(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년11월03일
(11) 등록번호 10-0925017
(24) 등록일자 2009년10월28일

(51) Int. Cl.
A61K 38/26 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2004-7003458
(22) 출원일자 2002년09월09일
심사청구일자 2007년08월30일
(85) 번역문제출일자 2004년03월08일
(65) 공개번호 10-2005-0026685
(43) 공개일자 2005년03월15일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2002/004082
(87) 국제공개번호 WO 2003/022304
국제공개일자 2003년03월20일
(30) 우선권주장
0121709.0 2001년09월07일 영국(GB)
(56) 선행기술조사문헌
EP00795562 A1
US05650390 A1
Gastroenterology. 1997 Jun;112(6):1961-70
Endocrinology, v.115 no.1, pp.102-105
전체 청구항 수 : 총 8 항

(73) 특허권자
임페리얼 이노베이션스 리미티드
영국 런던 에스더블유7 2에이제트 임페리얼컬리지 일렉트리컬 앤드 일렉트로닉 엔지니어링 빌딩 레벨 12
(72) 발명자
블룸,스티븐로버트
영국,런던에스더블유72큐에이,임페리얼컬리지,셔필드빌딩,임페리얼컬리지이노베이션스리미티드
그하테이,모하메드알리
영국,런던에스더블유72큐에이,임페리얼컬리지,셔필드빌딩,임페리얼컬리지이노베이션스리미티드
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

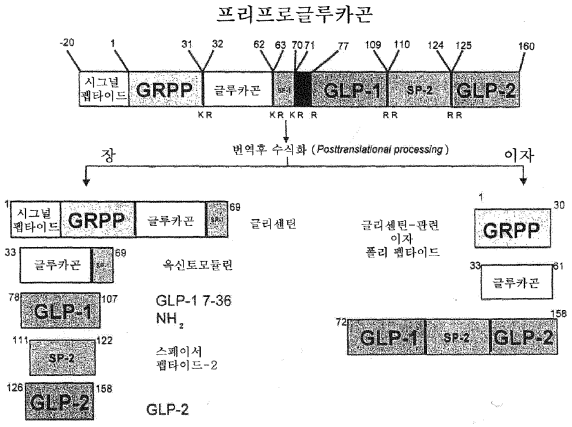
심사관 : 조경주

(54) 과체중의 예방 또는 치료를 위한 옥신토모듈린

(57) 요 약

본 발명은 포유 동물에서 과체중을 예방 또는 치료하기 위한 조성물과 방법에 관한 것이다. 조성물은 음식물 섭취를 감소시키는 것으로 보이는 옥신토모듈린을 포함한다.

대 표 도



(72) 발명자

스몰,케롤린제인

영국,런던에스더블유72큐에이,임페리얼컬리지,셔필드빌딩,임페리얼컬리지이노베이션스리미티드

다킨,캐서린루이스

영국,런던에스더블유72큐에이,임페리얼컬리지,셔필드빌딩,임페리얼컬리지이노베이션스리미티드

특허청구의 범위

청구항 1

옥신토모듈린을 유효성분으로 포함하는, 인간에서 과체중을 치료하기 위한, 경구, 비경구, 점막(mucosal), 직장, 피하 또는 경피성 투여용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 과체중이 비만인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 옥신토모듈린은 인간의 옥신토모듈린인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 옥신토모듈린은 서열번호 1로 나타내어지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 옥신토모듈린은 염의 형태 또는 금속의 존재하에서 제공되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 옥신토모듈린은 인간, 소, 돼지, 랫트, 햄스터, 장어, 아귀에서 유래된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 조성물은 흡입에 의한 투여 또는 입, 혀밑, 비강 투여용에 적합한 제형인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서, 옥신토모듈린은 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol), 폴리비닐피롤리돈(polyvinyl pyrrolidone), 폴리비닐알코올, 또는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체(copolymers)와 접합(conjugation)된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

명 세 서

기 술 분 야

<1> 본 발명은 포유 동물의 체중 감량을 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 흔히 발생하는 질병 중 효과적인 치료법이 없는 것으로 비만을 들 수 있다.

<3> 이는 삶의 질을 떨어뜨리고 다른 질병 발생의 위험을 증가시키는 쇠약 상태의 일종이다.

<4> 미국 내 성인 인구의 25%가 현재 임상적 비만으로 간주된다. 한 해에 450억 달러의 의료비용, 즉 연간 의료비 지출의 8%가 직접적으로 비만에 기인한다고 추정되고 있다.

<5> 유럽에서는 문제가 더 심각해지고 있다. 새로운 접근방법이 개발되지 않는다면 영국 인구의 20%이상이 2005년까지 임상적 비만이 될 것으로 보고되었다. 의학 전문가들과 보건계의 권위자들 사이에 비만이 대사 질환이라는 인식이 확산 되고 있다. 그러나 비만의 장기적인 관리에 있어서 식이요법, 운동과 병행하여 사용될 수 있는 효과적이고 안전한 의약품이 부족하다.

<6> 본 발명의 목적은 이러한 의약품을 제공하고, 또한 이들 의약품들의 계속된 개발과 특정을 위한 방법을 제공하는 것이다.

발명의 상세한 설명

<7> 프리프로글루카곤(preproglucagon)은 160개 아미노산으로 이루어진 펩타이드로, 프로호르몬 컨버타아제-1(prohormone convertase-1)과 -2에 의해서 조직 특이적인 방법으로 절단되어, 중추신경계(CNS)와 말초 조직 모두에서 다양한 기능을 가진 다수의 생성물을 만든다.

<8> 도 A에서 보듯이 장내와 중추신경계 내에서 프리프로글루카곤 절단의 주된 번역 후 생성물(post-translational products)이 유사글루카곤펩타이드-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1), 유사글루카곤펩타이드-2(glucagon-like peptide-2, GLP-2), 글리센틴(glicentin)과 옥신토모듈린(oxyntomodulin, OXM)이다. 현재까지 OXM의 중추신경계 내에서의 역할은 밝혀진 바 없다.

<9> GLP-1과 GLP-2가 음식물의 섭취를 억제하는 것으로 여겨져 온 반면에, OXM 펩타이드의 그와 같은 역할은 증명된 바 없다. 생물학적 활성 펩타이드로서의 OXM의 중요성은 아직 증명되지 않았다.

<10> 예상과 달리, 놀랍게도, OXM 펩타이드가 음식물의 섭취를 억제하고 체중을 감소시킬 수 있다는 사실이 발견되었다.

<11> 따라서 본 발명은 첫번째 측면으로 포유 동물의 과체중 예방 또는 치료에 사용하기 위한 OXM을 포함하는 조성물을 제공한다.

<12> 본원에서 옥신토모듈린이란 용어는 OXM과 동일하며, 하기하는 바와 같이 OXM 펩타이드 서열이나 그 유사체를 포함하는 여하한 조성물과 관련된다:

<13> OXM 서열은 당 업계에 주지되어 있으며 문헌화 되어 있다. 본원 발명은 여기서 인용한 모든 서열들에 관한 것이며 특히, **서열번호 1**로 기재되는 소의 OXM 서열(www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db+protein&val=121479, 돼지의 OXM 서열과 동일), **서열번호 2**로 기재되는 아귀의 OXM 서열, **서열번호 3**으로 기재되는 장어의 OXM 서열, 서열번호 5로 기재되는 인간의 OXM 서열(www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?121484:OLD09:43184, 래트 햄스터 서열과 동일)을 포함한다.

<14> 또한 본원에서 사용된 옥신토모듈린이라는 용어는 상기한 OXM 서열들의 유사체로서 1번 위치의 히스티딘 잔기(residue)가 그대로 있거나, 양전하를 띠는 방향성 모이어티(aromatic moiety) 또는 그 유도체로 치환된 경우를 포함한다. 바람직하게는 그 모이어티가 아미노산이거나 더욱 바람직하게는 히스티딘 유도체인 경우이다. 반면에, 상기 OXM 서열에서 나머지 아미노산 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 또는 22개는, 1번 위치의 히스티딘을 제외하고는 독립적으로 선택된 임의의 다른 아미노산에 의해 독립적으로 치환될 수 있다.

<15> 서열 안의 임의의 1 이상의(22개 까지) α-아미노산 잔기는 독립적으로 다른 α-아미노산 잔기에 의해 치환될 수 있다. 바람직하게는, 히스티딘을 제외한 다른 아미노산 잔기는 보존적 치환(conservative replacement)에 의하여 치환되는데 이는 당업계에 잘 알려져 있듯이 소수성(hydrophobic) 아미노산은 다른 소수성 아미노산으로 치환되는 것과 같이 비슷한 화학적 성질의 다른 아미노산으로 치환되는 것을 말한다.

<16> 위에서 논의된 바와 같이, 1 내지 22개의 아미노산은 치환될 수 있다. 위에서 언급한 치환의 경우뿐 아니라, 비필수적(non-essential)이거나 변형적(modified)이거나 동질이성질체에 의한(isomeric) 형태의 아미노산 치환도 가능하다. 예를 들어, 1에서 22개의 아미노산은 동질 이성질체(일례로 D-아미노산과 같은)로 치환 되거나, 노르(Nor)-아미노산(예로 노르-류우신 또는 노르-발린)과 같은 변형된 아미노산으로 치환되거나 필수적이지 않은 아미노산(일례로 타우린)으로 치환될 수 있다. 더 나아가 1에서 22개의의 아미노산은 측쇄(side chain)에 의해 연결된 상응하는 또는 다른 아미노산에 의해 치환될 수 있다(예를 들어 감마-결합(gamma-linked) 글루타민산). 위에서 논의된 각 치환에서 히스티딘 잔기는 변형되지 않거나 위에서 정의된 바와 같다.

<17> 더 나아가 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 잔기는 1번 위치의 히스티딘(또는 위에서 확정된 형태)을 제외하고는 OXM 서열에서 제거 될 수 있다. 이들 삭제된 잔기들은 2, 3, 4 또는 5개의 인접하거나 완전히 동떨어진 잔기들이 될 수 있다.

<18> OXM 서열의 C-말단은 아미노산이나 다른 모이어티를 추가적으로 덧붙여 변형될 수 있다. 상기 OXM은 이들의 해당 염의 형태로 제공될 수 있다. 약학적으로 허용되는 OXM 염과 그 유사체의 예로는 메탄설폰산(methanesulphonic acid), 벤젠설폰산(benzenesulphonic acid), 파라톨루엔설폰산(p-toluenesulphonic acid)과 같은 유기산들과 염산, 황산 등의 무기산으로부터 유도되어 각각 메탄설포네이트(methanesulphonate), 벤젠설포네이트(benzenesulphonate), 파라톨루엔설포네이트(p-toluenesulphonate)와 염산염, 황산염 등을 생성하는 것, 또는, 유기 또는 무기 염기와 같은 염기로부터 유도되는 것이 있다. 이 발명의 화합물들의 염을 형성하는

데 적합한 무기염기로는 암모니아, 리튬, 나트륨, 칼슘, 칼륨, 알루미늄, 철, 마그네슘, 아연 등의 수산화물, 카보네이트 그리고 바이카보네이트가 포함된다. 염은 또한 적합한 유기 염기에 의해서도 형성될 수 있다. 약학적으로 허용되는 본 발명의 화합물의 염기첨가염(base addition salts)을 형성하는데 적합한 유기 염기로는 독성이 없으면서 충분히 강력한 유기 염기들이 포함된다. 이들 유기 염기들은 이미 당 업계에 잘 알려져 있으며 아르기닌과 라이신과 같은 아미노산, 모노-, 디-, 또는 트리에탄올아민과 같은 모노-, 디- 또는 트리수산화알킬아민, 콜린(choline), 메틸아민, 디메틸아민, 트리메틸아민과 같은 모노-, 디- 또는 트리알킬아민, 구아니딘; N-메틸글루코사민(N-methylglucosamine); N-메틸피페라진(N-methylpiperazine); 모폴린(morpholine); 에틸렌디아민; N-벤질페네틸아민(N-benzylphenehtylamine); 트리(수산화메틸)아미노메탄; 등을 포함한다.

<19> 염은 당 업계에 주지된 통상의 방법으로 제조될 수 있다. 상기 기본 화합물들의 산첨가염(acid addtion salts)의 제조는 유리 염기(free base) 화합물을 수용액, 알코올수용액, 또는 필요한 산을 함유하는 다른 적절한 용매에 녹임으로써 가능하다. OXM이 산성기를 포함하는 경우에는 상기 화합물의 염기염은 당해 화합물을 적합한 염기와 반응시킴으로써 제조 가능 하다. 산 또는 염기염은 직접 분리 되거나 용액을 농축 시킴으로써(증발탈수법) 얻어질 수 있다. OXM은 또한 용매화물(solvated) 또는 수화물(hydrated)의 형태로 존재할 수 있다.

<20> 본 발명의 OXM은 하나 이상의 지질, 당, 단백질 또는 폴리펩타이드와 같은 그룹과 접합(conjugate)될 수 있다. OXM은 이들 그룹에 부착되거나(attached)(예를 들어 공유결합이나 이온결합에 의해) 이들과 연합될(associated) 수 있다. OXM이 이들 그룹에 부착된 경우에, C와 N말단 아미노산을 통해 결합이 연결되지 않는 것이 바람직하다. OXM은 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol), 폴리비닐피롤리돈(polyvinyl pyrrolidone), 폴리비닐알코올, 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체(copolymers), 셀룰로오스, 셀룰로오스 유도체, 키토산, 아카시아 검, 카라야 검, 구아 검, 잔탄 검, 트라가칸스(tragacanth), 알지닉산(alginic acid), 카라지난(carageenan), 아가로스(agarose), 퍼셀라란(furcellarans)과 같은 다당류, 덱스트란, 녹말, 녹말 유도체, 히알루로닉산, 폴리에스테르, 폴리아마이드, 폴리안하이드라이드, 폴리오르토에스테르와 같은 고분자 화합물(polymer)과도 결합할 수 있다.

<21> OXM은 화학적으로 변형될 수 있다. 특히 OXM의 아미노산 측쇄, N 말단 및/또는 C 말단이 변형될 수 있다. 예를 들어, OXM은 알킬화, 디설파이드 형성, 금속복합체 형성, 아실화, 에스테르화, 아마이드화, 니트로화, 산 처리, 염기 처리, 산화 또는 환원 중 하나 이상의 반응을 할 수 있다. 이들 반응을 수행하는 방법은 당 업계에 주지되어 있다. 특히, OXM은 그것의 저급알킬에스테르(lower alkyl ester), 저급알킬아마이드, 저급디알킬아마이드, 산첨가염, 카복실염, 또는 염기첨가염의 형태로 제공될 수 있다. 특히, OXM의 아미노 또는 카복실 말단은 예를 들어 에스테르화, 아마이드화, 아실화, 산화, 또는 환원 등에 의해 유도체화 될 수 있다. 특히 OXM의 카복실 말단은 유도체화되어 아마이드체(amide moiety)를 형성할 수 있다.

<22> OXM은 금속, 특히 2가 금속으로 처리될 수 있다. 따라서, 본 발명의 목적을 위하여 OXM은 아연, 칼슘, 마그네슘, 구리, 망간, 코발트, 몰리브데늄 또는 철 중 하나 이상의 존재 하에서 제공될 수 있다.

<23> OXM은 약학적으로 허용되는 담체(carrier)나 희석제(diluent)와 결합되어 제공될 수 있다. 적당한 담체 및/또는 희석제는 당 업계에 주지되어 있으며 의약품 용(pharmaceutical grade) 녹말, 마니톨(mannitol), 락토오스, 스테아르산 마그네슘 , 사카린 나트륨, 탈컴(talcum), 셀룰로오스, 글루코스, 수크로스, (또는 다른 당), 탄산 마그네슘, 젤라틴, 오일, 알코올, 계면활성제(detergent), 유화제 또는 물(멸균된 것이 바람직함)을 포함한다. 조성물은 혼합제제가 될 수도 있고, 동시, 분리, 또는 연속 사용(투약 포함)을 위한 결합 제제가 될 수도 있다. OXM은 결정성 고체나 가루, 수용액, 현탁액 또는 유중(in oil)제제로 제공될 수 있다.

<24> 전술한 용도를 위한 본 발명에 따른 조성물은 편리한 임의의 방법으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 경구(흡입 포함), 비경구, 점막(mucosal)(예: 입, 혀밑, 코), 직장, 피하 또는 경피성 투여가 가능하며, 그에 따라 조성물

은 적절히 변형될 수 있다

<25> 경구 투여를 위하여 조성물은, 액체나 고체로 제형화(formulate)될 수 있다. 예를 들어, 용액, 시럽, 현탁액이나 유상액(emulsions), 정제, 캡슐, 로젠지(lozenges) 등이 가능하다.

<26> 액체 제제는 일반적으로 그 화합물나 생리적으로 허용되는 염을 물, 에탄올, 글리세린, 폴리에틸렌, 글리콜, 또는 오일 등과 같은 적절한 수성 또는 비수성인 액체 담체에 섞어 만든 현탁액이나 용액으로 이루어 진다. 이러한 제제는 또한 부유제(suspending agent)나 방부제, 착색제, 방향제를 함유할 수 있다.

<27> 정제 형태의 조성물은, 고체 제제 조제를 위해서 통상적으로 사용되는 적절한 약학적 담체를 사용해서 조제될 수 있다. 이러한 담체의 예로써 스테아르산 마그네슘, 녹말, 락토오스, 수크로오스, 미정질(microcrystalline) 셀룰로오스가 있다.

<28> 캡슐 형태의 조성물은, 일상적인 캡슐화 과정에 의해 조제될 수 있다. 예를 들어, 활성 성분을 포함한 분말, 과립 또는 환약(pellets)등을 표준 담체를 이용하여 조제한 후 경질의 젤라틴 캡슐에 채워 넣을 수 있다. 다른 방법으로는, 적절한 약학적 담체, 즉 수용성 고무질, 셀룰로오스, 실리케이트 또는 오일을 사용한 분산물(dispersion)이나 현탁액을 조제하여 이를 연질의 젤라틴 캡슐에 채운다.

<29> 경구 투여를 위한 조성물들은, 소화관을 통과하는 동안에 활성 성분이 분해되지 않도록 보호하기 위해 디자인될 수 있다. 정제나 캡슐에서 제제를 외부 코팅하는 것이 예이다.

<30> 전형적인 비경구용 조성물은, 당해 화합물나 생리적으로 허용되는 염을 멸균된 적절한 수성 또는 비수성인 담체나 비경구적으로 허용되는 오일, 예를 들어, 폴리에틸렌글리콜, 폴리비닐피롤리돈(polyvinyl pyrrolidone), 레시틴(lecithin), 아라키스유(arachis oil) 또는 참기름(sesame oil)에 섞어 만든 현탁액이나 용액으로 조제될 수 있다. 당해 용액을 동결 건조하여(lyophilised) 투여 직전에 적절한 용매에 녹이는 것도 가능하다.

<31> 비강과 구강을 통한 투여를 위한 조성물은, 에어로졸(aerosols), 적제(drops), 겔, 그리고 분말로 편리하게 제형화할 수 있다. 전형적으로 에어로졸 제제는 활성 물질을 생리적으로 허용되는 수성 또는 비수성의 용매와 혼합한 용액이나 미세현탁액(fine suspension)을 포함하고, 일반적으로 1회 또는 수회 투여분이 멸균상태로 밀폐용기에 제공되는데, 이는 분무(atomizing) 장치와 같이 사용되기 위한 약포(cartridge)나 리필(refill)의 형태가 될 수 있다. 다르게는, 내용물이 소모된 후 폐기시키기 위한 1회 분량 코흡입기(nasal inhaler)나 계량 밸브가 장착된 에어로졸 디스펜서와 같은 일체형의(unitary) 투약 기구가 될 수 있다. 투여 형태가 에어로졸 디스펜서를 포함하는 경우에는 약학적으로 허용되는 추진제(propellant)를 함유하게 된다. 에어로졸 투여는 펌프-분무기(pump-atomiser)의 형태를 취할 수도 있다.

<32> 구강과 설하투여에 적합한 조성물에는 정제, 로젠지(lozenges), 향정(pastilles) 등이 포함된다. 여기서 활성 성분은 설탕과 아카시아, 트라가칸스, 또는 젤라틴과 글리세린과 같은 담체와 함께 제형화된다.

<33> 직장(rectal)이나 질(vaginal) 투여를 위한 조성물은 간편하게 좌약(코코아 버터와 같은 통상의 좌약 기제를 함유하는), 페서리(pessaries), 질정제(vaginal tabs), 폼(foam), 또는 관장제의 형태가 된다.

<34> 경피 투여를 위한 조성물은 연고, 겔, 패취 그리고 분말 주사제를 포함한 주사제를 포함한다.

<35> 조성물은 정제나 캡슐 또는 앰풀과 같은 단위 투여량(unit dose)의 형태를 취하는 것이 편리하다.

<36> OXM은 과체중을 막는 예방책이나 초과된 체중을 감량하는 치료책으로 사용될 수 있다.

<37> 포유 동물의 과체중 상태가 모두 임상적 비만으로 진단 받는 것은 아니지만, 과체중은 통상적으로는 비만이다. OXM은 액체, 고체, 또는 반고체 상태가 될 수 있다.

<38> 현대 사회에서, 포유 동물의 과체중을 예방 또는 치료하는 것이 절실히 요구된다. 포유 동물은 사람 외에도 말, 개과 동물(특히 애완용 개과 동물), 고양이과 동물(특히 애완용 고양이과 동물), 육류를 생산하는 돼지, 소, 양과 같은 다른 포유 동물을 포함할 수 있으나, 바람직하게는 사람이다. 본 발명은 기름기 없는 살코기 생산을 극대화하기 위하여 상기 동물들의 과체중 예방을 위해 사용될 수 있다.

<39> 본원 명세서 전체를 통해서 "예방(prevention)"이라는 용어는 여하한 정도의 과체중을 여하한 정도라도 경감(mitigate)시킬 수 있는 여하한 효과를 의미한다. 이 문서 전체를 통하여, "치료(treatment)"라는 용어는 과체중을 여하한 정도라도 개선(ameliorate)하는 것을 의미한다.

<40> 두 번째 측면으로서, 본 발명은 포유 동물에 있어서 과체중을 예방 또는 치료하는 방법, 즉, OXM으로 구성된 조성물을 포유 동물에 투여하는 방법을 제공한다. 그 포유 동물은 과체중을 예방 또는 치료할 필요가 있을 수 있다. 체중 감소는 미용상(cosmetic)의 이유도 될 수 있다. OXM을 포함하는 조성물은 유효 농도로 투여될 수 있다.

<41> 본 발명의 첫번째 측면의 모든 바람직한 기술 특징은 또한 두 번째 측면에도 적용된다.

<42> 본 발명의 세 번째 측면은 포유 동물에 있어서 미용상의 체중 감소를 위한 방법, 즉 OXM을 포함하는 조성물을 포유 동물에 투여하는 것에 관한 방법을 제공한다. 이 경우에, 체중 감소는 순전히 미용상 외관의 목적을 위한 것이다.

<43> 본 발명의 첫번째와 두 번째 측면의 모든 바람직한 기술 특징은 또한 세 번째 측면에도 적용된다.

<44> 이 이론에 얽매이지 않더라도, 본 발명이 포유 동물 체내로의 음식물 섭취의 억제제로 작용하는 OXM을 투여함으로써 과체중을 예방 또는 치료함은 자명하다. 이와 같이 감소된 음식물 섭취가 과체중을 예방 또는 치료하는 결과로 된다. 본원 명세서에서 "음식물(food)"이라 함은 섭식되어 열량을 발생시키는 물질을 말한다.

<45> 본 발명의 네 번째 측면은 과체중의 예방과 치료를 위한 의약의 제조에 있어서 OXM의 용도를 제공한다.

<46> 본 발명의 첫번째와 세 번째 측면의 모든 바람직한 기술 특징은 또한 네 번째 측면에도 적용된다.

<47> 본 발명의 첫번째 두 번째 그리고 네 번째 측면은 의약품에 관한 것이다. 의약품의 특정 투여 체제(particular

dosage regime)는 궁극적으로 주치의에 의해서 결정될 것이며, 이에 있어서 사용되는 OXM, 동물의 종류, 나이, 체중, 증상의 심각성 및/또는 적용될 치료의 강도 등의 요소와 약물의 투여방법, 부작용(adverse reaction)과 금기(contra indications) 등이 고려될 것이다. 환자의 경과와 회복을 철저히 관찰하여 표준적으로 설계된 임상적 실험(standard designed clinical trials)을 통해 특별히 확정된 투여 범위(dosage range)가 결정될 수 있다.

<48> 이와 같은 실험(trials)은 동물에서의 최대내량(maximum tolerated dose)의 낮은 백분율을 사람에서의 시작 투여량으로 사용하는 단계적 증가(escalating) 투여량 설계를 이용할 수 있다.

<49> 본 발명의 다섯번째 측면은 포유 동물에서 음식물 섭취를 방해하는 제제를 규명하기 위한 OXM의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 이 측면은 계속하여 과체중의 예방 또는 치료에 적합한 약제를 규명하고 개발하기 위한 수단을 제공한다.

<50> OXM의 용도는 펩타이드 자체의 용도를 포함할 수 도 있지만, OXM의 이론적 특성 또는 모델에 따른 용도를 포함할 수 있다. 이용된 OXM의 기능적 또는 구조적 특성은 펩타이드 그 자체의 특성일 수도 있지만 파마코포어(pharmacophore)(3차원 전자 밀도 지도)나 X-레이 결정 구조뿐 아니라 컴퓨터가 생성한 모델이나 물리적 2차원 또는 3차원 모델, 또는 전기적으로 생성된(예; 컴퓨터가 생성한) 1차, 2차, 또는 3차 구조의 특성일 수도 있다.

<51> 구조적 특성은 OXM과 상호 작용할 수 있고 이로 인하여 그 기능에 영향을 미치는 잠재적 제제의 확인을 가능하게 할 수 있다. 이러한 확인은 컴퓨터 모델링 및/또는 추론적 약제 설계(rational drug design)에 의할 수 있다.

<52> 본 발명에 있어서 각 측면의 바람직한 기술 특징은 각각의 다른 측면에 관하여 필요한 변경을 가하여(*mutatis mutandis*) 적용될 수 있다.

<53> 지금 부터 본원 발명을 하기 도면들을 참조하고 실시예를 통하여 기술한다.

실 시 예

<67> A - OXM은 ICV와 iPVN 주사시에 절식 유도 재섭식(fasting-induced refeeding)의 상당한 감소를 유발한다.

<68> 펩타이드와 시약

<69> GLP-1, 글리센틴, 글루카곤, 그리고 SP-1은 페닌슐라래버러토리, 인크.(영국, 헬렌스 스트리트)에서 구입하였다. OXM은 IAF 바이오켐파마(캐나다, 레이벌)에서 구입하였다. 엑센딘-4와 엑센딘-(9-39)는 영국, 런던, 해머스미스 호스피털, 클리니컬 사이언스 센터, 헤모스타시스 유닛, 메디컬 리서치 카운슬에서 396 MPS 펩타이드 합성기(어드밴스트켐테크 인크)로 F-moc 화학법을 이용하여 합성하였고 C_8 컬럼 역상(Reverse Phase) HPLC(영국, 마클레스필드, 페노멕스)로 정제하였다. 정확한 분자량은 질량분광법(mass spectrometry)으로 확인하였다. 모든 시약은 별도의 언급이 없으면 머크 앤 코(영국, 레이세스터, 루터워쓰)로부터 구입한 것이다.

<70> 동물

<71> 숫컷 성체 위스터 래트(Wistar rat)는 개개의 우리안에서 조절된 온도(21-23℃)와 광선(12시간 light, 12시간 darkness) 조건하에 음식물(RM1 다이어트, 영국, 위담, 스페셜 다이어트 서비시즈 유케이 리미티드)과 물에 대

한 임의(*ad libitum*) 접근이 가능한 상태에서 유지하였다. 연구가 끝날 때까지 동물들은 외과 수술로부터 회복된 후 매일 처리(handled daily)되었다. 모든 동물 관련 실험 과정의 실시는 브리티시 홈 오피스 애니멀(사이언티픽 프로시저스) 법령 1986(프로젝트 라이센스 PIL 90/1077)에 의해서 승인되었다.

<72> ICV, iPVN 삽관(cannulation)과 실험 물질의 주입

<73> 동물들에게 영구 스테인레스 스틸 유도 캐뉼러(permanent stainless steel guide cannulas)를 정위(stereotactically) ICV, iPVN 삽입하였다. 모든 연구는 명기(light phase) 초기, 09:00-11:00시에 24시간 절식 후 수행 하였고, 음식물의 섭취는 주사 후 1, 2, 4. 8, 24시간 경과시에 측정하였다.

<74> 섭식 연구 프로토콜

<75> 프로글루카곤 유도 생성물들과 관련 펩타이드의 음식물 섭취에 미치는 효과의 비교.

<76> 연구 1a에서 래트에 10㎕ 생리식염수, GLP-1(13nmol), OXM(3nmol), 글루카곤(3nmol), 또는 글리센틴(3nmol; n=8/군)을 ICV 주사했다.

<77> 모든 연구에서 **서열번호 1**로 기재되는 소의 OXM 서열과 **서열번호 4**로 기재되는 인간의 GLP-1 서열을 사용하였다.

<78> 연구 1b에서는 래트에 1㎕의 생리식염수, GLP-1(1.0 nmol), OXM(1.0 nmol), 글리센틴(1.0 nmol), 글루카곤(1.0 nmol) 또는 SP-1(3.0 nmol; n=12-15/군)를 iPVN 주사했다. 엑센딘-4는 ICV 주사하였을 때 GPL-1보다 더 강하게 음식물 섭취를 방해하였다. 그러므로, 엑센딘-4는 0.03 nmol의 투여량으로 iPVN 주사하였다.

<79> OXM의 증가된 투여량이 음식물 섭취에 미치는 영향의 조사

<80> 연구 2a에서는 래트에 생리식염수, GLP-1(3 nmol), 또는 OXM(0.3, 1, 3 또는 10 nmol; n=8/군)을 ICV 주사하였다. 연구 2b에서는 래트에 생리식염수, GLP-1(1.0 nmol), 또는 OXM(0.1, 0.3 또는 1.0 nmol; n=12-15/군)을 iPVN 주사하였다. OXM이 GLP-1의 수용체를 통하여 작용하는지를 판단하기 위하여 GLP-1 수용체의 길항제(antagonist)인 엑센딘-(9-39)를 이용한 연구를 수행하였다.

<81> 야간 섭식과 행동 분석

<82> 연구3. OXM이 비특이적 미각 혐오(taste averion)를 통하여 음식물의 섭취를 방해하는 것이며 이것이 진정한 포만 인자(satiety factor)가 아닐 가능성이 있다. 따라서 ICV 캐뉼러 삽입 래트에 GLP-1(3 nmol), OXM(3 nmol) 또는 생리식염수(n=6/군)를 암기의 시작 시점에 투여하였다. 음식물 섭취량을 주사 후 1시간 경과 시에 측정하였고, 행동을 판단하였다. 주사 후 1시간동안 행동 채점지(behavoural score sheet)를 이용하여 래트를 관찰하였다.

<83> 연구 4a에서는 래트에 생리식염수, GLP-1(3 nmol), GLP-1(3 nmol)과 엑센딘-(9-39)(30 nmol), OXM(3 nmol), OXM(3 nmol)과 엑센딘-(9-39)(30 nmol), 또는 단독 엑센딘-(9-39)(30 nmol)을 ICV 주사하였다. 연구 4b에서는 래트에 생리식염수, GLP-1(1 nmol), GLP-1(1 nmol)과 엑센딘-(9-39)(10 nmol), OXM(1 nmol), OXM(1 nmol)과 엑센딘-(9-39) (10 nmol), 또는 단독 엑센딘-(9-39)(10 nmol; n = 10-12/군)을 iPVN 주사하였다.

<84> 수용체 결합 분석, 연구 5.

<85> 수용체 결합 분석은 명시된 바와 같이 래트 시상하부막(200㎍ 단백질), 500 Bq(100 pM) [^{125}I] GLP-1, 그리고

비표식 경쟁 펩타이드(GLP-1 및 OXM)의 0.5 ml 최종 부피에서 수행하였다. 막은 실온에서 90분간 배양하였다. 결합된(bound) 방사능과 자유 방사능(free radioactivity)은 원심분리(centrifugation)에 의해서 분리하였다(2분, 4℃). 가라앉은(pelleted) 막은 검정 버퍼(assay buffer)(0.5 ml, 얼음 냉각)로 세척하고, 막은 상기한 바와 같이 원심분리 하였다. 상청액은 제거하고 γ-카운터를 이용하여 펠릿내의 방사능을 측정하였다. 1μm의 GLP-1 또는 OXM의 존재하(불포화 결합, nonsaturable binding)에서와 부존재하(총결합, total binding)에서 결합된 [^{125}I] GLP-1의 양의 차이로서 특이적(포화, saturable) 결합을 계산하였다. 모든 곡선은 3중의 점(points in triplicate)으로 구성하였다. IC_{50}값은 프리즘 3 프로그램(캘리포니아, 산 디에고, 그래프 패드 소프트웨어)으로 계산하였다.

<86> 통계

<87> 음식물 섭취 통계를 위하여 데이터는 평균±표준편차로 나타내었다. 실험군간의 통계적 차이는 분산분석(ANOVA)과 사후최소유의차 테스트(post-hoc LSD(least significant difference) test)에 의해 결정하였다. 행동 분석을 위해서는 각 행동 발생(occurrences of each behavior)의 중앙값(median number)과 범위(range)로 데이터를 표현하였다. 군들간의 비교는 만-위트니(Mann-Whitney) 유(U)-테스트(시스탯 8.0)을 사용하여 수행하였다. 모든 경우에 $P<0.05$는 통계적으로 유의한 것으로 보았다.

<88> 결과

<89> 프로글루카곤에서 유도된 생성물과 관련 펩타이드가 음식물 섭취에 미치는 영향의 비교.

<90> ICV 투여

<91> 연구 1a에서, OXM, GLP-1(3 nmol)은 ICV 주사시 재섭식을 상당량 감소시켰다. 이러한 억제 효과는 주사 후 4시간까지 지속되었다.(도 1a) 글루카곤과 글리센틴(3 nmol)은 어떤 시점에서도 음식물 섭취에 영향을 미치지 못했다(도 1a).

<92> iPVN 투여

<93> 연구 1b에서, OXM, GLP-1(3 nmol), 그리고 엑센딘-4(0.03 nmol)는 또한 iPVN 주사시 재섭식을 억제하였다. 이러한 억제효과는 주사 후 최소한 8시간 동안 유지되어 ICV로 주사되었을 때 보다 길었다(도 1b). 글리센틴, 글루카곤(1 nmol) 그리고 SP-1(3 nmol)은 iPVN으로 주사되었을때 어떤 시점에서도 음식을 섭취에 영향을 미치지 못하였다.

<94> OXM의 증가된 투여량이 음식물 섭취에 미치는 영향

<95> ICV 투여

<96> 연구 2a에서, OXM은 ICV 주사시 단위 투여량에 의존하는 방식으로 재섭식을 감소시켰는데, 3nmol의 투여량에서 주사 후 1, 2, 4시간 경과시 최대의 효과에 도달하였다(도 2a).

<97> iPVN 투여

<98> 연구 2b에서, GLP-1과 OXM(각각 1 nmol)의 iPVN 투여에 의하여 주사 후 8시간까지 음식물 섭취가 유의적으로 감소하였다(도 2b).

<99> ICV 캐뉼러 삽입 포식 래트에 있어서 암기의 시작 시점에서 OXM이 미치는 영향.

<100> 암기는 래트의 자연적 섭식 시간이다. 따라서, 이 시기 비절식 동물의 잠정적 포만 요소(putative satiety factor)를 판단하는 것은 더 많은 생리적인 효과를 보여 줄 것이다.

<101> 음식물 섭취에 OXM이 미치는 영향

<102> 연구 3a에서, 암기 초기에 주사된 GLP-1과 OXM(3 nmol) 모두 생리식염수 처리 동물과 비교하여 주사 후 1시간 경과시에 음식물 섭취를 유의적으로 감소시켰다.(도 3a)

<103> OXM의 ICV 주사 후 행동의 관찰

<104> 암기 초기의 OXM(3 nmol)의 ICV 투여로 인하여 섭식 에피소드(feeding episode)가 유의적으로 감소하고(연구 3a) 양육 행동(rearing behaviour)이 증가하였다(연구 3b)(도 3b). 몸을 청소하거나(grooming), 가만히 있거나(still), 고개를 숙이거나(head-down), 굴을 파거나(burrowing), 운동(locomotion)하는 것과 같은 다른 행동의 에피소드에는 변화가 없었다.

<105> OXM이 GLP-1R을 통하여 작용하는지를 판단하기 위하여 GLP-1R 길항제인 엑센딘-(9-39)를 이용하여 연구를 수행하였다.

<106> ICV 투여, 연구 4

<107> GLP-1 수용체의 길항제인 엑센딘-(9-39)와 GLP-1을 10:1(길항제/작용제)의 비율로 ICV 혼합 투여하였더니 GLP-1의 식욕감퇴(anorectic) 효과를 차단하였다.(도 4a) 더 나아가, 엑센딘-(9-39)와 OXM의 혼합 투여도 OXM의 식욕감퇴 효과를 약화시켰다(도 4a).

<108> iPVN 투여

<109> 유사하게, iPVN 주사된 GLP-1과 OXM의 식욕감퇴 효과 모두 엑센딘-(9-39)와의 혼합 주사시 차단되었다(도 4b).

<110> 수용체 결합 분석. 연구 5.

<111> 래트의 시상하부 막 제조(rat hypothalamic membrane preparations)에서 GLP-1의 GLP-1 수용체에 대한 친화도(IC_{50})는 0.16 nM(도 5)였다. 같은 막 제조에서 OXM의 GLP-1 수용체에 대한 친화도는 8.2 nM 였고,(도 5) 이는 GLP-1에 비하여 대략 2 차수 크기만큼(2 orders of magnitude) 약하다.

<112> 토론

<113> ICV와 iPVN로 주사되었을 때 모두, OXM은 절식 유도 섭식의 강한 감소를 유발시킨다. 이 효과는 주사 후 8시간(iPVN) 또는 4시간(ICV) 경과 후까지 지속 되었다. 동일 몰수의 투여량으로 ICV와 iPVN 투여되었을 때, OXM의 효과는 GLP-1의 그것과 양적으로나 시간 과정(time course)상으로 대략 동일하다. 또한 OXM은 암기의 시작 시점에서 비절식 래트의 음식물 섭취를 억제하며 그 때에 래트는 혐오 행동(aversive behaviour)의 징후를 나타내지 않았다.

<114> 위점막(gastric mucosa)에 OXM-특이적 결합 부위가 있다고 암시되어 왔다. 그러나 중추신경계에서는 그러한 결합 부위가 확인되지 않았다. 따라서 OXM과 GLP-1이 섭식 연구에 있어서 유사한 영향력을 가지므로, OXM이 그 효과를 시상하부 GLP-1R을 통하여 매개한다는 이론이 있었다. OXM은 GLP-1R에 대한 나노몰 농도의 친화도를 가진다고 알려져 있다(IC_{50}=8.2 nM). 이러한 친화도는 GLP-1에 비하여 대략 2 차수 크기만큼 약하다(IC_{50}=1.6 nM). 그러나 GLP-1R에 대한 이런 감소된 친화도에도 불구하고 OXM은 같은 크기로 음식물 섭취를 감소시킨다. 이에 대

한 한가지 설명으로는 OXM이 시상하부에서 GLP-1R과 자기 자신의 수용체 모두를 통하여 작용한다는 것이다. 따라서, OXM이 낮은 친화도에도 불구하고 GLP-1에 상당하는 반응을 도출해 낼 수 있었던 것이다.

<115> GLP-1R 작용제인 엑센딘-4의 단편(fragment)인 엑센딘-(9-39)는 강하고 선택적인 GLP-1R에 대한 길항제이다. GLP-1과 엑센딘-(9-39)이 혼합주사 되었을 때 GLP-1의 식욕감퇴 작용이 차단된다. OXM이 엑센딘-(9-39)과 혼합주사 될 때 OXM의 식욕감퇴 작용 역시 완전히 차단된다. 이는 OXM이 GLP-1R을 통하여 그 효과를 중개한다는 주장을 강하게 뒷받침한다.

<116> 본 발명자들은 절식 래트에 급성 ICV 주입된 후의 글리센틴과 글루카곤의 효과를 조사하였다. 이들 펩타이드 투여 후에 절식 유도 음식물 섭취에 대한 여하한 효과도 관찰되지 않았다. 더구나, 이들이 iPVN으로 주사된 경우에도 효과가 나타나지 않았다. OXM의 잠정적 최소 활성 구조(putative minimal active structure)인 SP-1이 iPVN 주사 되었을 때 음식물 섭취에 대한 아무런 억제도 나타나지 않았다. 따라서 OXM이 보이는 효과는 특이적이다.

<117> B - OXM의 말초성(peripheral) 투여 역시 음식물의 섭취와 체중 증가를 감소시킨다.

<118> 펩타이드와 시약

<119> OXM은 IAF 바이오켐파마(캐나다, 레이벌)로부터 구입하였다. GLP-1, 글리세린, 글루카곤, 그리고 SP-1은 페닌슐라래버러토리, 인크.(영국, 헬렌스 스트리트)에서 구입하였다. 엑센딘-(9-39)는 영국, 런던, 해머스미스 호스피털, 클리니컬 사이언스 센터, 헤모스타시스 유닛, 메디컬 리서치 카운슬에서 396 MPS 펩타이드 합성기(어드밴스트켐테크, 인크.)로 F-moc 화학법을 이용하여 합성하였고 C_8 컬럼상의 역상(Reverse Phase) HPLC(페노멕스, 영국, 마클레스필드)로 0.1%의 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid)에 아세토니트릴(acetonitrile) 그래디언트(gradient)를 이용하여 정제하였다. 정확한 분자량은 질량분광법으로 확인하였다. 모든 시약은 달리 언급이 없으면 머크 유로랩 리미티드(영국, 레이세스터, 루터워쓰)로부터 구입한 것이다.

<120> 동물

<121> 숫컷 성체 위스터 래트(180-200g)는 개개의 우리 안에서 조절된 온도(21-23℃)와 광선(12시간 명기, 12시간 암기) 조건하에 표준 래트 사료(RM1 다이어트, 영국, 위담, 스페셜 다이어트 서비시즈 유케이 리미티드)와 물에 대한 임의 접근이 가능한 상태에서 유지하였다. 모든 동물 관련 실험 과정의 착수는 브리티시 홈 오피스 애니멀스(사이언티픽 프로시저스) 법령 1986(프로젝트 라이센스 PPL: 90/1077, 70/5281과 70/5516)에 의해서 승인되었다.

<122> 궁상핵 내 삽관(intra-arcuate cannulation)

<123> 정수리점(bregma)에서 3.3 mm 후면, 0.3 mm 측면, 두개골 외부 표면의 9.0 mm 아래에 위치시킨 캐뉼러를 이용한 삽관 프로코콜(canulation protocol)을 이용하여, 영구적인 내재 일방 스테인레스 스틸 유도 캐뉼러(플라스틱스 원, VA, 로나노크)를 동물의 시상하부 궁상핵(arcuate nucleus) 안으로 정위 삽입하였다.

<124> 복강 내 주사(Intra-peritoneal(IP) injection)

<125> 모든 IP 주사는 1ml 주사기와 25 게이지 바늘을 이용하여 행해졌다. 주사의 최대용적은 500㎕이고 개개의 동물의 체중에 따라 조절되었다. 모든 펩타이드는 생리식염수에 용해시켰다.

<126> 이 연구에서 소의 OXM과 인간의 GLP-1은 각각 **서열번호 1**과 **서열번호 4**에서 제시된 서열을 사용하였다.

<127> 생체 내(in vivo) 프로토콜

<128> 1. OXM의 말초적 투여가 절식 동물의 음식물 섭취에 미치는 투여량-작용 효과의 조사:

<129> 동물들은 연구 전 24시간 동안 절식시켰다. 명기 초기 동안(09:00-10:00시)에 생리 식염수, GLP-1(양성대조군으로 30 nmol/kg 체중) 또는 OXM(10-300 nmol/kg 체중)(n = 12/군) 500 μl을 래트에게 1회 IP 주사하였다. 주사에 이어서, 동물들을 우리로 옮긴 후, 미리 무게를 잰 분량의 먹이를 주었다. 음식물 섭취량는 주사후 1, 2, 4, 8, 그리고 24 시간 경과시에 측정하였다.

<130> 2. OXM의 말초성 투여가 비절식 동물의 암기 동안의 음식물 섭취에 미치는 영향의 조사:

<131> 암기는 래트에게 정상적인 섭식 시간이다. 따라서 이 시간의 음식물 섭취에 대한 여하한 억제는 절식 이후에 재섭식에 대한 변화보다 더 생리적인 것으로 간주될 수 있다. 조명을 끄기에 앞서, 생리 식염수 또는 OXM(3-100 nmol/kg 체중) (n=12/군)을 동물에 1회 IP 주사하였다. 음식물 섭취량은 조명을 끈 후 1, 2, 4, 8 그리고 12 시간 경과 후에 측정하였다.

<132> 3. 반복적 OXM IP 주사의 효과

<133> 45개체의 동물을 체중에 따라 임의로 다음 세 군으로 나누었다(n = 15/군). 1) 음식물에 대한 임의 접근이 가능한 생리식염수 처리 군과 2) 음식물에 대한 임의 접근이 가능한 OXM 처리군(주사당 50 nmol/kg 체중 - 앞선 투여량-작용 실험에 근거한 투여량)과 3) OXM 처리군이 명기와 암기에 섭취하는 음식물 양의 중간으로 음식물 섭취를 제한한 생리식염수 처리군이 그것이다. 7일 동안 매일 2회씩 동물에 주사하였다(07:00시와 19:00시). 음식물 섭취량(g), 체중(g), 그리고 물 섭취량(ml)은 매일 측정하였다. 8일째 날에 동물들을 단두시켰다. 체내 비만정도(body adiposity)를 판단하기 위하여 부고환 백색 지방조직(epididymal white adipose tissue, WAT)과 견갑간 갈색 지방조직(interscapular brown edipose tissue, BAT)을 절단하여 무게를 측정하였다.

<134> 4. 위배출(gastric emptying)에 OXM의 말초성 투여가 미치는 영향의 조사

<135> 위가 비었다는 것을 확실히 하기 위하여 동물을 36시간 동안 절식 시켰다. 명기 초기 동안(09:00-10:00), 미리 중량을 측정한 표준 래트 먹이에 30분간 임의(*ad libitum*) 접근을 허용하였다. 그 시간이 지난 후, 음식물을 제거하고 그 중량을 재측정하였다. 그리고 나서, 생리식염수, OXM(50 nmol/kg 체중), 또는 CCK-8(15nmol/kg 체중)을 동물에게 IP 주사했다. 이들 래트는 앞선 섭식 연구에서 사용되었던 동물들과 바로 동일한 시점, 즉 주사 후 1, 2, 4, 또는 8 시간 경과시(군당, 시점당 n = 12)에 살해하였다. CCK-8 군은 2시간 경과 시에 대한 실험에서만 양성 대조군으로 사용되었다. 동물들은 이산화탄소로 질식사 시켰다. 신속히 복벽 절개(laparotomy)를 수행하여 위를 노출시켰다. 유문연접부(pyloric junction)를 잡아매고(ligated)(2.0 머실크, 존슨 앤드 존슨, 벨기에), 이어서 위-내사위 연접부(gastro-oesophogeal junction)를 잡아매어 위를 제거하였다. 위의 내용물을 모두 제거하며 미리 무게를 잰 웨잉 보우트(weighing boat)에 올려놓고 48시간 동안 자연 건조 시켰다. 일단 건조되면 내용물의 무게를 재고 위 속에 남아 있는 반시간의 재 섭식 시간동안 섭취된 먹이의 백분율을 다음 계산식을 이용하여 계산하였다:

<136> % 위속에 남아있는 음식물 = 위 내용물의 건조 중량×100/섭취된 음식물의 중량

<137> 5. OXM의 궁상핵내 투여량의 증가가 미치는 영향의 조사

<138> 궁상핵내(intra-arcuate, intra-ARC(iARC)) 캐뉼라 삽입 래트를 체중에 따라 임의 추출하여 6개 군으로 나누었다. 명기 초기 동안(09:00-10:00시), 생리식염수, OXM(0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 또는 1.0 nmol)을 24시간 절식 래트에게 iARC 주사하였다. 음식물 섭취량은 주사 후 1, 2, 4, 8 그리고 24시간 경과 시에 측정되었다.

<139> 6. 말초성 투여된 OXM이 궁상핵 GLP-1 수용체를 통하여 직접적으로 작용하는지 여부의 조사.

<140> 궁상핵내 캐뉼라 삽입된 래트를 체중에 따라 임의 추출하여 6개 군으로 나누었다(n = 10-12/군). 명기 초기 동안(09:00-10:00시), 24시간 절식 래트에 생리식염수 또는 엑센딘-(9-39)(5nmol)를 iARC 주입하고, 이어서 15분 후에 생리식염수, OXM(30 nmoles/kg 체중) 또는 GLP-1(30 nmoles/kg 체중)을 IP 주입했다. 주입에 대한 상세 사항은 아래 표1에서 기술하였다.

표 1

<141>

군	궁상핵내 주입	IP 주입
1	생리식염수	생리식염수
2	생리식염수	OXM(30 nmoles/kg)
3	생리식염수	GLP-1(30 nmoles/kg)
4	엑센딘 9-39(5 nmols)	생리식염수
5	엑센딘 9-39(5 nmols)	OXM(30 nmoles/kg)
6	엑센딘 9-39(5 nmols)	GLP-1(30 nmoles/kg)

<142> 면역조직화학법

<143> OXM(50 nmol/kg), CCK(15 nmol/kg) 또는 생리식염수를 IP 주사하고 90분 후 래트를 말단 마취하여 0.1M 인산버퍼 생리식염수(phosphate buffered saline, PBS)에 이어 4% PB-포르말린(PBF)로 심장을 통하여 관류(transcardially perfused)시켰다. 뇌를 제거하여 하룻밤 동안 PBF에 고정(post-fix)하고 나서 하룻밤 동안 PB-수크로오스(20% w/v)로 이동시켰다. 뇌와 뇌간의 관상부 40㎛를 동결 마이크로톰(freezing microtome)에서 절단하여 애비딘-바이오틴 퍼옥시다제(avidin-biotin peroxidase)법에 의한 포스-유사 면역반응(fos-like immunoreactivity, FLI)을 위하여 염색시켰다. 해당 절편을 폴리-L-라이신 코팅한 슬라이드에 올려놓고 에탄올 농도를 증가시키면서(50-100%) 탈수시키고 자일렌(xylene)으로 지질을 제거한 후 DPX 마운턴트(mountant)를 이용하여 커버슬립을 덮는다. FLI-양성 핵을 찾기 위하여 광학현미경(니콘 이클립스 E-800)으로 슬라이드를 검사하였고 마이크로이매저(micro imager)(실릭스 마이크로이매저)를 사용하여 상을 포착하였다. 시상하부와 뇌간내의 FLI-양성 핵의 수는 실험군들에 대해 알지 못하는 연구팀내의 자유 계약 직원에 의해서 측정되었다. 절편 당 FLI-양성 핵의 평균 숫자는 각 동물에 대해 정수로(integer) 계산하여 표시하였다.

<144> 시상하부 외식편(explant) 정적 배양(static incubation)

<145> 정적 배양 시스템이 사용되었다. 단두(decapitation)의 방법으로 수컷 위스터 래트를 죽인 후 뇌 전체를 즉시 제거하였다. 뇌실 표면을 가장 위로하여(uppermost) 마운트(mount)하고 진동 마이크로톰(vibrating microtome) 안에 놓는다(영국 다트모스, 마이크로필드 사이언티픽 리미티드). 1.7 mm 절편을 시상하부 기저(basal hypothalamus)로부터 채취하여, 윌리스 환(Circle of Willis)의 측면으로 차단시키고, 95%의 O_2와 5%의 CO_2로 평형상태인 1ml의 인공 뇌척수액(artificial cerebrospinal fluid)을 포함한 챔버에서 배양한다. 시상하부 절편은 안쪽 시각교차앞구역(the medial pre-optic area), 뇌실곁핵(paraventricular hypothalamus nucleus, PVN), 등쪽안쪽핵(dorsomedial nucleus), 배쪽안쪽핵(ventromedial nuleus), 외측시상하부(lateral hypothalamus)와 궁상핵(ARC)을 둘러싸고 있다. 튜브는 37℃로 유지된 수조안 플랫폼에 두었다. 두시간의 초기 평형 단계 후, 각 외식편은 45분간 600 ㎕의 인공 뇌척수액(aCSF)에서 배양(basal period)된 후 테스트 단계로 들어갔다. OXM의 GLP-1 수용체에 대한 IC_{50}값에 대한 10배의 농도를 나타내는 분량으로서 100nM의 OXM이 사용되었다.조직의 생존 능력(viability)은 56 mM의 KCL를 포함하는 인공 뇌척수액(aCSF)에 최종 45분간 노출시키는 것으로 확인하였다. 인공 뇌척수액(aCSF)은 제거한 후 방사성면역측정법(radioimmunoassay)에 의한 αMSH-면역반응성을 측정할 때 까지 -20℃에서 보관하였다.

<146> αMSH-IR을 측정하기 위한 방사성면역측정법

<147> α-MSH는 실험실 내(in-house) 방사성면역측정법을 사용하여 측정하고, 케미콘인터내셔널인크로부터 입수된 항체를 이용하여 현상(develop)하였다.

<148> 통계적 분석

<149> IP와 iARC 섭식 연구의 데이터는 사후 최소유의차검정(post-hoc LSD test)으로 분산분석(ANOVA) 하였다. 다르게 처리된 군들로부터 얻은 지방패드(fat pad)의 무게는 비대응 t-테스트(unpaired t-test)로 분석하였다. 각 외식편을 각각의 기초단계(basal period)와 비교한 시상하부 외식편 배양 연구로 얻은 데이터는 대응 t-테스트(paired t-test)로 분석하였다. 모든 경우에 $P<0.05$를 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

<150> 결과

<151> 1. 절식동물에서 말초성(peripheral) 투여의 효과:

<152> 24시간 동안 절식한 동물에 있어서 OXM(100 nmol/kg, 300 nmol/kg)의 IP투여는 생리식염수 대조군과 비교할 때 주사 후 1시간내의 재섭식(refeeding)을 유의적으로 억제하였다(1시간: OXM 100 nmol/kg, 5.4±0.2 g ($P<0.05$), 300 nmol/kg, 4.5±0.2 g($P<0.05$) vs. 생리식염수, 6.3±0.2 g). 100 nmol/kg에 의한 음식물 섭취량의 감소는 주사 후 8시간 경과시까지 지속되었다. 그러나, OXM의 가장 높은 투여량(300 nmol/kg)은 주사 후 24시간까지 계속하여 음식물 섭취를 유의적으로 억제하였다(24시간: OXM 300 nmol/kg, 9.5±0.6 g vs. 생리식염수, 17.5±0.7 g: $P < 0.05$)(도 6a). 30 nmol/kg과 10 nmol/kg는 조사된 어떤 시점에서도 음식물섭취량을 변화시키지 못하였다.

<153> 2. OXM의 말초성 투여가 비절식동물의 암기 음식물 섭취에 미치는 효과:

<154> OXM 3 nmol/kg과 10 nmol/kg을 암기 직전에 주입한 경우, 야간 섭식 래트에 있어서 어느 시점에서도 음식물 섭취에 영향을 미치지 못하였다. 그러나, OXM 30 nmol/kg의 경우는 주사 후 2시간 까지 음식물 섭취를 유의적으로 억제하였다(2 시간: OXM, 30nmol/kg, 4.5±0.4 g vs. 생리식염수, 5.8±0.4 g; $P < 0.05$). 음식물 섭취량은 주사 후 4시간 까지 감소하였으나 유의할 만한 정도는 아니었다. OXM 100 nmol/kg은 암기 동안 계속하여 유의적으로 음식물 섭취를 억제하였다.(8시간: OXM, 14.1±0.8 g vs. 생리식염수, 16.9±0.5 g; $P < 0.05$)(도 6b).

<155> 3. OXM의 반복적 IP투여의 효과

<156> 매일 2회씩 7일간 OXM을 IP 투여한 경우 생리식염수 처리 대조군에 비하여 누적 일일 음식물 섭취량(cumulative daily food intake)이 유의적으로 감소 하였다(누적 음식물 섭취 제 7일: OXM, 50 nmol/kg, 168±4.6 g vs. 생리식염수, 180±4.3 g; $P<0.01$)(도 7a). 게다가, OXM 처리 동물은 생리식염수 대조군에 비하여 몸무게의 증가가 유의할 만큼 느렸다(누적 체중 증가 제 7일: OXM, 50 nmol/kg, 21.0±1.5g vs. 생리식염수, 37.6±1.9 g; $P<0.005$). 또한, 음식물을 제한한 페어페드(pair fed) 동물은 동량의 먹이를 섭취하면서도 OXM 처리 동물만큼 느리게 체중이 증가하지는 않았다(제 7일: 페어페드, 33.5±2.0g P=NS vs. 생리식염수(임의 섭식), $P<0.05$ vs. OXM)(도 7b). 또한, 만성적(chronic) OXM은 지방과다증의 감소를 야기하는데 이는 생리식염수 주입 페어페드 동물에서는 발견되지 않았다(표2). OXM 처리 동물에서는 실험 제 1일과 2일에 물의 섭취가 유의적으로 감소하였다(제 1일: OXM, 24.1±1.28 ml vs. 생리식염수, 28.1±1.33 ml; $P<0.05$). 그 이후의 실험일에는 일일 물 섭취량이 생리식염수 처리 동물에 비하여 증가하였다(제 3-6일). 그러나, 제 7일에 이르러서는 물 섭취량에서 생리식염수와 OXM 처리 군 사이에 차이가 없었다(가시적 차이 없음).

표 2

<157> 일주일 동안 매일 2회씩의 생리식염수 또는 OXM의 IP 투여가 음식물을 제한한 래트와 음식물에 임의 접근하게 한 래트의 부고환 WAT나 견갑간 BAT의 무게에 미친 영향.

조직/호르몬	생리식염수	OXM	페어페드
WAT	0.69±0.02	0.51±0.01[a]	0.61±0.02[b]
BAT	0.16±0.01	0.12±0.01[a]	0.15±0.01[b]

<158> 4. OXM의 식욕감퇴 효과에 있어서 위배출 지연(delayed gastric emptying)의 역할

<159> 36시간 동안 절식한 래트에게 음식물을 제공한 후 1시간 경과 후, GLP-1처리 동물의 위에 남아 있는 내용물의 건조 중량은(30분간의 섭식 시간동안 소모된 음식물에 대한 백분율로서) 생리식염수 처리 동물에 비하여 유의적으로 컸다(1시간: GLP-1, 50 nmol/kg, 76.9±2.7g vs. 생리식염수, 65.8±1.6 g; P<0.01). OXM 처리 동물의 위 내용물의 양은 생리식염수 대조군보다 많았으나 통계적으로 유의한 정도는 아니었다(1시간: OXM, 50 nmol/kg, 72.0±0.4 g vs. 생리식염수, 65.8±1.6g; P<0.07). 두 시간의 사후 섭식에서, OXM은 생리식염수 처리 동물과 비교할 때 위 내용물에 영향을 미치지 못하였다. 그러나, 이 시점에서의 양성 대조군으로 사용된 CCK(15 nmol/kg)를 주사한 동물은 유의적으로 많은 위 내용물을 보유함으로써 CCK가 위배출률을 유의적으로 감소시킴을 시사하였다. 4시간과 8시간의 사후 섭식에 있어서, OXM은 생리식염수 처리 동물에 비하여 위 내용물에 영향을 미치지 못하였다(도 8).

<160> 5. 궁상핵내 주사된 OXM 단위 투여량의 점차적 증가가 미치는 영향의 조사

<161> 24시간 절식 후 재섭식하는 처음 1시간동안의 음식물 섭취량은 iARC 투여된 OXM의 모든 투여량(0.01 nmol 제외)에 대하여 유의적으로 감소하였다(1시간: OXM, 0.03 nmoles, 6.1±0.5 g (P<0.05); OXM, 0.1 nmoles, 5.6±0.4 g (P<0.05); OXM, 0.3 nmoles, 5.1±0.6 g (P<0.01); OXM, 1.0 nmoles, 3.6±0.5 g (P<0.005) 모두 vs. 생리식염수, 7.7±0.2g)(도 9). OXM 0.3과 1.0 nmoles은 주사 후 8시간까지 계속하여 음식물 섭취를 억제하였다. 주사 후 24시간 경과시에는, 비록 유의할 정도는 아니었지만, OXM 1.0 nmoles에 의해서 음식물 섭취가 억제되었다(24시간: OXM, 1.0 nmoles, 37.8±3.0 g vs. 생리식염수, 40.8±1.6 g P = NS).

<162> 6. 말초성 투여된 OXM이 궁상핵 GLP-1 수용체를 통하여 작용하는지 여부의 조사

<163> IP 투여된 GLP-1(30 nmol/kg)과 OXM(30 nmol/kg) 모두 암기 시작 후 1시간 동안의 음식 섭취를 유의적으로 억제하였다(1시간: GLP-1, 5.0±0.6 g, OXM, 5.1±0.4 g vs. 생리식염수, 9.2±0.3 g). 그러나 OXM의 IP투여에 의해서 야기된 식욕 감퇴는 이에 앞서서 궁상핵에 직접 주사하여 투여된 GLP-1 수용체의 길항제, 엑센딘 9-39(300 nmol/kg)에 의해서 차단되었다(표 3과 도 10). IP 투여된 GLP-1에 의한 음식물 섭취의 억제는 엑센딘 9-39를 미리 궁상핵에 투여하는 것에 의해 영향을 받지 않았다.

표 3

<164> OXM(30 nmol/kg), GLP-1(30 nmol/kg) 또는 생리식염수가 IP 투여되기 15분 전에 엑센딘 9-39(5 nmoles) 또는 생리식염수를 궁상핵내 투여했을 때 1시간 경과시의 음식물 섭취량(g)에 미치는 영향.(S = 생리식염수, G = GLP-1(30 nmol/kg), Ox = OXM(30 nmol/kg), Ex = 엑센딘 9-39(5 nmoles))

펩타이드	음식물 섭취량(g)	표준편차
생리식염수/생리식염수	9.2	0.3
생리식염수/GLP-1	5.0	0.6
엑센딘 9-39/GLP-1	5.0	0.3
생리식염수/OXM	5.1	0.4
엑센딘 9-39/OXM	9.4	0.4
엑센딘 9-39/생리식염수	9.0	0.3

<165> 7. IP 주입된 OXM에 반응하는 시상하부에서의 FLI의 발현(expression) 매핑:

<166> OXM(50 nmol/kg)의 IP 주입 후에 시상하부 궁상핵 내에서만 중점적으로 FLI 농밀 염색이 발견되었다(도 11a). 나머지 시상하부 핵들(뇌실곁핵(paraventricular hypothalamus nucleus, PVN), 등쪽안쪽시상하부핵

(dorsomedial hypothalamus nuleus, DMH), 배쪽안쪽핵(ventromedial hypothalamus nuleus, VMH))은 특이적 c-fos 염색을 나타내지 않았다.

<167> 뇌간에서는 특히 고립로핵(nucleus tactus solitarius, NTS)과 맨아래구역(area postrema, AP)에서, CCK(15 nmol/kg) IP 주입으로 인하여 FLI 염색이 발생하였다(도 11a). 그러나, 생리식염수의 IP 투여나 OXM의 IP 투여는 조사된 같은 뇌간 핵내에서 c-fos 발현(c-fos expression)을 특별히 증가시키지 않았다(도 11b).

<168> 8. OXM과 함께 배양되었을 때 시상하부 외식편으로부터 방출되는 α-MSH의 변화:

<169> 시상하부 외식편과 OXM을 함께 배양하면 α-MSH의 방출을 기초 방출과 비교하여 유의적으로 증가시킨다(α-MSH : OXM, 100 nM, 4.1±0.6 fmol/외식편 vs. 2.6±0.5 fmol/외식편; $P<0.05$). 외식편의 생존률(viability)은 56 mL의 KCL과 배양함으로써 평가하였고, 80%이상의 외식편에서 생존이 확인되었다. 생존하지 못한 외식편은 분석에서 제외되었다.

<170> 토론

<171> OXM의 말초성 투여는 래트에서 음식물 섭취량의 감소를 야기하였다. 이는 명기에서의 절식 이후와 야간 섭식 단계 모두에서 볼 수 있었다. 식욕감퇴 효과는 강력하였고, 길게는 24시간까지 지속되었다. 매일 2회씩 일주일 동안 OXM을 IP 투여한 결과, 생리식염수 처리 동물과 비교하여 속성 내성(tachyphylaxis)없이 일일 음식물 섭취량이 감소하였다. 양쪽 군의 동물이 같은 양의 일일 칼로리를 섭취하였음에도 불구하고, OXM으로 처리된 동물은 페어페드 동물 보다 유의적으로 적은 체중 증가를 보였다. OXM의 IP 투여는 물 섭취량을 일시적으로 감소시켰으나 지속되지는 않았고, 이는 체중 증가율의 감소가 탈수증상에 의한 것이 아님을 시사한다.

<172> 만성(chronic) 연구의 결론에서, 부고환 WAT나 견갑간 BAT를 제거하여 중량을 측정하였다. OXM 처리 동물은 페어페드 동물에 비하여 동일한 양의 음식물 섭취에도 불구하고 모든 지방 패드의 무게가 감소되었다. 따라서 말초성 OXM 투여는 다른 대사 지표(metabolic parameters)에도 영향을 미치는 것으로 보인다.

<173> 포만에 주로 기여하는 인자는 뇌간을 활성화시키는 미주신경에 의해 매개되는(vagally-mediated) 메카니즘을 통한 위배출지연이다. GLP-1과 OXM 모두 설치류와 사람에 있어서 위배출의 강력한 억제제이며, GLP-1의 경우에 위배출 억제가 포만을 유도하는 주된 메카니즘으로 생각되어지고 있다. 본 발명자들은 OXM도 이와 똑같이 작용하고, 위배출에 미치는 OXM의 영향이 식욕 감퇴의 원인이라고 가정하였다. 그러나, OXM의 말초성 투여가 음식물을 재공급한 후 처음 1시간 동안 위배출의 경미한 지연을 야기하였지만, 이는 유의할 만한 정도가 아니었으며 효과는 일시적이었다. 이는 OXM이 위배출을 지연시키기는 하지만, 이것이 음식물섭취를 강력하고 지속적으로 억제하는 주원인이 아님을 암시한다.

<174> 본 발명자들은 OXM의 말초성 투여가 거의 배타적으로 궁상핵내에서만 FLI를 증가시킴을 여기서 보고한다. 더 나아가, 본 발명자들은 시상하부 외식편을 OXM과 배양할 때 POMC(pro-opiomelanocortin) 유도 생성물인 α-MSH의 방출이 시상하부 외식편에서 유의적으로 증가되는 것을 발견하였다. IP 투여된 OXM은 미주신경 매개 정보를 통합하는데 중요한 부분으로 알려진 NTS와 AP에서의 FLI 발현에 영향을 미치지 않음으로써 OXM이 이 경로를 통해 작용하지 않는다는 견해를 더욱 뒷받침한다.

<175> GLP-1 작용의 주된 부위는 뇌간내의 핵들이며, 정보는 순차적으로 시상하부 PVN으로 전달되어 그곳에서 식욕 감퇴 효과가 매개되는 것으로 사료된다. 궁상핵에의 직접적인 OXM 주입은 비록 매우 낮은 분량이라도 강하고 지속적인 음식물 섭취 억제를 야기함으로써 궁상핵이 OXM의 작용 부위라는 가설을 더욱 뒷받침한다. OXM의 말초성 투여에 의한 식욕감퇴의 효과는 이에 앞서 궁상핵내에 엑센딘 9-39를 투여함으로써 차단되었다. 그러나, 흥미롭게도, GLP-1의 말초 투여를 통한 식욕감퇴 작용은 그러하지 않았다. 이러한 발견은 OXM이 궁상핵내의 GLP-1 수

용체를 통하여 작용한다는 점을 강하게 시사한다. 더구나, 이는 GLP-1과 OXM의 작용이 별도의 경로에 의해서 매개된다는 것을 확인시켰다.

<176> 종합하여 상기 데이터는 OXM이 장기 및 단기적인 음식물섭취 조절과 체중 관리에 있어서 잠재적으로 중요함을 증명한다. 위배출지연이나 뇌간 핵들의 활성화를 수반하는 통상의 포만 경로를 통한 식욕 감소보다는, 순환하는 OXM은 잠재적으로 핵내부의 POMC 뉴런을 활성화시킴으로써 궁상핵과의 직접적 상호작용을 통한 식욕 감퇴 효과를 매개한다. 그러므로, OXM은 포유 동물의 비만과 같은 과체중의 치료 또는 예방에 있어서 유용할 수 있으며, 나아가 포유 동물의 비만과 같은 과체중의 치료을 위한 치료제를 개발하기 위한 새로운 표적(target)을 보여준다.

산업상 이용 가능성

<177> OXM의 말초성 투여는 래트에서 음식물 섭취량의 감소를 야기하였다. 이는 명기에서의 절식 이후와 야간 섭식 단계 모두에서 볼 수 있었다. 식욕감퇴 효과는 강력하였고, 길게는 24시간까지 지속되었다. 매일 2회씩 일주일 동안 OXM을 IP 투여한 결과, 생리식염수 처리 동물과 비교하여 속성 내성(tachyphylaxis)없이 일일 음식물 섭취량이 감소하였다.

도면의 간단한 설명

<54> 도 A는 프리프로글루카곤(preproglucagon)과 그 구성 부분을 도식적으로 표현한 것이다.

<55> 도 1은 절식한(fasted) 래트(rat)에서 음식물 섭취량에 미친 ICV와 iPVN 투여된 프리프로글루카곤 유도체와 관련 생성물의 효과를 비교한 것이다. 도 1a는 절식 동물에 GLP-1, OXM, 글루카곤, 또는 글리센틴을(모두 3 nmol) ICV 주사한 후 8시간까지의 누적 음식물 섭취량(g)을 보여준다. *, P<0.05 vs. 생리식염수 대조군(saline control). 도 1b는 절식한 동물에 GLP-1, OXM(둘 다 1 nmol), 또는 엑센딘-4(0.03 nmol)를 급성(acute) iPVN 주사한 후 24시간까지의 누적 음식물 섭취량을 보여준다. *, P<0.01 vs. 1, 2, 4시간 경과 후 모든 군에 대한 생리식염수 대조군. *, P<0.05 vs. 8시간 경과 후의 엑센딘-4만에 대한 생리식염수 대조군.

<56> 도 2는 절식 래트의 음식물 섭취량에 미친 OXM의 ICV와 iPVN 투여 효과에 대한 두 그래프를 보여준다. 도 2a는 OXM(0.3, 1, 3, 또는 10nmol)을 급성(acute) ICV 주사한 후 8시간까지의 누적 음식물 섭취량(g)을 보여준다. 도 2b는 절식 동물에 OXM(0.1, 0.3, 또는 1.0 nmol)을 급성(acute) iPVN 주사한 후 8시간까지의 누적 음식물 섭취량(g)을 보여준다.

<57> 도 3은 암기(dark phase)의 시작 시점에서의 ICV OXM의 효과에 대한 두개의 막대 그래프를 보여준다. 암기의 시작 시점에, 포식(sated) 래트에 OXM, GLP-1(3nmol), 또는 생리식염수를 ICV 주사 하였다. 음식물 섭취(g)(도 3a)와 행동(도 3b)은 주사 후 1시간 경과시에 결정되었다. *, P<0.05 vs. 생리식염수 대조군.

<58> 도 4는 엑센딘-(9-39)에 의한 OXM과 GLP-1의 음식물 섭취 억제 효과에 대한 두개의 막대 그래프를 보여준다. 도 4a는 GLP-1(3 nmol), GLP-1과 엑센딘-(9-39) (30 nmol), OXM(3 nmol), OXM과 엑센딘-(9-39) (30 nmol), 또는 단독 엑센딘-(9-39)(30 nmol)을 급성(acute) ICV 주사하고 1시간 후의 음식물 섭취. 도 4b는 GLP-1(1 nmol), GLP-1과 엑센딘-(9-39) (10 nmol), OXM(1 nmol), OXM과 엑센딘-(9-39) (10 nmol), 또는 단독 엑센딘-(9-39)(10 nmol)을 절식 동물에 급성(acute) iPVN 주사한 후 음식물 섭취. **, P<0.005 vs. 생리식염수 대조군.

<59> 도 5는 래트의 시상하부 막(hypothalamic membranes)내에서 GLP-1와 OXM에 의한 [^{125}I] GLP-1 결합과의 경쟁을 보여주는 그래프이다.

<60> 도 6은 a) 암기 초기 동안에 IP 투여된 OXM(500 μl의 생리식염수에 30, 100, 300 nmol/kg) 또는 생리식염수가 24시간 절식 래트의 누적 음식물 섭취(g)에 미치는 영향(■ = 생리식염수, ○ = OXM 30 nmol/kg, ▲ = OXM 100 nmol/kg, ▽ = OXM 300 nmol/kg); 그리고 b) 암기가 시작되기에 앞서 IP 투여된 OXM(500 μl의 생리식염수에 30, 100 nmol/kg) 또는 생리식염수가 비절식(non-fasted) 래트의 누적 음식물 섭취량에 미치는 영향을 보여준다(■ = 생리식염수, ○ = OXM 30 nmol/kg, ▲ = OXM 100 nmol/kg). *P<0.05 vs. 생리식염수.

<61> 도 7은 매일 2회씩 7일간 IP 주사된 OXM(50 nmol/kg)과 생리식염수가 a)누적음식물섭취량(g)에 미치는 영향과 b)체중 증가에 미치는 영향을 보여준다. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.005 vs. 생리식염수.

<62> 도 8은 36시간동안 절식한 래트에서 IP 투여된 OXM(50 nmol/kg), 생리식염수, 또는 양성 대조군(1시간 = GLP-1(50 nmol/kg); 2시간 = CCK(15 nmol/kg))이 위배출(gastric emptying)에 미치는 영향을 보여준다. 위 속의 내용물(건조 질량)은 30분간의 섭식 시간 동안의 음식물 섭취량의 백분율로 표현되었다. **P<0.01 vs. 생리식염수.

<63> 도 9는 OXM을 24시간 절식 래트의 궁상핵(arcuate nucleus) 내에 투여 할 때 그 투여량의 증가(0.01 - 1.0 nmol)에 따라 1시간 후의 음식물 섭취에 어떤 영향을 미치는 지를 보여준다. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.05 vs. 생리식염수.

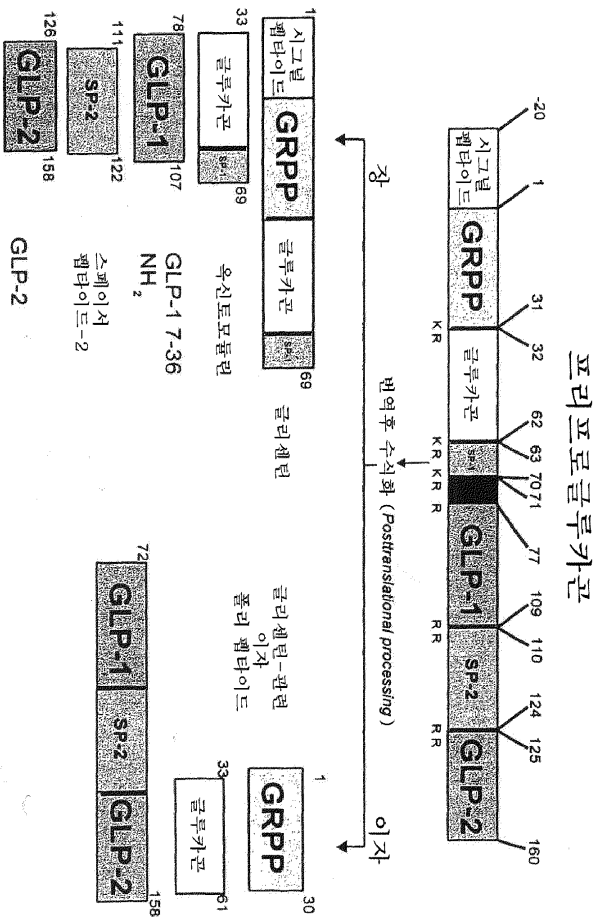
<64> 도 10은 OXM(30 nmol/kg), GLP-1(30 nmol/kg), 또는 생리식염수를 IP 투여하기 15분전에 엑센딘 9-39(5 nmoles) 또는 생리식염수를 궁상핵 내 투여하였을 때 이것이 1시간 후의 음식물섭취량(g)에 미치는 영향을 보여준다.(S = 생리식염수, G = GLP-1(30 nmol/kg), Ox = OXM(30 nmol/kg), Ex = 엑센딘9-39(5 nmoles)).

<65> 도 11a는 시상하부의 궁상핵 내 IP 투여된 A) 생리식염수, 또는 B) OXM(50 nmol/kg)에 대한 포스-유사 면역반응성의 발현(expression)을 보여준다. (x40 확대) ***P<0.005 vs. 생리식염수.

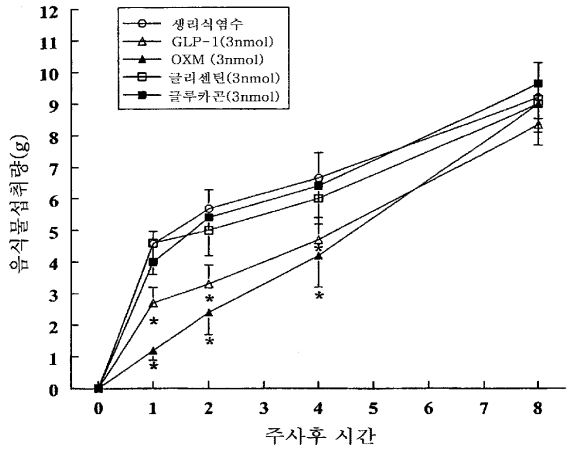
<66> 도 11b는 뇌간의 고립로핵(NTS)과 맨아래구역(AP)에 IP 투여된 A) 생리식염수, B) OXM(50 nmol/kg), C) CCK(15 nmol/kg)에 대한 포스-유사 면역반응성(fos-like immunoreactivity)의 발현(expression)을 보여준다.

도면

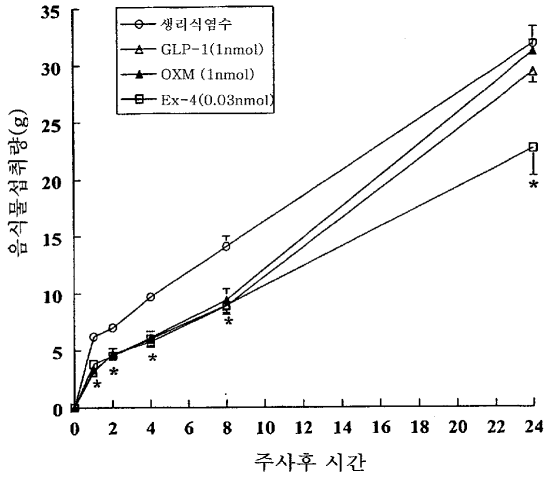
도면A


프리프로글루카곤
시그널 펩타이드
GRPP
글루카곤
IP-1
GLP-1
SP-2
GLP-2
KR
RR
-20
1
31
32
62
63
70
71
77
109
110
124
125
160
절단
번역후 수식화 (Posttranslational processing)
이자
글리센틴
글리센틴-관련 이자 폴리 펩타이드
옥신토모듈린
GLP-1 7-36 NH2
스페이서 펩타이드-2
GLP-2
1
33
69
78
107
111
122
126
158
72
30
61

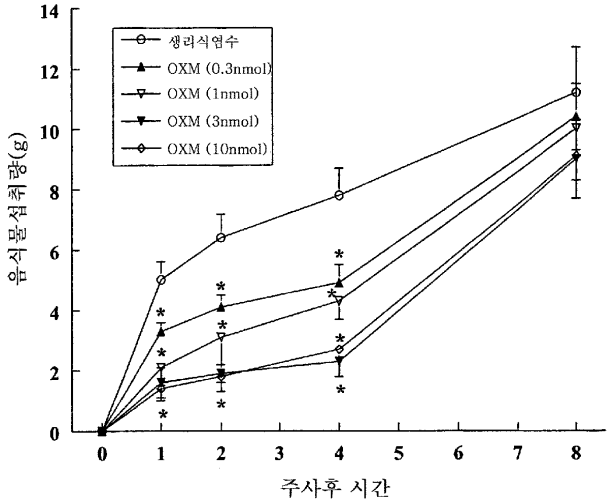
도면1a


생리식염수
GLP-1(3nmol)
OXM (3nmol)
글리센틴(3nmol)
글루카곤(3nmol)
음식물 섭취량(g)
주사후 시간
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

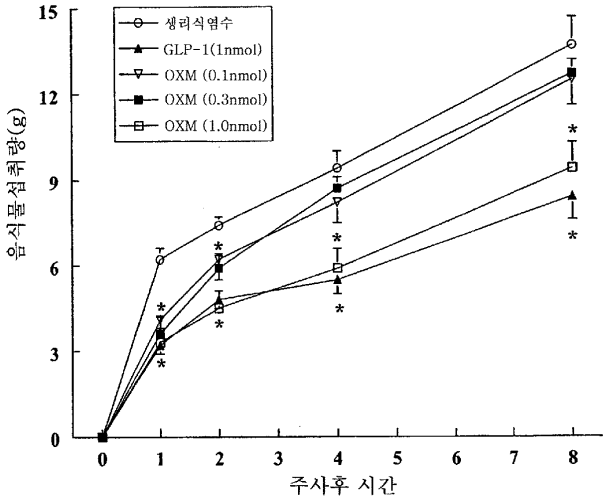
도면1b



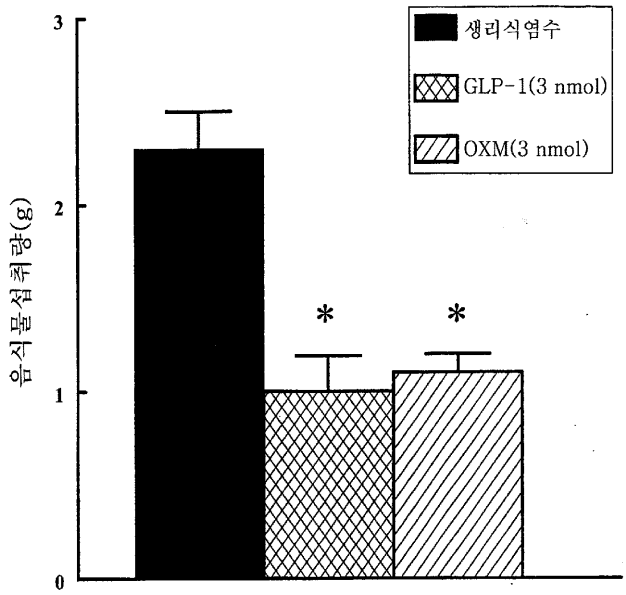
도면2a



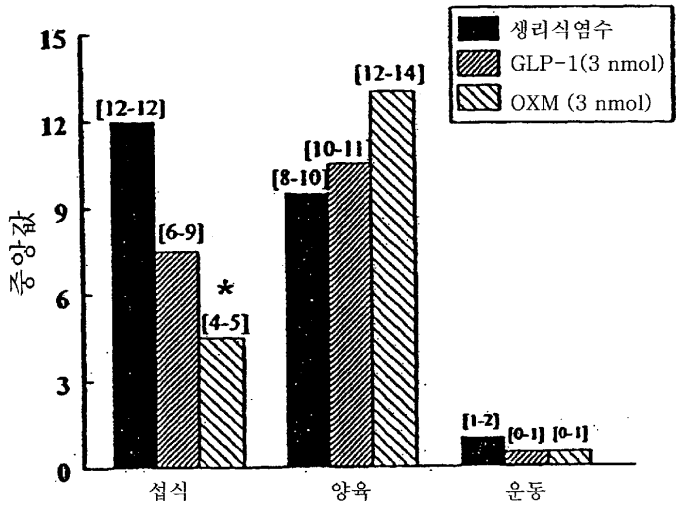
도면2b



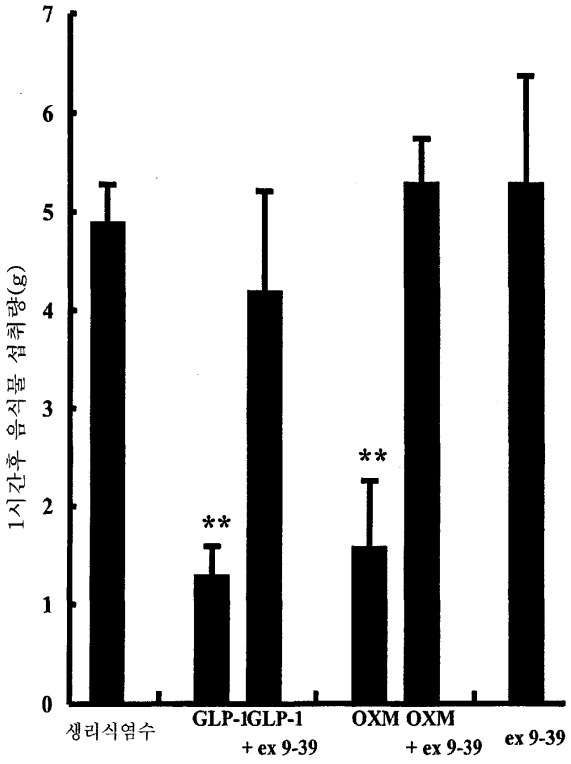
도면3a


생리식염수
GLP-1(3 nmol)
OXM(3 nmol)
음식물섭취량(g)
3
2
1
0
*
*

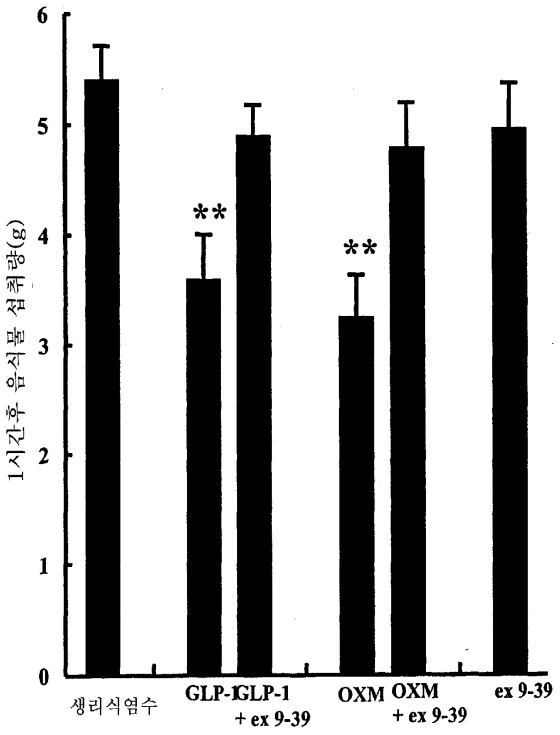
도면3b


생리식염수
GLP-1(3 nmol)
OXM (3 nmol)
중앙값
15
12
9
6
3
0
[12-12]
[6-9]
*
[4-5]
[8-10]
[10-11]
[12-14]
[1-2]
[0-1]
[0-1]
섭식
양육
운동

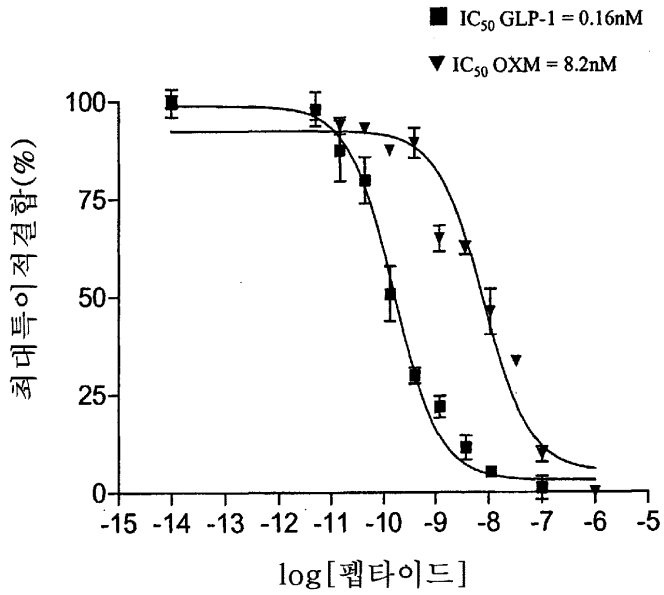
도면4a


1시간후 음식물 섭취량(g)
0
1
2
3
4
5
6
7
**
**
생리식염수
GLP-1
GLP-1 + ex 9-39
OXM
OXM + ex 9-39
ex 9-39

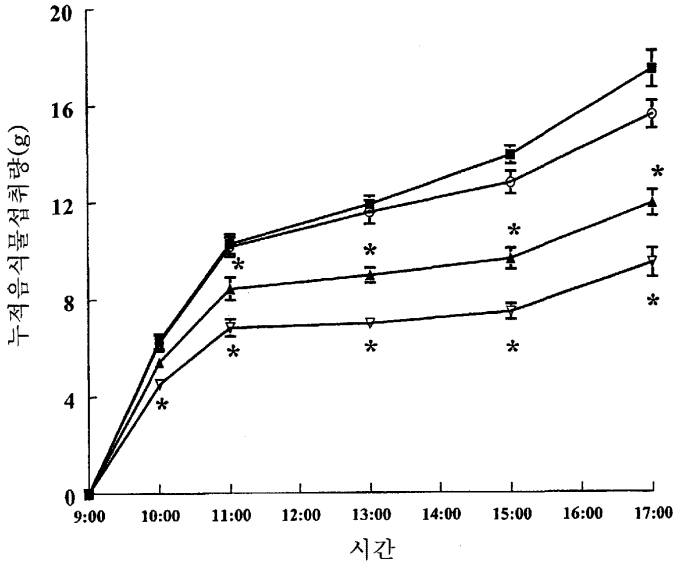
도면4b


1시간후 음식물 섭취량(g)
0
1
2
3
4
5
6
**
**
생리식염수
GLP-1
GLP-1 + ex 9-39
OXM
OXM + ex 9-39
ex 9-39

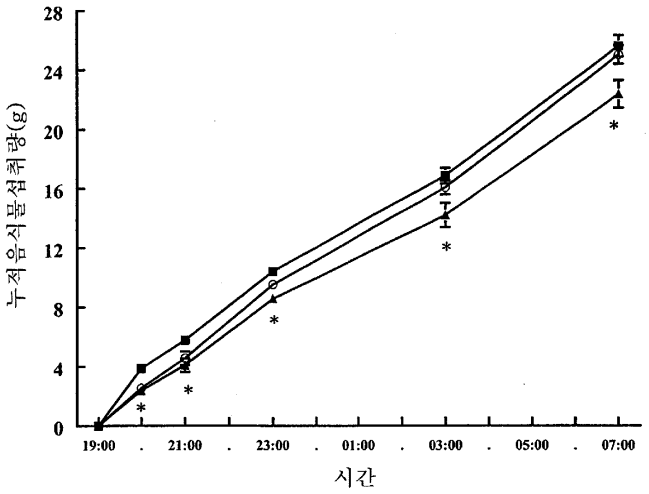
도면5


■ IC50 GLP-1 = 0.16nM
▼ IC50 OXM = 8.2nM
최대특이적결합(%)
100
75
50
25
0
-15 -14 -13 -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6 -5
log[펩타이드]

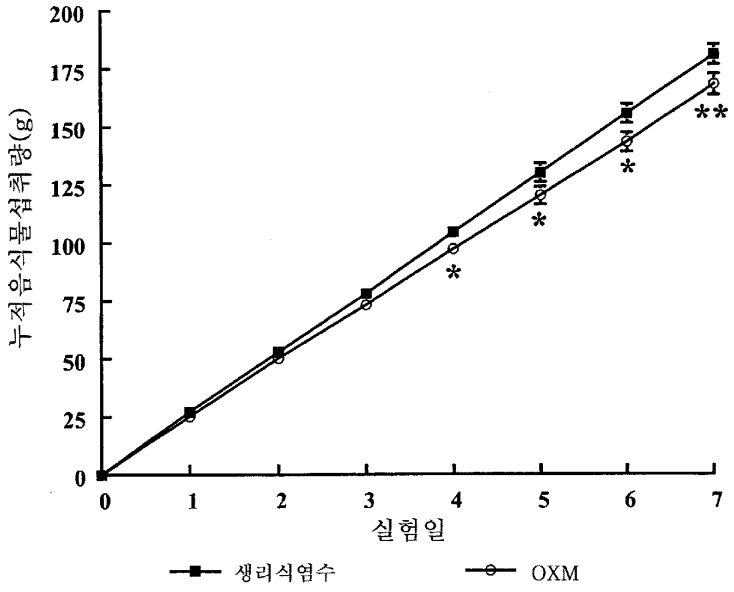
도면6a


누적음식물섭취량(g)
20
16
12
8
4
0
9:00 10:00 11:00 12:00 13:00 14:00 15:00 16:00 17:00
시간

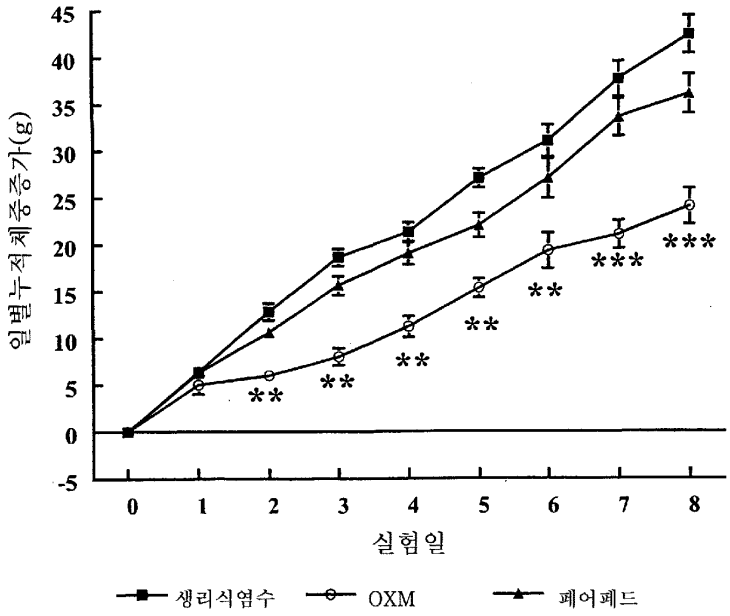
도면6b


28
24
20
16
12
8
4
0
누적음식물섭취량(g)
19:00
21:00
23:00
01:00
03:00
05:00
07:00
시간

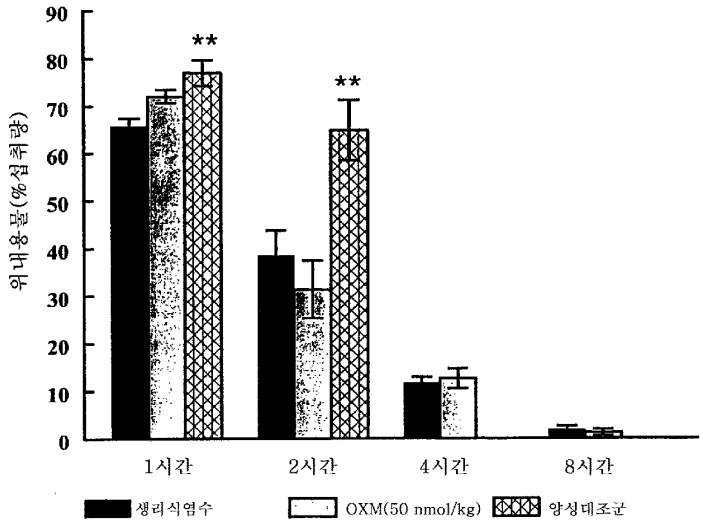
도면7a


200
175
150
125
100
75
50
25
0
누적음식물섭취량(g)
0
1
2
3
4
5
6
7
실험일
생리식염수
OXM

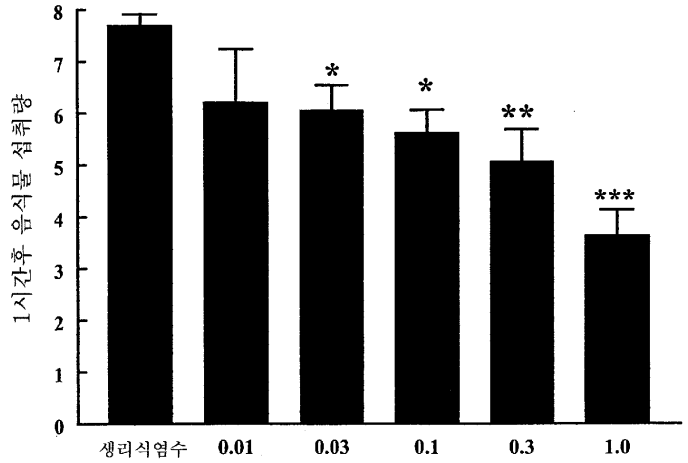
도면7b


일별누적체중증가(g)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
-5
0
1
2
3
4
5
6
7
8
실험일
**
**
**
**
**
***
***
생리식염수
OXM
페어페드

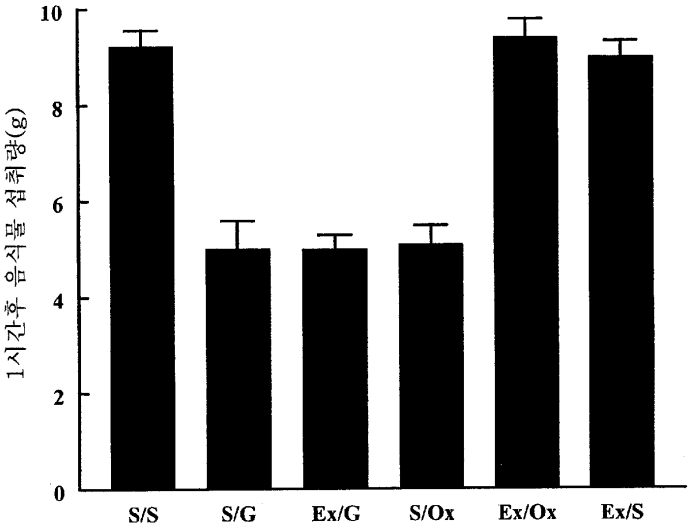
도면8


위내용물(%섭취량)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
**
**
1시간
2시간
4시간
8시간
생리식염수
OXM(50 nmol/kg)
양성대조군

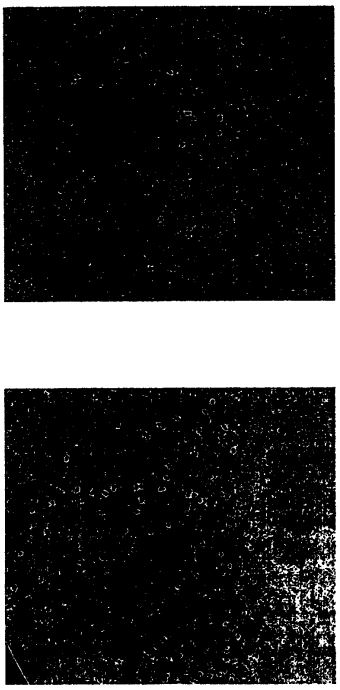
도면9


1시간후 음식물 섭취량
8
7
6
5
4
3
2
1
0
*
*
**
***
생리식염수
0.01
0.03
0.1
0.3
1.0

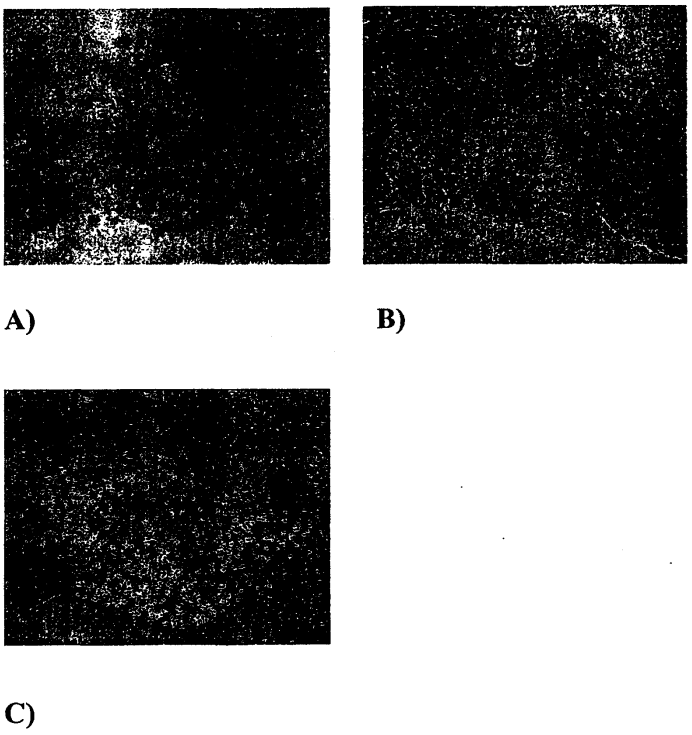
도면10


1시간후 음식물 섭취량(g)
10
8
6
4
2
0
S/S
S/G
Ex/G
S/Ox
Ex/Ox
Ex/S

도면11a



도면11b



서 열 목 록

<110> Imperial Collge Innovations Limited
<120> Oxytomodulin for preventing or treating excess weight

<130> 4fpi-02-02

<150> PCT/GB02/04082
<151> 2002-09-09

<150> GB 0121709.0
<151> 2001-09-07

<160> 5

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 37
<212> PRT
<213> Bovine

<400> 1
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
20 25 30

Lys Asn Asn Ile Ala
35

<210> 2
<211> 36
<212> PRT
<213> Lophius sp.

<400> 2
His Ser Glu Gly Thr Phe Ser Asn Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Glu Asp
1 5 10 15

Arg Lys Ala Gln Glu Phe Val Arg Trp Leu Met Asn Asn Lys Arg Ser
20 25 30

Gly Val Ala Glu
35

<210> 3
<211> 36
<212> PRT
<213> Anguilla sp.

<400> 3
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Asn Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Glu Thr
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Ser Lys Arg Ser
20 25 30

Gly Gly Pro Thr
35

<210> 4
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 5
<211> 37
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala
35