(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0099353
(43) 공개일자 2007년10월09일

(51) Int. Cl.
A61K 31/4745 (2006.01) *A61K 31/4725* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-0030700
(22) 출원일자 2006년04월04일
심사청구일자 2007년08월02일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내
(72) 발명자
백자현
서울시 성북구 안암동 5가 1번지 고려대학교 생명과학대학생명과학부, 분자신경생물학연구실
김성열
서울시 성북구 안암동 5가 1번지 고려대학교 생명과학대학생명과학부, 분자신경생물학연구실
(74) 대리인
손민

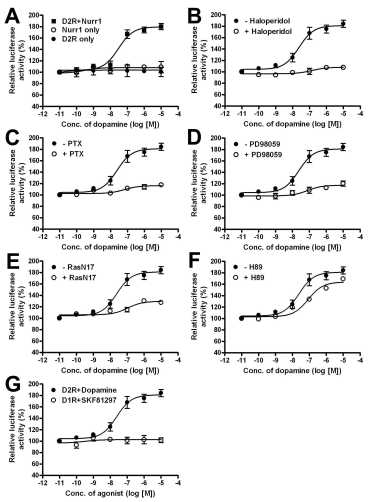
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 도파민 D2 수용체에 의한 도파민성 수용체 발달의 조절방법 및 이의 조성물

(57) 요 약

본 발명은 도파민 D2 리셉터의 작용제 또는 길항제를 포함하는 Nurr1의 활성 및 도파민성 신경세포의 발달을 조절하는 조성물 및 도파민 D2 리셉터의 작용제 또는 길항제를 처리하여 Nurr1의 활성 및 도파민성 신경세포의 발달을 조절하는 방법, 그리고 이를 이용한 Nurr1과 관련된 질환의 치료방법 및 이의 조성물에 관한 것이다. 또한 본 발명은 테스트 화합물이 도파민 D2 리셉터의 조절자 여부를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하여, 도파민 D2 리셉터의 작용제 또는 길항제를 도파민 신경세포에 처리함으로써 Nurr1의 활성을 조절할 수 있으며, 이로 인하여 도파민 신경세포의 생성을 촉진 또는 억제할 수 있다.

대표도 - 도5



특허청구의 범위

청구항 1

도파민 D2 리셉터의 작용제 또는 길항제를 포함하는 Nurr1의 활성을 조절하는 조성물.

청구항 2

도파민 D2 리셉터의 작용제 또는 길항제를 포함하는 도파민성 신경세포의 발달을 조절하는 조성물.

청구항 3

도파민 D2 리셉터의 작용제 또는 길항제를 처리하는 것을 포함하는 Nurr1의 활성을 조절하는 방법.

청구항 4

도파민 D2 리셉터의 작용제 또는 길항제를 처리하는 것을 포함하는 도파민성 신경세포의 발달을 조절하는 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 작용제는 수마니롤(sumanirole), 퀸피롤(quinpirole), 카베르골린(cabergoline) 또는 브로모크립틴(Bromocriptine)인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 길항제는 할로페리돌(haloperidol), 스피페론(spiperone) 또는 레목시프라이드(remoxipride)인 방법.

청구항 7

테스트 화합물을 도파민 신경세포와 접촉시키는 단계; 및 Nurr1의 활성의 증가 또는 감소를 측정하는 단계를 포함하는 도파민 D2 리셉터의 조절자를 스크리닝하는 방법.

청구항 8

테스트 화합물을 도파민 신경세포와 접촉시키는 단계; 및 도파민성 신경세포의 발달 정도를 측정하는 단계를 포함하는 도파민 D2 리셉터의 조절자를 스크리닝하는 방법.

청구항 9

도파민 D2 리셉터의 작용제 또는 길항제를 처리하여 Nurr1에 의해 조절되는 질환의 치료를 위한 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서, Nurr1에 의해 조절되는 질환이 뇌신경 퇴행성 질환, 약물중독 또는 스트레스성 신경정신질환 등의 신경정신질환인 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<9> 본 발명은 도파민 D2 리셉터의 작용제 또는 길항제를 포함하는 Nurr1의 활성을 조절하는 조성물, 이에 의한 Nurr1 활성의 조절 방법, 이를 이용한 Nurr1과 관련된 질환의 치료방법 및 이의 조성물, 및 테스트 화합물의 도파민 D2 리셉터 조절자 스크리닝 방법에 관한 것이다.

<10> 1950년대 도파민이 발견된 이후, 뇌에서의 도파민의 기능이 집중적으로 연구되어 왔다. 도파민은 뇌의 신경전달

물질로서, 도파민을 생성하는 세포는 태아기의 중뇌 배쪽에서 생성되고, 이 생성 과정에는 많은 전사인자와 신경전달 기작의 복잡한 상호관계가 요구된다(Perrone-Capano C et al., *Neurosci Biobehav Rev.*, 2000 Jan;24(1):119-24; Simon HH et al., *Ann N Y Acad Sci.*, 2003 Jun; 991: 36-47.; Riddle R and Pollock JD, *Brain Res Dev Brain Res.*, 2003 Dec 30;147(1-2):3-21.). 현재까지 도파민의 기능과 관련하여 도파민이 운동, 인지, 감각, 감정 및 자율(예를 들어, 식욕, 체온, 수면의 조절) 기능을 포함하는 뇌 기능의 여러 관점에서 필수적이라는 사실이 알려졌다. 따라서, 이러한 도파민 기능의 조절은 뇌기능에 영향을 미치는 광범위한 장애를 치료하는데 이용될 수 있으며, 실제적으로는 신경 장애 및 정신 장애 모두는 뇌에서의 도파민 시스템과 수용체와의 상호 작용을 바탕으로 하는 약물에 의해 치료되고 있다.

<11> 도파민 수용체는 몇 가지 형태(예로, D1, D2, D3, D4 및 D5 등)로 구분할 수 있다. 이들 도파민 수용체는 각각 뇌의 특정 영역에서 다른 기능에 참여한다는 것이 알려져 있으며, 이들 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 화합물을 이용하여 관련 질환을 치료하고자 연구 중에 있다. 예를 들어, 국제공개번호 WO 99/09025호는 도파민 D4 수용체와 상호작용하는 2-(4-아릴 또는 헤테로아릴-피페라진-1-일메틸)-1수소-인돌 유도체에 관하여 개시하고 있으며, 국제공개번호 WO 1996/02249호는 도파민 D3 수용체 리간드로 유용한 티아디아졸 화합물에 관하여 개시하고 있으며, 국제공개번호 WO 1995/33729에서는 신규한 일련의 4-페닐피페라진, 4-페닐-피페리딘 및 4-페닐-1,2,3,6-테트라히드로피리딘화합물이 중추 세로토닌 5-HT1A 및 도파민 D2 리셉터에 대한 효과를 가지고 있음을 기재하고 있다.

<12> 한편, Nurr1은 스테로이드/방패샘(steroid/thyroid) 호르몬 수용체에 속하는 전사인자로서(Law, et al., *Mol. Endocrinol.*, 1992, 6:2129), 도파민성 신경세포에서 발현되어(Zetterstrom, et al., Mol. *Brain Res.*, 1996, 41:111) 중뇌 도파민성 신경세포의 발생에 역할을 할 것이라 여겨지고 있다. 이에 Nurr1의 기능을 알아보기 위하여 Nurr1이 결손된 유전자 변이 생쥐를 제작하였는데, 상기 Nurr1이 결손된 유전자 변이 생쥐에서는 중뇌 도파민성 신경세포가 만들어지지 않았고 태어나서 바로 죽었는데, 이는 Nurr1이 중뇌 도파민성 신경세포의 유도(induction)에 중요한 역할을 하는 것으로 추측되었다(Zetterstrom, et al., *Science*, 1997, 276:248-250; Saucedo-Cardenas, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95:4013-18; Castillo, et al., *Mol. Cell Neurosci.*, 1998, 11:36-46). 그러나, 여전히 도파민 뉴런의 발달에 관여할 수 있는 많은 인자들과 신호전달기작의 네트워크에 대하여 아직도 많은 부분이 알려져 있지 않다.

<13> 이에 본 발명자는 도파민 D2 수용체에 특이적으로 작용하는 도파민의 역할을 연구하는 중 도파민 D2 수용체의 존재 여부에 따라 뉴런 내의 Nurr1과 Ptx3의 활성 정도가 다르며, 도파민 D2 수용체가 세포외 신호 조절 활성효소(extracellular signal regulated kinase; ERK)의 활성화에 의해 Nurr1과 상호작용한다는 것을 발견하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<14> 본 발명의 하나의 목적은, 도파민 D2 리셉터의 작용제 또는 길항제를 포함하는 Nurr1의 활성 및 도파민성 신경세포의 발달을 조절하는 조성물을 제공하는 것이다.

<15> 본 발명의 다른 하나의 목적은, 도파민 D2 리셉터의 작용제 또는 길항제를 처리하여 Nurr1의 활성 및 도파민성 신경세포의 발달을 조절하는 방법을 제공하는 것이다.

<16> 본 발명의 다른 하나의 목적은, 테스트 화합물을 도파민 신경세포와 접촉시키는 단계, 및 Nurr1의 활성의 증가 또는 감소를 측정하는 단계를 포함하는 도파민 D2 리셉터의 조절자를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

<17> 본 발명의 다른 하나의 목적은, 도파민 D2 리셉터의 작용제 또는 길항제를 처리하여 Nurr1과 관련된 질환의 치료 방법 및 그 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<18> 하나의 양태로서, 본 발명은 도파민 D2 리셉터의 작용제 또는 길항제를 포함하는 Nurr1의 활성 및 도파민성 신경세포의 발달을 조절하는 조성물에 관한 것이다.

<19> 본 발명에서 사용된 용어 "도파민 D2 리셉터"는 도파민성 신경세포에 존재하는 도파민 등의 물질과 결합하여 Nurr1의 활성을 조절하며 도파민성 신경세포의 발달을 조절하는 부위를 말한다.

<20> 본 발명에서 사용된 용어 "발달"은 도파민성 신경세포의 분화(differentiation) 또는 증식(proliferation)을 말한다.

<21> 본 발명에서 사용된 용어 "작용제(agonist)"는 도파민 D2 수용체에 결합하여 Nurr1의 활성을 증진시키는 물질을 말한다. 구체적으로, 본 발명의 도파민 D2 리셉터의 작용제(agonist)는 수마니롤(sumanirole), 퀸피롤(quinpirole), 카베르골린(cabergoline), 브로모크립틴(Bromocriptine) 등이 있다. 본 발명의 구체적 실시에서, 퀸피롤을 정상 신경세포 및 도파민 D2 수용체가 없는 신경세포에 처리한 경우 도파민 D2 수용체가 있는 정상 신경세포에서만 Nurr1의 활성이 증진되었다(도 8 참조).

<22> 본 발명에서 사용된 용어 "길항제(antagonist)"는 도파민 D2 수용체에 결합하여 Nurr1의 활성을 감소시키거나 정지시키는 물질을 말한다. 구체적으로, 본 발명의 도파민 D2 리셉터의 길항제는 할로페리돌(haloperidol), 스피페론(spiperone), 레목시프라이드(remoxipride) 등이 있다. 본 발명의 구체적 실시에서, 도파민 D2 수용체가 있는 정상 신경세포에 할로페리돌을 처리한 경우에 Nurr1의 활성이 할로페리돌을 처리하지 않은 경우보다 감소되었다(도 5의 B 참조).

<23> 본 발명에서 사용된 용어 "Nurr1의 활성을 조절하는 또는 "조절된"이란, Nurr1의 활성이 증가 또는 감소되는 것을 말한다. Nurr1의 활성을 조절함으로써 도파민성 신경세포의 발달을 조절할 수 있으며, 또한 이로 인하여 Nurr1의 활성 또는 도파민성 신경세포와 관련된 질환을 치료 및 예방할 수 있다.

<24> 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 도파민 D2 리셉터의 작용제 또는 길항제를 처리하여 Nurr1의 활성 및 도파민성 신경세포의 발달을 조절하는 방법에 관한 것이다.

<25> 본 발명의 도파민 D2 리셉터에 결합하는 작용제 또는 길항제에 의해 ERK의 활성이 증가 또는 감소되고 이로 인하여 Nurr1의 활성이 증가 또는 감소된다. Nurr1의 활성이 증가 또는 감소됨으로써 도파민성 신경세포의 발달이 조절될 수 있다. 즉, 본 발명의 구체적 실시에서, 도파민 D2 리셉터의 작용제인 퀸피롤을 정상쥐에 처리한 경우 도파민성 신경세포의 수 및 신경돌기의 평균 길이가 증가하였으나, 이와 반대로 도파민 D2 리셉터가 결핍된 쥐에 퀸피롤을 처리한 경우에는 신경세포의 수 및 신경돌기의 평균 길이의 변화가 없었다. 또한, 도파민 D2 리셉터의 길항제인 할로페리돌을 전처리한 경우에는 도파민성 신경세포의 수 및 신경돌기의 평균 길이가 감소하거나 변화가 없었다(도 6의 B 및 C).

<26> 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 테스트 화합물을 도파민 신경세포와 접촉시키는 단계, 및 Nurr1의 활성의 증가 또는 감소를 측정하는 단계를 포함하는 도파민 D2 리셉터의 조절자를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

<27> 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 테스트 화합물을 도파민 신경세포와 접촉시키는 단계, 및 도파민성 신경세포의 발달 정도를 측정하는 단계를 포함하는 도파민 D2 리셉터의 조절자를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

<28> 본 발명에서 사용된 용어 "테스트 화합물"은 도파민 D2 리셉터에 결합하여 도파민 신경세포의 생성을 촉진 또는 감소시키는 물질인지의 여부를 확인하고자 하는 화합물 또는 Nurr1 관련 질환을 치료하는 활성을 테스트할 약제를 말한다.

<29> 본 발명의 스크리닝 방법은 테스트 화합물을 도파민 신경세포와 접촉시키고, 일정 시간 경과 후에 Nurr1의 활성의 증가 또는 감소를 측정하는 단계 또는 도파민성 신경세포의 발달 정도를 측정하는 단계를 포함하며, 이는 인 비보(in vivo), 인 시츄(in situ) 및 인 비트로(in vitro)에서 실시할 수 있다.

<30> Nurr1의 활성을 측정하는 방법은 본 발명의 당업자에게 알려진 방법이면 어떠한 방법이든지 사용할 수 있다. 예를 들면, 세포내 단백질의 양 및 인산화에 의한 활성화를 간접 측정하는 웨스턴 블랏법, 세포내 단백질의 발현을 직접 확인하는 면역형광 염색에 의한 관찰법, 세포질에서 핵질로 이동하는 전사인자의 활성도를 측정하는 세포질-핵질간 이동 단백질의 변화 비교, 핵 내의 전사인자의 활성을 측정하는 젤 리타데이션 측정법, 루시퍼라아제 의존적 리포터에 의한 간접 활성 측정법 등이 있다. 본 발명의 구체적 실시에서는 Nur 반응인자(NurRE)-의존적인 리포터 유전자 활성화 검정 방법에 의하여 Nurr1의 활성을 측정하였다.

<31> 도파민성 신경세포의 발달 정도를 측정하는 방법은 본 발명의 당업자에게 알려진 방법이면 어떠한 방법이든지 사용할 수 있다. 예를 들면, 도파민성 신경세포의 분화 정도는 신경돌기의 이상증식 (neurite outgrowth), 신경돌기 가지 수의 증가, 신경세포의 이동 (neural migration), 그리고 분화 정도나 단계에 따라 나타나는 표지 단백질 또는 mRNA 양의 검정을 통해 측정할 수 있으며, 도파민성 신경세포의 증식 정도는 직접 도파민성 신경세포를 염색하여 직접 수를 분석하거나, 신경세포의 방사성 싸이미딘 삽입반응 ([^{3}H]-thymidine incorporation), 형광물질인 BrdU 삽입반응, 그리고 MTT 발색반응 등을 통해 알수 있다. 본 발명의 구체적 실시에서는 면역세포염색 방법을 이용하여 도파민성 신경세포를 특이적으로 염색한 이후에 신경세포의 수를 측정하였으며 동시에 신경돌기의 길이와 수를 분석하여 도파민성 신경세포의 발달 정도를 측정하였다.

<32> 본 발명의 스크리닝 방법은 Nurr1의 활성의 증가 또는 감소를 측정하는 단계 이후에, 테스트 화합물의 부재시 Nurr1의 활성과 비교하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 테스트 화합물의 존재하에 Nurr1의 활성이 테스트 화합물의 부재하의 Nurr1의 활성보다 증가한 경우라면 테스트 화합물은 도파민 D2 리셉터의 작용제임을 알 수 있으며, 이와 반대로 테스트 화합물의 존재하의 Nurr1의 활성이 테스트 화합물의 부재하의 Nurr1의 활성보다 감소한 경우라면 테스트 화합물은 도파민 D2 리셉터의 길항제임을 알 수 있다.

<33> 본 발명의 스크리닝 방법은 도파민성 신경세포의 발달 정도를 측정하는 단계 이후에, 테스트 화합물의 부재시 도파민성 신경세포의 발달 정도와 비교하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 테스트 화합물의 존재하에 도파민성 신경세포의 발달 정도가 테스트 화합물의 부재하의 도파민성 신경세포의 발달 정도보다 증가한 경우라면 테스트 화합물은 도파민 D2 리셉터의 작용제임을 알 수 있으며, 이와 반대로 테스트 화합물의 존재하의 도파민성 신경세포의 발달 정도가 테스트 화합물의 부재하의 도파민성 신경세포의 발달 정도보다 감소한 경우라면 테스트 화합물은 도파민 D2 리셉터의 길항제임을 알 수 있다.

<34> 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 도파민 D2 리셉터의 작용제 또는 길항제를 처리하여 Nurr1과 관련된 질환을 치료하는 방법 및 그 조성물에 관한 것이다.

<35> 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는 치료학적 처치 및 예방 또는 방지 수단을 말한다. 따라서, 치료가 필요한 자들은 이미 신경변성 장애 또는 신경병을 가진 자 뿐만 아니라 신경변성 장애 또는 신경병을 예방하고자 하는 자들을 포함한다. 본 발명의 방법은 이에 한정하는 것은 아니지만, 사람, 영장류 및 가축, 사육, 애완용 또는 스포츠 동물, 예컨대 개, 말, 고양이, 양, 돼지, 소 등을 비롯한 치료가 필요한 임의의 포유동물을 치료하는데 사용할 수 있다.

<36> 본 발명에서 사용되는 용어 "Nurr1과 관련된 질환"은 도파민 D2 리셉터의 작용제 또는 길항제에 의하여 Nurr1의 활성이 조절됨으로써 발생할 수 있는 질환을 말한다. 상기 질환은 도파민성 신경세포 장애 관련질환(도파민성 신경세포 발달장애 및 도파민성 신경세포의 가소성장애)을 포함하며, 보다 구체적으로는 뇌신경 퇴행성 질환(예를 들어, 파킨슨 증후군 등), 약물중독, 스트레스성 신경정신질환 등의 신경정신질환 등을 포함할 수 있다.

<37> 본 발명의 치료용 조성물은 주사, 경구, 국소, 비내(nasal), 흡입, 입 또는 코를 통한 취입(insufflation), 구강(buccal), 비경구, 직장 투여 등을 위해 제제화될 수 있다. 본 발명의 치료용 조성물은 약리학적으로 수용가능한 희석액, 방부제, 가용화제, 유화제, 아쥬반트, 부형제 및/또는 캐리어를 함께 포함할 수 있다. 또한 본 발명의 조성물은 여러 버퍼(예를 들면 Tris-HCl, 초산염, 인산염), pH 및 이온 강도의 희석액; 데타젠트 및 용해제(예를 들면 Tween 80, polysorbate 80 등), 항산화제(예를 들면 아스코르빈산, 스디움케타바이설화이드 등), 방부제(예를 들면 씨메로살(Thimerosal), 벤질알코올 등) 및 벌킹 물질(예를 들면 락토스, 만니톨 등)과 같은 첨가물을 또한 포함할 수 있다.

<38> 본 발명의 치료용 조성물은 그래뉼 또는 펠렛 형태에서 순수한 멀티 미립자로서 제재에 포함될 수가 있다. 캡슐 투여를 위한 물질의 제재는 분말, 가볍게 압축된 플러그(plug) 또는 정제로 사용될 수 있다.

<39> 본 발명의 치료용 조성물은 안료 및 향료를 모두 포함할 수 있다. 예를 들어, 단백질(또는 유도체)은 제제화될 수가 있고(예를 들어 리포좀 또는 마이크로스피아 캡슐화법에 따라) 그 다음에 안료 및 향료를 포함하고 있는 냉장된 음료와 같은 식용 산물내에 더욱 포함될 수 있다.

<40> 정제분해물질(disintegrant)는 고체상 약제 형태로 치료제를 제형화하는데 포함될 수가 있다. 정제분해물질로 사용되는 물질은 전분(예를 들면, 감자 전분 또는 전분, Explotab)에 기초한 시판 정제분해물질을 포함하지만, 이것으로 한정되는 것은 아니다. 나트륨 전분·글리콜산염, 암버리트(Amberlite), 스디움 카복시메틸 셀룰로오스, 울트라밀로펙틴(ultramylopectin), 알긴산나트륨, 젤라틴, 오렌지 껍질, 산 카복시메틸 셀룰로오스, 천연 스펀지 및 벤토나이트가 모두 사용될 수 있다. 다른 형태의 정제분해물질은 불용성 양이온 교환 수지이다. 분말상의 껌질이 정제분해물질로서 결합제로 사용될 수가 있고, 이것들은 한천, 카라야(Karaya) 또는 트라가칸타(tragacanth)와 같은 분말상의 껌질을 포함할 수 있다. 또한 알긴산 및 그 나트륨 염도 정제분해물질로 유용하다.

<41> 제재화 과정에서 붙는 것을 방지하기 위해 항-마찰제(anti-frictional agent)가 상기 치료제의 제재에 포함될 수가 있다. 윤활제가 상기 치료제와 그 다이(die) 벽 사이 층에 사용될 수가 있고 이들은 그 마그네슘 및 칼슘 염을 포함하는 스테아릭산, 폴리 테트라 플루오르 에틸렌(PTFE), 유동 파라핀, 식물유 및 왁스, 활석(talc) 및 실리카를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 라우릴(lauryl) 황산나트륨, 마그네슘 라우릴 황산 에스테르, 다양한 분자량의 폴리에틸렌글리콜, 카보왁스(Carbowax) 4000 및 6000과 같은 가용 윤활제도 사용될 수가 있다.

<42> 압축 중에 재배열을 돕고 제재화 동안 상기 약제의 흐름 성질을 개량할 수가 있는 활제(glidants)가 첨가될 수가 있다. 상기 활제는 전분, 활석, 발열성 실리카 및 수화된 실리코알루마네이트를 포함할 수가 있다.

<43> 수용성 환경으로 상기 치료제의 용해를 돕기 위해, 계면활성제가 습윤제로 첨가될 수가 있다. 계면활성제는 음이온 세제(예를 들면, 나트륨 라우릴 설페이트, 다이옥틸 나트륨, 술포숙시네이트, 디옥틸, 나트륨, 설폰산 에스테르)를 포함할 수가 있다. 양이온 활성제 또한 사용될 수 있고, 벤자르코니움(benzalkonium) 염화물 또는 벤제토니움(benzethonium) 염화물을 포함할 수가 있다. 계면활성제로서 제재에 포함될 수가 있는 잠재적인 비이온성의 활성제는 라우로마크로골(lauromacrogol) 400, 스테아린산포리오키실 40, 폴리오시에틸렌(polyoxyethylene) 하이드로게네이트된 카스톨(castol) 오일 10, 50 및 60, 글리세롤 모노스테아린산, 포리솔베이트 40, 60, 65 및 80, 슈크로스 지방산 에스테르, 메틸셀룰로오스 및 카복시메틸 셀룰로오스를 포함할 수 있다.

<44> 경구 투여를 위한 액체 제재물은 예를 들어 용액, 시럽 또는 현탁의 형태를 취할 수가 있거나 사용전 물 또는 다른 적당한 운반수단을 갖는 구성을 위해 건조 산물로 나타낼 수 있다. 그러나 액체 제재물은 현탁제(예를 들면, 솔비톨, 시럽, 셀룰로오스 유도체 및 수소 부가된 식용지방), 유화제(예를 들면, 레시틴 또는 아카시아 등), 비수용 운반수단(예를 들면, 아몬드유, 유성의 에스테르, 에틸 알코올 또는 분획된 식물유) 및 방부제Ⅱ(예를 들면, 메틸 또는 프로필-p-하이드록시 벤조에티트, 또는 솔빈산 등)과 같은 약리학적으로 수용가능한 첨가제로 통상의 방법에 의해 제조될 수 있다. 그 조제물은 버퍼, 염, 향료, 안료, 감미료를 적당량 포함할 수 있다.

<45> 본 발명의 치료용 조성물은 비내 전달도 가능하다. 비내 전달은 허파에 상기 산물의 축적의 필요없이 상기 치료 산물을 코로 투여한 후에 혈관으로의 이동을 가능하게 한다. 비내 전달 조성은 덱스트란 또는 사이크로덱스란을 갖는 것을 포함한다.

<46> 흡입에 의한 투여를 위해 본 발명의 치료용 조성물은 적절한 추진체(propellant)(예를 들어, 다이클로로다이후로로메탄, 다이클로로테트라후루로메탄, 이산화탄소 또는 적당한 가스)를 사용하여 가압된 팩으로부터 온 에어로졸 분무 프레젠테이션 또는 분무기의 형태로 통상적으로 운반될 수 있을 것이다.

<47> 대량 순간 투여 또는 연속 주입과 같은 주사에 의한 비경구투여용으로 상기 조성물을 제재화할 수 있다. 주사용 제재는 첨가 방부제를 갖는 예를 들면, 앰플 또는 멀티 공여량 용기 내의 단위 형태 내에 나타날 수가 있다. 상기 조성물은 현탁, 용액 또는 오일 또는 수용성 담체 내의 에멀젼과 같은 형태로 섭취될 수 있고, 현탁, 안정 및/또는 분산제와 같은 제재화제를 포함할 수 있다. 대안적으로 그 활성 성분은 사용전에, 예를 들어 살균된 병원체 없는 물과 같은 적당한 운반수단으로 구성하기 위한 파우더일 수 있다.

<48> 본 발명의 치료용 조성물은 코코아버터 또는 다른 글리세라이드 등의 통상의 좌약 베이스를 포함하는 좌약 또는 체류 관장제와 같은 직장투여용 조성물로 제제화될 수 있다.

<49> 본 발명의 치료용 조성물은 비경구, 국소, 예를 들어 경구, 비내, 직장과 은 점막내(transmucosal) 또는 경피내 투여될 수 있다. 바람직하게는 예를 들면 정맥 주사와 같은 비경구 투여이고, 소동맥, 근육내, 경피내, 피하내, 복강내, 심실내(intraventricular) 및 두개골내를 포함하지만 이에 한정되지 않는 투여이다.

<50> 본 발명의 치료용 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료 또는 예방에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 예방하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 질환의 종류 및 이의 중증도; 환자의 연령, 체중, 건강, 성별; 환자의 약물에 대한 민감도; 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율; 치료 기간; 사용된 본 발명의 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 일반적으로, 0.01내지 500 mg/kg/일의 양으로 투여할 수 있다.

<51> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

<52> **실시예 1 : 실험동물 준비와 중뇌 뉴런의 초대배양**

<53> Institut de Genetiqul et Biologie Moleculaire et celluaire(Strasbourg, France)에서 구입한 D2R-/- 이형접합(heterozygous) 쥐의 교배로부터 D2R-/- 쥐 및 정상(WT) 쥐를 얻었으며, 이들 각각의 유전자형은 서던 부합법(southern hybridization)으로 규명하였다(An JJ et al., *Mol Cell Neurosci*. 2004, 25:732-741). 정액주입

후 질전(vaginal plug) 형성으로 임신여부를 확인하여 이를 E0 일로 하고, 임신 E14 일에 신경과학회의 지침(Society for Neuroscience guidelines)에 따라 도살하였다. 신경세포의 초대배양은 도살 후의 신경세포 분리법을 좀 더 상세히 기술하면, 태아 나이 14일에 생쥐를 해부하여 중뇌를 분리하고, 분리한 중뇌는 0.1%의 트립신을 함유하는 HBSS 완충용액에 37℃에서 10분 동안 배양한 후, 10% 우태아혈청(Invitrogen), 1.4 mM L-glutamine그리고 6.0 g/L의 포도당을 함유하는 고포도당 DMEM 배지에서 파스퇴르 파이펫을 이용하여 각각의 세포를 분리하였다. 분리한 세포는 면역 세포 염색 혹은 MMP+염색을 위하여 50㎍/㎖의 poly-D-lysine과 2 ㎍/㎖의 라민(Sigma, St. Louis)으로 코팅된 각각의 적절한 배양접시에서 B27 및 GlutaMax-1를 함유한 신경세포기본배지(Neurobasal media)에서 37℃, 5 % CO_2 배양기내에서 배양하였다.

<54> **실시예 2 : D2R의 결핍에 의한 신경세포수의 영향**

<55> 도파민 D2 리셉터(D2R)의 결핍이 도파민 뉴런의 발달에 영향을 줄 수 있는 지를 확인하기 위해서, 정상쥐와 D2R-/- 쥐의 태아 중뇌의 티로신-하이드록실라제(TH) 양성 뉴런의 수를 측정하였다. 구체적으로, 정상 쥐와 D2R-/- 쥐의 태아의 중뇌에서 분리한 도파민성 신경세포를 50㎍/㎖의 poly-D-lysine과 2 ㎍/㎖의 라민(Sigma, St. Louis)으로 코팅한 슬라이드 위에 1.0 × 10^5 의 세포수로 37℃에서 5일간 배양한 후 면역염색을 실시하였다. 면역 세포염색은 초대배양한 도파민 뉴런을 4 % 포름알데하이드로 상온에서 20분 동안 고정한 후, 5 % 말혈청 및 0.2% 트리톤 X-100이 포함된 PBS 완충용액에서 1시간 동안 반응시키고, 토끼로부터 추출한 TH 다클론항체(1:1000; Pel-Freez, Rogers, AR)를 5 % 말혈청 및 0.2% 트리톤 X-100이 포함된 PBS 완충용액에서 4℃에서 16시간 이상 반응시켰다. 아비딘-바이오틴 복합체 반응(Vector Laboratories, Burlingame, CA)을 이용하여 면역세포염색을 시행하고, 각 슬라이드당 20개의 부분을 랜덤하게 선택한 후 Metamorph imaging system이 탑재된 현미경(Universal imaging corporation, West chester, PA)을 이용하여 세포 수와 모양을 분석하였다(81 그리드의 40 프레임 이상 계수).

<56> D2R의 결핍이 도파민성 신경세포의 발달에 영향을 줄 수 있는지를 확인하기 위해서, 신경세포에 특이적인 독성물질인 1-메틸-4-페닐피리디니움(MPP+:1-메틸-4-페닐피리디니움;Research Biochemical, Inc)을 초대 배양 배지에 첨가한 후 세포 수를 분석하였다. 구체적으로, 정상쥐와 D2R-/- 쥐의 태아의 중뇌에서 분리한 도파민성 신경세포를 50㎍/㎖의 poly-D-lysin과 2 ㎍/㎖의 라민(Sigma, St. Louis)으로 코팅한 슬라이드 위에 1.0 × 10^5 의 세포수로 접종하고, 4일 동안 B27 및 GlutaMax-1를 함유하는 신경세포 기본배지(Neurobasal media)에서 배양하였다. MMP+시약은 신경세포배양을 위한 기본배지에 용해시켜 준비하고, 배양 5일째의 신경세포를 B27를 포함하지 않는 기본배지로 대체한 후 상기 준비해 둔 MMP+ stock을 1 내지 10㎛M의 농도로 첨가한 후 24시간 동안 배양하였다. 각 슬라이드는 항 TH 다클론항체로 면역 염색 후 세포 수 분석을 진행하였다. 그 결과, D2R-/- 쥐의 초대배양에서 정상적인 쥐의 초대배양에 비해 도파민 뉴런의 수가 더 많이 감소한 결과를 보여주었다(도 1의 B, C). 특히 10㎛M MPP+ 처리 후 살아남은 D2R-/- 쥐의 TH 양성 뉴런의 수는 40%에 불과하여 정상 쥐 초대배양의 54%에 비해 현저하게 수가 적었다(도 1의 C).

<57> **실시예 3 : D2R의 결핍에 의한 도파민성 신경세포의 발달**

<58> D2R의 결핍이 도파민성 신경세포의 발달에 영향을 줄 수 있는 지를 확인하기 위해서, 정상적인 쥐와 D2R-/- 쥐의 태아(E14 : 태아나이 14일) 및 태어난 지 한 달이 된 어린 쥐에서 분리한 흑색 (substantial nigra; SN)과 배쪽피개구역(ventral tegmental area; VTA)에서 TH 양성 뉴런의 수와 SN과 VTA에서 특이적으로 발현되는 것으로 알려진 전사 인자인 Nurr1을 조직 염색하여 TH 및 Nurr1의 발현도를 확인하였다(도 2 및 3). 구체적으로, 정상 쥐와 D2R-/- 쥐의 두뇌를 4% 파라포름알데히드로 고정시킨 후, OCT 용액에 묻어 놓은 조직을 냉동미세절단기를 이용, 40㎛m 두께로 절단하여 항-TH 항체와 항-Nurr1 항체를 처리하여 면역 조직염색을 한다. 조직 염색시에 생쥐 다클론항체 항-TH(1:1000; Pel-freez, Rogers, AR) 또는 토끼 다클론항체 항-Nurr1(M-196, 1:200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA)를 처리하고, 아비딘-바이오틴 복합체 반응(Vector Laboratories, Burlingame, CA)을 이용하여 면역세포염색을 수행하였다.

<59> 그 결과, E14의 경우 D2R-/- 쥐의 VTN에 있는 TH 양성 뉴런 수가 정상 쥐의 70% 정도로 감소하였으며(도 2의 A 및 B), P30과 P60인 쥐의 SN과 VTN에서도 정상 쥐의 뉴런에 비해 60% 정도로 감소하였고(도 2의 A 및 B), D2R-/- 쥐의 중뇌에 발현되는 Nurr1 양성 세포의 수는 태아 시기에서 정상 쥐의 것에 비해 70% 이하로 나타났으나 P30 및 P60이 되면서 85% 정도로 유지되었다(도 3).

<60> E14 : 태아나이 14일

<61> P30 : 생후 30일

<62> P60 : 생후 60일

<63> **실시예 4 : D2R의 결핍에 의한Ptx3 발현량의 변화**

<64> D2R의 결핍이 도파민성 신경세포 발달에 특이적인 Ptx3의 발현에 영향을 미치는지 확인하기 위해서, RT-PCR 방법을 이용하여 정상쥐와 D2R 결핍 쥐의 Ptx3에 대한 발현량을 비교하였다. 구체적으로, 정상쥐 및 D2R 결핍 쥐의 중뇌로부터 분리한 신경세포로부터 LiCL RNA 추출 완충용액을 이용하여 총 RNA를 분리하고, 랜덤 프라이머를 이용하여 90℃에서 4분 동안 변성시킨 후 냉각하고, 42℃ 에서 50분 동안 반응시켜 cDNA의 주형을 제작하였다. 이 cDNA의 증폭에 사용한 프라이머의 서열은, PTX3: 5'-AGGACGGCTCTCTGAAGAA-3', 5'-TTGACCGAGTTGAAGGCGAA-3', β-액틴: 5'-GATGACGATATCGCTGCGCT-3'와 5'GCTCATTGCCGATAGTGATGACCT-3'으로, 중합 조건은 94℃, 5 분 동안 주형을 변성시킨 후, 94℃에서 1분, 60℃에서 1분, 72℃에서 1분 동안 반응시키는 것을 한 회전으로 하여 30회전 시키고, 72℃에서 7분 동안 반응시켜 중합산물을 안정화시켰다. 중합 산물은 EtBr(ethidium bromide, 0.5 μg/ml)이 함유된 1.5% 아가로즈 젤에서 40분간 50V에서 전기영동 한 후 젤 이미지 분석 시스템(Gel documentation system 2000, Bio-Rad, Hercules, CA)을 이용하여 확인 및 정량하였다. 그 결과, 하우스키핑 단백질인 액틴에 비교해서 Ptx3의 발현이 D2R-/- 쥐의 전 발달 과정 동안 정상 쥐의 70 %로 감소함을 알 수 있었다(도 4).

<65> **실시예 5 : D2R에 의해 매개된 Nurr1의 활성화 조사**

<66> D2R이 TH 양성 뉴런의 수와 Nurr1 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해서, D2R의 활성화가 Nurr1의 활성화를 유도할 수 있는가를 Nur 반응인자(Nur response element; NurRE)-의존적인 리포터 유전자 활성화 검정 실험을 실시하였다(Philips et al, *Mol Cell Biol.*, 1997, 17:5946-5951; Maira et al, *Mol Cell Biol.*, 1999, 19:7549-7557). 한국 세포주 은행으로부터 분양받은 HEK293T 세포주는 10% 우태아 혈청(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 함유한 DMEM (Dulbeco's modified eagle's medium; Invitrogen, Carlsbad, CA) 배지에서 배양하고, 도파민 수용체, Nurr1 및 Nur 반응요소(NurRE) 유전자의 형질도입은 jetPEI transfection reagent(Qbiogene, Carlsbad, CA)을 이용하였다. 구체적으로, 5 내지 7 × 10^5 세포수로 접종한 단층의 HEK293 세포에 1.5 ㎍의 pSV-D2R 혹은 pSV-D1R의 벡터, 1.5 ㎍ 의 pCMX-Nurr1, 1.5 ㎍ 의 pXP1-luc (POMC 유전자 프로모터와 NurRE(pXP1-NurRE-luc)을 포함) 및 0.5 ㎍의 pCH110를 상기 시약을 이용하여 형질도입 하였다. Ras 우성 음성 돌연변이 세포의 형질도입의 경우, 1.0 ㎍의 pMT-RasN17 혹은 pSK-null vector, 1.0 ㎍의 pSV-D2R, 1.0 ㎍의 pCMX-Nurr1, 1.0 ㎍의 pXP1-NurRE-luc 및 0.5 ㎍의 pCH110를 형질 도입을 실시하였다. 3시간 후에, 형질도입혼합물은 새 배지로 교환하고, 48시간 동안 배양 후 분석을 시행하였다. 도파민 수용체의 길항제에 대한 분석은 분석 하룻밤 전 새로운 배지로 교환하고, 길항제 할로페리돌의 전배양하 혹은 무배양하에서 다양한 농도의 도파민과 SKF38393을 각각 37℃에서 6시간 동안 반응시켰다. 할로페리돌의 전배양조건은 1μM 의 농도로 5 분 동안 실시하였다. Pertussis toxin, H-89 및 PD98059의 신호전달체계 관련 인자의 저해제는 각각 100ng/ml, 1 μM, 10 μM 의 농도로 12시간, 20분, 30분 동안 반응시켰고, 그 활성은 루시퍼라아제 분석시약(luciferase assay system; Promega)을 처리하여, 96-웰 형광계수기 (Microlumat; EG & Berthold, Bad Wilbad, Germany)를 이용하여 형광정도를 측정하였다.

<67> 각각 측정된 값은 GraphPad Prism softwere 를 이용하여 비선형 곡선형(nonlinear squares regression)으로 값을 비교 처리하였다. 그 결과, 도 5와 같은 결과를 얻었다. HEK293T 세포주에 D2R, Nurr1, 그리고 NurRE-luc을 형질도입한 후 도파민을 다양한 용량으로 처리하여 대조군과 비교시 180% 정도의 활성을 나타내는 것을 확인하였으며, Nurr1 또는 D2R이 없을 경우 변화가 관찰되지 않았다(도 5의 A). D2R에 대한 특이성을 확인하기 위해 D2R 길항제인 할로페리돌을 처리한 실험에서 D2R에 매개되는 Nurr1 활성화가 억제 또는 감소되었고(도 5의 B), D2R에 의해 매개되는 Gαi의 활성을 측정하기 위한 실험에서 Gαi의 저해제인 PTX를 처리하였을 경우 D2R에 매개되는 Nurr1 활성도가 감소됨을 알 수 있었다(도 5의 C). 도파민 수용체에 의해 매개되는 Nurr1의 활성화가 MEK 저해제인 PD98059에 의해 억제되는지를 살펴보기 위한 실험에서 PD98059 존재 하에서 그 활성도가 확연히 감소됨을 알 수 있었고(도 5의 D), Ras의 우성적 음성 돌연변이인 RasN17을 발현시켜 그 관련성을 확인한 결과 루시퍼라아제 활성도가 대조구에 비해 확연히 감소함을 알 수 있었다(도 5의 E). PKA 억제제인 H-89(1μM for 20 min)가 도파민 D2 수용체(D2R)에 의한 NurRE에 의존적인 루시퍼라제 리포터 유전자의 전사 활성화에 주는 효과를 본 실험에서 PKA 저해제에 의한 루시퍼라아제 활성이 특이적인 차이가 없음을 알 수 있었다(도 5의 F). 부가적으로 Nurr1의 활성화에 PKA가 영향을 주지 못하는 것(도 5의 F)과 관련해서 도파민 D1 수용체(D1R)의 활성화가 Nurr1을 활성화시킬 수 있는지를 D1R 특이적인 작용제인 SKF81297로 확인해 보았으나 크게 변화가 없음

을 알 수 있었다(도 5의 G).

<68> **실시예 6 : D2R 작용제의 도파민성 신경세포의 발달에 대한 효과**

<69> D2R에 의해 유도되는 ERK와 Nurr1의 활성화가 도파민 뉴런의 발달에 작용한다는 것을 실험적으로 확인하기 위해서, 상기 실시예 1의 방법에 따라 정상 쥐 및 도파민 결핍쥐의 중뇌를 분리하고 초대배양의 배지에 D2R 작용제인 1μM의 퀸피롤을 12 시간 간격으로 4일간 처리하였다. 처리된 세포는 실시예 2의 방법으로 고정 및 염색하여 TH 양성 뉴런의 수와 신경돌기의 모양을 분석하였다(도 6의 A). 정상적인 쥐에서 얻은 뉴런들은 D2R 작용제인 퀸피롤(quinpirole)에 의해 TH 양성 뉴런이 25% 증가 하였으며(도 6의 B), 상당한 정도의 신경돌기 성장을 관찰할 수 있었다(도 6의 C). 이에 반하여, D2R-/- 쥐의 경우에는 거의 변화가 없었다.

<70> 퀸피롤(Quinpirole)에 의한 상기 효과들이 D2R에 특이적인지 확인하기 위해 D2R 길항제인 할로페리돌(haloperidol)을 1μM의 농도로 5분 동안 전처리 후 1μM의 퀸피롤을 처리한 경우, 할로페리톨을 전처리하지 않은 대조군에 비해 의한 TH 양성 뉴런의 증가가 관찰되지 않았다(도 6 B).

<71> D2R에 의한 도파민 뉴런의 발달이 ERK에 의해 매개 되는지를 알아보기 위해 MEK 억제제인 PD98059를 처리하여 퀸피롤의 효과를 확인해 보았더니, PD98059를 처리한 경우, 처리하지 않은 대조군에 비해 약간의 뉴런 수와 신경돌기 길이를 감소시키는 현상을 관찰할 수 있었다(도 6의 B 및 C).

<72> 중뇌 도파민 뉴런의 초대배양에서 퀸피롤이 ERK와 Nurr1의 활성화를 유도할 수 있는지를 알아보기 위하여 형광염색법을 통해 후 TH 양성인 뉴런 중에서 ERK 또는 Nurr1이 활성화된 세포를 관찰하였으며, 동시에 ERK 활성화에 대한 웨스턴 블랏을 실시하였다. 실시예 1 및 2와 동일한 방법으로 정상 쥐와 D2R-/- 쥐에서 얻은 중뇌의 신경세포의 초대배양하고, 10μM 농도로 15분 동안 퀸피롤을 처리한 후, 실시예 2의 방법으로 세포를 고정시키고, 토끼 다클론항체 TH (1:1000; Pel-Freez, Rogers,AR) 와 생쥐 단일클론항체 P-ERK (E10, 1:200; Cell signals, Beverly, MA)를 4℃에서 12 시간 동안 반응한 후 2가지 형광항체 (항 생쥐 Alexa Fluor 488 과 항 토끼 Alexa Fluor 568, 각각 1:200; Molecular Probes, Eugene, OR)를 이용하여 상온에서 1시간 동안 염색 후 TH 양성인 뉴런 중에서 ERK 가 활성화된 세포를 관찰하였다. 형광염색의 이미지를 관찰하기 위해서는 공초점 현미경 (Nikon Eclipse fluorescence microscope, TE2000-U, Nikon, Kanagawa, Japan; Ultraview RS confocal scanner, Perkin elmer, Wellesley, MA) 또는 형광 현미경 (Axiovert 2000 microscope with epifluorescence unit, Zeiss, Zena, Germany) 으로 분석하였고, 웨스턴 블랏은 아래와 같은 조건으로 실시하였다. 구체적으로, 10μM의 퀸피롤(quinpirole)을 15분 동안 처리한 후 차게 식힌 PBS 완충용액으로 수세 후 20 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2.5 mM 소디움 피로포스페이트(sodium pyrophosphate), 1 mM 글리세롤 포스페이트(glycerol phosphate), 1mM Na3VO4, 1㎍/㎖ 아프로티닌(aprotinin), 1㎍/㎖ 류펩틴(leupeptin), 1mM PMSF 및 1% Triton X-100 조성의 세포용해용액으로 얼음 위에서 10분 동안 처리하였다. 용해 혼합물은 얼음 위에서 소니케이터 프로브 타입으로 호모게나이즈하고, 13,000 ×g, 4℃의 조건으로 10분 동안 원심분리하였다. 원심분리 상층액을 브래드포드법으로 단백질 정량하고, 약 50㎍의 단백질을 10% SDS-PAGE 젤에서 전기영동하였다. 전기영동으로 분리된 단백질은 반 건조 단백질 이동 키트 (Semi-dry transfer unit, Amersham bioscience, Piscataway, NJ)를 이용하여 PVDF 막(polyvinylidene difluoride nitrocellulose membrane)으로 옮겨진 후, 생쥐 단일클론항체 항-p-ERK(1:2000; Cell Signaling, Beverly, MA) 및 토끼 단일클론항체 항-ERK(1:5000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)으로 4℃에서 12시간 동안 1차 반응한 후 향상된 화학발광법 (Enhanced chemiluminescence; Amersham Bioscience, Piscataway, NJ)으로 블랏을 관찰하였다. 이때 퀸피롤의 처리는 50 μM 의 PD98059를 30분 동안 전처리하거나 혹은 1μM의 할로페리돌을 5 분 동안 전처리 또는 비전처리한 후 실시하였다. 그 결과, 퀸피롤이 처리된 정상 신경세포는 ERK가 인산화되는 것을 확인할 수 있었으나, D2R-/- 신경세포에서는 ERK가 인산화가 관찰되지 않았다(도 7의 A). 또한 할로페리돌 및 PD98059에 의한 경우에도 D2R에 의한 ERK의 활성화를 관찰할 수 있는지 알아보기 위하여, 할로페리돌 및 PD98059로 처리하여 웨스턴 블랏으로 확인하였다. 이에 반하여, 할로페리돌 및 PD98059가 처리된 경우에 정상 뉴런과 D2R-/- 뉴런의 어느 경우에도 ERK가 인산화되는 것을 관찰할 수 없었다(도 7의 B 및 C).

<73> 또한 중뇌 초대배양에 6시간 동안 퀸피롤을 처리한 후 Nurr1의 형광면역 염색 여부를 확인하였다(도 8의 A). 구체적으로, 생쥐 단일클론항체 TH (1:1000; Diasorin,MN) 와 토끼 다클론항체 Nurr1 (M-196, 1:200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)를 4℃에서 24 시간 동안 반응하는 것을 제외한 상기 방법으로 실험을 실시하였다. 그 결과 D2R-/-뉴런에서 관찰되지 않았던 정상 뉴런에서의 퀸피롤에 의한 Nurr1의 활성화가 관찰되었다. 또한 TH 양성 뉴런 중에서 Nurr1이 활성화된 뉴런의 비율을 분석하여 보았을 경우 정상 뉴런에서 퀸피롤을 처리한 경우에 뚜렷한 증가를 확인하였다(도 8의 B).

발명의 효과

<74> 본 발명에 의하여 Nurr1의 활성 및 도파민성 신경세포의 발달을 조절할 수 있으며, Nurr1의 활성과 관련된 질환을 치료할 수 있다. 또한 신경성질환 등의 Nurr1의 활성과 관련된 질환에 대한 효과를 가지는 테스트 화합물 또는 임상 약제의 효능을 간단하게 스크리닝할 수 있다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 정상인(WT) 쥐와 도파민 D2 수용체가 결핍된 (D2R-/-) 쥐의 태아 나이 14일에서 얻은 중뇌를 초대배양한 티로신 하이드록실라제(TH) 양성 뉴런을 1-메틸-4-페닐피리딘움(MPP+) 처리 후 뉴런 수 변화를 분석한 결과이다. (A)는 정상 쥐와 D2R-/- 쥐에 대하여 대조군과 10μM MPP+를 24시간 동안 처리한 실험군 간의 전형적인 형상이며(비례자, 50 μm), (B)는 정상(n=5)과 D2R-/- (n=7) 쥐의 중뇌를 초대배양하여 1 내지 10μM MPP+ 처리 후 TH 양성 뉴런 수 변화를 비율로 분석한 결과이고, (C)는 MPP+ 처리 후 TH 양성 뉴런 수의 비율을 대조군 TH 양성 뉴런 (100 %)을 기준으로 나타낸 결과이다.

<2> 도 2는 정상인(WT) 쥐와 D2R-/- 쥐의 TH 양성 뉴런의 입체학적 분석을 나타낸 것으로서, (A)는 태아나이 14일(E14), 생후 30일(P30) 및 생후 60일(P60) 된 각각의 쥐에 대한 염색절편. 흑색질(SN)과 배쪽피개구역(VTA)에 대한 전형적인 형상을 나타낸 그림이며(저배율 비례자, 400 μm; 고배율 비례자, 200 μm), (B)는 E14 쥐 중뇌, P30인 쥐 SN 또는 VTA, 그리고 P60인 쥐 SN 또는 VTA에서의 TH 양성 뉴런 수의 결과를 비교한 그림이다.

<3> 도 3은 정상인(WT) 쥐와 D2R-/- 쥐의 Nurr1 양성 뉴런의 입체학적 분석을 나타낸 것으로서, (A)는 태아나이 14일(E14), 생후 30일(P30), 및 생후 60일(P60) 된 각각의 쥐에 대한 염색절편. 흑색질 (SN)과 배쪽피개구역(VTA)에 대한 전형적인 형상을 나타낸 그림이며(저배율 비례자, 400 μm; 고배율 비례자, 200 μm), (B)는 E14 쥐 중뇌, P30인 쥐 SN 또는 VTA, 및 P60인 쥐 SN 또는 VTA에서의 TH 양성 뉴런 수의 결과를 비교한 그림이다.

<4> 도 4는 정상인(WT) 쥐와 D2R-/- 쥐에서의 Ptx3 mRNA 발현 양을 태아나이 15일 (E15), 출생일 (P1), 생후 1 내지 6개월(1M, 2M, 4M, 6M), 그리고 생후 1년(1Y)의 발달 단계별로 확인한 것으로서, (A)는 전체 RNA를 추출한 후 역전사 중합연쇄반응으로 분석한 결과이며, B 및 C는 β-액틴 mRNA 발현 양을 내부 기준으로 하여 정량한 결과이다.

<5> 도 5는 HEK293T 세포주에서 도파민 D2 수용체(D2R)에 의한 NurRE에 의존적인 루시퍼라제 리포터 유전자의 전사 활성화에서 MAPK 관련 신호기작의 역할. (A) D2R과 Nurr1을 같이 또는 각각 발현시킨 세포주에서 도파민 농도에 따른 루시퍼라제 활성화 정도를 나타낸 그림이며, (B)는 D2R 길항제인 할로페리돌(haloperidol)을 5분 동안 1μM 처리하거나 처리하지 않은 경우의 도파민 농도에 따른 루시퍼라제 활성화 정도를 나타낸 그림이며, (C)는 Gαi 억제제인 퍼투시스 톡신(pertussis toxin; PTX)을 12시간 동안 100ng/ml 처리한 경우와 처리하지 않은 경우의 도파민 농도에 따른 루시퍼라제 활성화 정도를 나타낸 그림이며, (D)는 MEK 억제제인 PD98059를 30분 동안 10μM 처리한 경우와 처리하지 않은 경우의 도파민 농도에 따른 루시퍼라제 활성화 정도를 나타낸 그림이며, (E)는 Ras 돌연변이인 RasN17이 D2R에 의한 NurRE에 의존적인 루시퍼라제 리포터 유전자의 전사 활성화에 주는 효과를 나타낸 그림이며, (F)는 PKA 억제제인 H-89를 20분 동안 1 μM 처리시 도파민 D2 수용체 (D2R)에 의한 NurRE에 의존적인 루시퍼라제 리포터 유전자의 전사 활성화에 주는 효과를 나타낸 그림이며, (G)는 도파민 D1 수용체(D1R) 와 D1R에 특이적인 유도체 SKF81297을 이용하여 D1R에 의한 루시퍼라제 리포터 유전자의 전사 활성화를 D2R과 비교하여 실험한 결과를 나타낸 그림이다.

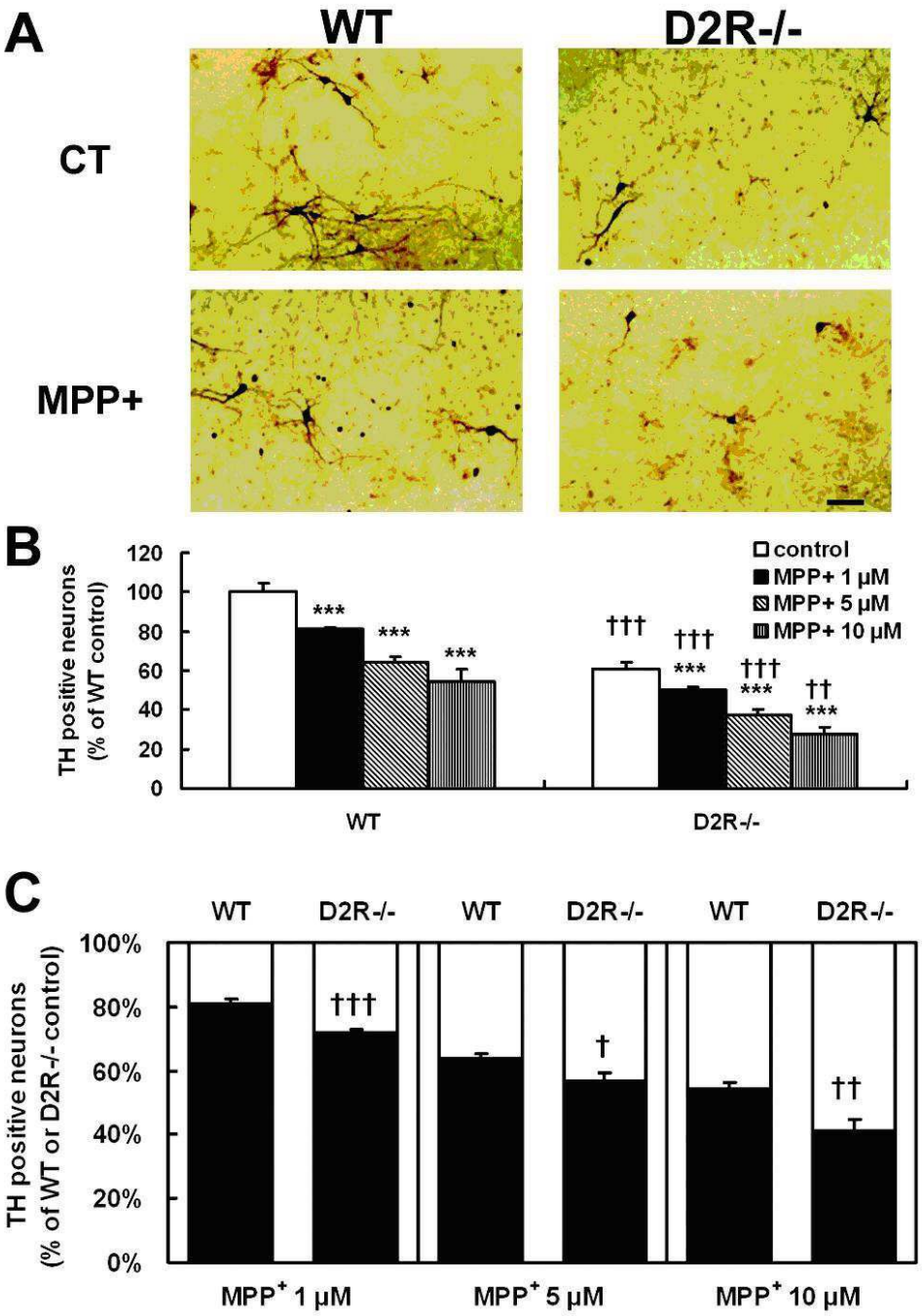
<6> 도 6은 정상(WT) 쥐와 D2R-/- 쥐에서 초대배양한 중뇌 뉴런에서 D2R의 활성화가 TH 양성 뉴런의 수와 신경돌기 확장에 미치는 영향을 나타낸 것으로서, (A)는 대조군(CT), 퀸피롤(Quinpirole; Q), 할로페리돌(haloperidol)과 퀸피롤(quinpirole) (H+Q), PD98059 (PD), 및 PD98059와 퀸피롤(PD+Q)을 정상 쥐와 D2R-/- 쥐에서부터 얻어 배양한 중뇌 초대배양 뉴런에 처리 한 것에 대한 전형적인 형상을 나타낸 그림이며(비례자, 100 μm), (B)는 배양한 중뇌 초대배양 뉴런의 세포 수에 대한 정량적인 분석을 나타내며, (C)는 신경돌기 평균길이에 대한 정량적인 분석을 나타낸다.

<7> 도 7은 정상(WT) 쥐와 D2R-/- 쥐에서 초대배양한 중뇌 뉴런에서 D2R의 활성화에 의한 MAPK의 활성화를 나타낸 것으로서, (A)는 정상 쥐와 D2R-/- 쥐에서부터 얻은 TH 양성 뉴런 중에 퀸피롤(Q, 10 μM for 15 min)에 의하여 ERK가 인산화된 뉴런의 전형적인 면역형광 그림이며, B와 C는 대조군(CT), 퀸피롤(Q), 할로페리돌과 퀸피롤(H+Q), PD98059 (PD), 및 PD98059와 퀸피롤(PD+Q)을 정상 쥐와 D2R-/- 쥐에서부터 얻어 배양한 중뇌 초대배양 뉴런에 처리한 것에 대한 웨스턴 결과를 나타낸다.

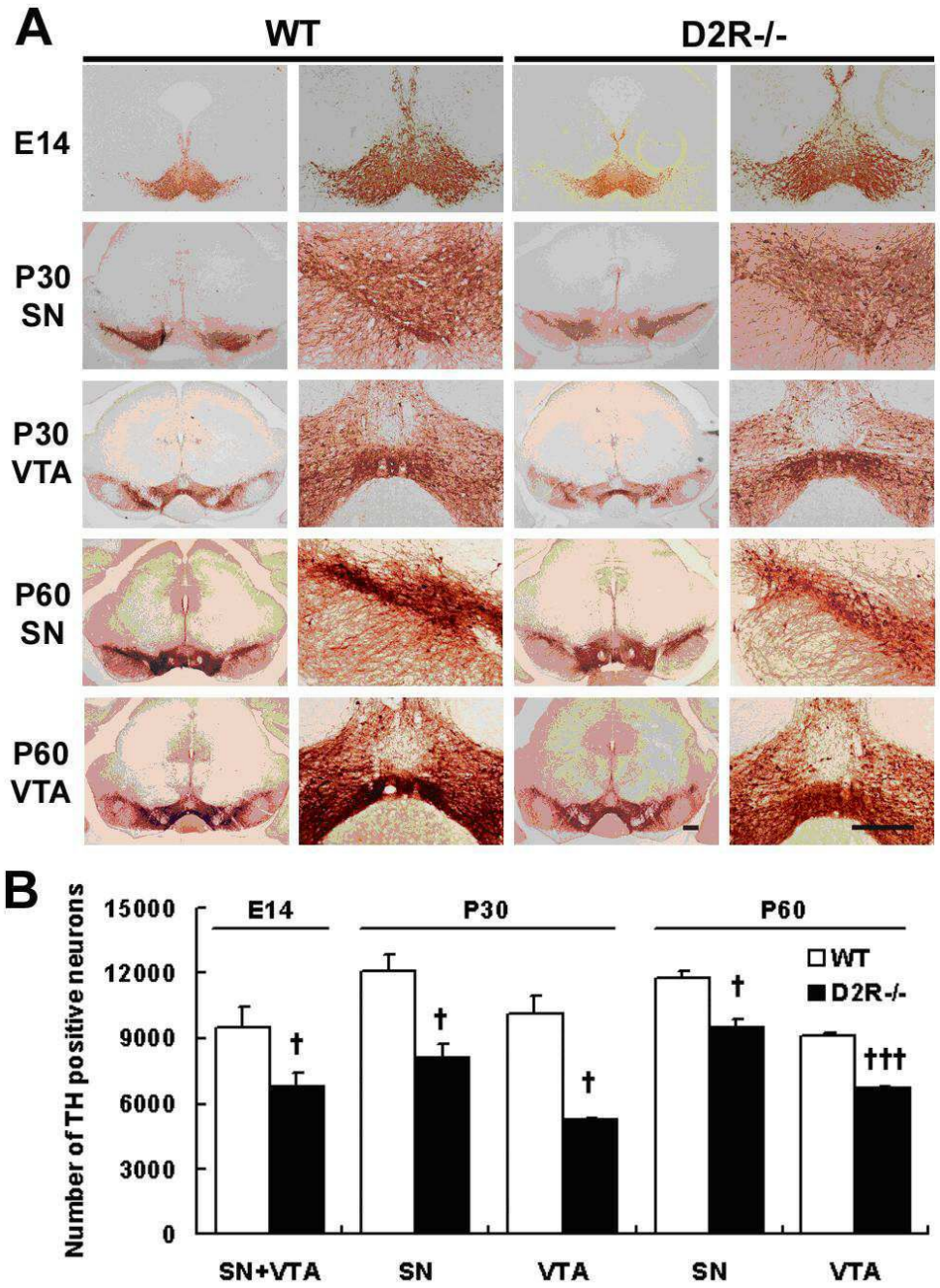
<8> 도 8은 정상(WT) 쥐와 D2R-/- 쥐에서부터 얻어 초대배양한 중뇌 뉴런에서 D2R의 활성화에 의한 Nurr1의 활성화 정도를 나타낸 것으로서, 초대배양한 뉴런에 6시간 동안 퀸피롤을 처리한 후 고정하여 항 TH 항체와 항 Nurr1 항체를 반응시킨 결과이다. (A)는 TH 양성인 뉴런 중에서 퀸피롤에 의하여 Nurr1이 활성화된 세포의 전형적인 면역형광 그림이며, (B)는 그 비율에 대한 정량적인 분석 결과이다.

도면

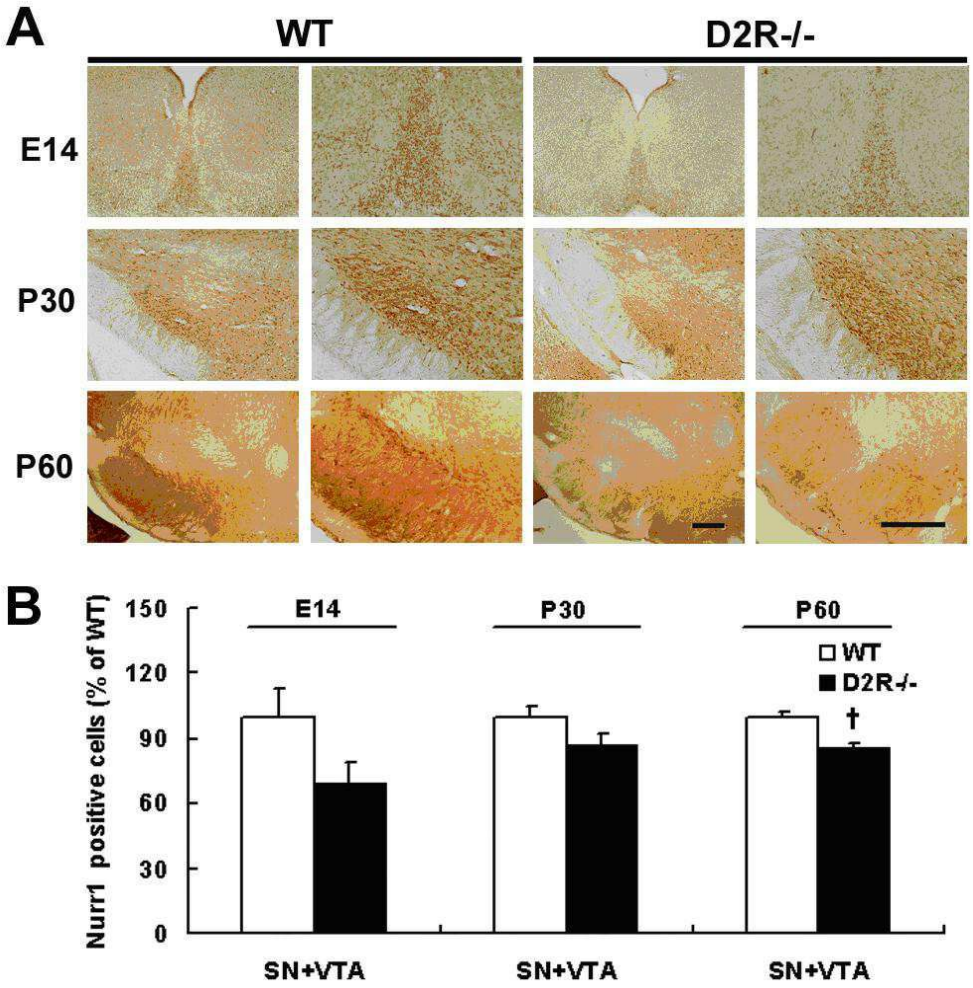
도면1



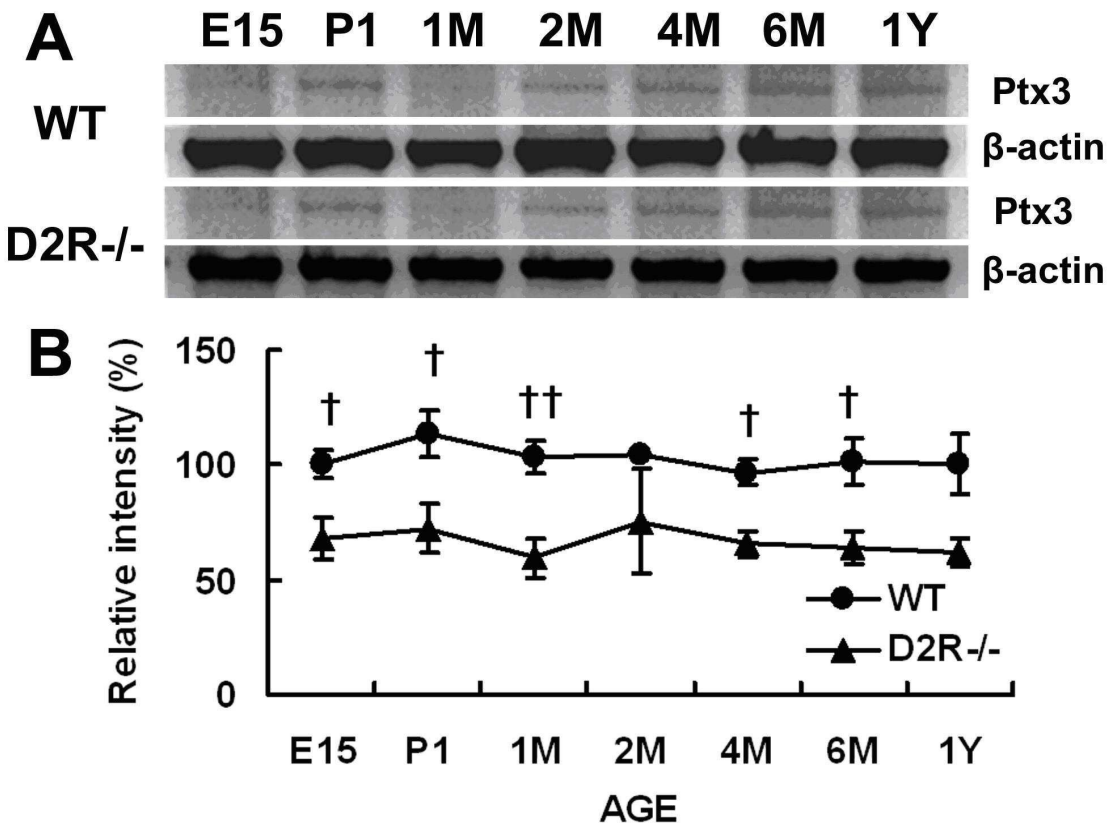
도면2


A
WT
D2R-/-
E14
P30
SN
P30
VTA
P60
SN
P60
VTA
B
Number of TH positive neurons
15000
12000
9000
6000
3000
0
E14
P30
P60
WT
D2R-/-
†
†
†
†
†††
SN+VTA
SN
VTA
SN
VTA

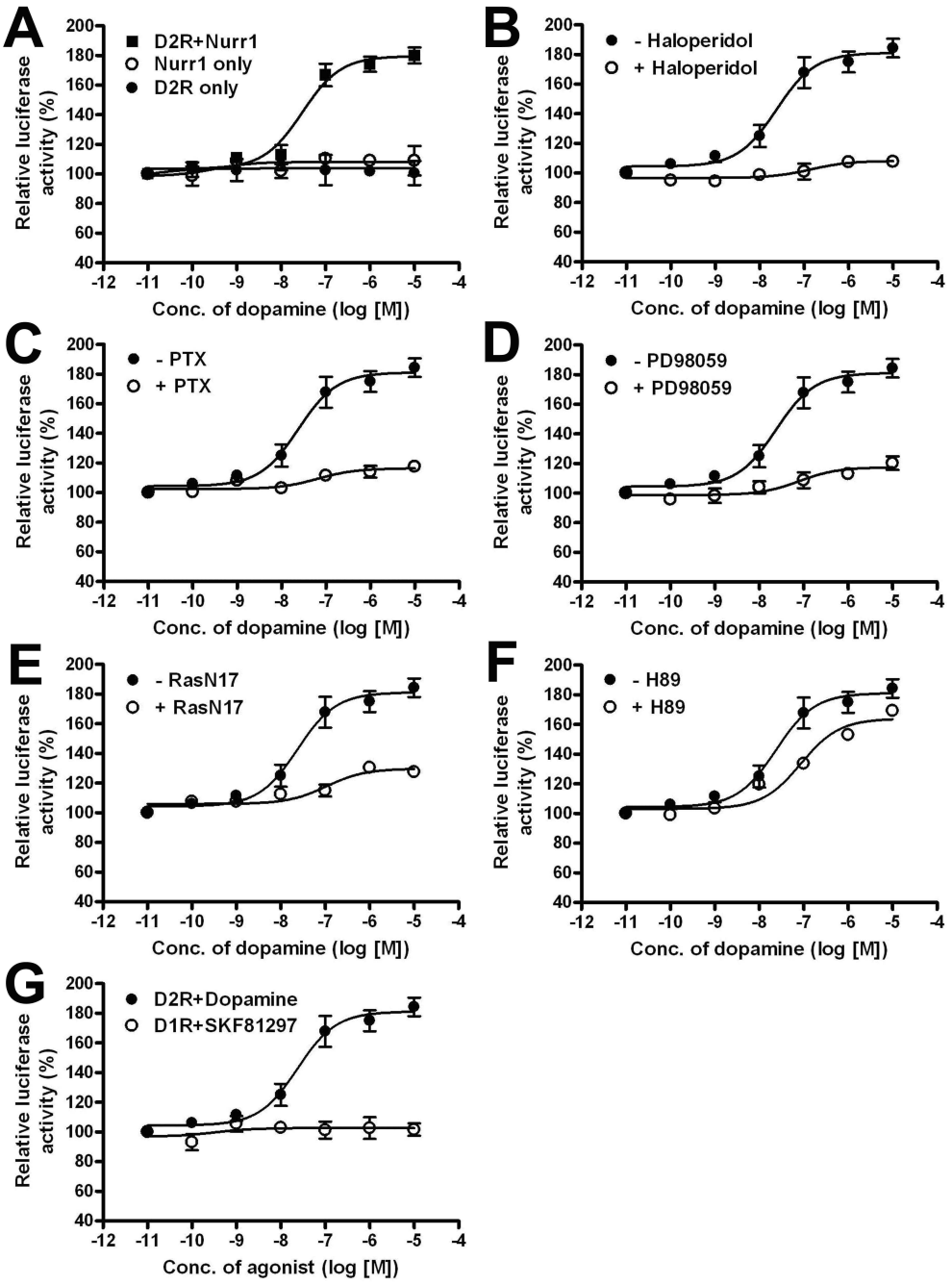
도면3


A
WT
D2R-/-
E14
P30
P60
B
E14
P30
P60
WT
D2R-/-
†
Nurr1 positive cells (% of WT)
150
120
90
60
30
0
SN+VTA
SN+VTA
SN+VTA

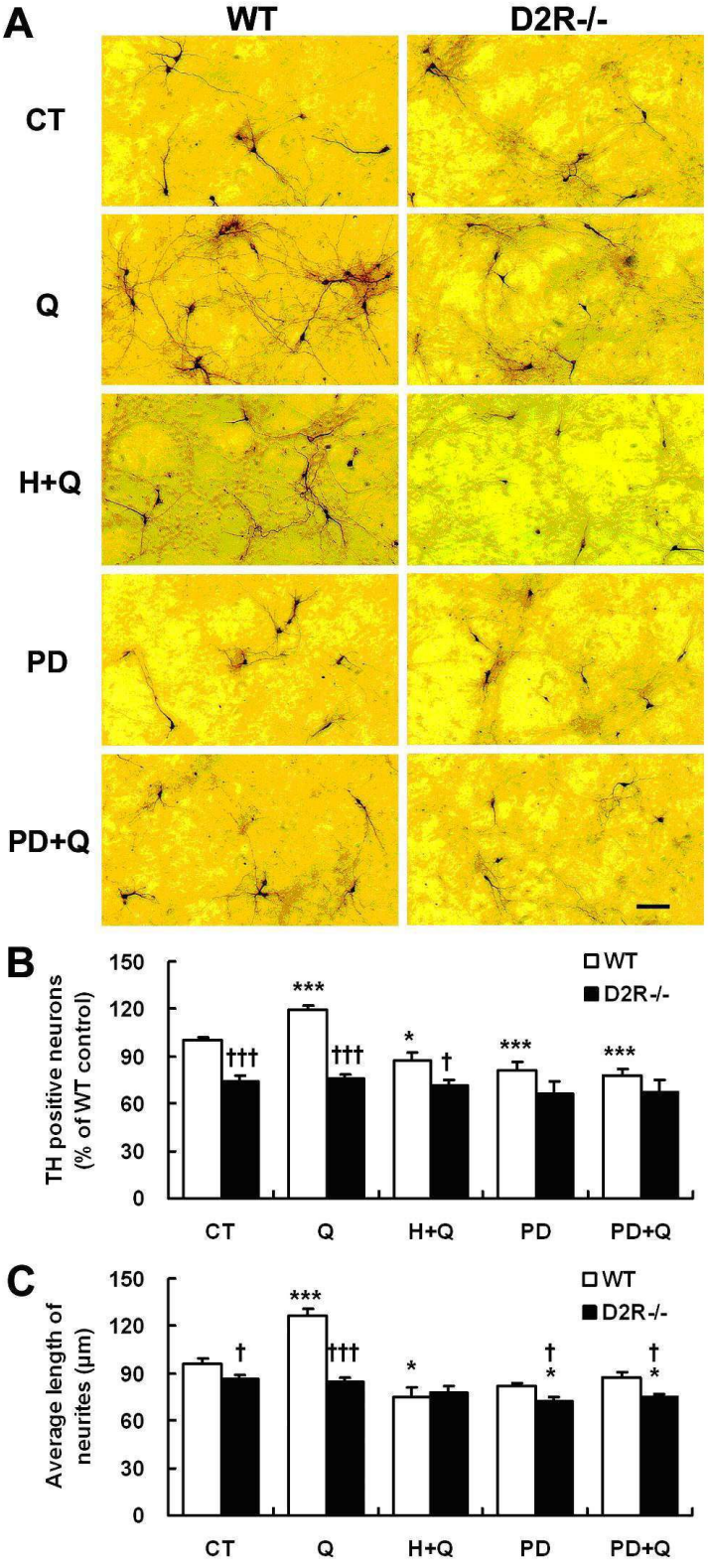
도면4


A
E15
P1
1M
2M
4M
6M
1Y
WT
Ptx3
β-actin
D2R-/-
Ptx3
β-actin
B
Relative intensity (%)
150
100
50
0
†
†
††
†
†
WT
D2R-/-
E15
P1
1M
2M
4M
6M
1Y
AGE

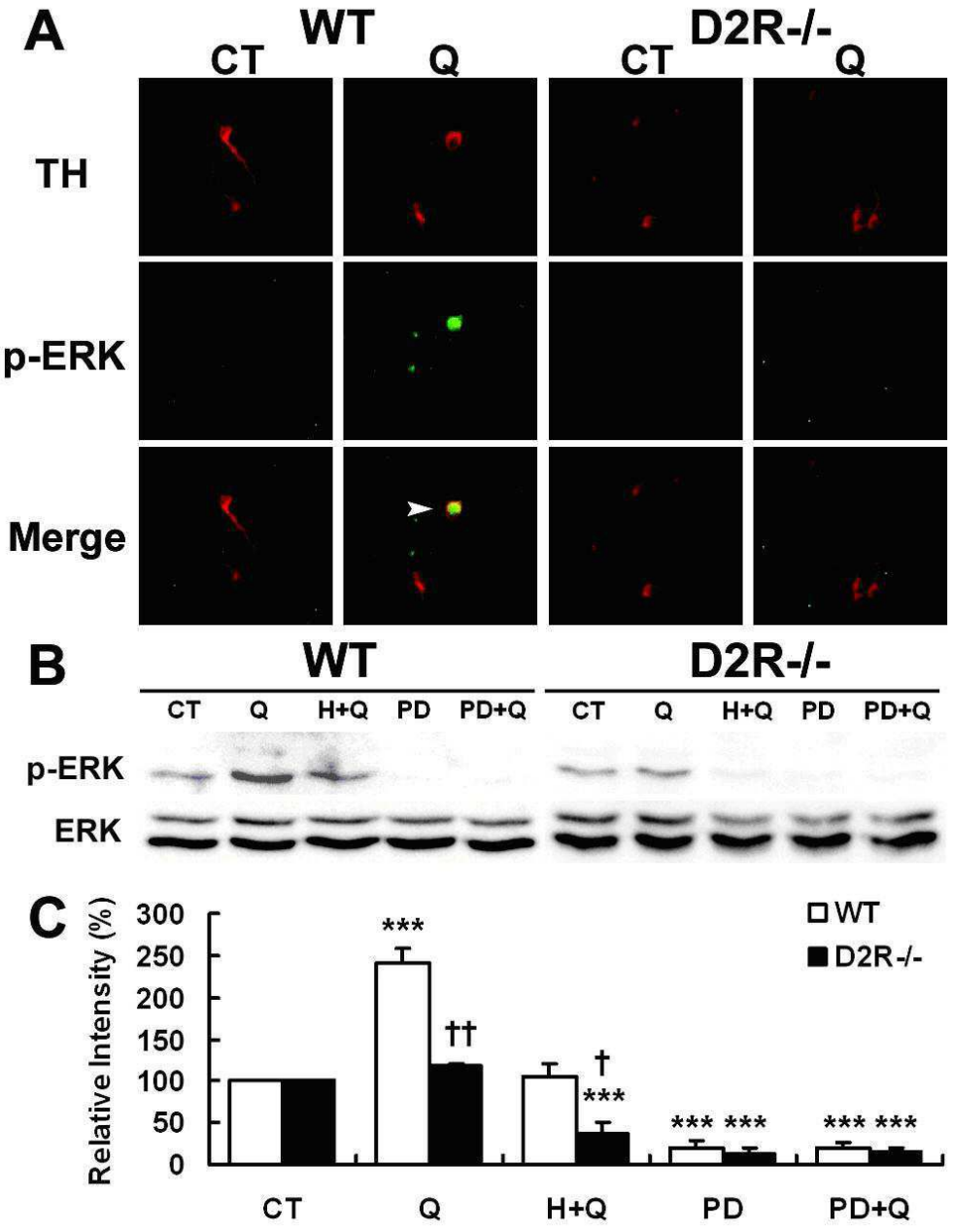
도면5


A
D2R+Nurr1
Nurr1 only
D2R only
Relative luciferase activity (%)
Conc. of dopamine (log [M])
B
- Haloperidol
+ Haloperidol
Relative luciferase activity (%)
Conc. of dopamine (log [M])
C
- PTX
+ PTX
Relative luciferase activity (%)
Conc. of dopamine (log [M])
D
- PD98059
+ PD98059
Relative luciferase activity (%)
Conc. of dopamine (log [M])
E
- RasN17
+ RasN17
Relative luciferase activity (%)
Conc. of dopamine (log [M])
F
- H89
+ H89
Relative luciferase activity (%)
Conc. of dopamine (log [M])
G
D2R+Dopamine
D1R+SKF81297
Relative luciferase activity (%)
Conc. of agonist (log [M])

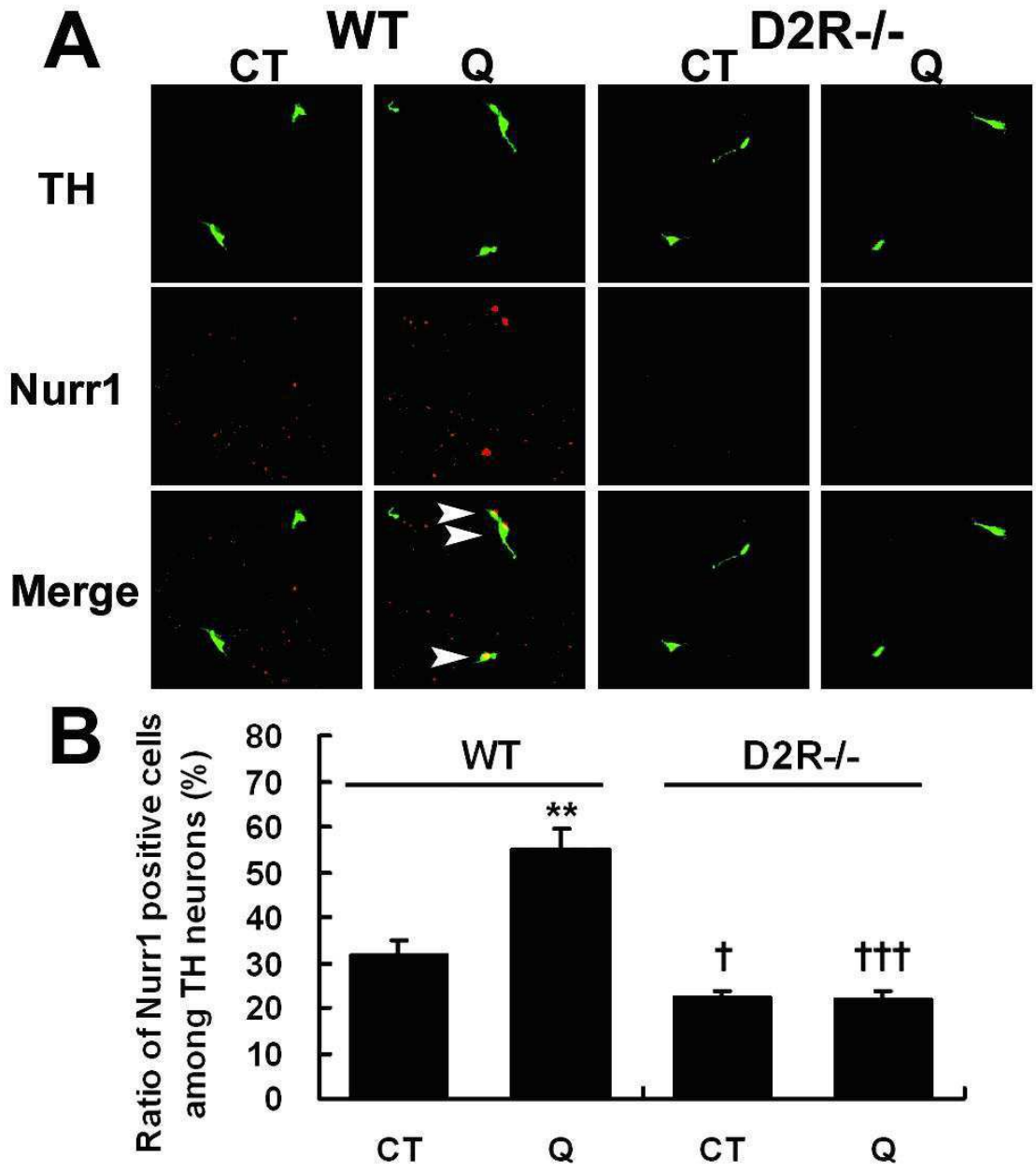
도면6


A
WT
D2R-/-
CT
Q
H+Q
PD
PD+Q
B
TH positive neurons (% of WT control)
150
120
90
60
30
0
WT
D2R-/-
***
†††
*
†
***
***
CT
Q
H+Q
PD
PD+Q
C
Average length of neurites (μm)
150
120
90
60
30
0
WT
D2R-/-
†
***
†††
*
†
*
†
*
CT
Q
H+Q
PD
PD+Q

도면7


A
WT
D2R-/-
CT
Q
CT
Q
TH
p-ERK
Merge
B
WT
D2R-/-
CT
Q
H+Q
PD
PD+Q
CT
Q
H+Q
PD
PD+Q
p-ERK
ERK
C
Relative Intensity (%)
300
250
200
150
100
50
0
WT
D2R-/-
***
††
†
***
*** ***
*** ***
CT
Q
H+Q
PD
PD+Q

도면8


A
WT
D2R-/-
CT
Q
CT
Q
TH
Nurr1
Merge
B
Ratio of Nurr1 positive cells among TH neurons (%)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
WT
D2R-/-
**
†
†††
CT
Q
CT
Q