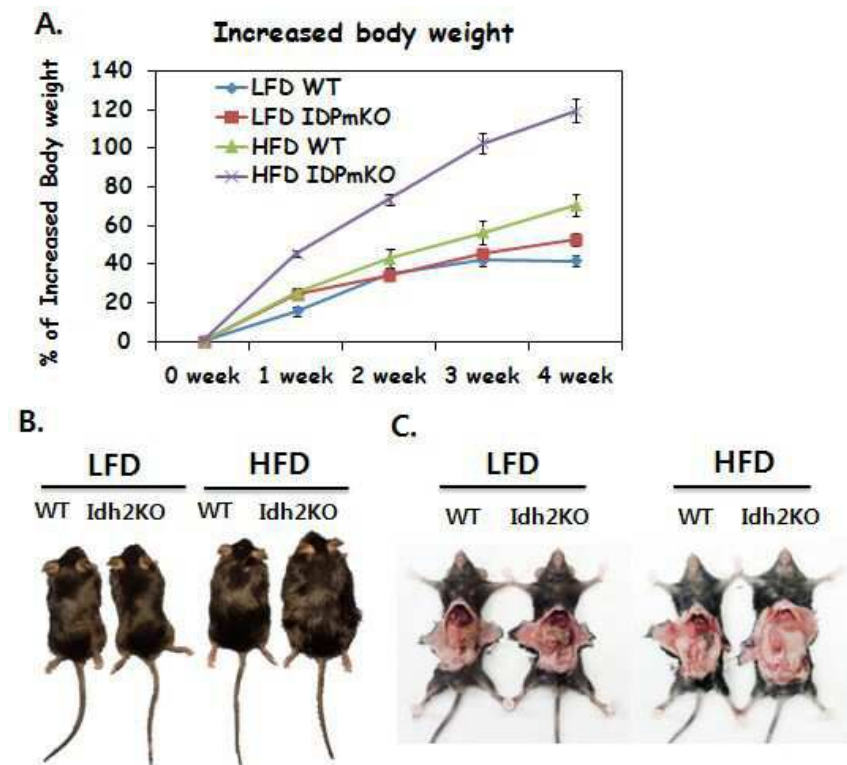
IDH2 KO: IDH2 Knock-out

LFD: law fat diet

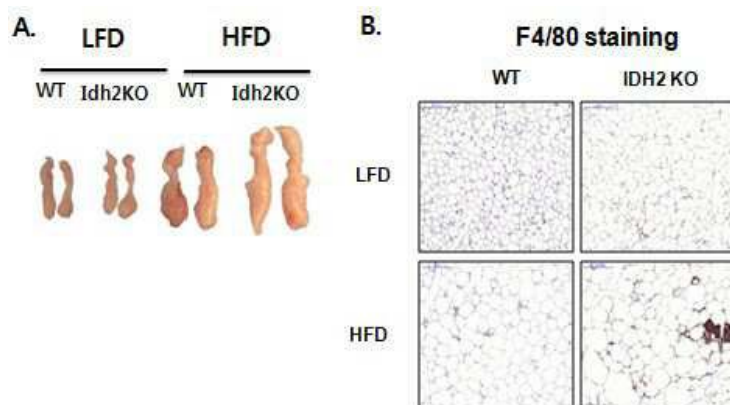
HFD: high fat diet

도면

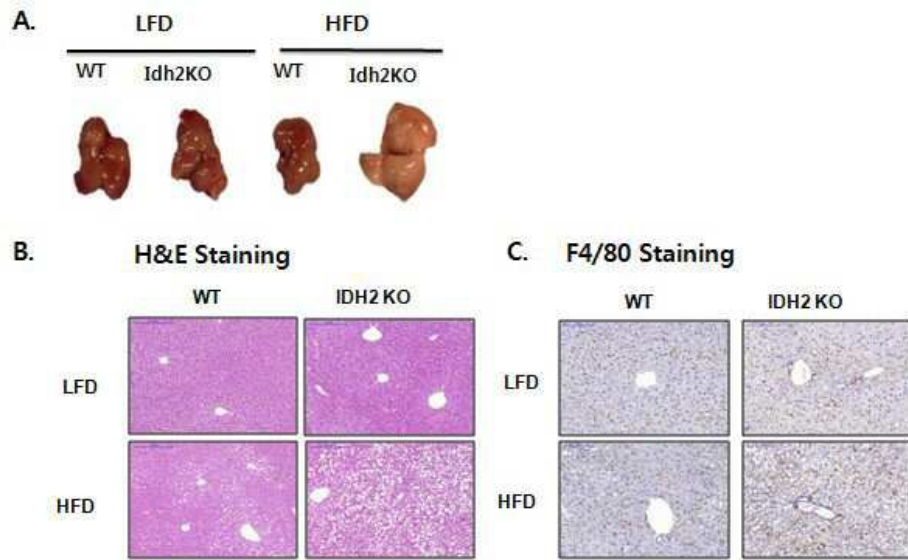
도면1



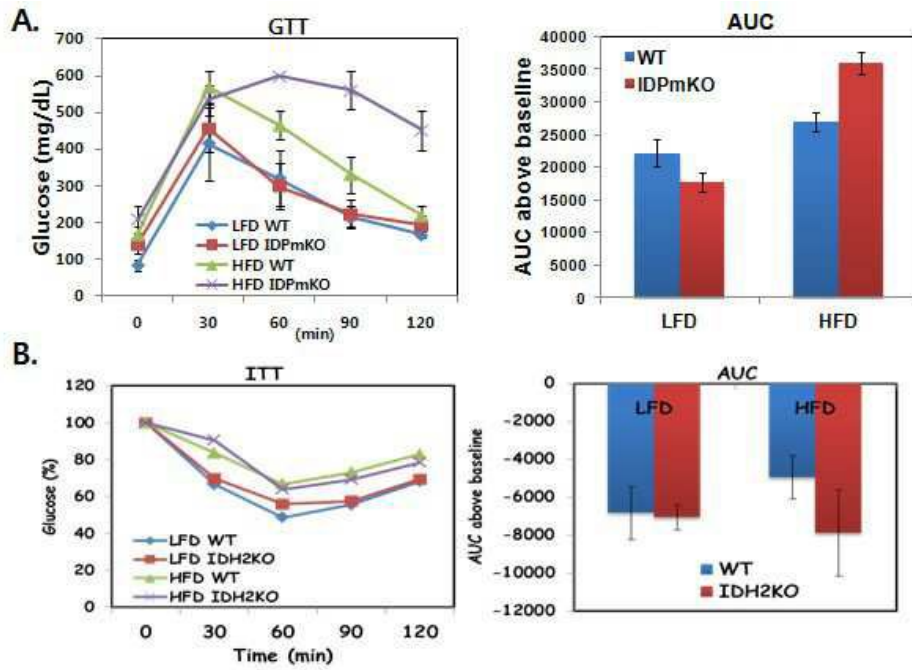
도면2



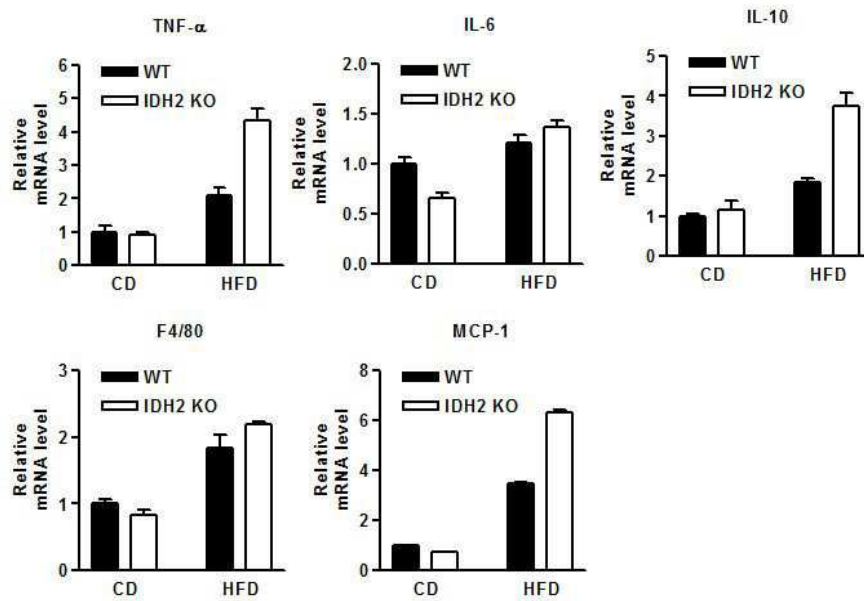
도면3



도면4



도면5



서열목록

- <110> INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION KEIMYUNG UNIVERSITY
- <120> Composition for preventing or treating obesity or metabolic diseases comprising IDH2 as an active ingredient
- <130> PN1405-145
- <160> 2
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 452
- <212> PRT
- <213> IDH2 protein amino acid sequence(source\_Mus musculus)
- <400> 1

Met Ala Gly Tyr Leu Arg Ala Val Ser Ser Leu Cys Arg Ala Ser Gly

1 5 10 15

Ser Ala Arg Thr Trp Ala Pro Ala Ala Leu Thr Val Pro Ser Trp Pro

20 25 30

Glu Gln Pro Arg Arg His Tyr Ala Glu Lys Arg Ile Lys Val Glu Lys

35 40 45

Pro Val Val Glu Met Asp Gly Asp Glu Met Thr Arg Ile Ile Trp Gln

50 55 60

Phe Ile Lys Glu Lys Leu Ile Leu Pro His Val Asp Val Gln Leu Lys  
 65 70 75 80  
 Tyr Phe Asp Leu Gly Leu Pro Asn Arg Asp Gln Thr Asn Asp Gln Val  
 85 90 95  
 Thr Ile Asp Ser Ala Leu Ala Thr Gln Lys Tyr Ser Val Ala Val Lys  
 100 105 110  
 Cys Ala Thr Ile Thr Pro Asp Glu Ala Arg Val Glu Glu Phe Lys Leu  
 115 120 125  
 Lys Lys Met Trp Lys Ser Pro Asn Gly Thr Ile Arg Asn Ile Leu Gly  
 130 135 140  
 Gly Thr Val Phe Arg Glu Pro Ile Ile Cys Lys Asn Ile Pro Arg Leu  
 145 150 155 160  
 Val Pro Gly Trp Thr Lys Pro Ile Thr Ile Gly Arg His Ala His Gly  
 165 170 175  
 Asp Gln Tyr Lys Ala Thr Asp Phe Val Val Asp Arg Ala Gly Thr Phe  
 180 185 190  
 Lys Leu Val Phe Thr Pro Lys Asp Gly Ser Ser Ala Lys Glu Trp Glu  
 195 200 205  
 Val Tyr Asn Phe Pro Ala Gly Gly Val Gly Met Gly Met Tyr Asn Thr  
 210 215 220  
 Asp Glu Ser Ile Ser Gly Phe Ala His Ser Cys Phe Gln Tyr Ser Ile  
 225 230 235 240  
 Gln Lys Lys Trp Pro Leu Tyr Leu Ser Thr Lys Asn Thr Ile Leu Lys  
 245 250 255  
 Ala Tyr Asp Gly Arg Phe Lys Asp Ile Phe Gln Glu Ile Phe Asp Lys  
 260 265 270  
 His Tyr Lys Thr Asp Phe Asp Lys Asn Lys Ile Trp Tyr Glu His Arg  
 275 280 285  
 Leu Ile Asp Asp Met Val Ala Gln Val Leu Lys Ser Ser Gly Gly Phe  
 290 295 300  
 Val Trp Ala Cys Lys Asn Tyr Asp Gly Asp Val Gln Ser Asp Ile Leu

305                      310                      315                      320  
 Ala Gln Gly Phe Gly Ser Leu Gly Leu Met Thr Ser Val Leu Val Cys  
                                  325                      330                      335  
 Pro Asp Gly Lys Thr Ile Glu Ala Glu Ala Ala His Gly Thr Val Thr  
                                  340                      345                      350  
 Arg His Tyr Arg Glu His Gln Lys Gly Arg Pro Thr Ser Thr Asn Pro  
                                  355                      360                      365  
 Ile Ala Ser Ile Phe Ala Trp Thr Arg Gly Leu Glu His Arg Gly Lys

                                 370                      375                      380  
 Leu Asp Gly Asn Gln Asp Leu Ile Arg Phe Ala Gln Thr Leu Glu Lys  
 385                      390                      395                      400  
 Val Cys Val Gln Thr Val Glu Ser Gly Ala Met Thr Lys Asp Leu Ala  
                                  405                      410                      415  
 Gly Cys Ile His Gly Leu Ser Asn Val Lys Leu Asn Glu His Phe Leu  
                                  420                      425                      430  
 Asn Thr Thr Asp Phe Leu Asp Thr Ile Lys Ser Asn Leu Asp Arg Ala  
                                  435                      440                      445

Leu Gly Lys Gln

450  
 <210> 2  
 <211> 1359  
 <212> DNA  
 <213> IDH2 encoding polynucleotide sequence(source\_Mus musculus)  
 <400> 2

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| atggccggct acctgcgggc tgtgagctcg ctctgcagag cctcgggctc agcgcggacc  | 60  |
| tgggcaccgg cagcactgac tgtccccagc tggccgggagc agccgcggcg ccactatgct | 120 |
| gagaagagga tcaaggtgga gaagccggta gtggagatgg acggtgacga gatgaccggg  | 180 |
| atcatctggc agttcatcaa ggagaagctc atcctgcctc acgtggatgt tcagctcaag  | 240 |
| tattttgacc ttgggcttcc aaaccgtgac cagaccaatg accaggtcac cattgactct  | 300 |
|                                                                    |     |
| gctctggcca cccagaagta cagtgtggct gtcaagtgtg ccacaatcac ccctgatgag  | 360 |
| gcccgtgtgg aagagttcaa gctgaagaaa atgtggaaga gccctaacgg aacgatccgg  | 420 |
| aacatccttg ggggaaccgt cttcagagag ccaatcatct gcaaaaacat cccccgcctt  | 480 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| gtccctggct ggaccaagcc catcaccatt ggcaggcacg cccatggcga ccagtacaag  | 540  |
| gccacagatt ttgtggtaga tcgagctggc acgttcaagt tggctttcac cccaaaggat  | 600  |
| ggcagcagtg ccaaggagtg ggaggtgtat aacttccctg ccggaggcgt tgggatgggg  | 660  |
| atgtacaaca ccgacgagtc catttcgggc ttgcgcaca gctgcttcca gtactctatc   | 720  |
|                                                                    |      |
| cagaagaaat ggccgctcta cttgagcacc aagaacacca ttctgaaggc ctatgacggg  | 780  |
| cgtttcaagg acatcttcca ggagatcttt gacaagcact ataagactga cttcgacaag  | 840  |
| aataagatct ggtatgaaca tcggctcatc gacgacatgg tggcccaggt gctcaagtct  | 900  |
| tccggtggct ttgtgtgggc ttgcaaaaac tatgatggag acgtgcagtc tgacatcctg  | 960  |
| gctcaaggct ttggctccct cggcctgatg acatctgtgc tggctctgcc tgatgggaag  | 1020 |
| acaattgagg ctgaggctgc tcatgggaca gtcacccgcc attaccgaga acaccagaag  | 1080 |
| ggccggccca ccagtaccaa ccctattgcc agcatctttg cctggacacg gggctctggag | 1140 |
|                                                                    |      |
| catcgtggga agctggatgg gaaccaggac cttatcaggt ttgcacagac gctggagaag  | 1200 |
| gtgtgcgtgc agactgtgga gagcggagcg atgaccaagg acctggctgg ctgtatccat  | 1260 |
| ggcctcagca atgtgaagct gaacgagcac ttctgaaca ccacagactt cctggacacc   | 1320 |
| attaagagca acctggacag agctctgggc aagcagtag                         | 1359 |